

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología



Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como parte de un proceso de escalamiento y producción de bioplaguicidas.

Trabajo final de graduación para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología con el grado académico de bachillerato.

Moisés Mata Astorga

Cartago, Marzo 2008

EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN SUMERGIDA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *BEAVERIA BASSIANA* COMO PARTE DE UN PROCESO DE ESCALAMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOPLAGUICIDAS.

*Moisés Mata Astorga

RESUMEN

La broca del café (*Hypotenemus hampei*) es la principal plaga del cultivo del café en Costa Rica. Ante el problema que representa el uso de plaguicidas químicos, la utilización de bioplaguicidas representa una excelente alternativa. El CICAFFE les proporciona a los caficultores costarricenses el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para utilizarlo en el control de la broca, sin embargo, el proceso de fermentación sobre sustrato sólido mediante el cual se produce el hongo es muy laborioso y demandante de tiempo y recursos. Con el objetivo de evaluar el proceso de fermentación sumergida para la producción del hongo, se diseñaron fermentadores sencillos donde se valoró el efecto de diferentes medios y condiciones de cultivo sobre el rendimiento del mismo; además se evaluó la patogenicidad de las esporas producidas en un bioensayo sobre la broca. Los mejores rendimientos se presentaron en el medio extracto de levadura-peptona con sacarosa; estadísticamente, la temperatura y la cepa utilizada produjeron diferencias significativas, mientras que no ocurrió así con el pH inicial del medio y la luminosidad. Las esporas producidas en los fermentadores resultaron tener una alta capacidad patogénica, al producir una mortalidad del 86.7% en el bioensayo realizado.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, entomopatógeno, fermentador, escalado.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2008.

EVALUATION OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *BEAVERIA BASSIANA* SUBMERGED FERMENTATION AS PART OF A BIOPESTICIDE SCALING AND PRODUCTION PROCESS

†Moisés Mata Astorga

ABSTRACT

The coffee berry borer (*Hypotenemus hampei*) is the main pest that affects coffee in Costa Rica. Due to the problem that the use of chemical pesticides presents, the use of biological pesticides represents an excellent alternative to control plagues. CICAFFE provides Costa Rican coffee growers the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, for them to use it in the control of the coffee berry borer. Nonetheless, the process of fermentation on a solid substrate used to grow the fungus implies a lot of work, time and resources. With the aim to evaluate the process of submerged fermentation for *B. bassiana* production, simple fermentation devices were designed, where differences in culture medium as well as variable culture conditions were evaluated. Also, the rate of pathogenicity against coffee berry borer of the produced spores was evaluated. The best yields were achieved in the peptone, yeast extract and sucrose medium. Statistical analysis revealed that significant differences between results were the product of strain and temperature. All the while the medium's initial pH and luminosity showed no effect on the yields. The fermenter-produced spores resulted to have a high pathogenic capacity, producing a mortality rate of 86.7% in the bioassay.

Keywords: *Beauveria bassiana*, entomopathogenic, fermenter, scaling.

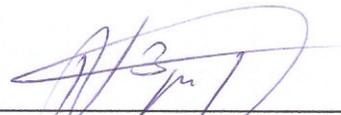
† GRADUATION PROJECT REPORT, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2008.

EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN SUMERGIDA DEL
HONGO ENTOMOPATÓGENO *BEAVERIA BASSIANA* COMO
PARTE DE UN PROCESO DE ESCALAMIENTO Y
PRODUCCIÓN DE BIOPLAGUICIDAS.

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de
Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller en
Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del tribunal


PhD. Miguel Rojas Chávez
Profesor Asesor ITCR


MSc. Miguel Barquero Miranda
Asesor empresa


M.Q.C. Virginia Montero Campos
Lectora

DEDICATORIA

*A mis padres, quienes me dieron la vida
y las enseñanzas para luchar en ella*

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones.

Al CICAFFE, por brindar el apoyo económico y logístico para la realización del proyecto.

Al ingeniero Miguel Barquero, quien fue mi tutor y guía durante todo el proyecto.

Al profesor Miguel Rojas por su apoyo y consejo oportuno.

A la profesora Virginia Montero por sus valiosas recomendaciones.

Al ingeniero Fabián Echeverría por su interés y compañerismo.

A Guiselle Meneses, Gustavo Vargas y Francisco González, quienes me brindaron su valiosa amistad, compañía y ayuda.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. El cultivo del café en Costa Rica.....	2
2.2. La broca del café.....	2
2.2.1. Problemática.....	2
2.2.2. Control.....	3
2.3. Control biológico.....	4
2.3.1. Definición.....	4
2.3.2. Clases de enemigos naturales.....	4
2.4. Bioplaguicidas.....	6
2.4.1. Interés en el uso de bioplaguicidas.....	6
2.4.2. Desarrollo y producción de bioplaguicidas.....	7
2.5. Beauveria bassiana.....	8
2.5.1. Taxonomía.....	8
2.5.2. Características.....	9
2.5.3. Patogenicidad.....	9
2.5.4. Producción comercial.....	10
3. OBJETIVOS.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Localización.....	16
Microorganismo.....	16
4.1. FASE I.....	16
4.1.1. Elaboración de los fermentadores.....	16
4.1.2. Ensayos de prueba con los fermentadores.....	19
4.1.3. Evaluación de agentes antiespumantes.....	21
4.1.4. Identificación del organismo contaminante.....	21
4.2. FASE II.....	22
4.2.1. Evaluación de la fermentación sumergida de Beauveria bassiana.....	22
4.2.2. Bioensayo sobre broca del café.....	29
5. RESULTADOS.....	31
5.1. FASE I.....	31
5.1.1. Elaboración de los fermentadores.....	31
5.1.2. Ensayos de prueba con los fermentadores.....	32

5.1.3.	Evaluación de agentes antiespumantes.....	34
5.1.4.	Identificación del microorganismo contaminante	34
5.2.	FASE II.....	36
5.2.1.	Evaluación de la fermentación sumergida de <i>Beauveria bassiana</i>	36
5.2.2.	Bioensayo sobre broca del café	44
6.	DISCUSIÓN.....	46
6.1.	FASE I.....	46
6.1.1.	Elaboración de los fermentadores.....	46
6.1.2.	Pruebas con los sistemas de cultivo.....	47
6.1.3.	Evaluación de agentes antiespumantes.....	48
6.1.4.	Identificación del organismo contaminante.....	49
6.2.	FASE II.....	51
6.2.1.	Evaluación de diferentes medios de cultivo	52
6.2.2.	Evaluación de diferentes relaciones FC:FN	54
6.2.3.	Evaluación de diferentes temperaturas de cultivo y condiciones de luminosidad	55
6.2.4.	Evaluación de distintos valores de pH.....	57
6.2.5.	Evaluación del crecimiento de diferentes cepas.....	58
6.2.6.	Bioensayo sobre broca del café	59
7.	CONCLUSIONES.....	61
8.	RECOMENDACIONES	62
9.	BIBLIOGRAFÍA	63
10.	ANEXOS.....	70
	Anexo 1: Metodología para la producción de <i>Beauveria bassiana</i> mediante fermentación sumergida.	70

ÍNDICE DE TABLAS

Núm.	Título	Pág.
4.1	Pruebas realizadas con los fermentadores tipo I para determinar la fuente de contaminación.	20
4.2	Descripción de los tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de <i>B. bassiana</i> en diversos sustratos líquidos.	24
4.3	Descripción de los tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de <i>B. bassiana</i> en sustratos con distintas relaciones FC:FN.	25
4.4	Descripción de los tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de <i>B. bassiana</i> en sustratos con distintas concentraciones y relaciones FC:FN.	26
4.5	Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo de cultivo de <i>B. bassiana</i> con diferentes temperaturas y condiciones de luminosidad.	27
4.6	Descripción de los tratamientos usados en el ensayo de fermentación de <i>B. bassiana</i> bajo distintos valores de pH.	28
4.7	Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo de cultivo de tres diferentes cepas de <i>B. bassiana</i> .	28
5.1	Rendimientos obtenidos en las pruebas hechas con los fermentadores tipo II.	34
5.2	Resultados del bioensayo de infección de brocas con un cultivo líquido de <i>B. bassiana</i> después de 10 días de cultivo.	45
6.1	Contenido de nitrógeno de algunas sustancias utilizadas comúnmente para la elaboración de medios de cultivo.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
2.1	Estadíos de desarrollo de la broca del café, <i>Hypotenemus hampei</i> .	3
2.2	Imágenes de conidias aéreas (A), conidias sumergidas (B) y blastosporas (C) del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> obtenidas en un microscopio de contraste de fases.	11
4.1	Esquema de la metodología para conteo al hemocitómetro.	23
5.1	Fermentador tipo I para la producción de <i>Beauveria bassiana</i> .	31
5.2	Fermentador tipo II para la producción de <i>Beauveria bassiana</i> (no está conectado a la bomba de aire).	32
5.3	Estructuras de <i>Beauveria bassiana</i> cultivado en medio líquido: blastosporas (A) y micelio (B).	33
5.4	Placa con ARE en el que se observó crecimiento bacteriano. Se distinguen dos tipos de colonias.	35
5.5	Células bacterianas observadas al microscopio luego de realizarles la tinción diferencial de Gram. Nótese los cocos Gram+ y los bacilos Gram-.	36
5.6	Evolución de la concentración de esporas de <i>B. bassiana</i> en siete medios líquidos de diversa composición (tratamientos) durante cuatro días de cultivo.	37
5.7	Evolución de la concentración de esporas del hongo <i>B. bassiana</i> en medios de cultivo con diferentes relaciones FC:FN durante cuatro días de cultivo.	38

5.8	Concentración de esporas de <i>B. bassiana</i> en medios con distintas relaciones FC:FN luego de cuatro días de cultivo.	38
5.9	Evolución de la concentración de esporas del hongo <i>B. bassiana</i> en medios de cultivo con diferentes relaciones FC:FN y diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno.	39
5.10	Concentración de esporas de <i>B. bassiana</i> en medios con distintas relaciones FC:FN y distintas concentraciones de carbono y nitrógeno luego de cuatro días de cultivo.	40
5.11	Evolución de la concentración de esporas del hongo <i>B. bassiana</i> en medios de cultivo con diferentes temperaturas.	41
5.12	Evolución de la concentración de esporas de <i>B. bassiana</i> en medios de cultivo líquidos bajo dos condiciones lumínicas.	42
5.13	Evolución de la concentración de esporas del hongo <i>B. bassiana</i> en medios de cultivo con diferentes valores iniciales de pH.	42
5.14	Evolución del pH en los tratamientos en los que se evaluó el efecto de este parámetro.	43
5.15	Rendimiento de diferentes cepas de <i>B. bassiana</i> cultivadas en medio líquido.	44
5.16	Adultos de la broca del café con crecimiento externo del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> al cabo de 10 días de haber sido inoculadas. Obsérvese el crecimiento micelial (A) y la esporulación (B).	45
6.1	Fotografía de dos tinciones realizadas a cultivos de bacterias. A) Bacterias aisladas en los medios líquidos de la investigación. B) <i>Staphylococcus sp.</i>	50

6.2	Fotografía de un cultivo líquido de <i>B. bassiana</i> al cabo de tres días de inoculado, que ilustra las altas concentraciones obtenidas en los fermentadores tipo II.	51
6.3	Morfología característica de dos cepas de <i>B. bassiana</i> cuando crecen en medio sólido. A) La cepa D0101 muestra poco desarrollo micelial y una densa esporulación. B) La cepa Sar no esporula pero su gran desarrollo micelial le da un aspecto abultado.	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Metodología para la producción de <i>Beauveria bassiana</i> mediante fermentación sumergida.	70

1. INTRODUCCIÓN

Una de las actividades agrícolas que más impacto ha tenido en el desarrollo económico y social de Costa Rica es el cultivo del café, gracias tanto a su comercialización nacional como internacional. Sin embargo, año tras año se dan grandes pérdidas en las cosechas a causa del ataque de distintas plagas y enfermedades. Según el Servicio Fitosanitario del Estado, la principal plaga que afecta este cultivo es la broca del fruto, *Hypothenemus hampei*, un pequeño coleóptero de la familia Scolytidae (Álvarez, 2004).

Es casi imposible eliminar totalmente a la broca de una plantación, sin embargo, mediante un adecuado manejo integrado de la plaga, que puede abarcar tanto controles químicos y biológicos como culturales, la densidad de la población puede disminuirse a valores manejables (López, 1994). El Centro de Investigaciones en Café (CICAFE) participa activamente en el combate del gran problema que representa esta plaga, mediante la producción y distribución del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, un controlador biológico de la broca, a los caficultores costarricenses. La producción del hongo en esta institución se lleva a cabo en matrices sólidas que utilizan arroz como sustrato, técnica bastante artesanal que es demandante de mucho espacio, tiempo, sustrato y por ende, dinero.

Ante esta situación, la producción del biocontrolador en un sistema que permita una mayor productividad a un menor costo sería de gran ayuda a la institución y a todos aquellos productores que se benefician con su labor. En la literatura se reporta el crecimiento de *B. bassiana* y otros hongos biocontroladores en medio líquido, donde ocurre la producción de blastosporas, las cuales pueden ser utilizadas en campo para infectar a distintas especies de insectos (Gallegos *et al.*, 2003; Taborsky, 1992).

Para evaluar la factibilidad de la producción de *Beauveria bassiana* en medio líquido, como parte de un proceso de escalado que permita sustituir la técnica convencional de cultivo sobre sustrato sólido, se plantea la determinación del crecimiento del hongo en distintos sustratos líquidos, llevando a cabo su cultivo en pequeños fermentadores elaborados para tal fin como parte del proyecto.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El cultivo del café en Costa Rica

El café es un cultivo procedente del continente africano. Pese a que existen alrededor de 60 especies, las más usadas en los países cafetaleros alrededor del mundo son unas pocas incluyendo *Coffea arabica*, *Coffea canephora* y *Coffea liberica*, de las cuales la primera es la que se cultiva en mayor proporción (López, 1994).

El cultivo del café en Costa Rica siempre ha tenido un importante rol económico y político desde que empezó a exportarse en la década de 1830 a Suramérica y Europa. En sus inicios, permitió a los costarricenses vivir de mejor manera, gracias a las exportaciones que se hacían a Panamá. Desde entonces, además de ser una actividad que genera muchos empleos, las ganancias obtenidas por la producción y comercialización del mismo han financiado gran parte de la modernización del país, paralelamente al intercambio económico y cultural que ha estimulado con el resto del mundo (López, 1994; Pratt y Harner, 1997).

2.2. La broca del café

2.2.1. Problemática

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) es un pequeño escarabajo negro de origen africano con una longitud promedio de 2mm que se ha convertido en la principal plaga del cultivo del café alrededor del mundo (ver Figura 2.1). El daño es causado por las hembras, las cuales barrenan los frutos verdes para depositar sus huevos, de los cuales salen larvas blancas y sin patas que se alimentan en el interior de los granos (Baker y Lea, 1998). El daño económico que causa es muy grande y se habla de que puede provocar una disminución de más del 50% de la cosecha, ya sea por la caída prematura de los frutos o por el rechazo de aquellos dañados (los cuales obviamente se ven afectados en sus características físicas y organolépticas) que provoca una reducción en el peso total. La plaga tiene además potenciales efectos nocivos para la salud, pues la inocuidad de la bebida

puede perderse, debido a la presencia de ocratoxinas producidas por hongos asociados al insecto (Camilo *et al.*, 2003).



Figura 2.1. Estadios de desarrollo de la broca del café, *Hypotenemus hampei*. Tomado de Hill, 1983.

2.2.2. Control

Dada la biología y el comportamiento de esta plaga se presentan serias dificultades para su control, ya que como se mencionó antes, el adulto se encuentra protegido en el interior de los frutos, y además se reproduce rápidamente; tales factores han hecho que los métodos tradicionales de control, especialmente la aplicación de varias sustancias de índole químico, hayan demostrado ser poco eficaces (Benavides *et al.*, 2003). Incluso en el caso del endosulfán, producto químico que alguna vez demostró ser efectivo contra la broca del fruto del café, el panorama está cambiando, pues se reporta que el insecto ha desarrollado en algunas latitudes grandes niveles de resistencia al mismo, que están dando como resultado amplios niveles de infestación sin importar si se utiliza el insecticida (Brun *et al.*, 1994).

Como consecuencia, en la actualidad se trabaja intensamente en la búsqueda y utilización de enemigos naturales para el manejo de la broca. Los agentes fúngicos son prometedores en este aspecto, pues actúan por contacto y no necesitan ser ingeridos, además pueden ser producidos en masa y son relativamente específicos. El control biológico basado en la utilización de hongos entomopatógenos (aquellos que parasitan insectos) es una tecnología renovable y muy accesible para incluso los agricultores de bajos recursos (Haraprasad *et al.*, 2001).

2.3. Control biológico

2.3.1. Definición

El término control biológico fue utilizado por primera vez por H.S. Smith en 1919, para referirse al uso de enemigos naturales para el control de insectos plaga. Obviamente, este concepto se ha ampliado de gran manera y su alcance se ha extendido con el tiempo, de manera que en la actualidad pueden encontrarse muchas otras definiciones, pero el principio continúa siendo el mismo (Barrera, 2000). Aunque se sabe que hace más de mil años los agricultores chinos utilizaban hormigas para controlar gusanos en las plantaciones de cítricos, el control biológico nació como método científico hacia finales del siglo XIX, con el exitoso caso ocurrido en 1888 de la introducción de Australia a California, del escarabajo *Rodolia cardinalis* para el control de la escama algodonosa de los cítricos (Barrera, 2000; Carballo y Guaharay, 2004).

En principio, cualquier organismo es susceptible al control biológico, pues en la naturaleza todo organismo tiene uno o más antagonistas que lo eliminan o compiten con él (Hanson y Hilje, 1993). A partir del uso de insectos entomófagos para el control de insectos plaga, el control biológico se ha extendido al uso de una amplia gama de organismos que ahora son utilizados como agentes de control. Entre estos se encuentran los virus, las bacterias y sus toxinas, hongos, nemátodos, insectos, ácaros y vertebrados de varias clases; es de esperar en este sentido, que con el tiempo ocurra una expansión considerable en el rango tanto de los organismos controlados biológicamente como de aquellos que proveen el control (Carballo y Guaharay, 2004).

2.3.2. Clases de enemigos naturales

La manera en que los organismos utilizados como agentes de control llevan a cabo su acción controladora es muy diversa; mientras que la mayoría de mecanismos generalmente tienen como efecto la muerte directa del organismo que atacan, a veces operan de otras maneras, como es el caso de los hongos antagonistas que inhiben el desarrollo de otros

microorganismos, mediante sustancias que excretan (antibióticos) (Barrera, 2000). Debido a esto, resulta conveniente clasificar a los enemigos naturales en varios grupos o clases de acuerdo a las características que los separan; los mismos se describen a continuación:

2.3.2.1. Depredadores:

Se trata de individuos que en su estado inmaduro o adulto, buscan gran cantidad de presas para alimentarse y completar su ciclo de vida; por lo general son de mayor tamaño que su presa (DeBach, 1986). Algunos consumen un amplio rango de especies (polífagos), otros un rango más estrecho (olífagos), y otros son altamente específicos (monófagos). Las mantis, arañas, hormigas y escarabajos de la familia Coccinellidae son ejemplos de depredadores (Barrera, 2000).

2.3.2.2. Parasitoides:

Los parasitoides son organismos que en su estado inmaduro poseen naturaleza parasítica, pues se alimentan y desarrollan sobre o dentro del cuerpo de un solo individuo hospedante, mientras que en su estado adulto son de vida libre y muy activos para buscar al organismo que parasitan, al cual se le denomina hospedero (Barrera, 2000). Se diferencian de los verdaderos parásitos, los cuales dependen de un hospedante vivo para su supervivencia y no necesariamente le causan la muerte. Los parasitoides son los enemigos naturales más utilizados en los programas de control biológico. La mayoría de los parasitoides (85%) son del orden Hymenoptera (avispidas parasíticas) y unos pocos (15%) son del orden Díptera (Carballo y Guaharay, 2004; Hanson y Hilje, 1993).

2.3.2.3. Antagonistas:

Algunos agentes de control biológico influyen sobre la abundancia de las plagas pero no se alimentan directamente sobre ellas. Estos afectan a las poblaciones de plagas por exclusión competitiva, la cual puede ser una simple exclusión física o mediante sustancias (antibióticos) que son liberados por los antagonistas. Este tipo de agentes tienen especial importancia en el control biológico de fitopatógenos (Barrera, 2000).

2.3.2.4. Patógenos:

Los patógenos son microorganismos parasíticos muchos más pequeños que su hospedero y que frecuentemente lo matan. Para que un patógeno mate a su hospedero, debe haber ocurrido reproducción dentro de él o un ataque masivo, y el hospedante muere con miles de patógenos dentro de su cuerpo. Se consideran como patógenos a las bacterias, virus, hongos, protozoarios y nemátodos. (Hanson y Hilje, 1993).

Los hongos patógenos de insectos (hongos entomopatógenos) ofrecen muchas posibilidades para la reducción de poblaciones plaga, esto se puede lograr ya sea favoreciendo el incremento de poblaciones de patógenos nativos o por la introducción de patógenos producidos masivamente, denominados bioplaguicidas o plaguicidas microbianos (Lomer y Lomer, 2004). Debido a su diminuto tamaño y rápida reproducción, son más fáciles de producir masivamente que los parasitoides y pueden ser liberados contra las plagas usando equipos desarrollados para la aplicación de plaguicidas químicos (Hanson y Hilje, 1993).

2.4. Bioplaguicidas

2.4.1. Interés en el uso de bioplaguicidas

Los insecticidas químicos han sido utilizados extensivamente por muchos años debido a su efectividad y facilidad de uso. Sin embargo, en la actualidad se están imponiendo controles más estrictos a su distribución y uso, debido en parte a una mayor conciencia respecto al peligro que representan para el ser humano y para el ambiente, y en parte porque muchos sistemas agrícolas ya no son rentables económicamente debido al precio y cantidad de insecticidas utilizados (Thomas, 1999). Por si eso fuera poco, como resultado de ese control más minucioso, muchos de los insecticidas que han demostrado ser más eficaces, no han sido aprobados en los nuevos procesos de registro; hecho que junto con la aparición de plagas resistentes a diversos productos ha resaltado la importancia de desarrollar estrategias basadas en el control biológico dentro de la filosofía del manejo integrado de plagas. El uso

de bioplaguicidas a base de patógenos fúngicos específicos y agresivos es una de esas estrategias que parece ser prometedora (Jackson, 1997, Monzón, 2001).

2.4.2. Desarrollo y producción de bioplaguicidas

El estudio de epizootias naturales provocadas por hongos y bacterias entomopatógenas durante la última mitad del siglo XIX y la primera mitad del siglo XX estimuló de gran manera el interés del hombre en el empleo de tales microorganismos como bioplaguicidas para controlar plagas de importancia agrícola. Tales estudios se realizaron con el objetivo de desarrollar estrategias de producción masiva como un prerrequisito necesario para aplicaciones de campo a gran escala (Tavorsky, 1992). Desde entonces, sin embargo, a pesar de que alrededor del mundo, una enorme cantidad de microorganismos con gran potencial para ser utilizados como bioplaguicidas han sido descubiertos, sólo una pequeña parte de estos ha sido desarrollada y comercializada hasta la fecha, en gran medida a causa de la falta de métodos económicos de producción (Jackson *et al.*, 2004). El método estándar para la producción de microorganismos es el proceso de fermentación. Aunque existen varios tipos de fermentación, los principales son la fermentación sumergida y la fermentación semi sólida (Tavorsky, 1992).

2.4.2.1. Fermentación semi sólida

Es este tipo de fermentación, utilizada básicamente para hongos, el microorganismo se desarrolla en la superficie húmeda de un material sólido, el cual generalmente es algún grano de cereal procesado, aunque se han realizado intentos para utilizar materiales de desecho. Esto permite al hongo crecer en condiciones similares a las encontradas en la naturaleza; las esporas, los propágulos infectivos mediante los cuales el hongo sobrevive e infecta insectos, son producidas en el aire. Aunque las fermentaciones semi sólidas son relativamente fáciles de desarrollar en pequeña escala, el escalado de las mismas a las proporciones necesarias para productos comerciales es bastante difícil (Tavorsky, 1992).

En el caso de los hongos entomopatógenos, los países en vías de desarrollo han aplicado métodos de fermentación en sustrato sólido, pero estos presentan muchas restricciones para la producción a nivel comercial. Por un lado, el escalado se dificulta por problemas

asociados con la esterilización del sustrato, intercambio gaseoso, control de la temperatura, mantenimiento de cultivos puros y recuperación del producto a partir del sustrato. Por otra parte, el tiempo de fermentación necesario para la esporulación en sustratos sólidos (generalmente requiere semanas), la cantidad de personal y la infraestructura (grandes espacios físicos), son factores que aumentan los costos de gran manera en este tipo de metodologías (Deshpande, 1999; Jackson, 1997; Jackson *et al.*, 2004).

2.4.2.2. Fermentación sumergida

Frente al panorama descrito antes para la fermentación semi sólida, la fermentación sumergida se perfila como el método más económico para la producción de agentes biocontroladores. Se trata, como su nombre lo indica, del crecimiento de microorganismos en sistemas totalmente líquidos (Tavorsky, 1992).

Existen gran cantidad de ventajas que hacen de esta metodología más efectiva, entre las que se destaca la necesidad de menos mano de obra para operar el fermentador y manejo del producto. Se cuenta además con la posibilidad de controlar de manera más sencilla factores ambientales como la temperatura, aireación y pH, manteniendo más estable el medio de crecimiento, cuya homogeneidad favorece las etapas de procesamiento posteriores (Jackson, 1997; Tavorsky, 1992).

2.5. Beauveria bassiana

2.5.1. Taxonomía

Dentro del grupo de los hongos entomopatógenos se encuentra el género *Beauveria*, parásito de un gran número de artrópodos, encontrándosele en más de 200 especies de ácaros e insectos de diferentes órdenes (Dalla *et al.*, 2005). A este género pertenece la especie *Beauveria bassiana*, encontrada en suelos alrededor de todo el mundo. Se trata de un hongo que se clasificó inicialmente en la clase Deuteromicetes u hongos imperfectos (de los que no se conoce su fase sexual) pero que recientemente ha sido reclasificado como un Ascomicete,

pues se descubrió su teleomorfo (forma sexual) en Asia, recibiendo éste el nombre de *Cordyceps bassiana* (Huang *et al.*, 2002). Sin embargo, la amplia utilización de su nombre como anamorfo (forma asexual) hace más conveniente referirse al hongo como *Beauveria bassiana*, y así se hará a lo largo de este trabajo.

2.5.2. Características

B. bassiana posee un micelio de color blanco formado por hifas con septos simples, las conidias son hialinas y globosas con tamaños que varían de 2 a 3.5µm. Los cadáveres de insectos infectados por este hongo presentan una densa cubierta blanca formada por el micelio y la esporulación del hongo, razón por la cual se le denomina muscardina blanca, a la enfermedad de los insectos que son parasitados por el mismo (Carballo y Guaharay, 2004).

El ciclo de vida de *B. bassiana* es similar al de otros hongos entomopatógenos; una vez que germina sobre la cutícula del hospedero produce una hifa de penetración que mediante la acción de proteasas, quitinasas y lipasas, es capaz de ingresar y posteriormente colonizar el insecto, para finalmente formar estructuras reproductivas que pueden iniciar de nuevo el ciclo (Iskandarov *et al.*, 2006; Monzón, 2001). Entre la penetración del exoesqueleto y la esporulación final sobre el cadáver del insecto, existe una etapa media de proliferación, que comienza cuando el hongo alcanza el hemocele. Lo que ocurre en esta etapa es que la producción de cuerpos hifales y células gemantes parecidas a levaduras denominadas blastosporas, las cuales permiten la dispersión y proliferación del hongo a través de la hemolinfa (Carballo y Guaharay, 2004; Deacon, 1990).

2.5.3. Patogenicidad

Beauveria bassiana infecta una gran diversidad de familias de insectos, aunque la mayoría son coleópteros y lepidópteros. Entre las plagas que son controladas usualmente con este hongo se encuentran la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), el picudo del algodón (*Anthonomus grandis*), el picudo del chile (*Anthonomus eugenii*), el escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), la palomilla *Cydia pomonella* en manzana, el barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilialis*), la oruga de los pinos (*Dendrolimus* spp), el picudo de la caña de

azúcar (*Metamazius hemipterus*), el gorgojo de la caña de azúcar (*Sphenophorus levis*), el barrenador gigante de la caña de azúcar (*Castnia licus*), el picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus*) y diferentes especies de chinches y saltamontes (Carballo y Guaharay, 2004). De igual manera, *B. bassiana* ha sido usado ampliamente en distintos países para controlar la broca del café, utilizando diversas metodologías de aplicación y formulaciones para aumentar la efectividad del hongo. Los resultados obtenidos algunas veces han cumplido o superado las expectativas, mientras que en ocasiones no se alcanzan valores de mortalidad tan altos como se esperan, resultados tan desiguales obedecen evidentemente a la amplia variedad de condiciones experimentales utilizadas. Bustillo *et al.* (1999) por ejemplo, reportan mortalidades de hasta un 30% cuando se asperjó una formulación que contenía una mezcla de conidios del hongo y aceite al suelo, mientras que Haraprasad *et al.* (2000) obtuvieron niveles de mortalidad de hasta un 75.6% cuando se asperjó una solución del hongo en agua a plantas afectadas por el insecto.

Siempre dentro del marco de control biológico, incluso se ha encontrado que este hongo entomopatógeno puede actuar en campo, reduciendo considerablemente las poblaciones de *H. hampei* con una efectividad incluso mayor que la obtenida con el uso de avispas parasitoides (Benavides y Arévalo, 2002).

2.5.4. Producción comercial

La producción masiva de *B. bassiana* para utilizarlo en el combate de plagas puede realizarse por fermentación en sustratos sólidos o en medios líquidos, como se describió anteriormente para la elaboración de bioplaguicidas. Cuando se realiza en sustratos sólidos, se producen gran cantidad de conidias aéreas (Figura 2.2.A), mientras que en los cultivos líquidos el hongo crece de manera similar a las levaduras, produciendo altas concentraciones de propágulos vegetativos denominados blastosporas (Figura 2.2.C), las mismas que se producen en la hemolinfa de los insectos (Vega *et al.*, 2003). También, se ha descubierto que cuando crece en medios líquidos químicamente definidos, además de

blastosporas, el hongo produce esporas muy similares a las conidias aéreas, a las que se les denomina conidias sumergidas (Figura 2.2.B) (Thomas *et al.*, 1987).

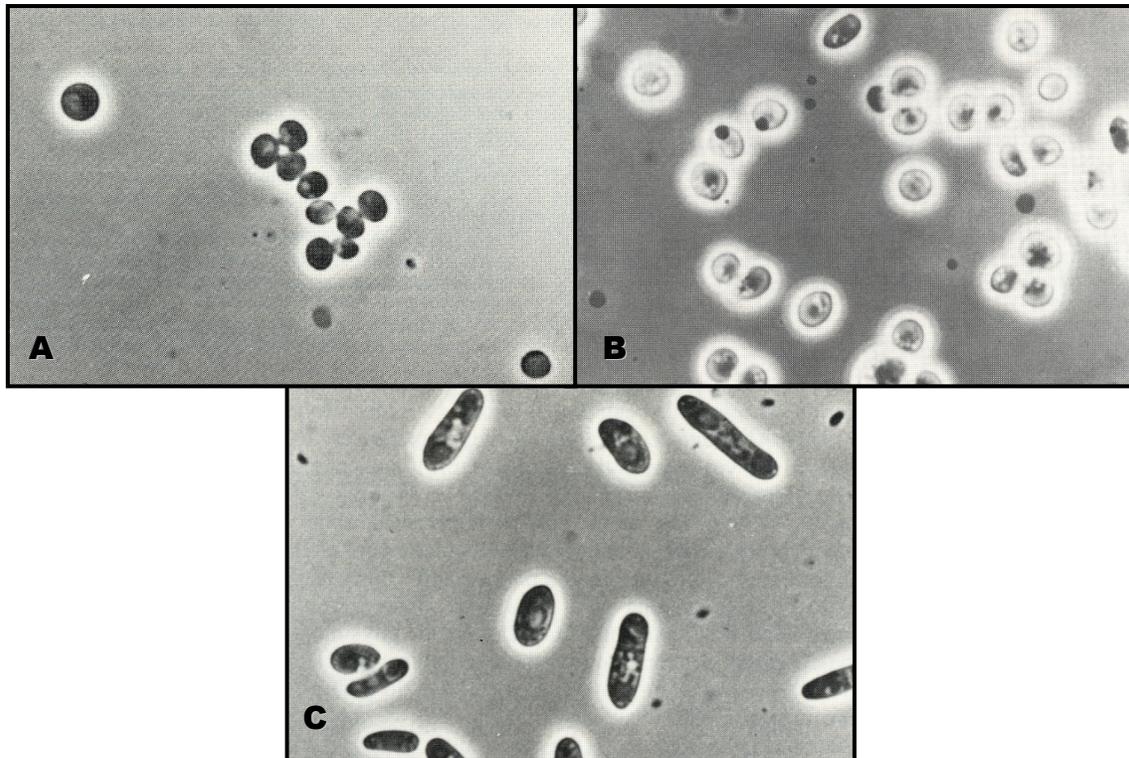


Figura 2.2. Imágenes de conidias aéreas (A), conidias sumergidas (B) y blastosporas (C) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* obtenidas en un microscopio de contraste de fases. Tomado de Thomas, 1987.

2.5.4.1. Producción en sustrato sólido

Como se mencionó en un apartado anterior, la fermentación semi sólida es la metodología que con mayor frecuencia se utiliza en los países no industrializados con el fin de obtener grandes cantidades de esporas del hongo. La metodología seguida es básicamente la misma alrededor del mundo, se trata de un proceso de varias etapas, que en general se organiza en dos fases. En la primera fase o fase de cepario *B. bassiana* se aísla y se cultiva en medios puros ya sean sólidos o líquidos; las esporas producidas en estos se utilizan como inóculo en la segunda fase. Ésta última comprende la preparación y esterilización del sustrato seleccionado por el productor en las matrices (bolsas o recipientes que contienen el

sustrato), la inoculación e incubación de las mismas, el proceso de secado y la cosecha del hongo (Monzón, 2001).

Uno de los sustratos que más se utiliza para la fermentación semi sólida es el arroz. Este es utilizado para la producción del hongo en el Centro de Investigaciones en Café de Costa Rica, como parte del programa de manejo integrado de la broca que impulsa el Instituto del Café de Costa Rica (Barquero, 2005). Nelson *et al.* (1996) utilizaron de igual manera el arroz para producir tres especies de hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii* y *Metarhizium anisopliae*, encontrando que el arroz por sí solo, rendía incluso mejores resultados que el arroz enriquecido con aditivos como la glucosa y el extracto de levadura, o que la cebada o el trigo molido como sustrato. Al cabo de 3 semanas de crecimiento a 23° C, las matrices de arroz alcanzaron una concentración máxima de 4.38×10^9 conidios por gramo de sustrato para *B. bassiana* (Nelson *et al.*, 1996).

Magara *et al.* (2004) realizaron una investigación utilizando diversos sustratos sólidos como parte de un proceso difásico de producción de *B. bassiana*. Maíz molido, afrecho de maíz, bagazo, cáscara de algodón, afrecho de maíz con bagazo, afrecho de maíz con cáscaras de algodón y bagazo con levadura gastada fueron los sustratos evaluados en el ensayo. En esta ocasión, el maíz molido resultó ser el más productivo con un rendimiento de 3.2×10^9 conidios por gramo, seguido por el afrecho de maíz, con 3.1×10^9 conidios por gramo. No se detallan las condiciones de cultivo.

2.5.4.2. Producción en sustrato líquido

El cultivo líquido de este entomopatógeno puede realizarse en distintos sistemas, desde erlenmeyers en agitación hasta fermentadores de escala industrial. La fermentación líquida de *B. bassiana* se ha realizado exitosamente persiguiendo objetivos de muy diversa índole, desde la obtención de blastosporas para ser usadas en control biológico hasta la producción de metabolitos de importancia clínica como los reportados por Matsuda *et al.* (2004) y Fukuda *et al.* (2004). En todos los casos, se ha observado que el hongo es de rápido crecimiento, y que se adapta a gran cantidad de sustratos, siempre y cuando posean una adecuada aireación, fuentes de carbono, nitrógeno y elementos minerales (Iskandarov *et al.*,

2006). Comparadas con las conidias, las preparaciones de blastosporas obtenidas en sustrato líquido muestran una mayor velocidad de germinación tanto sobre agar como sobre la cutícula de los insectos, lo que hace de las últimas una gran promesa como propágulos bioinsecticidas (Vega *et al.*, 2003). Estudios recientes, por ejemplo, sugieren que blastosporas del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* producidas en medio líquido, son más efectivas que las conidias infectando y matando mosca blanca (*Bemisia argentifolii*), eficacia que es superior debido a una tasa de germinación significativamente más rápida de las blastosporas en la cutícula del insecto (Jackson *et al.*, 2006). De igual manera se ha observado que esto ocurre con cultivos de *B. bassiana*, aunque en contraste con la mayor patogenicidad de las blastosporas, estas tienen menor estabilidad en almacenamiento que las conidias (Leland *et al.*; 2005).

En la literatura se encuentra una importante cantidad de ensayos que describen la producción del hongo en sistemas de fermentación sumergida, donde se evalúan gran cantidad de variables en lo que a medios de cultivo y condiciones de crecimiento se refiere. En tales sistemas, los medios utilizados son de dos tipos: definidos o complejos. Los medios definidos se obtienen adicionando ingredientes químicamente definidos a un volumen específico de agua destilada, mientras que los medios complejos se preparan a base de hidrolizados de proteína o extractos de origen vegetal o animal (BD BIONUTRIENTS, 2006).

Haraprasad *et al.* (2001) reportaron la producción de *B. bassiana* en medio líquido complejo YPD (dextrosa-extracto de levadura suplementado con peptona) utilizando botellas Roux de 1000 ml. Al cabo de 8 días de incubación observaron un crecimiento profuso del hongo, cuya biomasa, al ser liofilizada dio como resultado 3 gramos de polvo seco por cada botella Roux. Otro caso en el que se cultivó *B. bassiana* en un sistema cerrado (también denominado discontinuo) en agitación fue llevado a cabo por Bidochka *et al.* (1990), quienes cultivaron el hongo en medio líquido de gelatina suplementado solamente con monosacáridos, disacáridos, polioles o el amino azúcar *N*-acetil-D-glucosamina. El crecimiento se promovió colocando los medios en un agitador orbital con baño de agua a 27°C a una velocidad de 180 rpm.

Como medios complejos también se han utilizado materiales de bajo costo e incluso subproductos de procesos que generalmente se desechan. Gallegos *et al.* (2003) produjeron blastosporas en medios líquidos a base de harina de soya, harina de frijol, harina de haba y Caldo Dextrosa Sabouraud; ellos encontraron que las esporas producidas en harina de soya como sustrato eran más infectivas contra el picudo de la yema del manzano (*Amphidees* spp) que las que crecieron en los otros sustratos. Dalla *et al.* (2005) obtuvieron grandes cantidades de esporas mediante la fermentación del hongo en fermentadores utilizando papas de rechazo, broza de café, y bagazo de caña de azúcar, todos finamente molidos.

Mediante la utilización de medios definidos, algunos investigadores han obtenido rendimientos comparables a los obtenidos en medios complejos, a pesar de que es sabido que estos últimos generalmente permiten obtener mayores niveles de producción. Thomas *et al.* (1987) utilizaron el medio definido TKI, el cual les permitió obtener gran cantidad de conidias sumergidas; Hegedus *et al.* (1990) utilizaron un medio definido que contenía N-acetil-glucosamina y obtuvieron mejores resultados en cuanto a producción de conidias sumergidas que con medio extracto de levadura-peptona-glucosa (YPG). Por otra parte, utilizando un medio definido en sus componentes excepto por la fuente de carbono (melaza), Solis *et al.* (2006) produjeron en un fermentador con impulsores mecánicos, blastosporas que al ser utilizadas contra la palomilla del manzano (*Cydia pomonella*) causaron una mortalidad máxima del 96%.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* bajo diferentes condiciones de cultivo mediante su desarrollo en fermentadores.

Objetivos Específicos

- Elaborar fermentadores para el cultivo de *B. bassiana* en medio líquido.
- Verificar la funcionalidad de los fermentadores para el cultivo del microorganismo.
- Evaluar y monitorear el crecimiento de *B. bassiana* en distintos medios de cultivo.
- Evaluar y monitorear el crecimiento de *B. bassiana* en diferentes temperaturas
- Evaluar y monitorear el crecimiento de *B. bassiana* en medios con diferente pH
- Evaluar y monitorear el crecimiento de *B. bassiana* bajo distintas condiciones lumínicas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La descripción del proceso experimental está dividida en dos fases con el fin de facilitar la comprensión del mismo. En la primera fase se definen las metodologías involucradas en la elaboración y pruebas preliminares de los fermentadores, mientras que en la segunda se exponen los detalles de los ensayos de fermentación sumergida, realizados con base en la experiencia adquirida en la primera fase, así como un bioensayo de blastosporas de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Cabe destacar que en ambas fases los ensayos se realizaron en el mismo sitio y se utilizó el mismo microorganismo.

Localización

Todas las pruebas y ensayos realizados se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación en Fitopatología del CICAPE, ubicado en el distrito San Pedro de Barva, provincia de Heredia.

Microorganismo

La cepa de *Beauveria bassiana* que se utilizó a lo largo de todo el estudio corresponde al aislado Sar, el cual fue obtenido por el CICAPE en agosto de 2004, en el distrito Sarchí Sur de Alajuela. Echeverría (2006) llevó a cabo un proceso de selección en el que se evaluaron éste y otros aislamientos; al final del mismo esta cepa fue elegida por su mayor esporulación, resistencia a la luz ultravioleta y agresividad contra la broca del café. Desde entonces, Sar es la cepa que se utiliza rutinariamente para la producción del biocontrolador en sustrato sólido en el CICAPE.

4.1. FASE I

4.1.1. Elaboración de los fermentadores

Con el objetivo de evaluar la fermentación sumergida de *B. bassiana*, en esta investigación fue necesario elaborar un módulo o sistema (denominado aquí fermentador) que permitió al

hongo desarrollarse, mientras se llevaron a cabo los ensayos de cultivo del mismo. Se construyeron dos tipos de fermentadores diferentes.

4.1.1.1. Fermentadores tipo I

Para construir cada fermentador tipo I, de los cuales se elaboraron tres en total, se utilizó como base una botella de polipropileno con tapa ancha de 1 litro de capacidad. A la tapa de la botella se le hicieron tres agujeros dispuestos en un triángulo equilátero; para realizar las perforaciones se utilizó un taladro. Para el acabado final de los agujeros utilizó una lija para adecuarlos al diámetro de las mangueras y tubos que se introducirían en los mismos.

En dos de los orificios realizados se introdujeron mangueras de hule autoclavables, una para la entrada de aire y otra para la salida del mismo. En el tercer orificio se introdujo un tubo que permitiría el muestreo para las posteriores evaluaciones. El tubo era en realidad la parte superior de un balón aforado de polipropileno marca Nalgene® de 50 ml, pues contaba con tapa y rosca en la parte superior lo cual representaba una ventaja para muestrear y mantener cerrado el sistema en los períodos de cultivo. La unión entre los distintos componentes y la tapa de la botella se realizó utilizando silicón negro OCi®, resistente a altas temperaturas.

Mecanismo dual de aireación y agitación: Una parte vital en los fermentadores consistía en el sistema que permitía llevar a cabo la aireación del medio y a la vez la agitación constante del mismo. Para tal propósito se utilizó para cada fermentador una bomba de aire ELITE® 801 (marca HAGEN) con una salida de aire de 2500 cc/minuto y una presión de trabajo de 3.0 P.S.I. Cada bomba de aire se conectaba al fermentador por medio de una manguera ELITE® Flex-Air de 90 cm de longitud. Luego de salir impulsado de la bomba, el aire era filtrado al pasar por un sujetafiltro reutilizable de poliacetal Pall® en cuyo interior se colocaba un filtro de membrana Metricell de 25mm de diámetro con poros de 0.2 µm. Los sujetafiltros se ajustaban perfectamente a las mangueras de entrada de aire de cada fermentador. En la parte inferior de cada manguera de entrada se ajustaba una campana de aireación, que era la parte inferior de un balón aforado de polipropileno a la que se le realizaron pequeños agujeros a su alrededor para permitir la salida y dispersión del aire en el

medio. Para que la campana no flotara sobre el medio se rellenaba en su interior con perlas de vidrio.

El aire, una vez que emergía de la manguera de entrada en forma de burbujas, salía del fermentador por la manguera de salida que tenía en su extremo otro sujeta-filtro reutilizable de poliacetal Pall® en el que se colocaban discos de 25 mm de diámetro de papel filtro P8 Fisherbrand®, a manera de filtro de salida.

4.1.1.2. Fermentadores tipo II

Al realizar pruebas con los fermentadores tipo I se presentaron muchos problemas de contaminación (descritos más adelante), de manera que se dejaron de utilizar. Como sustituto se elaboraron unos nuevos en cuya fabricación no se utilizó ningún material plástico. Se utilizó como recipiente base erlenmeyers de 1 litro de capacidad, a los que se les colocó un tapón de hule que se ajustaba a la boca de los mismos. Con ayuda de un sacabocados N°3 se realizaron tres perforaciones equidistantes en los tapones de hule, por los cuales se introdujeron tres segmentos de varilla de vidrio previamente cortados, correspondientes a la entrada de aire, salida de aire y tubo de muestreo. Un total de seis fermentadores tipo II fueron elaborados.

Mecanismo dual de aireación y agitación: En el caso de los fermentadores tipo II el sistema de aireación se mantuvo similar al de los fermentadores tipo I, aunque se realizó un cambio importante en el filtro de entrada de aire. Al igual que antes, el aire de cada fermentador se abastecía mediante una bomba de aire ELITE® 801 (marca HAGEN) con una salida de aire de 2500 cc/minuto y una presión de trabajo de 3.0 P.S.I; la misma se conectada al fermentador por medio de una manguera ELITE® Flex-Air de 90 cm de longitud. En estos nuevos fermentadores el aire que entraba pasaba por unidades de filtración Millex® FG de Millipore®; que contaban en su interior con un filtro de membrana de 50mm de diámetro (el doble del diámetro de los filtros usados en los fermentadores tipo I) con poros de 0.2 µm. Las unidades de filtración se encontraban unidas al tubo de vidrio de entrada de aire por medio de un segmento de aproximadamente 6 cm de largo de manguera de hule natural Fisher Scientific®.

El aire, una vez que emergía del tubo de entrada en forma de burbujas, salía del fermentador por el tubo de vidrio de salida y pasando un segmento de 6 cm de manguera ingresaba a un sujetador-filtro reutilizable de poliacetal marca Pall® en el que se colocaban discos de 25 mm de diámetro de papel filtro P8 Fisherbrand®, a manera de filtro de salida.

4.1.2. Ensayos de prueba con los fermentadores

Los ensayos de prueba realizados en ambos tipos de fermentadores tenían por objetivo valorar de manera cualitativa la efectividad de los fermentadores y el grado de contaminación, para así poder realizar los ajustes necesarios en busca de la mejora de los mismos. Es importante destacar que en esta parte de la investigación no se llevó a cabo una estandarización tan minuciosa de las condiciones de cultivo y días de muestreo como sí se hizo en la segunda fase.

4.1.2.1. Pruebas de cultivo con los fermentadores tipo I

Para evaluar la funcionalidad de los fermentadores tipo I se realizaron varias pruebas con la cepa Sar y medio de cultivo sacarosa-extracto de levadura (15 g/l de sacarosa y 3 g/l de extracto de levadura). El medio se preparaba y se autoclavaba por 25 minutos, una vez enfriado se inoculaba en la cámara de flujo laminar con una asada del hongo proveniente de placas con medio PDA y por último se conectaba el fermentador a la bomba de aire. El cuarto de crecimiento mantenía una temperatura constante de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. Debido a que el principal problema fue la contaminación bacteriana, las variantes de cultivo y cambios en los materiales de los fermentadores se realizaron básicamente para determinar la posible causa de la misma. En la tabla 4.1 se describen las pruebas realizadas con los fermentadores tipo I.

Tabla 4.1. Pruebas realizadas con los fermentadores tipo I para determinar la fuente de contaminación.

Prueba	Posible causa de contaminación (hipótesis)	Metodología utilizada para corroborar hipótesis.
1	Ninguna (ensayo inicial)	Se inocularon los tres fermentadores con la cepa Sar, luego se conectaron a las bombas de aire.
2	Inadecuada filtración del aire	Se inocularon dos fermentadores, uno se conectó a la bomba de aire y el otro se colocó en un agitador orbital a 150 rpm.
3	Contaminación del inóculo utilizado	Se preparó medio de cultivo para los tres fermentadores, uno de los mismos no se inoculó, mientras que los otros dos se inocularon con una asada de Sar proveniente de dos placas diferentes. Todos se conectaron a las bombas de aire.
4	Inadecuada filtración del aire	Se preparó medio para dos fermentadores, Luego de autoclavar los fermentadores con el medio ninguno fue inoculado; se llevaron directo al cuarto de crecimiento. Uno se conectó a la bomba de aire y el otro se colocó en un agitador orbital a 150 rpm.
5	Acumulación bacteriana en mangueras de entrada y salida de aire	Se cambió las mangueras de hule por mangueras sintéticas Tygon®. Los tres fermentadores se inocularon, uno se colocó en agitación (150 rpm) y los otros se conectaron a las bombas de aire.
6	Acumulación bacteriana en paredes del fermentador	Se construyeron dos fermentadores de vidrio especialmente para esta prueba, usando un erlenmeyer y un tapón con mangueras de entrada y salida de aire. Se usó el mismo sistema de filtración. Uno de los mismos se colocó en agitación y el otro se conectó a la bomba de aire. Además se colocó un fermentador de tipo I en agitación, a manera de control.

4.1.2.2. Pruebas de cultivo con los fermentadores tipo II

En el caso de este segundo tipo de fermentadores solo se efectuaron dos ensayos. Los mismos se realizaron utilizando medio de sacarosa-extracto de levadura (15 g/l de sacarosa y 3 g/l de extracto de levadura), el cual era preparado y autoclavado en los fermentadores por 25 minutos. Nuevamente, la cepa que se utilizó como inóculo fue Sar.

Prueba N° 1. Se inoculó un fermentador que contenía 800 ml de medio con una asada del hongo cultivado en PDA y se conectó a la bomba de aire, además se inoculó un erlenmeyer con 800 ml que se uso como control en agitación (150 rpm). Se realizaron conteos al hemocitómetro durante el cuarto y el quinto día de cultivo.

Prueba N° 2. Se realizó con tres fermentadores. El pH de uno de los medios se ajustó a 4.8, otro a 5.5 y el otro a 6.2. En este caso, el inóculo que se utilizó fue por primera vez un cultivo líquido de *B. bassiana*. Después de determinar la concentración de esporas/ml del inóculo, se agregó a los fermentadores el volumen necesario para alcanzar una concentración inicial en los fermentadores de 1×10^4 esporas/ml.

4.1.3. Evaluación de agentes antiespumantes

Con el fin de hallar una sustancia que se pudiera utilizar como agente antiespumante en los fermentadores a lo largo de la investigación, se realizaron cultivos con el medio sacarosa-extracto de levadura (15 g/l de sacarosa y 3 g/l de extracto de levadura); para evaluar la efectividad de la sustancia agregada al medio, se observaba si ocurría o no formación de espuma dentro del fermentador. Se probaron dos sustancias: aceite de soya comercial y aceite de uso agrícola marca Spray Tech®.

4.1.4. Identificación del organismo contaminante

A partir de los cultivos líquidos de *B. bassiana* que se realizaron en los fermentadores tipo I se trató de aislar el microorganismo contaminante. Para esto se realizaron inoculaciones en la cámara de flujo laminar, se sumergió el asa bacteriológica en el medio de cultivo de las pruebas tres y cuatro y se inoculó en placas con agar de recuento estándar y placas con

PDA. Se utilizaron tanto los medios inoculados, como los que no fueron inoculados con el hongo para tratar de aislar el microorganismo. Las placas se mantuvieron a 26°C hasta que se observó algún tipo de crecimiento.

Cuando se obtuvo el crecimiento en las placas, a partir de subcultivos puros se realizó una tinción de Gram y una prueba de la catalasa para caracterizar el organismo aislado, así como una observación de su morfología al microscopio de campo claro.

4.2. FASE II

4.2.1. Evaluación de la fermentación sumergida de *Beauveria bassiana*

Esta etapa de la investigación se basó en la experiencia adquirida en la fase I para someter al hongo a pruebas en las que se evaluó su respuesta frente a distintas variables de cultivo. Además, se utilizaron los fermentadores tipo II para llevar a cabo la fermentación. A continuación se describen las condiciones y las metodologías que se mantuvieron constantes durante los seis ensayos realizados:

- Período de cultivo: cuatro días
- Concentración inicial de cada unidad experimental (fermentador o erlenmeyer control en agitación): 1×10^4 esporas/ml
- Tasa de aireación: 3.125 v/v/m (volumen de aire/volumen de líquido / minuto)
- Volumen de trabajo: 800 ml
- Antiespumante: 400 µl de aceite de soya
- pH del medio de cultivo: 5.5 (excepto en el ensayo donde la variable fue el pH)
- Temperatura de cultivo: $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (excepto en el ensayo donde esta fue la variable)
- Evaluación del crecimiento y medición del pH durante el 2º, 3º y 4º día de cultivo

El método que se utilizó para evaluar el crecimiento de *B. bassiana* fue el conteo de esporas en la cámara de Neubauer (denominada también hemocitómetro) para determinar la

concentración por mililitro. Siguiendo el procedimiento descrito por Hansen (2000) se estimó la concentración de esporas de la siguiente manera:

$$(\Sigma \text{ esporas cuadros } R1, R2, R3, R4, R5) \times \text{Factor de dilución} \times 50000 = \# \text{ de esporas/ml en el medio}$$

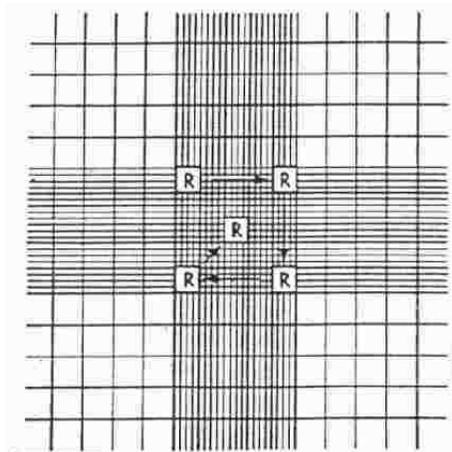


Figura 4.1. Esquema de la metodología para conteo al hemocitómetro. Fuente: Hansen (2000).

Cuando se realizó la evaluación del crecimiento utilizando el hemocitómetro, para cada tratamiento se llevaron a cabo dos conteos que se trataron como repeticiones, aspecto importante a tomar en cuenta en el posterior análisis de resultados. La determinación del pH se realizó mediante un pHmetro digital. El análisis estadístico de los datos recopilados se realizó en el programa STATISTICA© versión 5.5.

Tanto para la evaluación del crecimiento como para la medición del pH se tomaban alícuotas de los tratamientos; la metodología utilizada para obtener las mismas se describe a continuación:

- a. Se desconectaban los fermentadores de las bombas de aire, y los controles se retiraban del agitador orbital.
- b. Las unidades experimentales se limpiaban externamente con alcohol al 70% y se introducían a la cámara de flujo laminar.
- c. Se retiraba el tapón de muestreo del fermentador o la tapa de papel aluminio de los controles y con ayuda de un pipeteador automático y una pipeta estéril se tomaba una muestra de 4 ml.

- d. La muestra se colocaba en tubos estériles con tapa de 13 ml debidamente rotulados.
- e. Se agitaban los tubos en el vortex por 10 segundos.
- f. Se colocaba el respectivo tapón en el tubo de muestreo del fermentador o la tapa de aluminio en el control, luego se sacaba de la cámara de flujo laminar.
- g. Se devolvían las unidades experimentales al cuarto de crecimiento, donde se conectaban los fermentadores a las bombas de aire y se colocaban los controles en agitación.

4.2.1.1. Evaluación de diferentes medios de cultivo

Se prepararon seis medios de cultivo para evaluar el crecimiento del hongo sobre diversos sustratos. La fuente de carbono utilizada fue la misma, mientras que como fuente de nitrógeno y otros nutrientes se probaron cinco sustratos complejos y un sustrato químicamente definido. Además, se preparó un control con la composición usual utilizada en el CICA FÉ, el cual se mantuvo en agitación a 150 rpm. De esta manera se completaron siete tratamientos, cuya composición se describe en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Descripción de los tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de *B. bassiana* en diversos sustratos líquidos.

Nº de tratamiento	Composición del medio	
	Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno y otras sustancias
1	25 g/l de sacarosa	10 g/l de triptona Oxoid
2	25 g/l de sacarosa	10 g/l de peptona Sigma
3	25 g/l de sacarosa	10 g/l de extracto de levadura Oxoid
4	25 g/l de sacarosa	10 g/l de extracto de malta Bacto
5	25 g/l de sacarosa	10 g/l de cebada malteada Sigma
6	25 g/l de sacarosa	6g/l de (NH ₄) ₂ SO ₄ + 3.5g/l de KH ₂ PO ₄ + 1g/l de MgSO ₄ x7H ₂ O + 0.1g/l de NaCl + 0.1g/l de CaCl ₂
Control	25 g/l de sacarosa	10 g/l de extracto de levadura Oxoid

4.2.1.2. Evaluación de diferentes relaciones FC:FN

Una vez que se determinó cuales sustancias al ser utilizadas como sustrato, permitían un mayor crecimiento del hongo, se evaluaron medios en los que la variable fue la relación entre la cantidad de fuente de carbono y la cantidad de fuente de nitrógeno utilizada (FC:FN). De esta manera se evaluaron tres distintas relaciones, y además dos fuentes de nitrógeno diferentes. Se utilizó también un control en agitación a 150 rpm, cuya composición y relación FC:FN eran las utilizadas normalmente en el CICAFFE para medios líquidos. La fuente de carbono utilizada siempre fue la misma, sacarosa. En la tabla 4.3 se presenta la composición de los siete tratamientos.

Tabla 4.3. Descripción de los tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de *B. bassiana* en sustratos con distintas relaciones FC:FN.

Nº de tratamiento	Descripción del tratamiento	Composición del sustrato	
		Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno y otras sustancias
1	FC:FN 2:1	25 g/l de sacarosa	12.5 g/l de extracto de levadura
2	FC:FN 2:1 con 2/3 parte de Fuente N peptona	25 g/l de sacarosa	4.2 g/l de extracto de levadura y 8.3 g/l de peptona
3	FC:FN 5:1	25 g/l de sacarosa	5 g/l de extracto de levadura
4	FC:FN 5:1 con 2/3 parte de Fuente N peptona	25 g/l de sacarosa	1.7 g/l de extracto de levadura y 3.3 g/l de peptona
5	FC:FN 10:1	25 g/l de sacarosa	2.5 g/l de extracto de levadura
6	FC:FN 10:1 con 2/3 parte de Fuente N peptona	25 g/l de sacarosa	0.83 g/l de extracto de levadura y 1.67 g/l de peptona
7	Control (FC:FN 5:1)	25 g/l de sacarosa	5 g/l de extracto de levadura

4.2.1.3. Evaluación de distintas concentraciones y relaciones FC:FN

En este ensayo, además de evaluar dos distintas relaciones FC:FN, se evaluaron para cada relación tres concentraciones de los componentes agregados. Es decir, manteniendo una misma relación se modificó la cantidad de sustancia agregada. Los tratamientos se presentan en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Descripción de los tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de *B. bassiana* en sustratos con distintas concentraciones y relaciones FC:FN.

Nº de tratamiento	Descripción del tratamiento	Composición del sustrato	
		Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno y otras sustancias
1	FC:FN Concentración baja	2:1 12.5 g/l de sacarosa	2.08 g/l de extracto de levadura y 4.17 g/l de peptona
2	FC:FN Concentración media	2:1 25 g/l de sacarosa	4.17 g/l de extracto de levadura y 8.33 g/l de peptona
3	FC:FN Concentración alta	2:1 50g/l de sacarosa	8.33 g/l de extracto de levadura y 16.67 g/l de peptona
4	FC:FN Concentración baja	1:1 12.5 g/l de sacarosa	4.17 g/l de extracto de levadura y 8.33 g/l de peptona
5	FC:FN Concentración media	1:1 25 g/l de sacarosa	8.33 g/l de extracto de levadura y 16.67 g/l de peptona
6	FC:FN Concentración alta	1:1 50 g/l de sacarosa	16.67 g/l de extracto de levadura y 33.33 g/l de peptona
7	Control (FC:FN 5:1)	25 g/l de sacarosa	1.67 g/l de extracto de levadura y 3.33 g/l de peptona

4.2.1.4. Evaluación de diferentes temperaturas de cultivo y condiciones de luminosidad

En este ensayo se utilizaron ocho diferentes tratamientos mediante los que se evaluaron tres temperaturas de cultivo a intervalos de 5° C, así como dos condiciones diferentes de

luminosidad. Dos de los tratamientos eran controles en agitación (150 rpm) y los otros seis eran fermentadores con burbujeo. Una de las condiciones lumínicas consistía en crecimiento bajo luz natural, lo cual se lograba al colocar los fermentadores o los erlenmeyers control (ambos de vidrio transparente) en un cuarto con ventanas por donde podía entrar la luz. La otra condición lumínica, de total oscuridad, se consiguió envolviendo completamente los fermentadores y los erlenmeyers control con papel aluminio, de manera que la luz no ingresaba a los mismos. El medio de cultivo utilizado era igual para todos los tratamientos, con 25 g/l de sacarosa, 4.2 g/l de extracto de levadura y 8.3 g/l de peptona. Las condiciones de cultivo se detallan en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo de cultivo de *B. bassiana* con diferentes temperaturas y condiciones de luminosidad.

N° de tratamiento	Temperatura de cultivo	Condición lumínica
1	18°C	Luz natural
2	18°C	Oscuridad
3	23°C	Luz natural
4	23°C	Oscuridad
5	28°C	Luz natural
6	28°C	Oscuridad
7 (control)	23°C	Luz natural
8 (control)	23°C	Oscuridad

4.2.1.5. Evaluación de distintos valores de pH

Este ensayo contó con cuatro tratamientos, incluyendo el control. El pH de los medios se ajustó a tres diferentes valores, y cada valor se repitió en dos fermentadores, como se muestra en la tabla 4.6. Aunque se ajustó el pH inicial, durante los siguientes días de cultivo este no fue regulado.

Tabla 4.6. Descripción de los tratamientos usados en el ensayo de fermentación de *B. bassiana* bajo distintos valores de pH.

Nº de tratamiento	pH del medio de cultivo
1A	4.8
1B	4.8
2A	5.5
2B	5.5
3A	6.2
3B	6.2
Control A	5.5
Control B	5.5

4.2.1.6. Evaluación del crecimiento de diferentes cepas

En este ensayo se evaluó el desarrollo en los fermentadores de tres cepas de *B. bassiana* con muy distinta procedencia. Se utilizó la cepa Sar del CICAFFÉ, que como ya se mencionó antes fue aislada de la broca del café; la cepa D0101 de DIECA, aislada del salivazo e ingrediente activo del bioplaguicida Beauvedieca®, y la cepa GHA, ingrediente activo del bioinsecticida colombiano MYCOTROL® (tabla 4.7). El medio de cultivo utilizado era el mismo, con 25 g/l de sacarosa, 4.2 g/l de extracto de levadura y 8.3 g/l de peptona.

Tabla 4.7. Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo de cultivo de tres diferentes cepas de *B. bassiana*.

Tratamiento	Cepa inoculada
1A	Mycotrol
1B	Mycotrol
2A	Sar
2B	Sar
3A	D0101
3B	D0101

4.2.2. Bioensayo sobre broca del café

Aunque no era parte de los objetivos iniciales de la investigación, se llevó a cabo un bioensayo sobre la broca del café para evaluar la patogenicidad de las esporas de *Beauveria bassiana* producidas mediante fermentación sumergida. Las brocas utilizadas se recolectaron en una de las casas de emergencia de broca ubicadas en las instalaciones del CICAFFE. En las mismas se colocaban frutos brocados en cajas que permitían la salida del insecto, el cual al dirigirse hacia la luz era detenido en mallas blancas, donde podía ser recolectado en grandes cantidades.

4.2.2.1. Desinfección de las brocas

Una vez en el laboratorio, se tomaron aproximadamente 1000 brocas para someterlas a un proceso de desinfección. Los insectos se colocaron en bolsas de tergal, se sumergieron por 1 minuto en una solución de cloruro de benzalconio al 2% y se lavaron por 5 segundos en agua destilada, luego se repitió la inmersión por 1 minuto en la solución de cloruro de benzalconio al 2% y el lavado de 5 segundos en agua destilada. Finalmente, se colocó la bolsa de tergal con las brocas frente a un ventilador hasta que estas estuvieron secas. Las brocas que mostraron verse afectadas por el proceso de desinfección fueron descartadas.

4.2.2.2. Aplicación del hongo entomopatógeno

Los individuos seleccionados se colocaron sobre papel toalla en dos cajas plásticas de 40 x 30 cm, correspondientes al tratamiento con el hongo y al tratamiento control; en una se colocó aproximadamente el doble de brocas que en la otra. La caja con menos brocas se asperjó con 5 ml de agua destilada estéril, luego de lo cual se pasaron 30 brocas a dos placas Petri (15 a cada una) que sirvieron como controles. La caja que contenía mayor cantidad de insectos fue asperjada con 8 ml de un cultivo líquido de *B. bassiana* con una concentración de 1.25×10^7 esporas/ml que llevaba 4 días de crecimiento en un fermentador tipo II. De esta caja se tomaron brocas suficientes para 6 repeticiones con 15 individuos cada una. Todas las placas Petri de los dos tratamientos contaban con un papel filtro en su interior, el cual se humedeció con 2 ml de agua destilada estéril momentos antes de colocar las brocas, para

formar una cámara húmeda. Las placas se sellaron con papel parafilm® y se colocaron en un cuarto a 22°C, donde fueron evaluadas al cabo de 10 días.

5. RESULTADOS

5.1. FASE I

5.1.1. Elaboración de los fermentadores

5.1.1.1. Fermentadores tipo I

Los fermentadores tipo I funcionaban correctamente en lo que al flujo de aire y agitación del medio se refiere. En la figura 5.1 se presenta uno de los fermentadores tipo I.

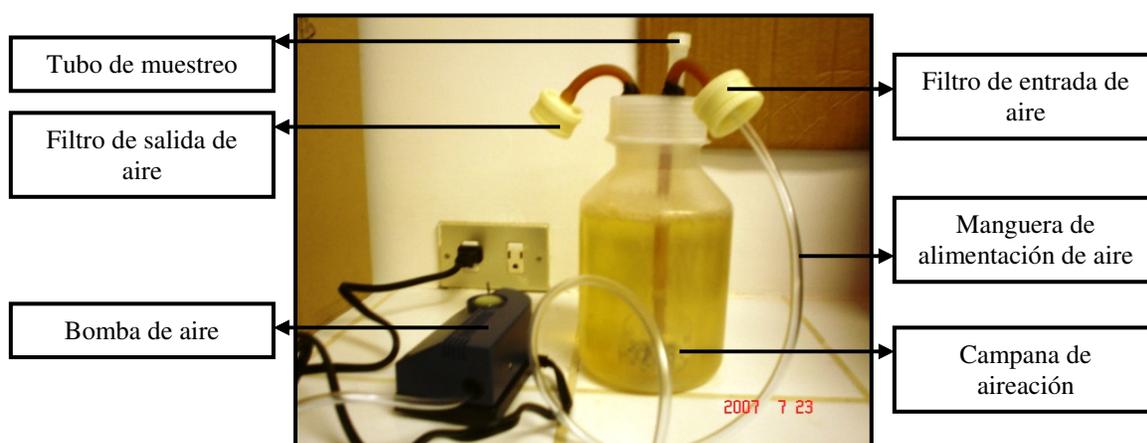


Figura 5.1. Fermentador tipo I para la producción de *Beauveria bassiana*.

A pesar del correcto funcionamiento, sin embargo, se encontró que ocurría una importante contaminación cuando se realizaban cultivos en estos sistemas. La contaminación se debía, según se observó al microscopio, a una bacteria de apariencia cocoide, cuya identificación será discutida más adelante.

5.1.1.2. Fermentadores tipo II

El segundo tipo de fermentadores que se diseñó (figura 5.2) demostró ser efectivo para el uso requerido, pues permitía una adecuada aireación y agitación del medio. Según lo observado se determinó incluso que la agitación era mejor que en los fermentadores tipo I, probablemente porque la forma de los erlenmeyers favorecía la circulación del líquido.

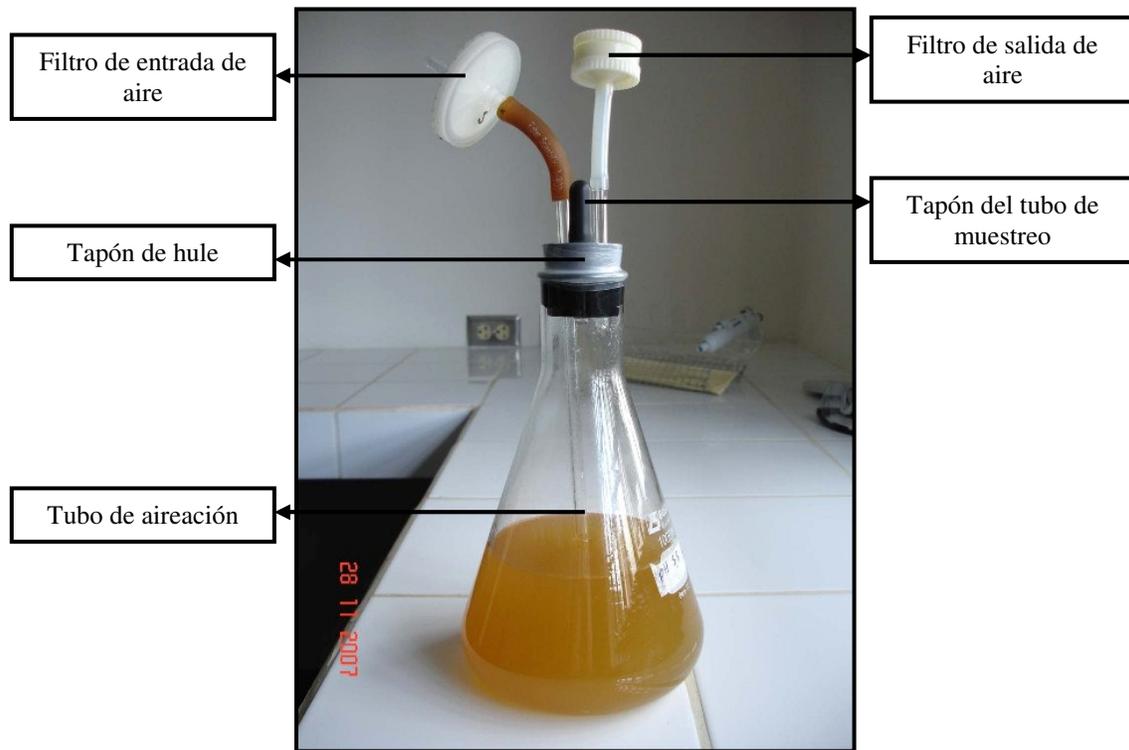


Figura 5.2. Fermentador tipo II para la producción de *Beauveria bassiana* (no está conectado a la bomba de aire)

5.1.2. Ensayos de prueba con los fermentadores

5.1.2.1. Pruebas de cultivo con los fermentadores tipo I

Al evaluar las pruebas 1,2,3,4 y 5 realizadas con este tipo de fermentadores se observó un grado de contaminación muy alto. Aunque en estas no se introdujo aire al sistema (pruebas 2 y 4), se cambió el inóculo (prueba 3) y se cambiaron las mangueras (prueba 5), la contaminación seguía siendo un gran problema. Fue hasta la prueba 6 que se consiguió una disminución marcada del nivel de contaminación en el medio. En esta última prueba, además de disminuir la contaminación, se alcanzó el mejor rendimiento de esporas/ml en el medio de cultivo.

Un análisis detallado de las mangueras que se cambiaron y de las paredes interiores de los fermentadores evidenció la formación de biofilms en la superficie de estos materiales. Estas

formaciones de microorganismos no pudieron ser totalmente removidas cuando se trató de limpiar los mismos.

5.1.2.2. Pruebas de cultivo con los fermentadores tipo II

En estas pruebas el nivel de contaminación era significativamente menor al que se presentaba en los fermentadores tipo I. Incluso se observó que la cantidad de bacterias en el medio disminuía con el tiempo hasta casi desaparecer al final.

De manera contrastante se logró observar por primera vez una concentración importante de esporas en los medios de cultivo. Utilizando un microscopio de campo claro se observaron estructuras de forma irregular, identificadas como blastosporas, y algunos segmentos de micelio con distintos niveles de desarrollo y ramificación (figura 5.3).

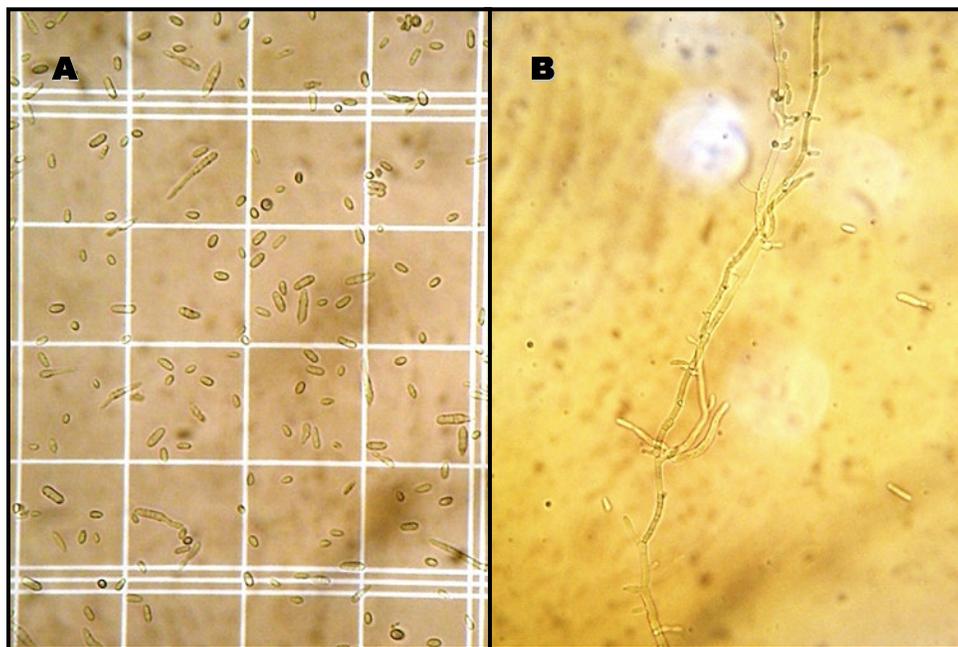


Figura 5.3. Estructuras de *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido: blastosporas (A) y micelio (B). Aumento: 400x.

En la prueba 1, donde se utilizó como inóculo una asada del hongo tomada de una placa de PDA, el crecimiento fue menor que en la prueba 2, donde por primera vez se usó un inóculo líquido. En ambos casos el control en agitación se desarrolló en una proporción menor. Los datos se muestran en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Rendimientos obtenidos en las pruebas hechas con los fermentadores tipo II.

Prueba N°	1		2				
	Fermentador	Control	pH 4,8	pH 5,5	pH 6,2	Control	
Esporas/ml	Día 4	3,48E+07	1,76E+07	1,07E+08	1,13E+08	1,24E+08	3,90E+07
	Día 5	3,05E+07	1,70E+06	7,83E+07	8,68E+07	9,20E+07	3,95E+07

Es importante destacar el hecho de que la concentración de esporas/ml cuantificada en las dos pruebas que se muestran en la tabla 5.1 es mayor en el día 4 que en el día 5, excepto para el control en agitación de la prueba 2.

5.1.3. Evaluación de agentes antiespumantes

Cuando los fermentadores se pusieron en funcionamiento, resultó evidente que el aceite comercial de soya era más efectivo que el aceite Spray Tech®, pues en el medio en que se adicionó el primero no se presentó acumulación de espuma mientras que en el segundo sí. De las distintas concentraciones utilizadas, se observó que 0.5ml/l (0.05v/v) eran suficientes y no era una cantidad excesiva, pues en concentraciones muy altas el aceite hacía que la limpieza del fermentador fuera más difícil.

5.1.4. Identificación del microorganismo contaminante

Las placas de PDA que se inocularon a partir de medios contaminados, tanto inoculados como no inoculados con *B. bassiana*, no resultaron de utilidad en el aislamiento del microorganismo. En las que provenían de medios inoculados solo se dio el crecimiento del hongo entomopatógeno, mientras que en las que se realizó un rayado con medio contaminado que no fue inoculado no se observó crecimiento alguno.

Las placas Petri con agar de recuento estándar, a diferencia de las de PDA, permitieron obtener resultados positivos. Al cabo de 3 días de haber realizado la inoculación, se observaron en la superficie del medio gran cantidad de colonias bacterianas con forma irregular y color crema, así como dos pequeñas colonias de color anaranjado (figura 5.4). El centro de tales colonias se ubicaba en la línea de rayado que se realizó con el asa.



Figura 5.4. Placa con ARE en el que se observó crecimiento bacteriano. Se distinguen dos tipos de colonias.

Con ayuda de un microscopio óptico fue posible observar que las colonias color crema estaban formadas por bacterias de morfología cocoide, mientras que las colonias anaranjadas estaban formadas por bacilos. La forma de los cocos correspondía a la forma del microorganismo que contaminaba los fermentadores, mientras que el bacilo claramente era distinto de éste.

Mediante la tinción de Gram, se determinó que los cocos eran Gram+, pues su color morado los hacía contrastar claramente con los bacilos, cuyo color rojizo los identificó como Gram- (ver figura 5.5). Gracias a la tinción se observó además que los cocos tenían una tendencia a agruparse en conjuntos racimosos. Cuando se agregó una gota de peróxido de hidrógeno a una de las colonias color crema, en la prueba de la catalasa, se observó de inmediato una violenta formación de burbujas. La misma prueba con una de las colonias anaranjadas resultó en una mínima formación de burbujas, además de muy lenta.

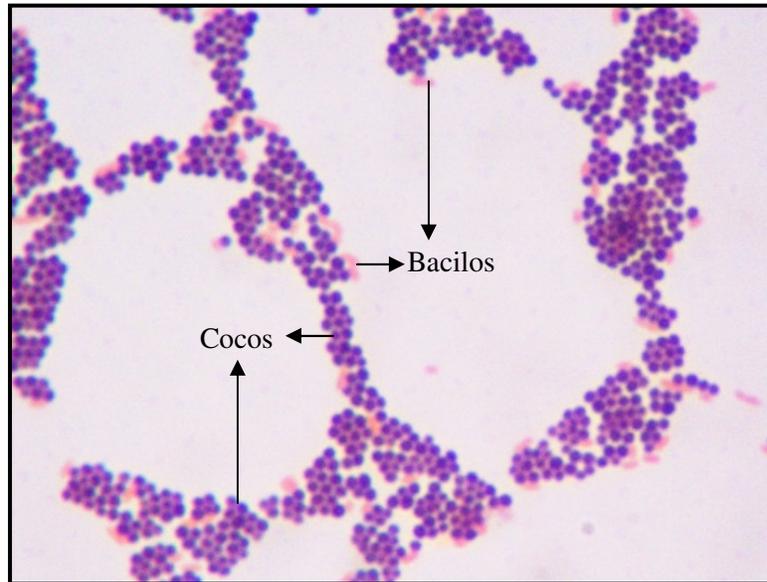


Figura 5.5. Células bacterianas observadas al microscopio luego de realizarles la tinción diferencial de Gram. Nótese los cocos Gram+ y los bacilos Gram-. Aumento: 1000x.

5.2. FASE II

5.2.1. Evaluación de la fermentación sumergida de *Beauveria bassiana*

En los seis ensayos cuyos resultados se describen a continuación la contaminación bacteriana no causó los problemas que se presentaron en la fase I. Aunque generalmente en el día dos se detectó un mínimo nivel de crecimiento de la bacteria cocoide, para los días tres y cuatro prácticamente había desaparecido, mientras que la concentración de esporas de *B. bassiana* había aumentado exponencialmente.

5.2.1.1. Evaluación de diferentes medios de cultivo

El desarrollo del hongo entomopatógeno fue muy diferente en todos los sustratos, como se muestra en figura 5.6. En la primera evaluación (día dos) la mayor concentración se presentó en el tratamiento 2 donde se utilizó como fuente de nitrógeno peptona, mientras

que el medio químicamente definido presentaba el menor desarrollo del microorganismo. La evaluación del último día de cultivo mostró que la proliferación fue mejor en los tratamientos 3 ($2,77 \times 10^8$ esporas/ml) y 5 ($1,96 \times 10^8$ esporas/ml), donde se usó como fuente de nitrógeno extracto de levadura y cebada molida respectivamente.

En el tratamiento con triptona se observó en todas las evaluaciones un nivel considerable de contaminación por bacterias de diversa morfología, incluyendo cocos y bacilos.

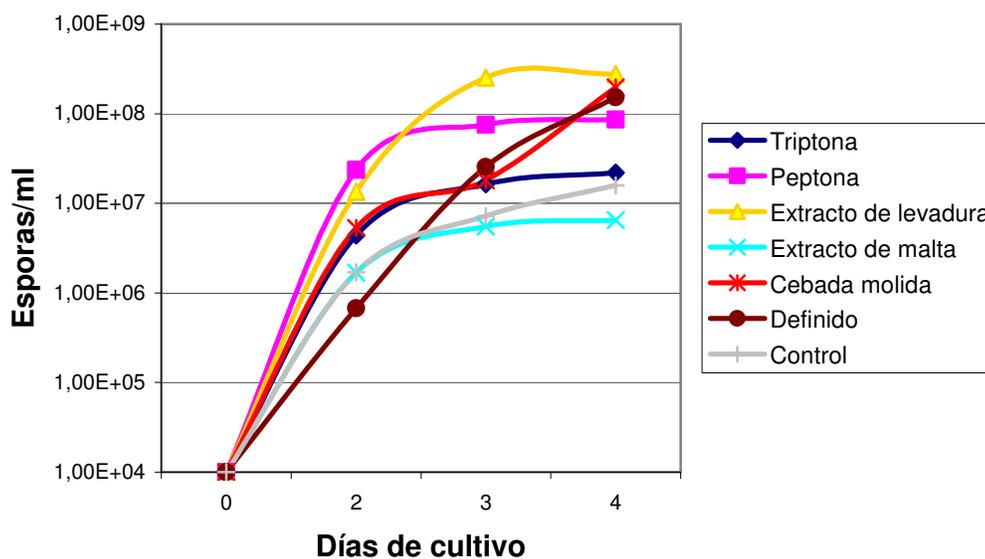


Figura 5.6. Evolución de la concentración de esporas de *B. bassiana* en siete medios líquidos de diversa composición (tratamientos) durante cuatro días de cultivo.

5.2.1.2. Evaluación de diferentes relaciones FC:FN

Al analizar la curva de crecimiento del hongo durante este ensayo (figura 5.7) se observa un comportamiento muy similar entre los tratamientos, aunque el control se desarrolla en una proporción mucho menor. La mayor concentración para todos los días de evaluación se presenta en el tratamiento 2, que estadísticamente es el único con un mejor rendimiento que todos los demás para el día final del ciclo de cultivo, cuando se determinó una concentración de $3,35 \times 10^8$ esporas/ml (figura 5.8).

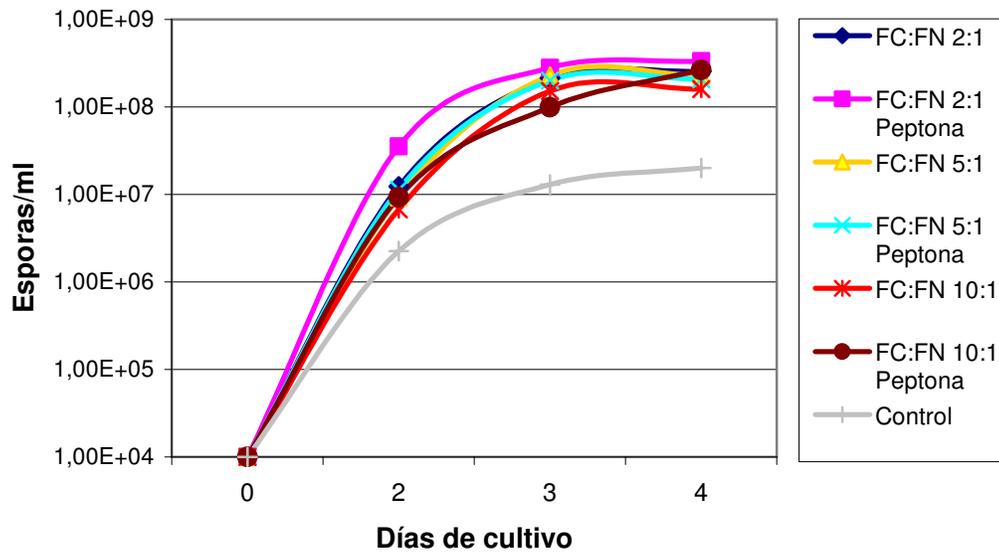


Figura 5.7. Evolución de la concentración de esporas del hongo *B. bassiana* en medios de cultivo con diferentes relaciones FC:FN durante cuatro días de cultivo.

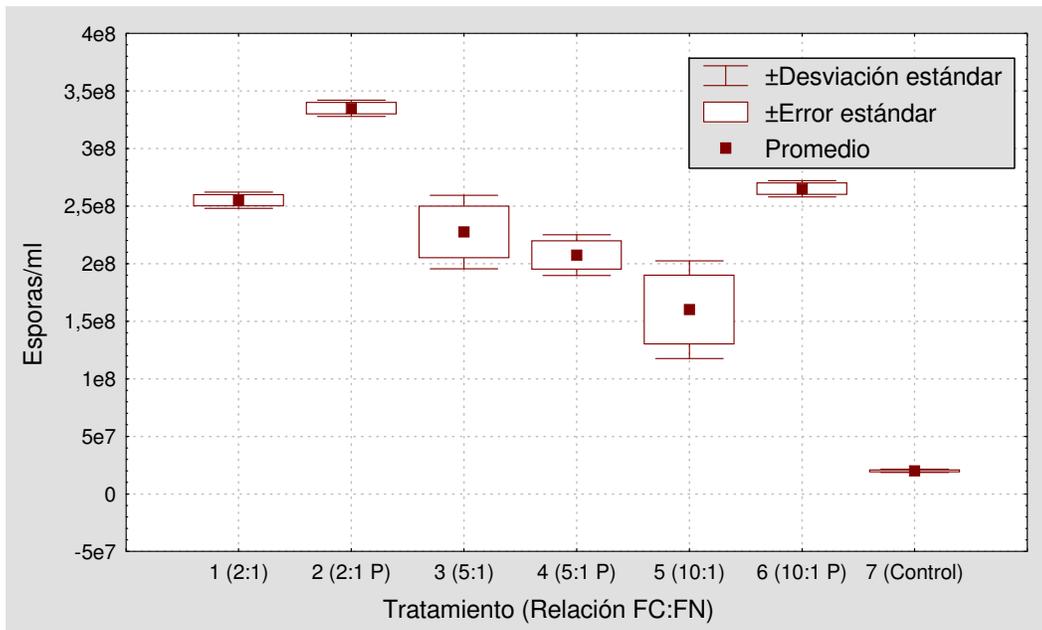


Figura 5.8. Concentración de esporas de *B. bassiana* en medios con distintas relaciones FC:FN luego de cuatro días de cultivo.

5.2.1.3. Evaluación de distintas concentraciones y relaciones FC:FN

El crecimiento del hongo en los seis primeros tratamientos de este ensayo fue muy parecido, como se observa en la figura 5.9. Al cabo de cuatro días de cultivo, el rendimiento de los diversos tratamientos fue similar, pues aparte del control solo el tratamiento 1 fue estadísticamente inferior a los demás (figura 5.10). Entre los restantes cinco tratamientos no se presentó diferencia estadística, de manera que se puede considerar que la producción fue básicamente la misma. Sin embargo, resulta interesante notar que los tratamientos 1 y 4, en los cuales se utilizó la más baja concentración de sacarosa (12,5 g/l), presentaron los menores rendimientos al final de la semana.

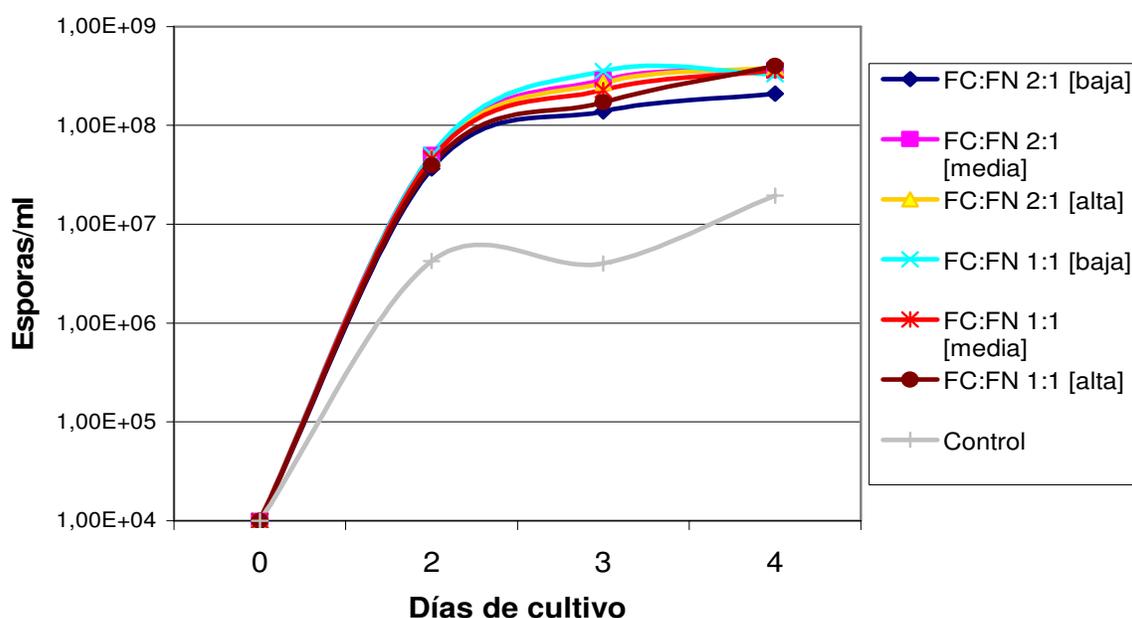


Figura 5.9. Evolución de la concentración de esporas del hongo *B. bassiana* en medios de cultivo con diferentes relaciones FC:FN y diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno.

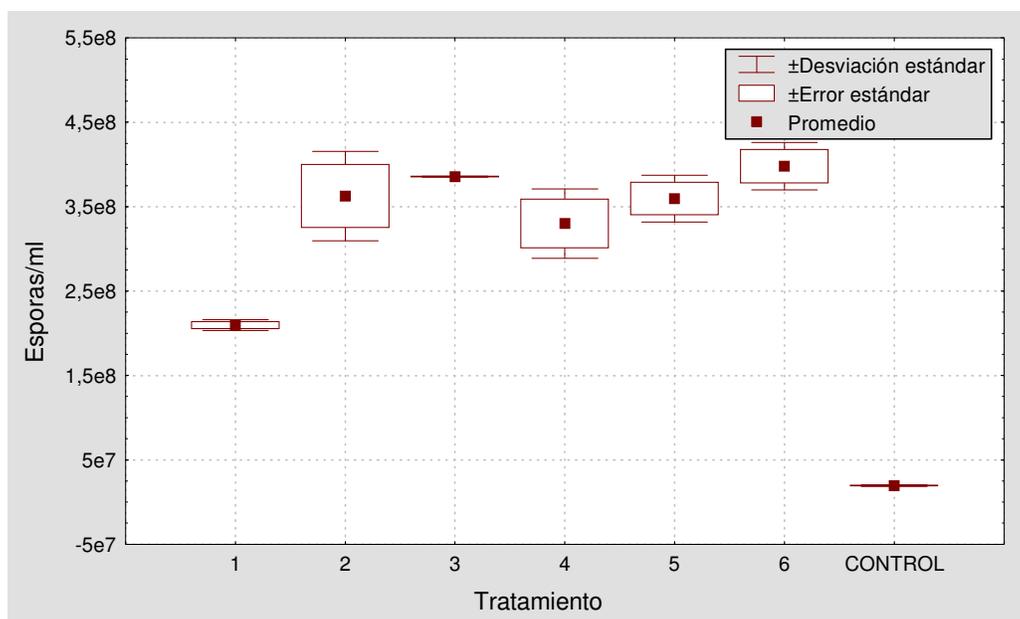


Figura 5.10. Concentración de esporas de *B. bassiana* en medios con distintas relaciones FC:FN y diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno luego de cuatro días de cultivo.

5.2.1.4. Evaluación de diferentes temperaturas de cultivo y condiciones de luminosidad

La temperatura influyó de manera muy evidente en el desarrollo del hongo en los fermentadores. La figura 5.11 muestra la concentración del entomopatógeno en los diferentes tratamientos a través del tiempo. La temperatura más baja (18°C) provocó un lento crecimiento, que al final sería incluso superado por el control en agitación. La temperatura intermedia (23°C) hizo que *B. bassiana* creciera de una manera similar a como lo hizo en ensayos anteriores, alcanzando la máxima concentración en el cuarto día de cultivo. Algo muy diferente ocurrió cuando la temperatura de cultivo fue más alta (28°C), pues el hongo alcanzó la mayor concentración en el medio tan solo tres días después de haber sido inoculado, disminuyendo ésta en el día cuatro como se observa en la figura 5.11.

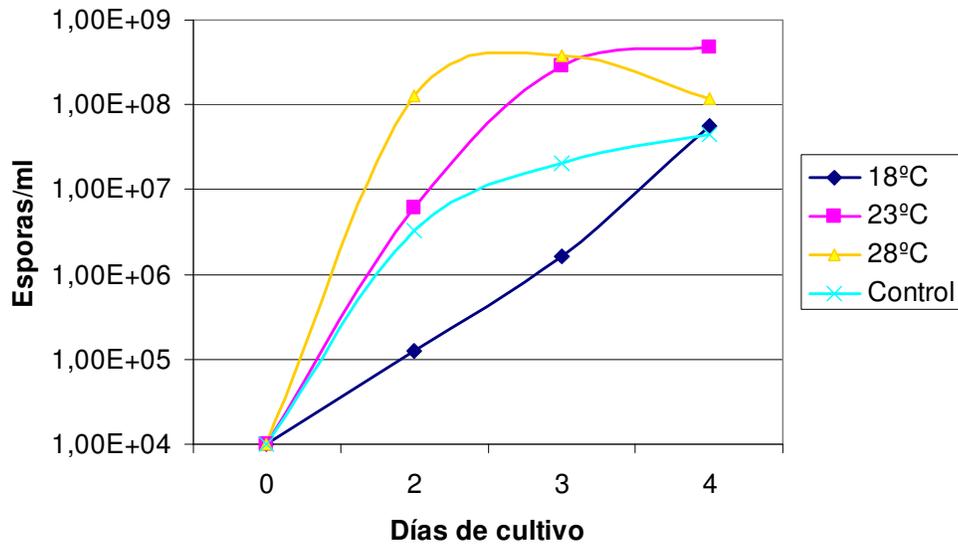


Figura 5.11. Evolución de la concentración de esporas del hongo *B. bassiana* en medios de cultivo con diferentes temperaturas.

A diferencia de lo ocurrido con la temperatura, la condición lumínica en que se llevó a cabo el crecimiento pareció influir muy poco o nada en el desarrollo del hongo. En los tratamientos que tenían temperatura media y alta, la variable luz/oscuridad no provocó diferencias significativas en la concentración. Por otra parte, aunque sí se observaron ligeras diferencias entre los tratamientos luz/oscuridad a baja temperatura y también ligeras diferencias entre luz/oscuridad control, posiblemente intervinieron otros factores que serán discutidos más adelante. En la figura 5.12 se observa el crecimiento promedio en luz y oscuridad.

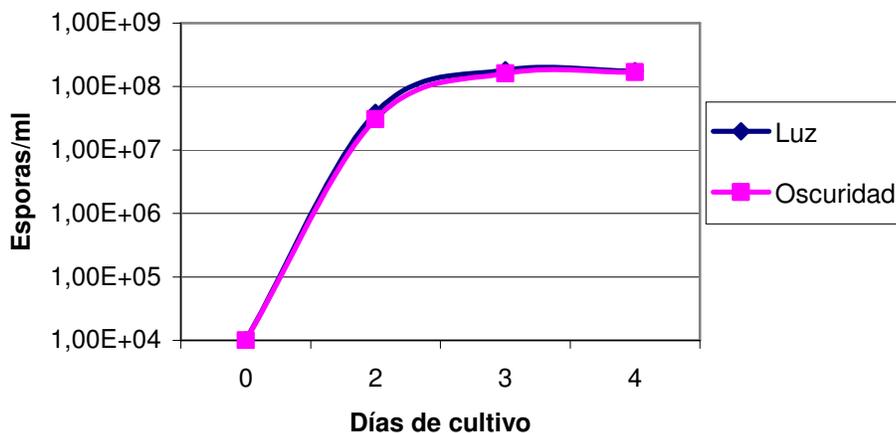


Figura 5.12. Evolución de la concentración de esporas de *B. bassiana* en medios de cultivo líquidos bajo dos condiciones lumínicas.

5.2.1.5. Evaluación de distintos valores de pH

En la figura 5.13 se observa claramente que el desarrollo del hongo en los fermentadores fue muy similar sin importar el pH inicial. Estadísticamente, al analizar las concentraciones de los cuatro tratamientos de este ensayo en el día 4, no se encuentran diferencias entre los mismos, excepto con el control en agitación.

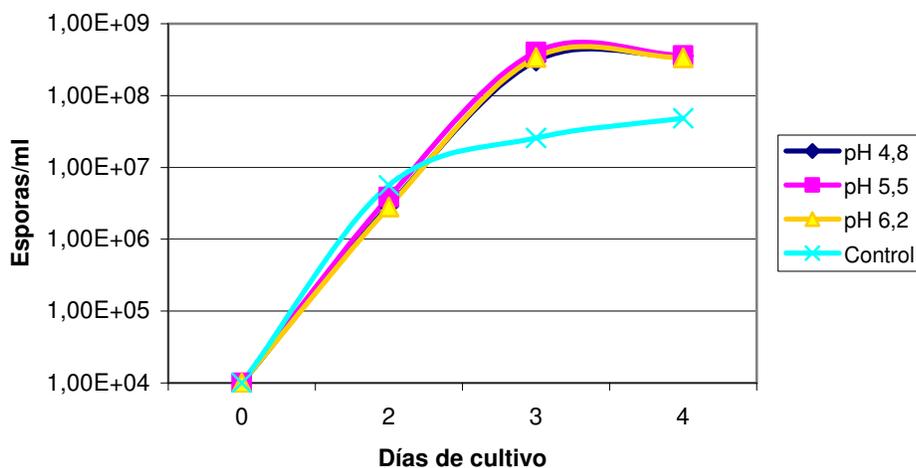


Figura 5.13. Evolución de la concentración de esporas del hongo *B. bassiana* en medios de cultivo con diferentes valores iniciales de pH.

En la figura 5.14 se muestra el comportamiento del pH en los cuatro tratamientos de este ensayo. Aunque en un principio se encontraban distanciados, el pH de los tres tratamientos converge a un valor similar hacia el final del ciclo de cultivo, aproximadamente 4,5. El pH del control en agitación no desciende tanto como los demás, finaliza con un valor de 5,1.

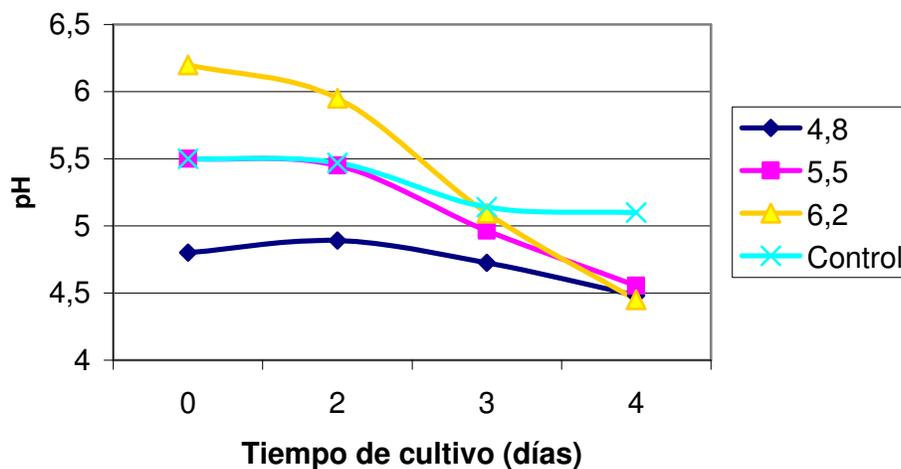


Figura 5.14. Evolución del pH en los tratamientos en los que se evaluó el efecto de este parámetro.

5.2.1.6. Evaluación del crecimiento de diferentes cepas

Las evaluaciones realizadas el día 2 mostraron un crecimiento similar de las 3 cepas en este ensayo, aunque se presentó una pequeña diferencia significativa entre GHA y D0101. En los siguientes días, sin embargo, el comportamiento cambió. Para el día 3, la concentración de la cepa Sar fue muy superior a las de las otras dos, entre las cuales no se observó diferencia estadística. Al llegar al último día de cultivo, la cepa Sar alcanzó el doble o más de la concentración de las otras cepas. Entre D0101 y GHA no se presentó diferencia significativa. La evolución de las cepas se presenta en la figura 5.15.

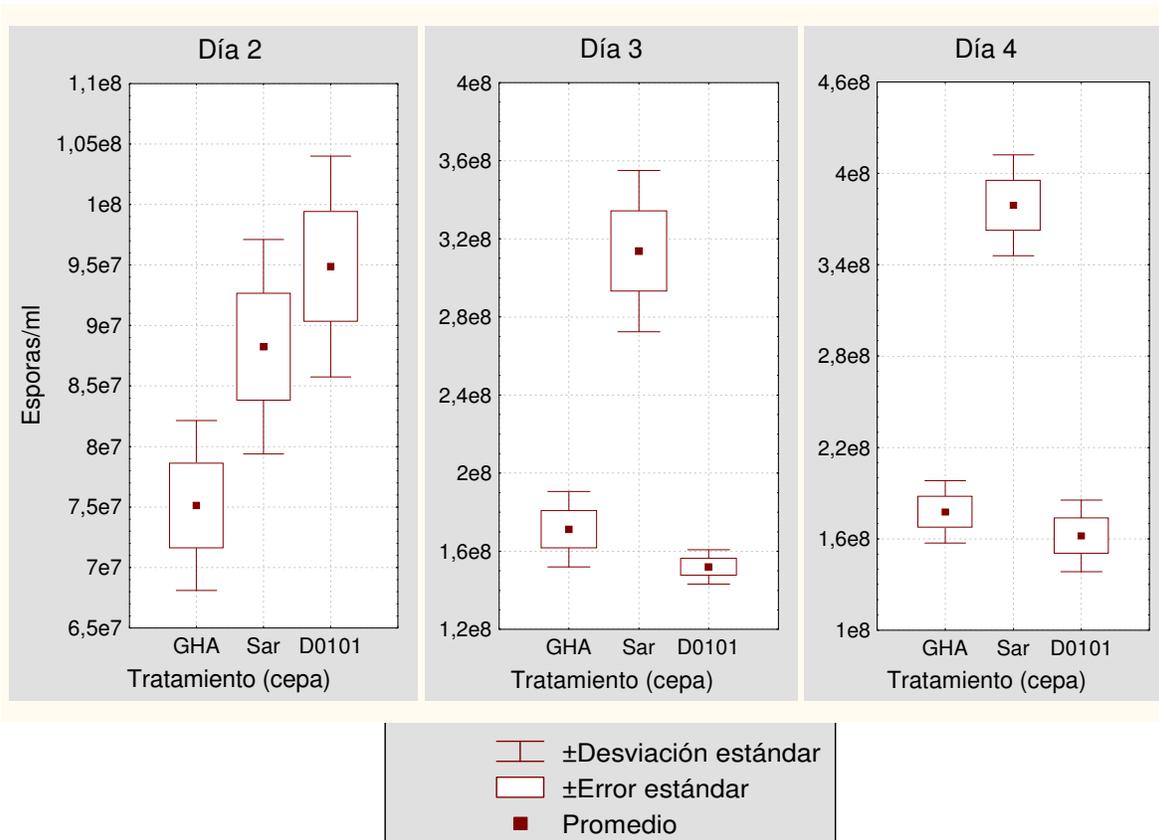


Figura 5.15. Rendimiento de diferentes cepas de *B. bassiana* cultivadas en medio líquido.

5.2.2. Bioensayo sobre broca del café

Al cabo de 10 días de incubación de las brocas tratadas con blastosporas de *B. bassiana* se observó que la mayoría de los individuos se hallaban cubiertos en mayor o menor medida con una capa blanca algodonosa. Del total de brocas tratadas, un 86.7% mostraba colonización externa por parte de las estructuras del hongo. Una de las placas control presentó dos individuos muertos con la misma capa blanca; los datos del bioensayo se presentan en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Resultados del bioensayo de infección de brocas con un cultivo líquido de *B. bassiana* después de 10 días de inoculado.

Tratamiento	1.25x10 ⁷ esporas/ml						Control	
Repetición	1	2	3	4	5	6	1	2
Brocas parasitadas	13	11	14	13	12	15	2	0
Promedio	13						1	
Porcentaje de mortalidad	86.7%						6.7%	

Cuando se examinaron los insectos con ayuda de un estereoscopio, se observó que la capa blanca era diferente entre los individuos. En algunos casos se trataba de un crecimiento micelial filamentososo muy espeso, mientras que en otros tenía una apariencia polvosa en forma de pequeños gránulos (figura 5.16).

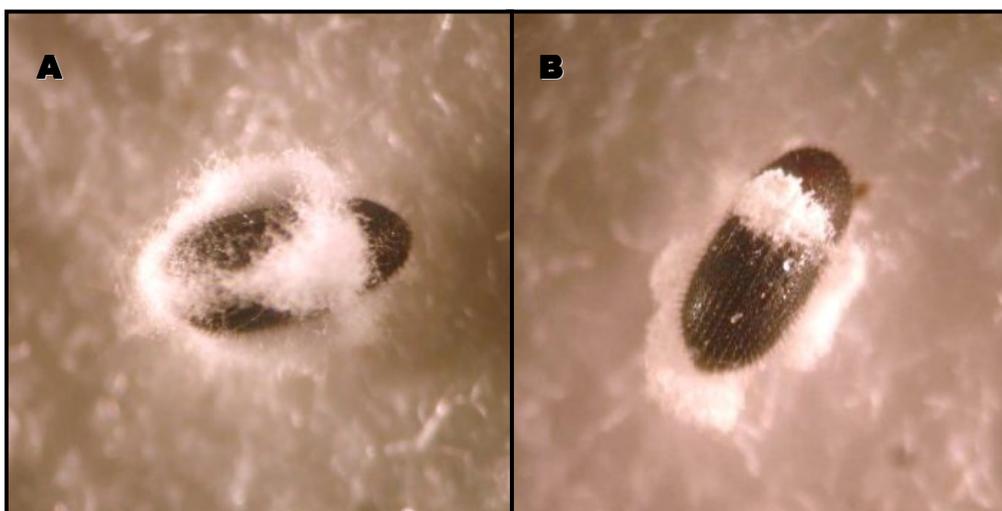


Figura 5.16. Adultos de la broca del café con crecimiento externo del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* al cabo de 10 días de haber sido inoculadas. Obsérvese el crecimiento micelial (A) y la esporulación (B). Aumento: 20X.

6. DISCUSIÓN

6.1. FASE I

6.1.1. Elaboración de los fermentadores

El uso de fermentadores o biorreactores con control automático de las condiciones de cultivo es la técnica más adecuada para producir microorganismos a gran escala. Pese a esto, los cultivos discontinuos (batch) pueden ser utilizados de igual manera para verificar y corregir cuando sea necesario las metodologías de laboratorio y así dar paso al escalado del proceso (Taborsky, 1992). Los fermentadores diseñados y utilizados en esta investigación constituían un sistema discontinuo, aunque no totalmente cerrado, donde *Beauveria bassiana* se desarrollaba bajo el efecto de distintos parámetros ambientales.

Los fermentadores industriales requieren de una gran cantidad de equipo especializado para garantizar el óptimo desarrollo del microorganismo de interés. Generalmente se trata de estructuras cilíndricas dotadas de una gran cantidad de válvulas, tuberías y controles, las cuales forman parte de sistemas como el de enfriamiento, esterilización, control de temperatura, control de pH, aireación y agitación (Madigan *et al.*, 2004). En los fermentadores elaborados como parte de este proyecto, muchos de estos sistemas no existían, ya fuera por la dificultad de instalarlos o porque debido a la naturaleza del fermentador no eran necesarios. Los fermentadores eran esterilizados dentro de autoclaves industriales, de manera que no contaban con equipo para la esterilización y enfriamiento. El control de la temperatura era externo, pues los cultivos se realizaron en un cuarto de crecimiento con control ajustable de la temperatura. El pH del medio de cultivo era monitoreado, aunque no se ajustaba automáticamente. Lo que si necesitaron ambos tipos de fermentadores fue un sistema que permitiera el ingreso de aire estéril al sistema, y además una adecuada agitación del medio. Esto se logró mediante la bomba de aire, los filtros de membrana y los tubos o varillas del sistema de aireación.

Debido al pequeño volumen de los fermentadores (1 litro), la sola presión con que ingresaba el aire era suficiente para agitar el medio de cultivo, que circulaba hacia arriba en la zona central de los fermentadores y descendía en el espacio cercano a las paredes del contenedor,

para luego subir nuevamente. Aunque la mayoría de los fermentadores de escala industrial utilizan dispositivos de agitación mecánicos, denominados impulsores, existe otro tipo de fermentadores que llevan a cabo la agitación del medio mediante la inyección de aire en la base de los mismos. A estos últimos se les denomina fermentadores de torre o “air lift” (Taborsky, 1992). Este mismo principio fue el que se utilizó en la elaboración de los fermentadores, aunque debido a la forma de los mismos se necesitó de un flujo de aire mayor que el utilizado normalmente, pues se dice que el diseño para este tipo de agitación debería ser el de un cilindro largo y delgado, y las botellas y erlenmeyers utilizados no tenían esa forma.

6.1.2. Pruebas con los sistemas de cultivo

En las pruebas realizadas durante la primera fase la contaminación fue el mayor impedimento para el desarrollo del hongo. Gracias a las pruebas 2 y 4 quedó claro que esta contaminación no provenía del aire introducido por las bombas, pues incluso en los medios que se mantuvieron como un sistema cerrado se observó contaminación. Además, los filtros utilizados para esterilizar el aire que entraba a los fermentadores tenían poros de $0.2\mu\text{m}$, un tamaño menor al de casi la totalidad de las especies de bacterias conocidas, por lo que es muy poco probable que la contaminación se haya originado del aire.

Mediante esta serie de pruebas se llegó a la conclusión de que la bacteria contaminante estaba presente siempre en los fermentadores en forma de biofilms, en los cuales un porcentaje de los individuos que los conformaban eran capaces de resistir al proceso de autoclavado. Aunque el tiempo de esterilización en la autoclave era de 25 minutos, probablemente no se alcanzaban la temperatura y presión establecidos para asegurar la muerte de absolutamente todo microorganismo.

Los materiales utilizados en la construcción de los fermentadores tipo I eran plástico (polipropileno) y látex, además del silicón usado para sellar; se trataba de materiales con superficies porosas hasta cierto grado, de manera que constituían un sustrato ideal para la colonización bacteriana. En contraste, en los fermentadores tipo II se cambió el

polipropileno por vidrio, y lo que antes habían sido mangueras se cambió por tubos de vidrio, de manera que la única superficie porosa presente en este segundo tipo de fermentadores era el tapón de hule. Probablemente este cambio en los materiales fue lo que provocó la gran disminución en el grado de contaminación, permitiendo además un adecuado crecimiento de *Beauveria bassiana*.

6.1.3. Evaluación de agentes antiespumantes.

Con el desarrollo de sistemas de agitación y aireación cada vez más eficientes para procesos de fermentación, el control de la espuma se ha convertido en un tema serio. La producción de espuma ocurre cuando la tensión superficial del medio se baja; la viscosidad alta y la presencia de moléculas de cadenas grandes ayudan a la formación de espuma (DeBach, 1984). Aunque los fermentadores utilizados en esta investigación eran muy pequeños, los altos rendimientos y el rápido desarrollo del hongo hicieron necesaria, como se observó en un principio, la adición de un agente antiespumante. Cabe destacar que en los biorreactores comerciales, la liberación de antiespumante al medio se da cuando los sensores del aparato detectan cierta cantidad de espuma, y no se añaden en un principio al medio como se hizo en esta investigación.

En la industria los antiespumantes más utilizados son emulsiones de silicona, sin embargo, también se utilizan aceites animales o vegetales (DeBach, 1984). Este último fue el caso del aceite de soya utilizado que demostró ser mejor que el aceite agrícola Spray Tech. A pesar de que entre sus componentes se encuentra aceite vegetal, el aceite agrícola contiene además agentes emulsificantes que probablemente interfirieron con la actividad antiespumante, al permitir que el aceite se dispersara en el agua. En cuanto a la concentración que se demostró ser ideal, puede decirse que 0.05% v/v es un valor razonable, pues Jackson *et al.* (2003), reportaron la utilización de 0.01% (v/v) del antiespumante #289 de Sigma en un fermentador de 20 litros para la producción de *Paecilomyces fumosoroseus*, concentración similar a la utilizada en esta investigación, considerando la gran diferencia entre las sustancias utilizadas.

6.1.4. Identificación del organismo contaminante

Los resultados obtenidos mediante la tinción de Gram y la prueba de la catalasa permitieron la identificación presuntiva de la bacteria contaminante, a pesar de la sencillez de las mismas. Al parecer, se trataba de una bacteria perteneciente al género *Staphylococcus*.

Como se mencionó en los resultados se identificó a la bacteria contaminante como un coco Gram+. La aireación del medio que se llevaba a cabo en los fermentadores permitió descartar la posibilidad de que se tratara de alguno de los géneros de cocos gram positivos anaeróbicos, pues estos no hubieran crecido en tales condiciones. Además gracias a la reacción catalasa + que mostró la colonia cultivada en agar de recuento estándar se logró dejar de lado los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, pues estos son catalasa -. Por último, se observó que la células se juntaban en grupos racimosos, y esta es una característica del género *Staphylococcus* (de ahí deriva su nombre) pues esta bacteria se divide en dos planos (Todar, 2005).

Resulta importante tomar en cuenta la descripción de las bacterias del género *Staphylococcus* en el ámbito clínico, pues se les caracteriza como bacterias con una gran habilidad para colonizar dispositivos prostéticos como catéteres y otro tipo de implantes plásticos. Esta capacidad de formar biofilms en materiales plásticos, gracias a la secreción de ácido teicóico, explica porqué los fermentadores tipo I presentaban tan altos niveles de contaminación, máxime considerando que la botella de polipropileno no poseía un recubrimiento especial como si ocurre con los dispositivos médicos (Todar, 2005).

En la figura 6.1 se presenta una comparación entre una tinción realizada en la investigación y la tinción de un cultivo de *Staphylococcus sp.* Respecto a la primera es importante destacar que los cocos aparecen morados y no azules debido a una sobreexposición al agente decolorante que se utiliza normalmente en el proceso de tinción; a pesar de esto se observa claramente el contraste con el color rosado de los bacilos Gram -.

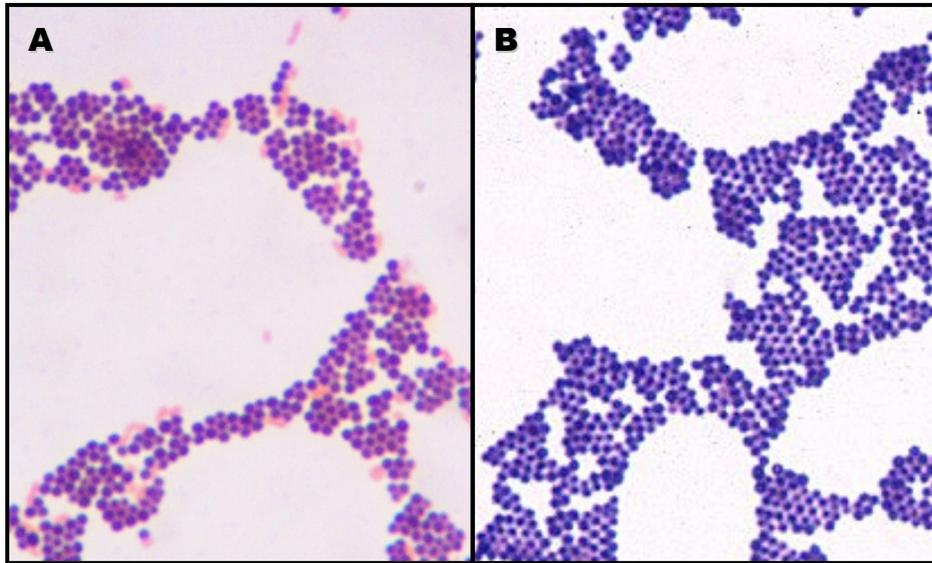


Figura 6.1. Fotografía de dos tinciones realizadas a cultivos de bacterias. A) Bacterias aisladas en los medios líquidos de la investigación. B) *Staphylococcus sp* (tomado de Hocquet, 2004). Aumento: 1000x.

La marcada disminución en la concentración de la bacteria que se observaba conforme el hongo entomopatógeno se propagaba en el medio pudo ser consecuencia directa del desarrollo del mismo. Esto porque se sabe que este hongo tiene la capacidad de producir una amplia gama de sustancias antibióticas, que le resultan indispensables en la naturaleza para evitar que las bacterias intestinales que se encuentran dentro del insecto que parasita le obstaculicen su desarrollo y colonización (Min-Cho *et al.*, 2006).

Beauveria bassiana produce una amplia gama de metabolitos secundarios que tienen efectos muy diversos. Algunos como la bassianina y tenellina son sustancias tóxicas para el insecto hospedero, mientras que otras como las beauvericinas y la oosporeina muestran actividad antibiótica (Carballo y Guharay, 2004; Min Cho *et al.*, 2004). Es posible que durante los ensayos de cultivo realizados como parte de esta investigación ocurriera la liberación al medio de algunas de estas sustancias de naturaleza antibiótica, de manera que para cada ciclo de cultivo conforme aumentaba la densidad de población del hongo también aumentaba la cantidad de antibióticos en el medio, provocando una disminución gradual en la cantidad de bacterias. La oosporeina, una dibenzoquinona que oxida proteínas y aminoácidos, tiene un efecto antibiótico específico sobre las bacterias Gram+ (no afecta Gram-) (Min Cho *et al.*, 2004). Tomando en cuenta el hecho de la bacteria que

contaminaba los fermentadores pertenece al grupo de las Gram+, es muy probable que este metabolito u otro de naturaleza semejante sea la razón de la eliminación de la bacteria que se observó hacia el final de cada ensayo.

6.2. FASE II

A lo largo de todas las pruebas que se realizaron en esta segunda etapa de la investigación se obtuvieron muy buenos rendimientos en los fermentadores (figura 6.2), tomando en cuenta que se trataba de sistemas muy sencillos. Como se puede observar en las curvas de crecimiento presentadas con anterioridad, en la mayoría de los casos la concentración de esporas que se obtuvo en los fermentadores era aproximadamente diez veces la concentración obtenida en los controles en agitación, con valores que rondaban los 400 millones (4×10^8) de esporas por mililitro de medio de cultivo. Esto indica claramente que las condiciones que se presentaban dentro de los fermentadores favorecían el desarrollo del hongo en mayor manera que las condiciones de aquellos cultivos que se encontraban en agitación.

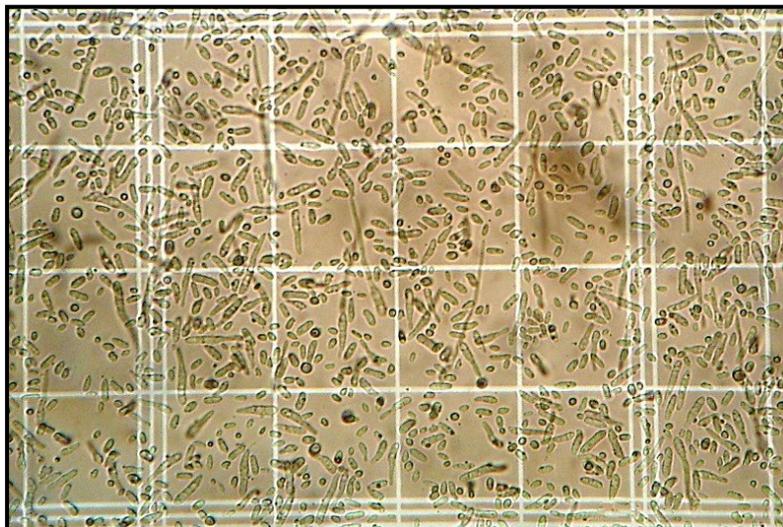


Figura 6.2. Fotografía de un cultivo líquido de *B. bassiana* al cabo de tres días de inoculado, que ilustra las altas concentraciones obtenidas en los fermentadores tipo II. Aumento: 400x.

El oxígeno disuelto en el medio es un nutriente esencial para aquellos organismos que se desarrollan en condiciones aeróbicas. Se trata de un nutriente que es muy poco soluble en medios líquidos, de manera que debe ser aportado continuamente al cultivo; esto puede realizarse mediante agitación o aireación forzada (Madigan *et al.*, 2004). Cuando un microorganismo se cultiva en medio líquido utilizando cristalería de laboratorio en agitación, como por ejemplo un erlenmeyer, se sabe que la tasa de transferencia o transporte de oxígeno (OTR por sus siglas en inglés) al medio es muy lenta, pues la interacción entre las dos fases está limitada a la superficie del líquido (Taborsky, 1992). Esto era lo que ocurría con los controles, donde esa menor cantidad de oxígeno daba como resultado el lento crecimiento del hongo. Mediante la disminución del volumen de líquido dentro del erlenmeyer hubiera sido posible aumentar la OTR, pero con el fin de mantener todos los tratamientos bajo las mismas condiciones esto no se hizo. En los fermentadores en cambio, el oxígeno era inyectado al medio por la bomba de aire, creándose una mayor OTR gracias a la formación continua de burbujas que ascendían desde el fondo del líquido. La tasa de aireación utilizada en la investigación era bastante alta, si se compara con otras investigaciones similares; este parámetro, representado como $v/v/m$, describe la relación entre el volumen de aire que entra al sistema cada minuto y el volumen de líquido presente en el mismo (Lozano *et al.*, 2007).

6.2.1. Evaluación de diferentes medios de cultivo

Algunos hongos, como el fitopatógeno *Colletotrichum truncatum*, deben crecer vegetativamente y luego diferenciarse para producir conidias. Este tipo de hongos requieren el agotamiento de los nutrientes esenciales para que se desencadene la esporulación, de manera que se benefician con los bajos niveles de nutrientes presentes en los medios pobres. Otras especies de hongos, por el contrario, se benefician de los medios nutricionalmente ricos con una acumulación óptima de biomasa, como es el caso de aquellos que producen blastosporas (Vega *et al.*, 2003; Jackson, 1997). *B. bassiana* se encuentra dentro de este grupo, y como se observó en los diferentes tratamientos con medios complejos, la producción de esporas ocurría prácticamente en el momento en que el sistema era inoculado.

Las marcadas diferencias de desarrollo que se presentaron en los distintos tratamientos de este ensayo tuvieron su origen en la variada naturaleza de las sustancias que se agregaron como fuente de nitrógeno y otras sustancias, pues la fuente de carbono fue igual para todos. La peptona es un digerido enzimático de tejidos animales que han sido hidrolizados en aminoácidos y péptidos; este producto se utiliza comúnmente como una fuente de nitrógeno orgánico en medios de cultivo microbiológicos para una gran variedad de hongos y bacterias. La triptona es un digerido pancreático de caseína, proteína que se obtiene de la leche. El extracto de malta es la porción soluble en agua de la cebada molida, la cual fue utilizada en su forma menos procesada en uno de los tratamientos. El contenido de carbohidratos de este extracto es muy alto, de los cuales gran cantidad son azúcares reducidos como la maltosa. El extracto de levadura es un derivado de células de levadura (*Saccharomyces*) soluble en agua. A diferencia de las peptonas de origen animal, el proceso de manufactura de este producto implica la autólisis de las células, es decir, la hidrólisis de las células es llevada a cabo por enzimas endógenas de las levaduras. Carbohidratos, aminoácidos, péptidos, vitaminas y micronutrientes son algunos de los componentes de este concentrado (BD Bionutrients, 2006).

El porcentaje de nitrógeno que hay en cada una de las sustancias evaluadas es muy variable y probablemente jugó un papel decisivo en el rendimiento final de cada tratamiento. Como se puede observar en la tabla 6.1, el extracto de malta contiene la menor concentración de nitrógeno, lo cual provocó que en este medio se diera el crecimiento más pobre de *B. bassiana*, incluso menor que el control. A pesar de que la triptona posee un alto contenido de nitrógeno, el reactivo utilizado pertenecía a un lote viejo del CICAPE, que había sido abierto en el 2005. Probablemente, la antigüedad del reactivo, además de provocar la pérdida de cualidades del mismo, fue la causa de la gran contaminación (mucho mayor que en otros tratamientos) que se presentó en este medio de cultivo. La peptona es la sustancia que presenta un mayor porcentaje de nitrógeno, con un 16%. Si se analiza la curva de crecimiento para este ensayo, se puede observar que esta sustancia fue la que permitió un desarrollo más rápido del hongo al inicio del cultivo, pero para los días 3 y 4 este disminuyó de manera notable. Puede ser que otro tipo de nutrientes que se necesitan en pequeñas cantidades, los micronutrientes, no se encontraban en la peptona en las cantidades necesarias para satisfacer las necesidades del microorganismo conforme pasaba el tiempo.

La gran diversidad de componentes del extracto de levadura, así como su alto contenido de nitrógeno crearon el balance necesario para que fuera en este sustrato donde ocurriera el mayor desarrollo del hongo. De igual manera, al tratarse de un material poco procesado, probablemente la cebada poseía tales características, que la convirtieron en el segundo mejor sustrato.

Tabla 6.1. Contenido de nitrógeno de algunas sustancias utilizadas comúnmente para la elaboración de medios de cultivo.

Sustancia	Triptona	Peptona	Extracto levadura	Extracto malta
Porcentaje de Nitrógeno	13.3%	16%	10.9%	0.3%

Fuente: Oxoid, 1998; BD Bionutrients, 2006.

6.2.2. Evaluación de diferentes relaciones FC:FN

Para este ensayo se decidió que los medios a evaluar serían dos, uno era el medio que permitió el mayor rendimiento en el primer ensayo, compuesto por azúcar y extracto de levadura, y el otro era un medio nuevo en el que además del azúcar se combinó el extracto de levadura con peptona como fuente de nitrógeno. Esta combinación se eligió al observar que durante el ensayo anterior el hongo creció inicialmente con mayor velocidad en el medio con peptona, posible evidencia de una rápida disponibilidad de nutrientes en este sustrato, a pesar de que globalmente no fue el mejor.

Después de cuatro días de cultivo, fue en el nuevo medio con peptona y extracto de levadura donde ocurrió el mejor desarrollo del hongo, como se observa en la figura 5.7. Este ha sido usado en otras ocasiones para la fermentación sumergida de *B. bassiana*, aunque a diferencia de la presente investigación, la fuente de carbono utilizada ha sido glucosa o dextrosa, recibiendo el medio el nombre de YPG o YPD respectivamente (Hegedus *et al.*, 1992; Haraprasad *et al.*, 2001).

Durante la realización de este y el siguiente ensayo se hizo referencia a la relación entre la cantidad de fuente de carbono y la cantidad de fuente de nitrógeno que se utilizaba en cada tratamiento, designada como FC:FN. Cabe destacar que no se trataba de la relación C:N como tal, pues debido a la falta de tiempo y equipo necesario, era muy difícil determinar la concentración exacta de cada uno de estos elementos en el medio, por lo que se indicaba la relación entre las sustancias que se usaban como fuente de los respectivos elementos. Vega *et al.* (2003) realizaron un estudio similar donde utilizaron concentraciones de carbono altas y bajas (36 y 8 g/l respectivamente) y distintas relaciones C:N (10:1, 30:1 y 50:1) para evaluar el rendimiento de varios hongos entomopatógenos. Encontraron que en general, el mejor crecimiento se presentaba en medios con alta concentración de carbono y relaciones C:N de 10:1. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en esta investigación, pues de manera similar, los mejores rendimientos se obtuvieron en el medio con un relación FC:FN más pequeña, y aunque no se observaron grandes diferencias provocadas por la concentración, los tratamientos con concentraciones medias y altas permitieron obtener rendimientos superiores a aquellos con bajas concentraciones de carbono.

6.2.3. Evaluación de diferentes temperaturas de cultivo y condiciones de luminosidad

Con base en los resultados arrojados por este ensayo, la variable luz/oscuridad no pareció tener un efecto importante en el desarrollo del hongo en estudio. Aunque se observó una pequeña diferencia entre los tratamientos 1 y 2 (con temperatura de cultivo de 18°C) y los tratamientos 7 y 8 (controles), ésta pudo obedecer a otros factores diferentes. En el caso de los controles en agitación, durante el transcurso de los 4 días de cultivo se presentó un problema con el agitador orbital, de manera que el control en oscuridad debió ser colocado en otro equipo en el cual no se pudo regular la velocidad de agitación. Esta diferencia de agitación probablemente originó la variación en el desarrollo. Por otra parte, los tratamientos que se mantuvieron a baja temperatura presentaron un desarrollo muy lento del hongo, como se observa en la curva de crecimiento. Debido a esto, ocurrió un mayor desarrollo de las bacterias que normalmente estaban presentes a muy bajas concentraciones en ambos fermentadores, pero el grado de contaminación fue mayor en el tratamiento 2 (en oscuridad) provocando posiblemente un mayor impedimento en el crecimiento del hongo.

Contrariamente a lo ocurrido con la luminosidad, la temperatura tuvo un efecto determinante en el crecimiento del hongo, lo cual se evidenció al ser la concentración del hongo en el medio estadísticamente diferente para las tres temperaturas. Al igual que ocurre con otros organismos, las tasas de desarrollo de los hongos entomopatógenos varían dependiendo de la temperatura, de acuerdo a las características de la cepa, incluso dentro de una misma especie (Shimazu, 2004). *Beauveria bassiana* puede ser encontrado en un amplio rango de temperaturas que va desde los 15°C a los 30°C (Godoy *et al.*, 2007), sin embargo, numerosos estudios han demostrado que un número considerable de aislados de *B. bassiana* presentan la mayor tasa de crecimiento a 28°C, un poco por encima del rango común de otros entomopatógenos, que se ubica entre los 20°C y 25°C (Shimazu, 2004). Esto concuerda con los resultados obtenidos, pues es evidente que la cepa utilizada en la investigación resultó favorecida en su desarrollo por la temperatura más alta evaluada, que fue de 28°C. En investigaciones realizadas en el pasado se han utilizado distintas temperaturas para llevar a cabo la producción de *B. bassiana*; éstas por lo general se han mantenido dentro de un rango estrecho, con valores un poco por encima y por debajo de 28°C. Holder *et al.* (2007) y Dalla *et al.* (2005) cultivaron el hongo a 26°C, Hegedus *et al.* (1990) utilizaron la temperatura de 27°C, Vega *et al.* (2003) obtuvieron buenos resultados a 28°C, mientras que Solis *et al.* (2006) realizaron la fermentación a 30°C.

En la figura 5.11 se puede observar que a 23°C, la cepa Sar tardó un día más en alcanzar una concentración de esporas/ml similar a la del tratamiento que se mantuvo a una temperatura superior, donde la mayor producción se alcanzó con tan solo 3 días de cultivo. Por otra parte, a 18°C ocurrió un crecimiento muy pobre del hongo, tanto que incluso no fue sino hasta el final que logró igualar el rendimiento del control en agitación. Esa significativa diferencia entre el comportamiento a distintas temperaturas se debió al metabolismo del hongo, que respondió de manera diferente ante las condiciones del entorno. Es probable que muchas de las reacciones enzimáticas que forman parte de la maquinaria celular de esta cepa se vieran favorecidas por la mayor temperatura de los tratamientos 5 y 6, de manera que el microorganismo podía crecer más rápidamente. En el tratamiento con menor temperatura, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas era mucho menor, de manera que la asimilación de nutrientes del medio por parte de las células ocurría con lentitud (Curtis y Barnes, 2001). Algunos investigadores sostienen que la temperatura

óptima de desarrollo de los hongos entomopatógenos varía de acuerdo al origen geográfico del organismo (Shimazu, 2004). Posiblemente esto sí se cumple, al menos en algunas ocasiones, pues el aislamiento de la cepa Sar se llevó a cabo a partir de una broca del café colectada en un cafetal ubicado en el distrito Sarchí Sur de Alajuela, localidad caracterizada por altas temperaturas.

6.2.4. Evaluación de distintos valores de pH

El crecimiento óptimo de los hongos entomopatógenos puede darse en un amplio rango de pH, mientras que algunos otros tipos de hongos crecen dentro de un rango de pH más reducido. Los tres tratamientos utilizados en este ensayo, donde el pH inicial era 4.8, 5.5 o 6.2, no tuvieron un impacto significativo en el crecimiento del hongo, pues este se desarrolló de manera muy similar en los medios de cultivo que poseían diferentes pH. De hecho, si se analiza la curva que muestra la evolución del pH a lo largo del ciclo de cultivo, se observa que el pH del medio en los tres tratamientos tendió a igualarse hacia el último día, lo cual podría ser indicio de una gran capacidad del hongo para regular el pH del medio que lo rodea, mediante la liberación de distintas sustancias. En un trabajo muy similar a este, de hecho, Jackson *et al.* (2004) encontraron que el también hongo entomopatógeno *Paecylomyces fumosoroseus* disminuía de manera natural el pH del medio durante la producción de blastosporas, y lo que es más, al igual que en la presente investigación no se presentaban diferencias significativas en el rendimiento después de tres días de cultivo en medios con pH inicial de 3.5, 4.0, 4.5 o 6.5.

Hallsworth y Magan (1996), señalan que los hongos entomopatógenos pueden regular el pH citosólico más efectivamente que muchas otras especies de hongos. De igual manera, pareciera que pueden regular el pH de su ambiente externo para así crear condiciones que favorezcan su crecimiento. Se ha propuesto que esto podrían hacerlo mediante procesos activos, y no difusión pasiva de solutos, tales como la extrusión de protones por el sistema de transporte de H^+ -ATPasa en la membrana plasmática (Ypsilos y Magan, 2005).

6.2.5. Evaluación del crecimiento de diferentes cepas

Diferentes cepas de una misma especie de microorganismo pueden presentar patrones de crecimiento muy distintos. Al estudiar el impacto de la nutrición en la producción de esporas para varios hongos entomopatógenos, Vega *et al.* (2003) encontraron un comportamiento muy distinto entre dos cepas de *Beauveria bassiana* procedentes de África y Estados Unidos. La cepa estadounidense producía rendimientos de hasta cinco veces los rendimientos de la otra.

En el caso de las cepas utilizadas en esta prueba, se observaron marcadas diferencias entre el patrón de esporulación de la cepa del CICAFFÉ y las otras dos. Cuando se realizó el cultivo de los inóculos de las tres cepas en PDA (figura 6.3) se observó un comportamiento que podría relacionarse con el crecimiento observado en los fermentadores. Tanto la cepa GHA de Mycotrol como la cepa D0101 de DIECA crecen sobre la superficie del agar como colonias pequeñas que se dispersan y producen una profusa esporulación color crema, sin mostrar mucho desarrollo micelial. Por el contrario, la cepa Sar crece generalmente en las placas como una sola colonia que se expande hacia los bordes, con un profuso crecimiento micelial que le otorga una apariencia algodonosa, presentando rara vez esporulación.

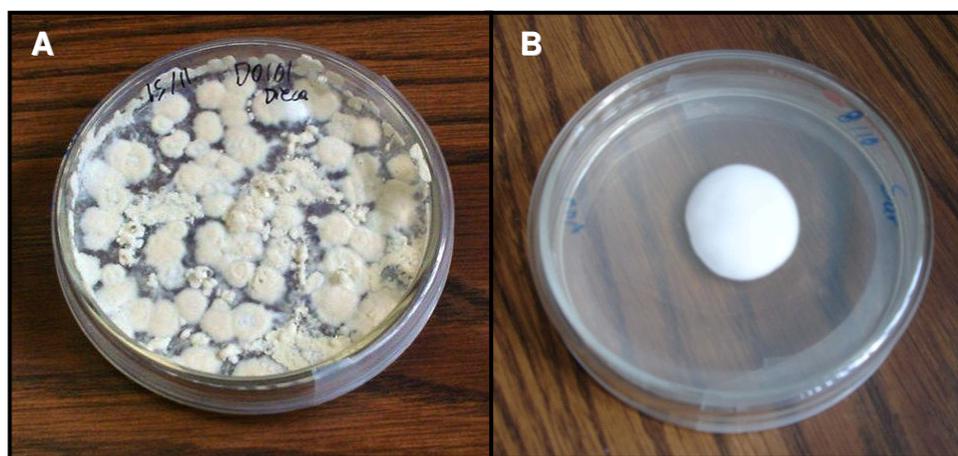


Figura 6.3. Morfología característica de dos cepas de *B. bassiana* cuando crecen en medio sólido.

A) La cepa D0101 muestra poco desarrollo micelial y una densa esporulación. B) La cepa Sar no esporula pero su gran desarrollo micelial le da un aspecto abultado.

Se sabe que las blastosporas son estructuras producidas de forma vegetativa, pudiendo considerárseles como segmentos hifales (Hegedus *et al.*, 1990). Esto podría explicar por qué Sar, que presenta un mayor crecimiento micelial sobre PDA, rindió el doble de concentración de blastosporas en medio líquido que las otras cepas, pues estas han sido seleccionadas como ingrediente activo de bioinsecticidas por su mayor esporulación, y no crecimiento micelial, sobre sustrato sólido.

6.2.6. Bioensayo sobre broca del café

Las blastosporas producidas en los fermentadores resultaron ser altamente infectivas contra la broca del café. A pesar de que no se obtuvo una mortalidad absoluta, el 86.7% de mortalidad ocurrido indica el gran potencial de la cepa Sar para controlar esta plaga. En el CICAFFE nunca se había realizado un ensayo que pusiera a prueba la virulencia de las blastosporas de esta cepa, no sus conidias, contra *H. hampei*. Por esta razón, y a pesar de que no era parte de los objetivos, la realización de la misma resultaba imprescindible, considerando que se planea escalar el proceso de fermentación evaluado.

El grado de virulencia de *B. bassiana* sobre la broca del café es muy variable, y depende en gran parte de la cepa utilizada. En un bioensayo realizado por Haraprasad *et al.* (2001), se encontró que incluso dentro de un grupo de aislados que habían sido todos obtenidos de brocas parasitadas, los niveles de mortalidad fluctuaban desde un 20% hasta un 93%. Otros factores, además de la cepa utilizada, tuvieron un efecto sobre la mortalidad obtenida.

Es sabido que los factores ambientales como temperatura y humedad tienen gran importancia en la germinación, sobrevivencia y penetración de las esporas en la cutícula del hospedero (Godoy *et al.*, 2007). El bioensayo con las blastosporas no se realizó bajo las mejores condiciones, de manera que probablemente la mortalidad se vio disminuida por esta razón. La humedad relativa no se mantuvo constante en las placas Petri donde se colocaron las brocas, así que seguramente disminuyó con el paso del tiempo pues el papel filtro no se humedeció después del primer día. *Beauveria bassiana* provoca mayor mortalidad cuando la humedad relativa es más alta, y aunque el valor óptimo depende de la cepa, este

generalmente se encuentra en valores cercanos al 90% (Shipp *et al.*, 2003; Carballo y Guaharay, 2004). Por otro lado, es importante tomar en cuenta que la temperatura a la que se llevó a cabo el ensayo (23°C), es ligeramente más baja que la reportada en otras ocasiones como óptima para la germinación del hongo, que es de 25°C (Kreutz *et al.*, 2004; Ekesi *et al.*, 1999; Carballo y Guaharay, 2004).

7. CONCLUSIONES

- Los envases de vidrio son más adecuados que los de plástico para la elaboración de sistemas de cultivo líquido.
- En la fermentación sumergida de *Beauveria bassiana*, el uso de sistemas con aireación produce rendimientos muy superiores a los obtenidos con sistemas en agitación.
- El pH inicial del medio de cultivo no tiene efecto significativo en el desarrollo de la cepa Sar de *Beauveria bassiana* en medio líquido.
- La condición lumínica en que se lleva a cabo la fermentación sumergida de la cepa Sar no tiene efecto significativo sobre el desarrollo de la misma.
- La cepa Sar de *Beauveria bassiana* crece más rápidamente en medio líquido a 28°C que a 23°C.
- La cepa Sar del CICAFAE produce mejores rendimientos mediante fermentación sumergida que la cepa GHA, ingrediente activo del producto comercial Mycotrol, y que la cepa D0101, ingrediente activo del producto Beauvedieca.
- Las blastosporas de la cepa Sar muestran alta patogenicidad contra la broca del café en estado adulto.
- Mediante la utilización de los fermentadores tipo II diseñados en esta investigación se pueden obtener rendimientos que rondan los 500 millones de esporas/ml de *Beauveria bassiana* (la metodología necesaria se detalla en el Anexo 1).

8. RECOMENDACIONES

- Evaluar la fermentación sumergida de *Beauveria bassiana* utilizando sustancias de desecho como sustrato.
- Realizar una búsqueda de otros posibles agentes antiespumantes y comparar su efecto sobre el desarrollo de *Beauveria bassiana*.
- Agregar el agente antiespumante al medio solo cuando se observe formación de espuma y no desde un principio.
- Monitorear los niveles de dióxido de carbono y oxígeno disuelto en el medio de cultivo.
- Utilizar mayor cantidad de fermentadotes para cada tratamiento.
- Realizar un bioensayo sobre broca en el que se compare el efecto de blastosporas producidas mediante fermentación sumergida con el efecto de conidias aéreas producidas mediante fermentación semisólida.

9. BIBLIOGRAFÍA

ÁLVAREZ, H. 2004. Principales plagas de importancia económica bajo Vigilancia Fitosanitaria. <<http://www.protecnet.go.cr/VIGILANCIA/PaginaWeb-Vigilancia.pdf>> (18/06/07).

BAKER, P. y LEA, S. 1998. Integrated Management of the Coffee Berry Borer. <<http://www.cabi-commodities.org/Coffee/Cfp/CfpcpIMC.htm>> (18/06/07).

BARQUERO, M. 2005. *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. Boletín Informativo ICAFE. Costa Rica. 5(1): 5-7.

BARRERA, J. 2000. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: El Control biológico, una herramienta para el desarrollo sustentable. Memorias Sociedad Mexicana de Control Biológico. Editores: Ibarra, J.; Del Rincón, C. y Leyva, J. Guanajuato. 220 pp.

BD BIONUTRIENTS. 2006. Technical Manual. Advanced Bioprocessing. Estados Unidos. 67 pp.

BENAVIDES, P.; BUSTILLO, A.; CÁRDENAS, R. y MONTOYA, E. 2003. Análisis Biológico y Económico del Manejo Integrado de la Broca del Café en Colombia. Revista Cenicafé. Colombia. 54(1): 5-23.

BENAVIDES, P. y ARÉVALO, E. 2002. Manejo Integrado: Una Estrategia Para el Control de la Broca del Café en Colombia. Revista Cenicafé. Colombia. 53(1): 39-48.

BIDOCHKA, M.; LOW, N. y KHACHATOURIANS, G. 1990. Carbohydrate Storage in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology. Estados Unidos. 56(10): 3186-3190.

BRUN, L.; MARCILLAUD, C. y GAUDICHON, V. 1994. Cross resistance between insecticides in coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from New Caledonia. Bulletin of Entomological Research. Reino Unido. 84(2): 175-178.

- BUSTILLO, A.; BERNAL, M.; BENAVIDES, P. y CHAVEZ, B. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. Florida Entomologist. Estados Unidos. 82(4): 491-498.
- CAMILO, J.; OLIVARES, F. y JIMÉNEZ, H. 2003. Fenología y reproducción de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) durante el desarrollo del fruto. Agronomía Mesoamericana. Costa Rica. 14(1): 59-63.
- CARBALLO, M. y GUAHARAY, F. 2004. Control Biológico de Plagas Agrícolas. Serie Técnica CATIE N°53. Managua. Nicaragua. 232 pp.
- CURTIS, H. y BARNES, N. 2001. Biología. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 1496 pp.
- DALLA, H.; DALLA, O.; BRAND, D.; PORTO DE SOUZA, L. y SOCCOL, C. 2005. Spore Production of *Beauveria bassiana* from Agroindustrial Residues. Brazilian Archives of Biology and Technology. Brazil. 48: 51-60.
- DEACON, J.W. 1990. Introducción a la Micología Moderna. Editorial Limusa. México D.F., México. 350 pp.
- DE BACH, P. 1984. Control biológico de las Plagas de Insectos y Malas Hierbas. EDITORIAL CONTINENTAL. México. 949 pp.
- DESHPANDE, M. 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. Critical Reviews in Microbiology. Londres. 25(3): 229-243.
- EKESI, S.; MANIANIA, N. y AMPONG-NYARKO, K. 1999. Effect of Temperature on Germination, Radial Growth and Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. Biocontrol Science and Technology 9: 177-185

FUKUDA, T.; ARAI, M.; YAMAGUCHI, Y. y MASUMA, R. 2004. New Beauvericins, Potentiators of Antifungal Miconazole Activity, Produced by *Beauveria sp.* FKI-1366. The Journal of Antibiotics. Japón. 57(2): 110-116.

GALLEGOS, G.; HUITRÓN, C.; GUERRERO, E.; OLAYO, R. y CEPEDA, M. 2003. Producción de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) en medios de cultivo líquido para el control de picudos de la yema del manzano. Memoria XXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Guadalajara, Jalisco, México. UAAAN, México. pp 91-93.

GODOY, J.; VALERA, R.; GUÉDEZ, L.; CAÑIZALEZ, C. y CASTILLO, C. 2007. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. Maracaibo, Venezuela. Rev. Fac. Agron. Universidad del Zulia. 24: 415-425.

HALLSWORTH, J. y MAGAN, N. 1996. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. Applied and Environmental Microbiology. 62(7): 2435-2442.

HANSON, P. y HILJE, L. 1993. Control Biológico de Insectos. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Programa de agricultura sostenible. Informe Técnico No 208. Turrialba, Costa Rica. 40pp.

HARAPRASAD, N.; NIRANJANA, S.; PRAKASH, H.; SHETTY, H. y WAHAB, S. 2001. *Beauveria bassiana* – A Potencial Mycopesticide for the Efficient Control of Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India. Biocontrol Science and Technology. Inglaterra. 11: 251-260.

HEGEDUS, D.; BIDOCHKA, M. y KHACHATOURIANS, G. 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. Applied Microbiology and Biotechnology. Alemania. 33(6): 641-647.

HEGEDUS, D.; BIDOCHKA, M.; MIRANPURI, G. y KHACHATOURIANS, G. 1992. A comparison of the virulence, stability and cell wall surface characteristics of three spore

types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36(6): 785-789.

HILL, D. 1983. *Agricultural insect pests of the tropics and their control*. Segunda Edición. Cambridge University Press. Cambridge. 746 pp.

HOCQUET, D. 2004. *Staphylococcus* culture. <http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr/bacterio_web/exa_microscopiques/cgp/Staphylococcus_Culture.htm>. (3/11/2007).

HUANG, B.; CHUN-RU, L.; ZHEN-GANG, L.; MEI-ZHEN, F. y ZENG-ZHI, L. 2002. Molecular identification of the teleomorph of *Beauveria bassiana*. *Mycotaxon*. Estados Unidos. 81: 229-236.

ISKANDAROV, U.; GUZALOVA, A.; DAVRANOV, K. 2006. Effects of Nutrient Medium Composition and Temperature on the Germination of Conidia and the Entomopathogenic Activity of the Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. Rusia. 42(1): 72-76.

JACKSON, M. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Alemania. 19: 180-187.

JACKSON, M.; CLIQUET, S. y ITEN, L. 2003. Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology*. 13: 23-33.

JACKSON, M.; ERHAN, S. y POPRAWSKI, T. 2006. Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biocontrol Science and Technology*. 16(1): 61-75.

JACKSON, M.; PAYNE, A y ODELSON, D. 2004. Liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 31: 149-154

KREUTZ, J.; VAUPEL, O. y ZIMMERMANN, G. 2004. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. against the spruce bark beetle, *Ips typographus* L., in the laboratory under various conditions. *Journal of applied entomology*. 128(6): 384-389.

LELAND, J.; MULLINS, D.; VAUGHAN, L. y WARREN, H. 2005. Effects of media composition on submerged culture spores of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, Part 1: Comparison of cell wall characteristics and drying stability among three spore types. *Biocontrol Science and Technology*. 15(4): 379-392.

LOMER, C.H. y LOMER, C.J. 2004. *Insect Pathology Manual*. LUBILOSA. 244 pp.

LÓPEZ, L. 1994. *Uso de Entomopatógenos y Parasitoides como Control Biológico de Plagas y Enfermedades en el Cultivo del Café*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 96 pp.

LOZANO, M.; ELÍAS, M.; RIVAS, C.; LUNA, H.; GALÁN, L. y MALDONADO, M. 2007. *Paecilomyces fumosoroseus* blastospore production using liquid culture in a bioreactor. *African Journal of Biotechnology*. 6(18): 2095-2099.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. y PARKER, J. 2004. Brock. *Biología de los Microorganismos*. Pearson Educación. Madrid, España. 1011 pp.

MAGARA, E.; NANKINGA, C.; GOLD, C.; KYAMANYWA, P.; TUSHEMEREIRWE, W.; MOORE, D. Y GOWEN, S. 2004. Efficacy of *Beauveria bassiana* substrates and formulations for the control of banana weevil. *Uganda Journal of Agricultural Sciences* 9: 908-913.

MATSUDA, D.; NAMATAME, I.; TOMODA, H. y KOBAYASHI, S. 2004. New Beauveriolides Produced by Amino Acid supplemented Fermentation of *Beauveria* sp. FO-6979. *The Journal Of Antibiotics*. 57(1): 1-9.

MONZÓN, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica. 63: 95-103.

NELSON, T.; LOW, A. y GLARE, T. 1996. Large Scale Production of New Zealand Strains of *Beauveria* and *Metarhizium*. Proceedings of the 49th New Zealand Plant Protection Conf. pp 257-261.

OXOID. 1998. The OXOID Manual. 8ª Edición. Hampshire, Inglaterra.

PRATT, L. y HARNER, C. 1997. Sustainability Analysis of the Coffee Industry in Costa Rica. Centro Latinoamericano de Competitividad y Desarrollo Sostenible del INCAE. <<http://www.incae.ac.cr/ES/clacds/nuestras-investigaciones/pdf/cen761.pdf>> (18/06/07).

SHIMAZU, M. 2004. Effects of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology. 39(3): 469-475.

SHIPP, J. ; ZHANG, Y. ; HUNT, D. y FERGUSON, G. 2003. Influence of Humidity and Greenhouse Microclimate on the Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for Control of Greenhouse Arthropod Pests. Environmental Entomology. 32(5): 1154-1163.

SOLIS, S.; GARCÍA, C.; GONZÁLEZ, M.; MEDRANO, H. y GALÁN, L. 2006. Toxicidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Vuill) contra palomilla del manzano *Cydia pomonella* L. (Lepidóptera: Tortricidae). Folia Entomológica Mexicana 45(2):195-200. Xalapa, México.

TABORSKY, V. 1992. Small-Scale Processing of Microbial Pesticides. Boletín de Servicios Agrícolas No. 96. Praga, República Checa.

THOMAS, K.; KHACHATOURIANS, G. y INGLEDEW, W. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Canadian Journal of Microbiology. 33(1): 12-20.

THOMAS, M. 1999. Ecological approaches and the development of “truly integrated” pest management. Proceedings of the National Academy of Sciences. Estados Unidos. 96: 5944-5961

TODAR, K. 2005. Staphylococcus. <<http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>>. (12/11/2007).

VEGA, F.; JACKSON, M.; MERCADIER, G. y POPRAWASKY, T. 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 19: 363-368.

YPSILOS, I. y MAGAN, N. 2005. Characterisation of optimum cultural environmental conditions for the production of high numbers of *Metarhizium anisopliae* blastospores with enhanced ecological fitness. Biocontrol Science and Technology. 15(7): 683-699.

10. ANEXOS

Anexo 1: Metodología para la producción de *Beauveria bassiana* mediante fermentación sumergida.

Inóculo líquido

- 1) Preparar el medio de cultivo para el inóculo, disolviendo 3 g/l de extracto de levadura y 15 g/l de sacarosa en el volumen necesario de agua destilada según la cantidad de inóculo a utilizar.
- 2) Ajustar el pH del medio a 5,5.
- 3) Distribuir el medio en erlenmeyers de 100 o 200 ml y autoclavar por 25 minutos.
- 4) Una vez frío el medio, inocular cada erlenmeyer con una asada del hongo cultivado en PDA.
- 5) Mantener el inóculo en agitación a 150 rpm y 23°C por 3 días

Producción en fermentadores

- 1) Preparar el medio líquido, disolviendo 4.2 g/l de extracto de levadura, 8.3 g/l de peptona y 25 g/l de sacarosa en el volumen necesario de agua destilada según el volumen de medio deseado. Agregar 500 µl de aceite de soya por cada litro de medio y agitar vigorosamente
- 2) Ajustar el pH a 5,5.
- 3) Distribuir el medio en fermentadores de 1 litro de capacidad añadiendo 800 ml de medio a cada uno y autoclavar por 25 minutos (los filtros de aire deben autoclavarse por separado).
- 4) Inocular con el inóculo preparado anteriormente que se mantuvo en agitación por 3 días. Para esto debe determinarse la concentración de esporas del mismo mediante conteo al hemocitómetro, y luego agregar a cada fermentador el volumen necesario para obtener una concentración inicial de 1×10^4 esporas/ml.

- 5) Colocar los filtros de aire en los tubos que corresponden a la entrada y salida de aire.
- 6) Conectar los fermentadores inoculados a la bomba de aire, mantener la temperatura de crecimiento a 23°C.
- 7) Desconectar los fermentadores al cabo de 4 días de cultivo y recuperar las esporas producidas.