



## DISEÑO Y EVALUACIÓN DE MEDIOS LÍQUIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BLASTOSPORAS DE *Beauveria bassiana* †

### [DESIGN AND EVALUATION OF LIQUID MEDIA FOR THE PRODUCTION OF BLASTOSPORES OF *Beauveria bassiana*]

Myriam Elías-Santos<sup>1</sup>, Jairo H. Alfaro-Álvarez<sup>1</sup>, Isela Quintero-Zapata<sup>1</sup>, Hugo A. Luna-Olvera<sup>1</sup>, Benito Pereyra-Alfárez<sup>1</sup>, Luis J. Galán-Wong<sup>1</sup>, María Guadalupe Maldonado-Blanco<sup>1</sup>, Claudio Guajardo-Barbosa<sup>1</sup>, José Lorenzo Meza-García<sup>2</sup> and Fatima Lizeth Gandarilla-Pacheco<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México, C.P. 66450. Email: myriam.eliassn@uanl.edu.mx, jairo.alvarez@hotmail.it, isela.quinterozp@uanl.edu.mx, hugo.lunaol@uanl.edu.mx, benito.pereyraal@uanl.edu.mx, luis.galanwn@uanl.edu.mx, maria.maldonadobl@uanl.edu.mx, cguajardob@hotmail.com, \*fatimagandarilla84@gmail.com

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Regional Guasave. Av. Universidad s/n, Fraccionamiento Villa Universidad, Guasave, Sinaloa, México, C.P. 81000. Email. lorenzo\_meza@prodigy.net.mx

\*Corresponding author

#### SUMMARY

**Background.** The nitrogen source in a liquid culture medium for the propagation of entomopathogenic fungi is considered an essential element in fermentation, however, it is one of the most expensive, which makes the search for alternative sources of this nutrient important. **Objective.** This research compared the production of blastospores obtained by designing different culture media for the GHA strain of *Beauveria bassiana* based on the nitrogen source used. **Methodology.** Six media were designed in liquid form, made with various nitrogen sources (sesame flour, amaranth flour, canary seed flour, linseed flour, peanut pericarp flour, oatmeal) with glucose corn as a carbon source for all of them. Additionally, the yield of blastospores obtained at different incubation times, the pH and the viability of the post-fermentation propagules were evaluated. **Results.** The M8 medium made with peptone and yeast extract as nitrogen sources was the one that obtained the highest concentration with  $1.28 \times 10^9$  blastospores / mL at 168 hours of incubation. Regarding the fermentation parameters evaluated, the pH ranged between 5.1- 5.5 and the determination of this parameter did not present significant difference with respect to the culture medium used or the day on which it was determined ( $p \geq 0.05$ ) while post-fermentation viability was determined. In two solid media, and according to the results in potato dextrose agar the viability ranged between 31-90% on average while in water agar it was 25-90%, the determination of this parameter did not present significant difference with respect to the medium of culture for production of blastospores or to the solid medium in which it was determined ( $p \geq 0.05$ ). **Implications.** The alternate nitrogen sources used did not significantly increase the production of blastospores compared to conventional sources such as peptone and yeast extract, which in a synergistic effect did manage to enhance the production of blastospores. **Conclusion.** The use of yeast extract and casein peptone in conjunction can increase the yield of blastospores in a liquid culture medium.

**Keywords:** *Beauveria bassiana*; blastospores; nitrogen source; glucose.

#### RESUMEN

**Antecedentes.** La fuente de nitrógeno en un medio de cultivo líquido para la propagación de hongos entomopatógenos se considera un elemento esencial en la fermentación, sin embargo, es uno de los más costosos, lo cual hace importante la búsqueda de fuentes alternativas de este nutriente. **Objetivo.** Esta investigación comparó la producción de blastosporas obtenida mediante el diseño de diferentes medios de cultivo para la cepa GHA de *Beauveria bassiana* con base en la fuente de nitrógeno utilizada. **Metodología.** Se diseñaron seis medios en forma líquida, elaborados con diversas fuentes de nitrógeno (harina de ajonjolí, harina de amaranto, harina de alpiste, harina de linaza, harina de pericarpio de cacahuete, harina de avena) y con glucosa de maíz como fuente de carbono para todos ellos. Adicionalmente se evaluó el rendimiento de blastosporas obtenidas a diferentes tiempos de

† Submitted August 17, 2020 – Accepted October 18, 2020. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License. ISSN: 1870-0462.

incubación, el pH y la viabilidad de los propágulos post fermentación. **Resultados.** El medio M8 elaborado con peptona y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno fue el que obtuvo la mayor concentración con  $1.28 \times 10^9$  blastosporas/mL a las 168 horas de incubación. Respecto a los parámetros de fermentación evaluados el pH osciló entre 5.1- 5.5 y la determinación de este parámetro no presentó diferencia significativa respecto al medio de cultivo utilizado ni al día en que fue determinado ( $p \geq 0.05$ ) mientras que la viabilidad post fermentación se determinó en dos medios sólidos, y de acuerdo a los resultados en agar papa dextrosa la viabilidad osciló entre 31-90 % en promedio mientras que en agar agua fue de 25-90%, la determinación de este parámetro no presentó diferencia significativa respecto al medio de cultivo para la producción de blastosporas ni al medio sólido en que fue determinado ( $p \geq 0.05$ ). **Implicaciones.** Las fuentes alternas de nitrógeno utilizadas no aumentaron en forma significativa la producción de blastosporas en comparación con las fuentes convencionales como la peptona y el extracto de levadura, las cuales en un efecto sinérgico si lograron potenciar la producción de blastosporas. **Conclusión.** El uso de extracto de levadura y peptona de caseína en conjunción, pueden aumentar el rendimiento de blastosporas en un medio de cultivo líquido.

**Palabras clave:** *Beauveria bassiana*; blastosporas; fuente de nitrógeno; glucosa.

## INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha considerado a la agricultura como uno de los sectores económicos más importantes a nivel global. Estudios recientes estiman que la población mundial podría alcanzar hasta 10 billones de personas para el año 2050. Como una solución a la demanda de alimentos se han utilizado fertilizantes y plaguicidas para incrementar la producción de cultivos con fines alimentarios (Bautista *et al.*, 2018), así como la protección de estos cultivos del ataque de insectos plaga, sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha ocasionado problemas de contaminación ambiental y desarrollo de resistencia en insectos plaga, por mencionar algunos de sus efectos nocivos. En este sentido, el uso de plaguicidas de origen biológico se ostentan como una opción para el control de plagas, debido a que estos productos presentan baja residualidad y generalmente muestran especificidad hacia su blanco, reduciendo así el desarrollo de resistencia (Arthurs & Dara, 2019). Esta constante de la degradación ambiental causada por las prácticas agrícolas convencionales ha permitido que el empleo de hongos entomopatógenos como control biológico se generalice cada vez más (Baron *et al.*, 2019). Los hongos entomopatógenos son microorganismos con la capacidad de infectar y matar artrópodos. Se utilizan principalmente como bioplaguicidas en la agricultura ecológica como una alternativa a los insecticidas químicos (Litwin *et al.*, 2020). De acuerdo a Mishra *et al.* (2015) los hongos ocupan el segundo lugar en el mercado mundial dentro de los plaguicidas microbianos, mientras que en América Latina se utilizan en mayor medida los micoplaguicidas (Mascarín *et al.*, 2018). *Beauveria bassiana* es una especie ampliamente distribuida, este hongo se considera ubicuo capaz de explotar una variedad de entornos, incluidos el suelo, las plantas y los insectos; puede vivir como un saprófito en el suelo, o como un entomopatógeno que afecta a una amplia gama de artrópodos (Zimmerman, 2007; Boomsma *et al.*, 2014). *B. bassiana* presenta diferentes tipos de propágulos, específicamente, conidios, blastosporas y

microesclerocios (Mascarín *et al.*, 2015; Huarte-Bonnet *et al.*, 2019). *B. bassiana* actualmente se comercializa como ingrediente activo en diferentes micoinsecticidas, ocupando un 33.9% del mercado aproximadamente, y son los conidios aéreos el ingrediente activo principal de estos productos (de Faria & Wraight, 2007). La producción de uno u otro propágulo va a estar sujeta a diferentes factores que tienen que ver con los métodos de producción, medios de propagación, incluso tomando en cuenta el tipo de cultivo donde se aplicarán y la plaga de interés (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2018), sin embargo, las blastosporas se consideran una opción viable debido a que presentan ciertas ventajas frente a los conidios como propágulo de elección. Por ejemplo, la producción de blastosporas puede obtenerse en cortos tiempos de fermentación de hasta 3 días, facilidad en la recuperación y una automatización de los procesos (Jackson, 1997).

En el desarrollo de un proceso de producción para la obtención de un micoplaguicida se deben cumplir diferentes etapas, primeramente la selección de la cepa en base a su virulencia, su capacidad de resistir condiciones ambientales adversas relacionadas con la resistencia a la luz UV, tolerancia a la temperatura, en segundo la selección de un medio de cultivo óptimo que pueda ser de bajo costo o el uso de sustratos alternativos, en tercero y relacionado con el medio de cultivo es la elección del método de producción, así como los procesos de separación, los parámetros a controlar durante el proceso, control de calidad y costos (Pourseyed *et al.*, 2010; Bautista *et al.*, 2018). Los hongos entomopatógenos pueden obtenerse mediante diversas técnicas de propagación como la fermentación sólida, cultivo líquido o sumergido y cultivo bifásico. Todas las técnicas varían entre ellas y tienen ventajas o desventajas según el propágulo y la cantidad que desea obtener, por ejemplo, el cultivo líquido puede facilitar el proceso de escalamiento además de garantizar la producción de propágulos bajo condiciones controladas (Jackson *et al.*, 2003). En la fermentación en sustrato sólido la cual puede resultar atractiva a primera vista por los bajos costos

de los sustratos, que en ocasiones pueden ser hasta residuos de procesos agroindustriales, el proceso de producción requiere semanas y existe el riesgo constante de contaminación (Mascarin *et al.*, 2015). Incluso y con todas sus bondades la fermentación líquida no está exenta de presentar algunas dificultades en su implementación, la más común es el costo de los medios de cultivo utilizados a comparación de los empleados en la fermentación sólida, por lo tanto, es importante la búsqueda de sustratos de menor costo en la optimización de este proceso. La fuente de carbono, nitrógeno, metales, vitaminas y la relación entre estos elementos, pueden influir en el crecimiento, la formación de propágulos y la eficacia (Hegedus *et al.*, 1990). Desde hace décadas se conoce que los elementos más abundantes en las células fúngicas son el carbono, oxígeno y nitrógeno, siendo este último uno de los más críticos en la fermentación debido a su alto costo (Mascarin *et al.*, 2015).

Esta situación hace imperativa la búsqueda de sustratos de bajo costo para optimizar procesos y obtener propágulos de hongos que sean eficaces contra insectos plaga y en cantidades suficientes. El objetivo de este estudio fue diseñar diferentes medios de cultivo líquido para obtener blastosporas de *Beauveria bassiana* mediante el uso de fuentes alternativas de nitrógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

*Beauveria bassiana* GHA (ARSEF 6444), el ingrediente activo del micoinsecticida comercializado bajo el nombre de Mycotrol®, fue la cepa utilizada en esta investigación. Este microorganismo fue donado a la colección del laboratorio L6 del Instituto de Biotecnología con sede en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FCB-UANL). Para su conservación esta cepa se encontraba en una solución de glicerol al 10 % (v/v) a -80 °C.

### Medios de cultivo

Para la obtención de las blastosporas se diseñaron seis medios de cultivo los cuales contenían una sola fuente de carbono (glucosa de maíz al 20 % (p/v) y diversas harinas procedentes de granos de cereales y residuos como fuentes de nitrógeno (ajonjolí, alpiste, amaranto, avena, linaza y pericarpio de cacahuate). Adicionalmente se agregaron cuatro medios como controles positivos suplementados con sales inorgánicas (CaCO<sub>3</sub>, NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>) y soluciones metálicas (ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>) y uno más como control negativo el cual solo contenía la fuente de carbono. La proporción de los

componentes para cada uno de los medios se resume en la Tabla 1.

### Preparación de las harinas utilizadas como fuente de nitrógeno

Las harinas se obtuvieron de manera artesanal a partir de cinco tipos de granos (ajonjolí, alpiste, avena, linaza y pericarpio de cacahuate). Los granos se procesaron en una licuadora hasta obtener un polvo fino, el cual se tamizó en una malla de 212 µm hasta obtener la consistencia de una harina típica. Las harinas obtenidas se almacenaron en recipientes plásticos a temperatura ambiente hasta su uso.

### Obtención del inoculo

La cepa GHA se cultivó durante 14 días en agar papa dextrosa a 25 ± 2°C. Posteriormente con ayuda de un asa Drigalsky se raspó la superficie de las cajas para desprender los conidios, para facilitar este proceso se agregaron 20 mL agua bidestilada estéril, finalmente este volumen se colectó en un frasco donde se diluyó y homogenizó para así obtener un volumen final de 100 mL. Finalmente se ajustó la suspensión a 5 × 10<sup>5</sup> conidios/mL mediante un recuento en cámara de Neubauer para la posterior inoculación del cultivo líquido-sumergido.

### Condiciones de fermentación

Para el cultivo se utilizaron matraces con baffles de 250 mL de capacidad, se les colocó 45 mL de cada uno de los medios y 5 mL de la suspensión del hongo para obtener un volumen total de 50 mL. Los matraces se agitaron a 250 rpm y se inocularon a 28°C. Los recuentos de blastosporas se realizaron a las 72, 120 y 168 horas de incubación.

### Determinación del pH

Se determinó para cada uno de los medios evaluados al finalizar el proceso de fermentación; para lo cual se utilizó un potenciómetro digital (Beckman OHMS 50 pH meter) escala 1-14, previamente una calibración del mismo; se tomó 1 mL de cada una de los tratamientos y se depositó en tubos Falcon para la medición del potencial de hidrógeno.

### Viabilidad de blastosporas

La viabilidad post fermentación se realizó en placas Petri previamente cuadrículadas que contenían agar papa dextrosa y agar agua, al solidificar se colocó una gota de las muestras diluidas a 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup> en cada uno de los medios. A las diez horas se cortó con un bisturí cada cuadro y se colocó una gota de azul de lactofenol, se contaron 100 blastosporas en un microscopio óptico con el objetivo de 40 X para

determinar la presencia o ausencia del tubo germinativo.

### Cinética de crecimiento a nivel matraz

Este procedimiento se realizó exclusivamente con el medio seleccionado con la mayor producción de blastosporas. Se tomaron muestras cada 48 h, durante 14 días. Estas muestras fueron separadas y se les realizó un conteo de blastosporas para construir una curva de crecimiento.

### Análisis estadístico

El diseño de los experimentos fue completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento. Los resultados obtenidos se reportan como promedios incluyendo el valor del error estándar. Los resultados se convirtieron a  $\text{Log}_{10}$  para procesarlos en el programa estadístico IBM SPSS® v.19 y mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de los datos. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Los experimentos fueron repetidos en al menos dos ocasiones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cantidad de blastosporas en cada uno de los medios líquido aumentó a partir de las 72 horas de

incubación en los cuales se reportó una diferencia significativa ( $p=0.001$ ) en la producción de blastosporas de acuerdo al medio de propagación. Esta tendencia se mantuvo a las 120 y 168 horas de incubación donde se reporta una diferencia altamente significativa en la obtención de blastosporas entre cada medio ( $p=0.00001$ ) y se observó que el medio M8 es el que alcanzó el mayor número de blastosporas (Tabla 2).

En la medición del pH dicho parámetro se mantuvo en un rango de 5.1 a 5.6 y de acuerdo a los resultados estadísticos no presentó diferencia significativa respecto al medio de cultivo ( $p=0.672$ ) ni al día en que fue determinado ( $p=0.400$ ) (Figura 1).

El porcentaje de germinación en agar papa dextrosa osciló entre 31-90 %, mientras que en agar agua se registró de 25- 90 % y de acuerdo con los resultados estadísticos la determinación de este parámetro no presentó diferencia significativa respecto al medio de cultivo para la producción de blastosporas ( $p=0.368$ ) ni al medio sólido en que fue determinado ( $p=0.438$ ) (Figura 2).

La curva de crecimiento de la cepa GHA se determinó en el medio M8 elaborado con peptona de caseína y extracto de levadura por ser el que obtuvo mayor producción de blastosporas. Los resultados obtenidos muestran que a las 48 horas se obtuvo el nivel más

**Tabla 1. Composición de los medios de cultivo para la propagación de *Beauveria bassiana*.**

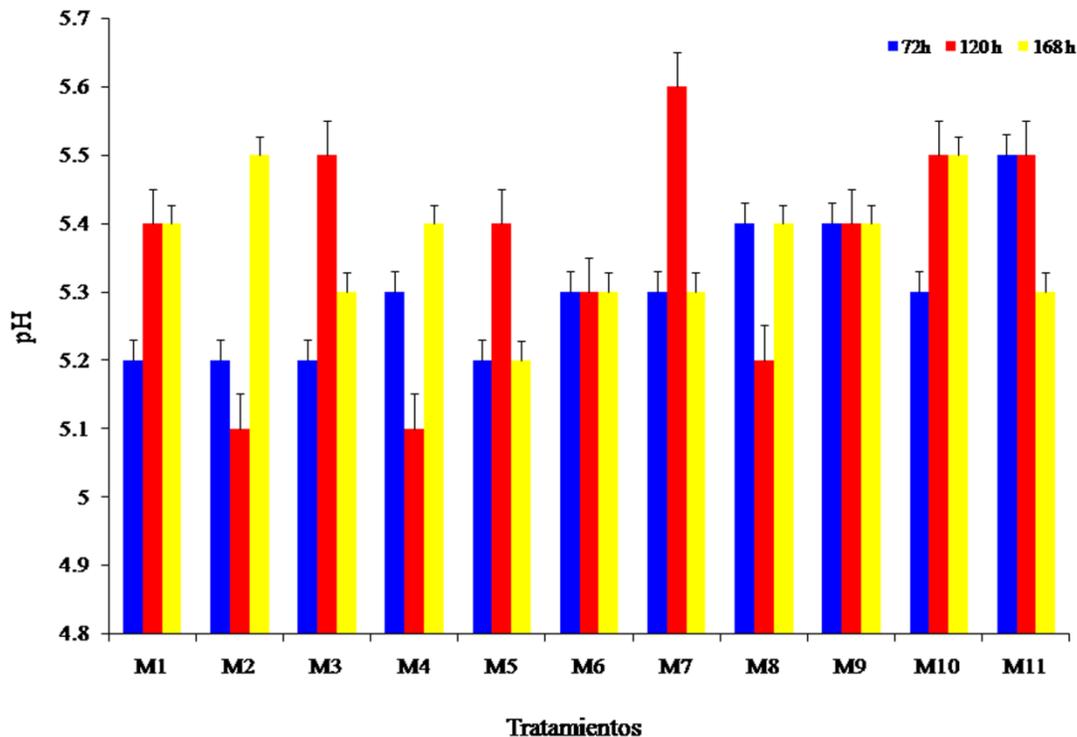
	Control	Tratamientos							Control			
	(-)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
Sustrato												
Glucosa de maíz (mL)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	120
Harina de ajonjolí (g)		20										
Harina de alpiste (g)			20									
Harina de amaranto (g)				20								
Harina de avena (g)					20							
Harina de pericarpio de cacahuete (g)						20						
Harina de linaza (g)							20					
Extracto de levadura (g)								5	5	5	5	
CaCO <sub>3</sub> (g)								1	1			
NaCl (g)								5	5			
Peptona (g)								20				
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)										4	4	
MgSO <sub>4</sub> (g)										0.6	0.6	
CaCl <sub>2</sub> (g)										0.8	0.8	
FeSO <sub>4</sub> (g)										0.1	0.1	
ZnSO <sub>4</sub> (mL)												60
MnSO <sub>4</sub> (mL)												60
CoCl <sub>2</sub> (mL)												60

\*Cada formulado corresponde a la cantidad de un litro.

**Tabla 2. Blastosporas de *Beauveria bassiana* en cultivo líquido a distintos tiempos de incubación en los medios evaluados.**

Medio	Blastosporas/mL		
	72 horas	120 horas	168 horas
M1	$2.15 \times 10^7$ (a)	$3.95 \times 10^7$ (a)	$3.64 \times 10^7$ (a)
M2	$6.05 \times 10^7$ (ab)	$1.08 \times 10^8$ (bcd)	$1.22 \times 10^8$ (bc)
M3	$3.05 \times 10^7$ (ab)	$9.78 \times 10^7$ (abc)	$1.13 \times 10^8$ (abc)
M4	$9.20 \times 10^7$ (ab)	$2.10 \times 10^8$ (cde)	$2.29 \times 10^8$ (cd)
M5	$8.41 \times 10^7$ ( ab)	$2.08 \times 10^8$ (cde)	$1.78 \times 10^8$ (cd)
M6	$2.20 \times 10^7$ ( a )	$4.35 \times 10^7$ (ab)	$5.10 \times 10^8$ (ab)
M7	$6.70 \times 10^7$ (ab)	$1.78 \times 10^8$ (cde)	$1.65 \times 10^8$ (cd)
M8	$2.10 \times 10^8$ (b)	$9.15 \times 10^8$ (g)	$1.28 \times 10^9$ (f)
M9	$1.98 \times 10^8$ ( b)	$7.25 \times 10^8$ (fg)	$9.80 \times 10^8$ (ef)
M10	$1.42 \times 10^8$ (ab)	$2.67 \times 10^8$ (de)	$2.70 \times 10^8$ (cd)
M11	$1.04 \times 10^8$ (ab)	$8.51 \times 10^8$ (ef)	$3.91 \times 10^8$ (de)
Media $\pm$ EE	$7.00 \times 10^7 \pm 0.10$	$1.82 \times 10^8 \pm 0.13$	$2.00 \times 10^8 \pm 0.14$

EE: Error estándar.

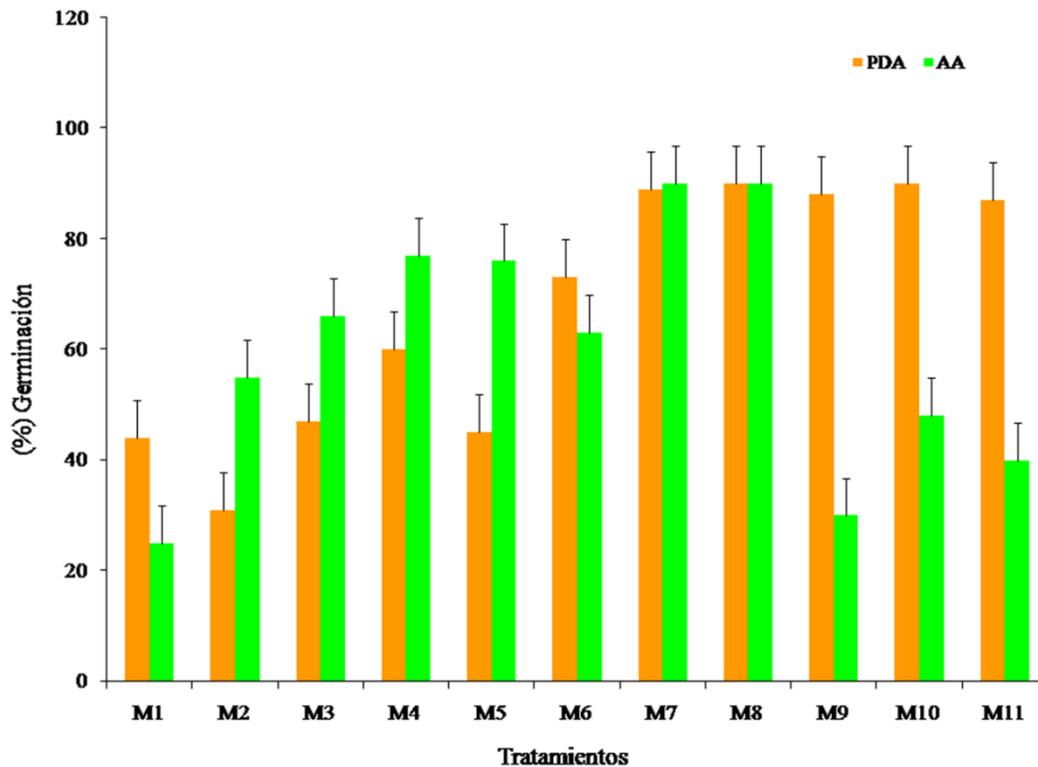
**Figura 1.** pH promedio de los medios para la producción de blastosporas de *Beauveria bassiana* (GHA) a diferentes tiempos de incubación en cultivo sumergido a nivel matraz bajo condiciones de laboratorio (28 °C; 250 RPM).

bajo con  $6.90 \times 10^7$  blastosporas/mL, mientras que a las 96 horas de incubación se obtuvieron  $9.20 \times 10^8$  blastosporas/mL, y a las 144 horas la producción aumentó significativamente hasta  $2.43 \times 10^9$  blastosporas/mL, y siguió aumentando exponencialmente hasta alcanzar  $3 \times 10^9$  blastosporas/mL (Figura 3).

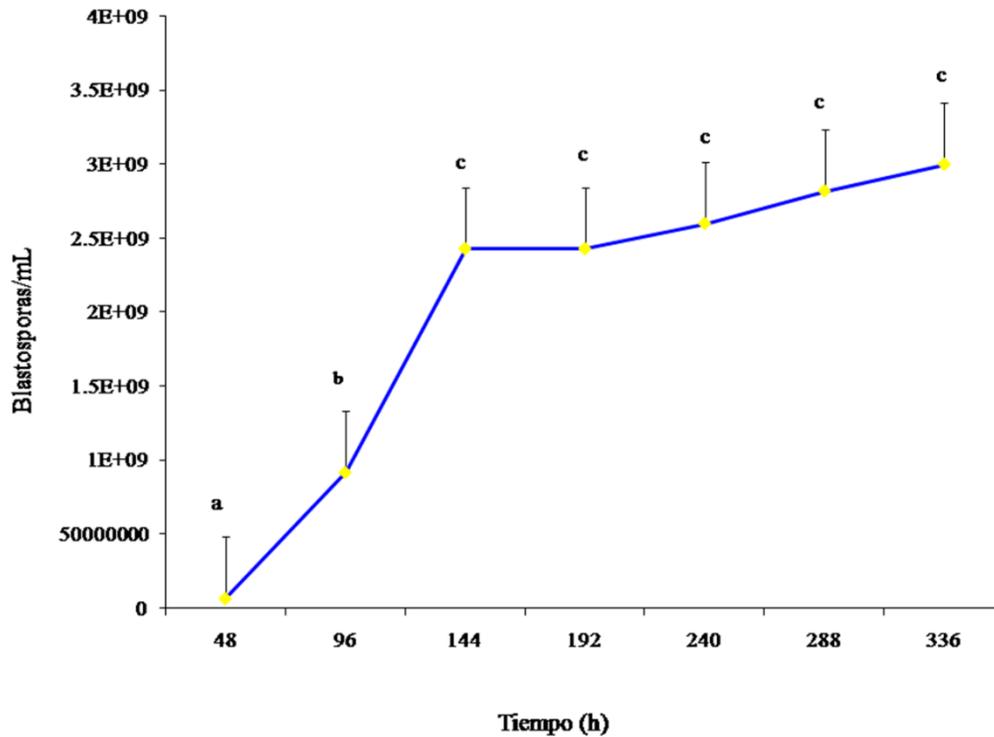
El interés de estudiar las condiciones para producir masivamente propágulos de *B. bassiana* datan de hace varias décadas y con los avances tecnológicos consecuentes estos métodos se han ido perfeccionando. Distintos autores han documentado métodos utilizados en la optimización para la obtención de blastosporas de *B. bassiana* en cultivo líquido haciendo énfasis en las variaciones en el medio de cultivo y condiciones de la fermentación

(Rombach *et al.*, 1989; Chong- Rodríguez *et al.*, 2011; Sandoval-Coronado *et al.*, 2010; Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013; Mascarin *et al.*, 2015). En este trabajo se diseñaron once medios para la propagación a nivel matraz de blastosporas de la cepa GHA de *B. bassiana*, con diferentes fuentes de nitrógeno y se obtuvieron valores promedio de  $10^7$ -  $10^9$  blastosporas/mL. El nitrógeno es un elemento clave en los procesos fermentativos (Mascarin *et al.*, 2018) es por eso que en los últimos años la tendencia es la búsqueda de nuevas fuentes, orgánicas o inorgánicas, de nitrógeno que tengan como característica disponibilidad y bajo costo en el mercado con la finalidad de optimizar recursos en la elaboración de medios de cultivo para fermentación. Estudios anteriores se han planteado esta problemática y han obtenido resultados similares a los de este trabajo, Chong- Rodríguez (2011) determinó que un medio a base de glucosa y peptona como fuente de nitrógeno alcanzó niveles de  $1.60 \times 10^9$  blastosporas/mL para la cepa GHA, estos resultados concuerdan con un estudio reciente con la misma cepa donde utilizaron la harina de semilla de algodón como fuente de nitrógeno alcanzando una producción de  $1.46 \times 10^9$  blastosporas/mL (Mascarin *et al.*, 2018), mientras que

en el presente trabajo la mayor producción de blastosporas se alcanzó con el medio que contenía peptona y extracto de levadura, mientras que los medios donde se utilizaron harinas solo alcanzaron niveles de  $10^8$  blastosporas/mL, lo cual coincide con lo reportado en un trabajo anterior donde determinaron la producción de blastosporas en un medio de casaminoácidos y glucosa para la cepa GHA alcanzando una producción de  $2.20 \times 10^8$  blastosporas/mL a las 72 horas (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013). Es interesante resaltar las variaciones existentes en estos trabajos pese a que la cepa en estudio es la misma, esta variabilidad puede deberse a distintos factores que pueden incidir directamente sobre la producción de blastosporas como la cantidad de inóculo inicial, el tipo y velocidad de agitación, temperatura y el mismo medio de cultivo. Por otro lado, Kleespies y Zimmermann (1992) mencionan que los hongos entomopatógenos son poseedores de una variabilidad genética amplia y pueden presentar diferencias cuando se propagan en cultivo líquido, por lo que se considera importante lograr la optimización de los parámetros de producción en medios de cultivo líquido para cada cepa en específico.



**Figura 2.** Porcentaje de germinación en agar papa dextrosa (PDA) y agar agua (AA) como sustratos de las blastosporas de *Beauveria bassiana* (GHA) obtenidas post fermentación en cultivo sumergido a nivel matraz bajo condiciones de laboratorio ( $25 \pm 2$  °C; 12:12 h luz: oscuridad).



**Figura 3.** Cinética de crecimiento de la cepa GHA de *B. bassiana* en el medio de cultivo M8 a nivel matraz bajo condiciones de laboratorio (28° C; 250 RPM).

Generalmente la producción de blastosporas a nivel laboratorio se lleva a cabo en equipos de agitación orbital como el utilizado en este estudio, sin embargo, Villalba *et al.* (2010) mencionan que la agitación mecánica mostro una concentración de blastosporas de hasta veinte veces más que en el sistema de agitación orbital para una cepa de *B. bassiana* por lo cual se puede considerar como un factor, aunque en el presente estudio no se realizó la producción en diferentes equipos.

Mascarin *et al* (2018) mencionan que la disposición de nitrógeno como aminoácidos en su forma libre influye directamente en la producción de blastosporas y la resistencia a la desecación, aunque el incremento de la concentración de glucosa y nitrógeno hasta 120 g/L y 30 g/L, respectivamente, no mejora o eleva la producción de blastosporas, si aumentó la tolerancia a la desecación lo cual se considera un parámetro crítico para la formulación. En este trabajo las fuentes de nitrógeno que promovieron la mayor producción de blastosporas fueron el extracto de levadura y la peptona, lo que es similar a lo reportado por Sandoval-Coronado *et al* (2010) quienes reportan para la cepa GHA una producción de  $5.1 \times 10^9$  blastosporas/mL en un medio de cultivo con 40 g/L de glucosa y 6 g/L de peptona de colágena a las 120 h. El extracto de levadura es un autolisado de células

de levaduras seleccionadas. Este producto contiene vitaminas del complejo B, aminoácidos y algunos factores de crecimiento, mientras que las peptonas son una mezcla hidrosoluble de polipéptidos, péptidos, aminoácidos y otras sustancias que quedan después de la digestión del material proteico. La calidad de las peptonas viene determinada por la calidad de las materias primas seleccionadas, sus condiciones de almacenamiento y los parámetros de la digestión. En este trabajo se utilizó la peptona de caseína que es un digerido pancreático de caseína que está compuesto por una mezcla de aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular, sin embargo, Griffin (1996) menciona que este tipo de peptona no presenta un contenido aceptable de vitaminas lo cual puede incidir en la esporulación. En este trabajo esta carencia parece haber sido suplementada con la adición del extracto de levadura.

Respecto a las harinas utilizadas, estas no mostraron diferencias significativas en la producción de blastosporas. Estas harinas procedentes de granos de acuerdo con tablas nutrimentales contienen en promedio desde 13 a 18 gramos de proteína por cada 100 gramos (FUNIBER, 2020), sin embargo, Badui-Dergal (1993) menciona que una proteína puede ser altamente nutritiva y carecer de funcionalidad en un proceso. Otro criterio que se debe considerar cuando

se utilizan cereales es su composición química, la cual puede variar dependiendo de los factores ambientales.

Otra de las limitantes en el uso de granos de cereales como sustratos para la producción de hongos radica en el hecho de que existen fracciones resistentes a la digestión enzimática. Este fenómeno se ha documentado para el almidón el cual presenta en su estructura una fracción resistente que se mantiene íntegra durante el paso por el tracto gastrointestinal humano (Villaroel *et al.*, 2018). En el caso de la presente investigación las semillas utilizadas para la elaboración de las harinas empleadas en los medios de cultivo evaluados no se sometieron a ningún pretratamiento de digestión enzimática lo cual pudo haber influido en la disponibilidad de las mismas y evitó que pudieran ser metabolizadas adecuadamente por *B. bassiana*. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la mayor producción de blastosporas se observó en el medio que contenía extracto de levadura y peptona de caseína debido a que ambos compuestos son un autolisado celular y un digerido pancreático, respectivamente, lo cual significa que al estar hidrolizados se aumenta la posibilidad de que sea metabolizado por el organismo en cuestión sin que esto signifique un gasto de energía adicional debido al pretratamiento enzimático.

### CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran la factibilidad de utilizar fuentes alternativas de nitrógeno para inducir la producción de blastosporas de *B. bassiana* mediante cultivo sumergido, aunque las harinas probadas se encontraron por debajo de la producción alcanzada con la peptona y la levadura de cerveza, estas se mantuvieron en el rango de  $10^8$  blastosporas/mL y estos rendimientos podrían ser mejorados en futuros ensayos modificando las proporciones C:N e incluyendo pretratamientos por digestión enzimática para aumentar la biodisponibilidad de los nutrientes.

### Declaraciones

**Financiamiento.** No se recibió ningún apoyo financiero de ninguna organización para realizar esta investigación

**Conflicto de Intereses.** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses relacionados con esta publicación.

**Cumplimiento de estándares éticos.** El trabajo de investigación no involucró experimentación con sujetos humanos. El trabajo se realizó de acuerdo con los respectivos reglamentos del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas

en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

**Disponibilidad de datos.** Los datos están disponibles con el autor correspondiente (fatimagandarilla84@gmail.com) bajo previa solicitud debidamente justificada.

### REFERENCIAS

- Arthurs, S. and Dara, S.K. 2019. Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165, pp.13-21. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008>.
- Badui Dergal S. 2006. Química de los alimentos. Pearson Educación. pp.736
- Bautista, E.J., Mesa, L. y Gómez-Álvarez, M.I.2018. Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. *Scientia Agropecuaria*, 9, pp. 585- 604. <https://doi.org/0.17268/sci.agropecu.2018.04.15>.
- Baron, N.C., Rigobelo, E.C. and Cunha-Zied, D. 2019. Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79, pp. 307-315. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000200307>.
- Boomsma, J.J., Jensen, A.B., Meyling, N.V., and Eilenberg, J. 2014. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annual Review of Entomology*, 59, pp. 467-485. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162054>.
- Chong-Rodríguez, M.J, Maldonado-Blanco, M.G., Hernández-Escareño, J.J., Galán-Wong, L.J. and Sandoval-Coronado, C.F. 2011. Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology*, 10, pp. 5736-5742. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2264>.
- De Faria, M.R. and Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with world wide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43, pp. 237-256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>.

- FUNIBER. 2020. Base de datos internacional de composición de alimentos. <https://www.composicionnutricional.com/alimentos/>. (consultado Mayo 21, 2020).
- Gandarilla-Pacheco, F.L., Galán-Wong, L.J., Arévalo-Niño, K., Elías-Santos, M. y Quintero-Zapata, I. 2013. Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia*, 47, pp.255-266. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952013000300005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000300005).
- Gandarilla-Pacheco, F. L., Morales-Ramos, L.H., Pereyra-Alfárez, B., Elías-Santos, M. y Quintero-Zapata, I. 2018. Estudio comparativo de la producción de unidades infectivas de *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) a partir de aislados nativos del noreste de México mediante tres estrategias de propagación. *Revista Argentina de Microbiología*, 50, pp. 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.008>.
- Griffin, D.H.1996. *Fungal physiology*. 2da Ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Hegedus, D.D., Bidochka, M.J. and Khachatourians G.G. 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33, pp. 641-647. <https://doi.org/10.1007/BF00604930>.
- Huarte-Bonnet, C., Paixão, F.R.S., Mascarin, G.M., Santana, M., Fernandes, E.K.K. and Pedrini N. 2019. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* produces microsclerotia-like pellets mediated by oxidative stress and peroxisome biogenesis. *Environmental Microbiology Reports*, 11, pp.518-524. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12742>.
- Jackson, M.A. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19:180-187. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900426>.
- Jackson, M.A., Cliquet, S., and Iten L.B. 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, pp. 23-33. <https://doi.org/10.1080/0958315021000054368>.
- Kleespies, R.G., and Zimmermann, G. 1992. Production of blastospores by three isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*, 2, pp. 127-135. <https://doi.org/10.1080/09583159209355226>.
- Litwin, A., Nowak, M. and Rózsalska, S. 2020. Entomopathogenic fungi: unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 19, pp. 23-42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>.
- Mascarin, G.M., Kobori, N.N., Jackson, M.A., Dunlap, C.A. and Delalibera Jr, I. 2018. Nitrogen sources affect productivity, desiccation tolerance, and storage stability of *Beauveria bassiana* blastospores. *Journal of Applied Microbiology*, 124, pp.810-820. <https://doi.org/10.1111/jam.13694>.
- Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Kobori, N.N., Behle, R.W. and Delalibera Jr, I. 2015. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, pp. 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.001>.
- Mishra, J., Tewari, S., Singh, S. and Arora, N.K. 2015. In: Arora, N.K. ed. *Biopesticides: Where We Stand? Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*. India: Springer. pp. 37-75.
- Pourseyed, S.H., Tavassoli, M., Bernousi, I. and Mardani K. 2010. *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): An effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of owl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Veterinary Parasitology*, 172, pp. 305-310. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.014>.
- Rombach, M.C.1989. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina. Hyphomycetes) sympodulo conidia in submerged culture. *Entomophaga*, 34, pp.45-52. <https://doi.org/10.1007/BF02372586>.
- Sandoval-Coronado C.F., Quintero-Zapata I., Maldonado-Blanco M. G., Elías-Santos M., & Galán-Wong L. J. 2010. En: Coria-Ávalos, V. M., Lara-Chávez, M. B. N., Orozco-Gutiérrez, G., Muñoz-Flores, H. J., y Sánchez-Martínez, R. eds. *Producción de*

- blastosporas de *Beauveria bassiana* en un medio de cultivo líquido a base de glucosa y peptona de colágena. Memoria XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Michoacán, México, INIFAP-CIRPAC.
- Villalba, P. L., Grillo-Ravelo, H., y Cupull, R. 2010. Evaluación de tres sistemas de agitación para la producción de blastosporas del hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, *Centro Agrícola*, 37, pp. 17-21. <http://cagricola.uclv.edu.cu/index.php/es/volumen-37-2010/numero-1-2010/359-evaluacion-de-tres-sistemas-de-agitacion-para-la-produccion-de-blastosporas-del-hongo-beauveria-bassiana-balsamo-vuillemin>.
- Villarroel, P., Gómez, C., Vera, C., y Torres J. 2018. Almidón resistente: Características tecnológicas e intereses fisiológicos. *Revista Chilena de Nutrición*, 45, pp. 271-278. <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182018000400271>.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17, pp. 553-596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>.