

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**EVALUACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO FUENTE DE
CARBONO EN LA PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

PRESENTA

CLAUDIA NOHEMÍ GARZA PÉREZ

Escobedo, N. L.

Enero de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**EVALUACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO FUENTE DE
CARBONO EN LA PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

PRESENTA

CLAUDIA NOHEMÍ GARZA PÉREZ

Escobedo, N. L.

Enero de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**EVALUACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO FUENTE DE
CARBONO EN LA PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

PRESENTA

CLAUDIA NOHEMÍ GARZA PÉREZ

Escobedo, N. L.

Enero de 2014

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Dr. Omar G. Alvarado Gómez
Asesor principal

Dr. Carlos F. Sandoval Coronado
Asesor externo

Dr. Jorge Ariel Torres Castillo
Co - asesor

Dra. Juana Aranda Ruiz
Co - asesor

DEDICATORIA

A Dios Nuestro Señor por ser tan generoso conmigo.

A mi familia, por esforzarse en comprender que mi falta de convivencia con ellos era debido a que estaba trabajando por mis sueños.

A mis amigos, por adaptarse a mis tiempos.

A todos los compañeros y profesores con los que he compartido estos dos años de aprendizaje y aventuras.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a todos los que de alguna forma han contribuido en el logro de mi meta.

Comenzando por el Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez por aceptar ser mi director de tesis, así como por su guía, sus consejos, su gran flexibilidad, confianza y apoyo constante.

Al Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado, por su paciencia, su confianza, su comprensión, su constancia y una interminable lista de virtudes y actitudes mostradas hacia mi persona no solo en esta etapa, sino a lo largo de estos últimos 10 años.

A mis asesores, la Dra. Juana Aranda Ruiz y al Dr. Jorge Ariel Torres Castillo por sus invaluable consejos y observaciones. Sin duda todos sus comentarios contribuyeron al enriquecimiento de mi trabajo de investigación.

Al Dr. Emilio Olivares Sáenz que sin ser parte de mi comité de tesis, desinteresadamente me brindó orientación con los análisis estadísticos del presente trabajo.

Al Dr. Francisco Zavala García quien no solo se ha desempeñado como Profesor, Subdirector de posgrado y Director; además ha sido consejero y apoyo constante a pesar de sus múltiples ocupaciones. Por impulsarnos tanto con palabras como con su ejemplo a ser mejor, a no conformarnos, a esforzarnos para dar más de nosotros mismos y traspasar los límites mentales autoimpuestos. Así mismo por la valiosas aportaciones realizadas al presente escrito.

Al Dr. Armando del Follo Martínez y la empresa Sigma Alimentos S. A. de C. V., por la generosa donación del agua residual de aislado de proteína de soya utilizada como sustrato en el presente trabajo.

Al Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por facilitar las instalaciones para la realización de la investigación.

A todo el departamento de posgrado por ser personas tan amables, dispuestas y eficientes. Definitivamente es imposible que hubiese alcanzado este sueño sin su colaboración.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivo.....	3
1.2. Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Hongos entomopatógenos.....	4
2.1.1. Ecología.....	4
2.1.2. Hongos entomopatógenos como agentes de control biológico...	6
2.2. Fuentes de carbono.....	9
2.2.1. Residuos agroindustriales como fuente de nutrientes.....	9
2.2.2. Plátano.....	12
2.2.3. Soya.....	13
2.3. Métodos de producción de hongos entomopatógenos.....	14
2.3.1. Cultivo en sustrato sólido.....	15
2.3.2. Cultivo en sustrato líquido.....	18

2.4. Estabilidad del ingrediente activo formulado.....	25
2.4.1. Factores que afectan la estabilidad.....	25
2.4.2. Formulación y vida de anaquel.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1. Localización.....	37
3.2. Preparación de los sustratos.....	37
3.3. Preservación de las cepas.....	38
3.4. Inóculo.....	39
3.5. Cultivo.....	39
3.6. Cinética del crecimiento.....	41
3.7. Separación, soporte y secado.....	42
3.8. Viabilidad y vida de anaquel.....	42
3.9. Diseño experimental.....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Producción.....	45
4.2. Cinética del crecimiento y consumo de azúcares totales.....	46
4.3. Viabilidad.....	49
4.4. Vida de anaquel.....	50
5. DISCUSIÓN.....	52
5.1. Producción.....	52
5.2. Cinética del crecimiento.....	54
5.3. Viabilidad.....	56

5.4.Vida de anaquel.....	57
6. CONCLUSIÓN.....	61
7. ANEXO.....	62
8. BIBLIOGRAFÍA.....	71

ABREVIATURAS

C	Carbono
°C	Grados centígrados
N	Nitrógeno
C:N	Proporción carbono: nitrógeno
Cm	Centímetro
mL	Mililitro
cm ²	Centímetro cuadrado
mL ⁻¹	Por mililitro
μL	Microlitro
G	Gramo
g ⁻¹	Por gramo
<i>et al.</i>	Y colaboradores
Mg	Miligramo
w/w	Masa por masa
L	Litro
L ⁻¹	Por litro
Rpm	Revoluciones por minuto
No.	Número

INDICE DE CUADROS

NO. CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Composición química de cáscaras de plátano.....	13
2	Comparación de la producción de blastoesporas por cepas de <i>M. anisopliae</i> después de 4 días de crecimiento a 28 °C y 300 rpm en varios medios de cultivo líquido.....	24
3	Tratamientos evaluados en la producción de esporas de hongos entomopatógenos en cultivo líquido.....	40
4	Análisis de Modelo Lineal General de la producción de esporas de hongos entomopatógenos después de 4 días de cultivo sumergido.....	45

NO.	TÍTULO	PÁGINA
CUADRO		
5	Producción de esporas de hongos entomopatógenos después de 4 días de cultivo sumergido.....	46
6	Análisis de Varianza de la cinética de producción de esporas de <i>B. bassiana</i> GHA.....	47
7	Coefficientes para ecuación de modelo cuadrático de la cinética de producción de esporas de <i>B. bassiana</i> GHA.....	47
8	Análisis de Varianza de la cinética de producción de esporas de <i>I. fumosorosea</i> 612.....	48
9	Coefficientes para ecuación de modelo cuadrático de la cinética de producción de esporas de <i>I. fumosorosea</i> 612.....	49
10	Consumo de azúcares totales por los tratamientos T3SBb y T5PIf con sus rendimientos correspondientes durante la cinética de crecimiento.....	49

NO.	TÍTULO	PÁGINA
CUADRO		
11	Viabilidad de esporas después de formulación y secado.....	50
	Sobrevivencia expresada en porcentaje de las esporas de <i>B. bassiana</i> GHA e <i>I. fumosorosea</i> 612 producidas en los medios de mayor rendimiento y sus respectivos controles a 4	
12	y 26 °C.....	51

INDICE DE FIGURAS

NO. FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Curva de mejor ajuste para <i>B. bassiana</i> GHA en el tratamiento T3SBb.....	47
2	Curva de mejor ajuste para <i>I. fumosorosea</i> 612 en el tratamiento T5Plf.....	48

RESUMEN

El cultivo sumergido es una técnica eficiente para la producción de hongos entomopatógenos y si además se utilizan sustratos económicos como nutrientes, dan como resultado una tecnología costeable para la obtención masiva de micoinsecticidas. Con el objetivo de demostrar la eficiencia de estos sistemas, se evaluaron residuos agro-industriales como fuentes de carbono en la producción de esporas tolerantes al secado y con larga vida de anaquel de *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* en cultivo líquido.

El proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio L2 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En la producción de las esporas se utilizaron matraces bafleados con capacidad de 250 mL inoculando el medio de cultivo con 5 mL de suspensión de conidias aéreas, para su posterior incubación, conteo y recuperación de esporas. Así mismo, se emplearon infusión de cáscara de plátano y agua residual de aislado de proteína de soya como sustratos proveedores de carbono.

Al transcurrir cuatro días de fermentación, *Beauveria bassiana* alcanzó cifras de 6.47×10^8 esporas mL^{-1} en el medio con 10 mL de agua residual de aislado de proteína de

soya (T3SBb). Por su parte, *Isaria fumosorosea* logró la obtención de 7.01×10^8 esporas mL^{-1} cuando se cultivó en el medio con 44 mL de infusión de cáscara de plátano (T5PIf). En el mismo orden, la viabilidad se mantuvo arriba del 94 y 86 % para ambos casos aún después de la formulación con caolín, tierra de diatomeas y cenizas, seguido por un proceso de secado. Igualmente, T3SBb mantuvo cifras de viabilidad de 61 - 76% después de 4 meses a 4°C mientras T5PIf obtuvo mejores resultados a 26°C en el mismo lapso de tiempo, logrando una sobrevivencia del 89% de las esporas cuando fueron formuladas con caolín.

SUMMARY

Submerged culture is an efficient technique for entomopathogenic fungi production. In addition to this, using economical substrates as nutriments results in a low cost technology for mycoinsecticide mass production. Consequently, agro-industrial wastes were evaluated as carbon sources in mass production of desiccation tolerant spores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* in liquid culture.

This research work was conducted at Laboratorio L2 of Instituto de Biotecnología of the Facultad de Ciencias Biológicas at the Universidad Autónoma de Nuevo León. The culture medium contained in a 250 mL Erlenmeyer baffled flask, was inoculated by 5 mL of aerial conidia suspension for later incubation. Moreover, banana peel infusion and soy waste water were employed as carbohydrate providers.

After four days of fermentation, when *Beauveria bassiana* were grown in the medium using 10 mL of soy waste water as carbon source (T3SBb), produced significantly higher yields (6.47×10^8 spores mL⁻¹), compared to cultures cultivated in media containing other concentrations. Meanwhile, spores counts of *Isaria fumosorosea* reached higher yields of 7.01×10^8 spores mL⁻¹ after cultivation in the medium containing 44 mL of banana peel infusion (T5PIf). Viability after formulation with

caolin, diatomeaceous earth and ash followed by air drying, remained above 86 (T5PIf) and 94 % (T3SBb) for both fungi. The T3SBb spores had the best storage stability (61 - 76%) at 4°C after 4 months. On the other hand, T5PIf performed better at 26°C (89%) after 4 months formulated in caolin.

1. INTRODUCCIÓN

Alrededor del 20 al 40 % del rendimiento agrícola a nivel mundial se pierde debido a plagas y enfermedades. Para ilustrar lo anterior, en el caso del maíz existe una merma del 24.5% de la producción mundial anual ocasionada por insectos. De este porcentaje, 14.5% sucede durante el crecimiento y desarrollo del cultivo, mientras que el 10% restante es durante el periodo de post-cosecha. Económicamente hablando, el detrimento equivale a 5.7 billones de dólares.

El control biológico de plagas entomológicas elude el uso de plaguicida químico para controlarlas o erradicarlas. Esta práctica emplea depredadores, parasitoides, extractos botánicos, microorganismos, nematodos y virus los cuales son enemigos naturales de los insectos. Los micoinsecticidas son una alternativa prometedora como agentes de control biológico debido en gran parte a que poseen un amplio rango de hospederos plaga, aunado a que son persistentes, no requieren ser ingeridos, generalmente son compatibles con otros insecticidas y poseen inocuidad ambiental.

Incluyendo a *I. fumosorosea* y *B. bassiana*, únicamente unos cuantos agentes de biocontrol se han desarrollado a nivel comercial en los últimos 20 años. Fundamentalmente, esto se debe a la falta de métodos de producción económicos,

vida de anaquel corta y al control inconsistente de la plaga a nivel de campo. No obstante, la aplicación de hongos entomopatógenos como agentes para el control biológico de insectos plaga, ha incrementado la atención mundial en las últimas décadas.

Existen esfuerzos que se enfocan en desarrollar técnicas costeables para la producción masiva de hongos entomopatógenos, entre estas estrategias, el cultivo líquido representa un proceso biotecnológico conveniente desde la perspectiva de eficiencia en comparación con la producción de esporas en sustrato sólido. Esto se debe a las ventajas brindadas; por mencionar algunas, el escalado es relativamente sencillo, aunado a que factores como la aireación, temperatura y pH pueden controlarse en forma efectiva.

Ciertamente, utilizar residuos agroindustriales como fuentes de carbono representa una gran alternativa para alcanzar el objetivo de obtener un importe de elaboración satisfactorio esto es debido a que son sustratos de bajo valor comercial, sumado a que se obtienen en grandes cantidades. Hasta el momento, la evaluación de residuos agroindustriales en la producción de hongos entomopatógenos se limita al sustrato sólido. El poder utilizar este tipo de fuentes de carbono en fermentación líquida, es de gran relevancia debido a que se obtendrán micoinsecticidas en un plazo más corto y a un costo menor. En consecuencia, el presente trabajo persigue el siguiente objetivo.

1.1. Objetivo

Evaluar el efecto de residuos agroindustriales de plátano y soya como fuente de carbono en la producción de esporas viables y de larga vida de anaquel en cultivo sumergido *I. fumosorosea* y *B. bassiana*.

1.2. Hipótesis

El agua residual de aislado de proteína de soya y la infusión de cáscara de plátano a utilizar como fuente de carbono en cultivo líquido, producirán altos rendimientos de esporas tolerantes al secado y con larga vida de anaquel *I. fumosorosea* y *B. bassiana*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Hongos entomopatógenos

Se les denomina hongos entomopatógenos a aquellos hongos que cuentan con la capacidad de parasitar insectos y matarlos o inactivarlos. Los hongos entomopatógenos son de gran relevancia dentro de los agroecosistemas debido a su capacidad natural para regular las poblaciones de insectos, la cual depende de la susceptibilidad del hospedero o de la asociación patógeno - hospedero. A este suceso se le llama control biológico y regularmente se refiere al uso de organismos naturales o modificados que son antagonistas a patógenos vegetales (Vega *et al.*, 2009).

2.1.1. Ecología

Los factores bióticos y abióticos ejercen una enorme influencia en la manifestación epizootica de los hongos entomopatógenos. Algunos de los factores abióticos que afectan la viabilidad y permanencia de los hongos entomopatógenos son: los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa y los fungicidas. La susceptibilidad y la relación con los hospederos se relacionan con los nutrimentos presentes en los

insectos, que son el medio para la propagación, dispersión y persistencia de los hongos (Pucheta - Díaz *et al.*, 2006). Los hongos entomopatógenos generalmente tienen ciclos de vida sincronizados con sus hospederos y condiciones ambientales, aunado a que exhiben un comportamiento diferente entre especies y en ocasiones entre cepas en lo referido a: preferencia por un grupo de hospedero, niveles de infección así como rangos de temperatura óptima que generalmente van de los 20 a 30 °C; colocándose como microorganismos mesofílicos aerobios.

El mecanismo de infección de los insectos por hongos entomopatógenos involucra: 1) el reconocimiento del hospedero y la unión a éste (adhesión), 2) la adquisición de nutrientes y la formación del apresorio (germinación), 3) la diferenciación celular en la hemolinfa (invasión), 4) el desarrollo de hifas invadiendo el cuerpo del insecto (proliferación) y 5) la creación de cuerpos fructíferos con la subsecuente esporulación (He *et al.*, 2012). La muerte del insecto hospedero se debe a la combinación de la acción de las micotoxinas, obstrucción física de la circulación sanguínea, agotamiento de nutrientes y/o la invasión de órganos (Srivastava *et al.*, 2009).

Uno de los hongos más utilizados como agente de control biológico es *Isaria fumosorosea*, su primera descripción fue publicada en 1904 por Wize. El hongo produce colonias en color blanco que posteriormente cambian a púrpura o rosadas, se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo y ha sido aislado de una gran cantidad de artrópodos, principalmente de Lepidoptera, Coleoptera y Hemiptera; así como del aire, agua, plantas, otros hongos y regularmente del suelo (Zimmermann, 2008).

Los hongos entomopatógenos producen abundantes conidias aéreas en sustrato sólido las cuales se pueden almacenar en preparaciones secas; mientras que en cultivo líquido, todos ellos regularmente producen altas concentraciones de células vegetativas llamadas blastoesporas las cuales típicamente son de mayor tamaño que las conidias aéreas, además se produce micelio y microesclerocios (Vega *et al.*, 2003). Estos últimos son agregados hifales compactos que regularmente están melanizados, son altamente resistentes a la desecación y son producidos por muchos hongos entomopatógenos con el objetivo de persistir en el suelo y material vegetal en descomposición (Jackson y Jaronski, 2009).

2.1.2. Hongos entomopatógenos como agentes de control biológico

Una de las mayores restricciones para incrementar la producción agrícola es la pérdida de rendimiento causada por insectos, enfermedades y malezas. Este detrimento oscila alrededor del 40 % del potencial de producción y se ha mantenido constante a pesar del incremento en el uso de plaguicidas. Los insecticidas químicos tienen algunas desventajas ya bastante reconocidas, entre las cuales se pueden mencionar el daño ambiental, que las plagas desarrollan resistencia a ellos y el efecto letal a organismos no blanco (Gao y Liu, 2010).

Una alternativa a los plaguicidas sintéticos son los hongos entomopatógenos; no obstante, estos son utilizados mejor cuando no se requiere una total erradicación de la plaga sino sólo se busca mantener las poblaciones por debajo del umbral económico donde el daño al cultivo no es severo y por lo tanto es aceptable (Shah y

Pell, 2003). Aunque hasta hoy en día se contabilizan aproximadamente 90 géneros de hongos entomopatógenos, la mayor parte de los que se producen comercialmente son especies de *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria* (antes *Paecilomyces*) los cuales son relativamente fáciles de cultivar en masa (Vega *et al.*, 2009).

Los hongos entomopatógenos son utilizados como agentes de control biológico debido a sus múltiples ventajas entre las cuales se incluyen su relativa inocuidad y seguridad a las personas, compatibilidad con otros enemigos naturales y que no dejan residuos tóxicos. El 59.6% de los insectos plaga del orden Hemiptera son afectadas por hongos entomopatógenos, el porcentaje de rango de hospederos dentro de otros nueve órdenes de insectos son los siguientes: Coleoptera (40.9%), Lepidoptera (17.5%), Thysanoptera (14.6%), Orthoptera (9.4%), Diptera (7.0%), Hymenoptera (2.9%), Isoptera (2.3%), Siphonaptera (1.2%) y Dictyoptera (0.6%) (Srivastava *et al.*, 2009).

Una barrera significativa para el desarrollo mercantil de los hongos entomopatógenos como bioinsecticidas es la capacidad de contar con métodos de producción masiva a bajo costo. Por lo tanto, se requiere desarrollar tecnologías de cultivo masivo que sean económicas (Soundarapandian y Chandra, 2007). El éxito comercial de un proceso económico de obtención de blastoesporas requiere de tiempos de fermentación cortos, grandes rendimientos de células que permanezcan estables una vez que han sido formuladas (Jackson *et al.*, 2003). Los hongos entomopatógenos son reconocidos como enemigos naturales de insectos plaga. A pesar de que miles

de especies de hongos infectan insectos, son pocos los que han sido seriamente considerados como potenciales candidatos comerciales (Pham *et al.*, 2010).

La comercialización de hongos entomopatógenos se ha restringido a aquellas especies que se pueden reproducir masivamente *in vitro* en sustratos económicos (Wraight *et al.*, 2007). Algunos de los hongos que tienen gran interés para su uso comercial son *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. El primero se ha investigado como un agente de control biológico por más de 100 años. Este hongo presenta actividad hacia insectos dentro de los órdenes Coleoptera, Orthoptera, Isoptera y Dictyoptera, mostrando ser efectivo; mientras que *B. bassiana* es tóxico sobre más de 70 especies de insectos plaga como la mosca blanca, áfidos, saltamontes, escarabajos, hormigas de fuego, entre otros (Slininger *et al.*, 2003).

En Norte América, la empresa Emerald Bio Agriculture (antes Mycotech) ha realizado esfuerzos considerables en el desarrollo de *B. bassiana* a nivel comercial, dando como resultado tres productos formulados que se venden principalmente en el mismo continente: Mycotrol, BotaniGard y Mycotrol O. El primero de ellos es infectivo incluso después de 12 meses en almacén a 25°C (Shah y Pell, 2003). Por otra parte, *Isaria fumosorosea* parasita especies pertenecientes a los órdenes Blattodea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera entre otros; aunque principalmente a miembros de Lepidoptera. Es altamente efectivo contra *Ceratohripoides claratris*, reportando una mortalidad de 80 a 93 %. Más aún, ha ganado mayor interés en los últimos 15 años debido a su empleo en contra de moscas blancas (Zimmermann, 2008).

2.2. Fuentes de carbono

2.2.1. Residuos agroindustriales como fuente de nutrientes

La selección de los ingredientes para la producción de hongos entomopatógenos no solamente debe ser basada en el rendimiento, además es necesario considerar la disponibilidad local, el costo (Kassa *et al.*, 2008), así como la preferencia del hongo a cultivar por un sustrato en específico (Barajas *et al.*, 2010).

Se requieren medios de cultivo económicos y simples para el uso práctico de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico. Se ha observado que aditivos como vitaminas y ácidos orgánicos no tienen efecto en el crecimiento de un vasto número de hongos entomopatógenos, no obstante muchos medios los incluyen. Por otra parte, diferentes tipos de azúcares proporcionan rangos variados de formación de blastoesporas, pero la glucosa es quien generalmente proporciona los más altos rendimientos; sin embargo, es una fuente de carbono costosa (Kocharin y Wongsu, 2006).

La falta de sustratos confiables y de bajo costo limita la producción y comercialización de los micoinsecticidas, por lo que numerosas fuentes de carbono han sido consideradas como sustratos potenciales, entre las que destacan los residuos agrícolas que se producen en grandes cantidades y que usualmente se

destinan a otros procesos. (Thakre *et al.*, 2011). Por otra parte, también valdría remarcar que la industria alimenticia también produce grandes volúmenes de desperdicios sólidos y líquidos resultantes de la producción, preparación y consumo de alimento. La disposición segura de estos residuos es muy importante para prevenir contaminación ambiental. En los últimos años se ha enfatizado considerablemente el reciclar y darle un mayor valor a los desperdicios orgánicos agrícolas e industriales que pueden ser transformados en diferentes productos (Mahawar *et al.*, 2012).

Se define como desperdicio o residuo a cualquier material de sobra resultante de actividades domésticas, industriales o agrícolas para el cual no hay demanda económica por lo que debe encontrarse la manera de disponer eficientemente del mismo. Anualmente se generan 20 millones de toneladas en materia seca de residuos agrícolas, al menos la mitad de estos desperdicios tienen el potencial de ser utilizados efectivamente para producir energía o biomasa (Okonko *et al.*, 2009).

Los residuos agrícolas que generalmente son raíces, hojas, tallos y restos de otros tejidos vegetales, usualmente no han sido clasificados como peligrosos no obstante que representan un serio problema de contaminación ambiental, principalmente los residuos de frutas ya que contienen un alto contenido de azúcares que pueden ser aprovechados como sustratos por los microorganismos (Yew *et al.*, 2011). Incluir residuos agroindustriales dándole una aplicación biotecnológica contribuye con la consecuente disminución de la contaminación ya que generalmente estos son liberados al ambiente (Maller *et al.*, 2011).

El potencial biotecnológico de los residuos agrícolas e industriales puede ser desarrollado y mejorado, generalmente sufren un pretratamiento con el objetivo de facilitar su uso o aumentar la disponibilidad de los nutrientes. Entre estos tratamientos se encuentran: reducción de tamaño, hidrólisis de polímeros, suplemento con nutrientes, ajuste de pH y humedad, cocinado, eliminación de contaminantes, entre otros. Algunos ejemplos de sustratos incluyen: bagazo de caña de azúcar, pajas de trigo y arroz, fibras de cereales, residuos de té y café, pulpa de sorgo, hollejos de manzana y uva, así como otros desperdicios vegetales (Krishna, 2005).

Un ejemplo del aprovechamiento de residuos es la conversión de carbohidratos derivados de cultivos en polisacáridos u oligosacáridos de alto valor. Por su parte, la cascarillas provenientes del procesamiento del café ha sido utilizadas como fertilizantes orgánicos, las cáscaras de piña para la producción de ácido cítrico, mazorcas de maíz en la producción de medios de cultivo para hongos, melazas de cítricos en la industria del alcohol bebible, residuos de yuca en bio-absorbentes que remueven tóxicos y metales de agua residual industrial, cáscaras de plátano en la producción de alcoholes, entre otros (Okonko *et al.*, 2009). La viabilidad en el uso eficiente de cualquier residuo está condicionada a no representar un problema mayor a su aprovechamiento.

2.2.2. Plátano

El plátano es cultivado principalmente por sus frutos por lo que deja una considerable cantidad de residuos en forma de cáscaras las cuales son ineficientemente dispuestas ocasionando contaminación ambiental. En algunas culturas se han explorado nuevas posibilidades para el uso de sub - productos de este cultivo, entre estas opciones se encuentra la envoltura de alimentos, elaboración de ropas y artículos ceremoniales. Generalmente dentro de los subproductos del cultivo de plátano se incluyen los pseudotallos, hojas, inflorescencias, tallos, rizomas y cáscaras (Padam *et al.*, 2012).

Las cáscaras de plátano cuentan con una gran cantidad de carbohidratos (92.88 mg g⁻¹) por lo que pueden ser utilizadas como materia prima renovable y de bajo costo, además poseen otros nutrientes básicos entre los cuales se encuentran proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos poli-insaturados y potasio que pueden ser utilizados por los microorganismos. Aún así, no han sido comercialmente explotadas en procesos industriales aunque si existen esfuerzos encaminados en la producción de biomasa, proteína, ácido láctico, composta, etanol, metano, pectinas y enzimas (Sharma *et al.*, 2007; Yew *et al.*, 2011).

En una evaluación de cáscaras de plátano con la meta de encontrar fuentes de carbono económicas, Chen *et al.* (2011) encontraron que los carbohidratos representan alrededor del 60% de la composición química de estas. Los tipos de azúcares encontrados en las cáscaras fueron glucosa, manosa, arabinosa y xilosa;

siendo esta última en mayor proporción. Es importante señalar que antes del análisis las muestras se sometieron a un secado a 70 °C durante 24 horas, esto con el objetivo de restar humedad. El resto de los componentes y su proporción se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición química de cáscaras de plátano.

Composición	Valor (% w/w)
Proteína cruda	8.15 ± 0.20
Grasa cruda	11.80 ± 0.30
Fibra cruda	8.05 ± 0.30
Carbohidratos	60.07 ± 0.25
Humedad	2.50 ± 0.25
Cenizas totales	11.54 ± 0.50

Debido a su abundancia, los residuos de plátano incluyendo sus cáscaras, se encuentran disponibles en grandes cantidades para ser utilizados en diversas tecnologías sustituyendo con ello el uso de alimentos agrícolas, como el uso de maíz para la elaboración de biocombustibles, práctica que eventualmente desembocaría en inseguridad alimentaria (Mohapatra *et al.*, 2011).

2.2.3. Soya

Por su alto contenido en proteínas, lípidos y otros nutrientes, la soya se considera un excelente alimento; no obstante, posee grandes cantidades de azúcares como

estaquiosa y rafinosa que no son digeribles para los humanos ni otros animales monogástricos por lo que su rol principal dentro de la alimentación humana y animal es debido a la cantidad y valor de las proteínas presentes en la misma. Otros azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa también están disponibles en este alimento (De Fátima Viana *et al.*, 2005). En un estudio Feng *et al.* (2008) reportaron un contenido de 37.2, 8.7 y 82.4 mg g⁻¹ de estaquiosa, rafinosa y sacarosa respectivamente en semillas de soya de la variedad Merrill. Existen diferentes factores que pueden influir en la cantidad de carbohidratos presentes en las semillas de soya, entre estos se incluyen el cultivar, genotipo y hasta su proceso (Lokuruka, 2010). En general, los carbohidratos totales representan aproximadamente el 30% de la composición nutrimental total en la semilla de soya sin cáscara (USDA, 2013).

Actualmente existen en el mercado diversos productos alimenticios a base de proteína de soya, desde alimentos y bebidas hasta suplementos para generar masa muscular. Además también se utiliza para la producción de plásticos biodegradables y recubrimientos (Karki *et al.*, 2009). Como ya se mencionó, los carbohidratos provenientes de la soya no son de importancia alimenticia por lo que generan un residuo que puede ser aprovechado como fuente de carbohidratos para el crecimiento de microorganismos.

2.3. Métodos de producción de hongos entomopatógenos

2.3.1. Cultivo en sustrato sólido

Una fermentación en soporte sólido se define como el proceso fermentativo en el cual los microorganismos crecen en materiales sólidos sin la presencia de medio líquido libre, ya que los nutrientes se encuentran absorbidos por la matriz. Por otra parte, una fermentación en sustrato sólido incluye el proceso en el cual el sustrato en sí actúa como matriz y fuente de carbono igualmente en ausencia o con la casi nula presencia de agua libre. El segundo sistema es el más comúnmente utilizado, en los países occidentales se refleja una tendencia al uso de residuos agroindustriales como sustrato y son considerados como los mejores (Robl *et al.*, 2009).

Como ya se mencionó, en la última década ha existido un creciente interés por darles un uso como nutrientes a los residuos y subproductos agroindustriales. Para cumplir este objetivo, Abraham *et al.* (2003) determinaron la capacidad de productos y subproductos agrícolas para ser utilizados en la producción masiva de *B. bassiana*. En ellos, cultivaron el hongo por 20 días a temperatura ambiente. De los productos agrícolas, la zanahoria fue el sustrato del que se produjo la mayor cantidad de esporas (2.0×10^{10} esporas en 100 g), seguidas por la tapioca y papa que permitieron la obtención de 1.74×10^{10} esporas en 100 g y 1.67×10^{10} esporas en 100 g, respectivamente. El grupo de los subproductos empleados como sustrato incluyó agua de coco, bagazo de caña, piel de tapioca y precipitado de jugo de caña de azúcar; sólo este último fue efectivo en la producción de ingrediente activo el cual alcanzó una concentración de 1.85×10^{10} esporas g^{-1} . De todos los sustratos

probados, los mejores fueron los pasteles de aceite de ajonjolí, semilla de algodón y neem con una producción de 5.35, 4.31 y 3.80 x 10¹⁰ esporas mL⁻¹.

Los granos alimenticios siguen ocupando un lugar importante como sustrato en la producción de hongos entomopatógenos. Soundarapandian y Chandra (2007) lograron una producción de 7.2, 7.6 y 8.3 x 10⁷ esporas por g⁻¹ de arroz, maíz y trigo respectivamente después de 2 semanas a 25 °C. Por su parte, Posada - Flórez (2008) obtuvo una máxima concentración de 7.4 x 10⁹ conidias g⁻¹ de *B. bassiana* 9205, mismas que fueron cultivadas por 15 días en arroz cocinado.

Se llevó a cabo un experimento con el objetivo de evaluar diferentes concentraciones de polvos de arroz, maíz y sorgo en dos soportes: virutas y serrín de madera. Los mejores rendimientos se lograron al agregar 1.6 g del sustrato tanto en la viruta como en el aserrín. En el caso de la viruta con arroz y sorgo se alcanzaron 2.3 x 10¹⁰ y 2.1 x 10¹⁰ de esporas totales por bolsa (alrededor de 100 cc); por otra parte, en el aserrín se consiguieron 3.4 x 10¹⁰, 3 x 10¹⁰ (1.6 g de sustrato) y 2.8 x 10¹⁰, 2.7 x 10¹⁰ (0.4 g de sustrato) con maíz y arroz, respectivamente. A mayores concentraciones de sustrato no lograron una producción favorable (Villalba *et al.*, 2009).

El bagazo de caña de azúcar es un soporte con alta porosidad, baja densidad y relativamente gran capacidad de absorción de agua; características que proveen de un ambiente ideal para el crecimiento de los hongos entomopatógenos. Al enriquecerlo con un medio líquido compuesto por 20 g L⁻¹ de harina de maíz y 10 g L⁻¹

¹ de extracto de levadura, se obtuvieron 1.08×10^{10} esporas g^{-1} del soporte al transcurrir 11 días de cultivo (Shi *et al.*, 2009).

En un estudio se consiguieron producciones de 8.93×10^9 , 1.14×10^9 y 5.87×10^8 en arroz, maíz y trigo, respectivamente después de 18 días de cultivo de *Nomuraea rileyi*. Se sugiere que la humedad en los sustratos fue un factor que influyó en la producción ya que alcanzó un 34.96%, debido a que existe una mejor disponibilidad de oxígeno a un porcentaje entre 35 y 60%. Además se realizó una dinámica de la producción de conidias en arroz obteniendo con ello, que el periodo óptimo para iniciar la cosecha es a los 14 días (Méndez *et al.*, 2010).

Por otra parte Barajas *et al.* (2010) llevaron a cabo una dinámica de producción para conidias de *M. anisopliae*, donde se alcanzaron rendimientos mayores al orden de 10^9 conidias g^{-1} a partir del día 12. Esto indica que el tiempo de cultivo de hongos entomopatógenos generalmente es de dos semanas. En el mismo año, igualmente se relacionó un alto rendimiento de conidias con el contenido de humedad en un experimento con *B. bassiana* ya que se reportó que un nivel de 40% de humedad derivó en la más alta producción de ingrediente activo con 3.17×10^9 esporas g^{-1} de arroz, después de 15 días de incubación (Pham *et al.*, 2010).

Aunado a la humedad, la concentración de carbono y principalmente la proporción C:N tienen gran influencia en la producción de hongos entomopatógenos (Gao *et al.*, 2007). Los hongos consumen los nutrientes del medio de cultivo durante la etapa vegetativa, antes de esporular. Sin embargo, en un estudio donde se evaluaron

concentraciones de carbono a 1, 2, 4, 8 y 16 g L⁻¹ así como proporción de C:N a 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 en la producción de esporas de *B. bassiana* no encontraron diferencia significativa entre los tratamientos después de 8 días de cultivo en sustrato sólido. Las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas fueron sacarosa y peptona de soya, respectivamente. Con base en experiencias anteriores y debido a estos resultados, afirman que la concentración óptima de carbono así como la proporción de C:N para el crecimiento de un hongo entomopatógeno depende también del medio en que éste es cultivado (Gao y Liu, 2010).

Recientemente Garza - López *et al.* (2012) realizaron un experimento con *B. bassiana* donde utilizaron como sustrato arroz pre - cocido, con una humedad del 40% ajustada con una solución de extracto de levadura (0.5 g L⁻¹), cosecharon 1.14 x10⁹ conidias mL⁻¹ después de 8 días de cultivo. En otro estudio actual Amala *et al.* (2012) obtuvieron 4.32 y 3.19 x 10⁸ esporas mL⁻¹ de *Paecilomyces lilacinus* en harina de arroz y harina de trigo, respectivamente, después de 28 días a 28 ± 4 °C. Conforme el tiempo transcurría, las concentraciones de esporas fueron en decremento, por lo que se sugiere que este hongo no debe ser almacenado y cultivado por más de 4 semanas a temperatura ambiente.

2.3.2. Cultivo en sustrato líquido

Existe escasa información referente al empleo de desechos agroindustriales en medio líquido a excepción del licor de remojo de maíz el cual se ha sido utilizado como fuente de nitrógeno en el cultivo sumergido, obteniendo altos rendimientos de

esporas, con germinación considerable y gran tolerancia a la desecación (Chong-Rodríguez *et al.*, 2011). A nivel mundial, el uso de hongos entomopatógenos en las últimas décadas ha ido en ascenso, siendo una de las alternativas más usadas en el control de plagas. La producción de hongos en sustratos sólidos dificulta la automatización del proceso y carece de una economía en la producción de conidios a escala satisfactoria (Méndez *et al.*, 2010).

El crecimiento está marcado por un incremento en el consumo de oxígeno el cual, reduce drásticamente una vez que la fuente de carbono es agotada. La gradual extinción de los nutrientes va acompañado de un declive en el metabolismo primario, entonces comienza el metabolismo secundario siendo el momento en que se acumulan reservas para tolerar el estrés al cual el hongo está siendo sometido, especialmente se sintetizan altas concentraciones de trehalosa, lo que permite conservar energía así como la integridad de la pared celular (Feofilova *et al.*, 2012).

La producción masiva de hongos entomopatógenos continúa siendo un reto. Los diferentes métodos de cultivo evalúan la capacidad de producción de propágulo de variados medios sintéticos o residuos agroindustriales económicos (Khachatourians y Qazi, 2008). Una fermentación líquida permite una mayor disponibilidad y distribución del oxígeno en el medio de cultivo en la etapa donde es más necesario.

En un estudio conducido por Abraham *et al.* (2003) se determinó la capacidad de melaza para ser utilizada como fuente de carbono en la producción masiva de *B. bassiana*; en ellos, cultivaron el hongo por 20 días a temperatura ambiente. En el

caso de la melaza, evaluaron diferentes concentraciones de la misma: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0%. La mayor producción de esporas se presentó en el medio con melaza al 6.0% (1.53×10^{10} esporas en 100 mL), seguida por 5 y 4% (1.25×10^{10} esporas en 100 mL).

No obstante, se han realizado experimentos con medios sintéticos. Con el objetivo de determinar si el cultivo líquido podría ser usado para producir altos rendimientos de esporas estables de varios hongos entomopatógenos, Vega *et al.* (2003) evaluaron diferentes concentraciones carbono (glucosa) y tasas de C:N (glucosa y casaminoácidos). Sorpresivamente encontraron que al utilizar 36 g L^{-1} de carbono y una tasa C:N de 10:1 (45 g L^{-1} glucosa y 45 g L^{-1} casaminoácidos), todos los hongos obtuvieron sus máximos rendimientos en casi todos los momentos de medición (a los días 2, 4 y 7 después de cultivo). Específicamente, las producciones más eficientes al séptimo día, las consiguieron las cepas ATCC 20874 (2.69×10^9 esporas mL^{-1}), ARSEF 6730 (2.24×10^9 esporas mL^{-1}) y ARSEF 4502 (1.33×10^9 esporas mL^{-1}) de *P. fumosoroseus* seguidas por *B. bassiana* ATCC 74250 (1.23×10^9 esporas mL^{-1}). Las concentraciones más bajas fueron registradas por *B. bassiana* ARSEF 5460 (0.27×10^9 esporas mL^{-1}) y *M. anisopliae* ARSEF 4901 (0.07×10^9 esporas mL^{-1}).

Una modalidad del cultivo líquido evaluada por Jackson *et al.* (2004) para reducir costos de procesos y pérdida de producto asociada con secado, empaque, transporte y almacenamiento fue el uso de un tanque de fermentación para la producción de bioinsecticidas *in situ* a pequeña escala. Como inóculo, utilizaron preparaciones de blastoesporas secadas por liofilización o aireación, las cuales

fueron rehidratadas en agua destilada y almacenadas a 4 °C hasta su uso. La viabilidad inmediata a la rehidratación fue del 100% la cual se redujo a 16% el día 17. No hubo diferencia significativa entre la tasa de viabilidad del cuarto y séptimo día aunado a que en todos los casos, las esporas lograron incrementar su concentración alrededor de tres veces respecto a la original en un periodo de dos días de fermentación a 300 rpm y 28°C. Esta información indica que es posible obtener una cantidad importante de ingrediente activo aún con esporas que reportan una viabilidad baja, ya que las sobrevivientes no pierden su actividad metabólica.

Los ingredientes del medio de cultivo pueden afectar el desarrollo y densidad celular. Comprender el impacto que la nutrición tiene sobre el crecimiento y esporulación de los hongos entomopatógenos, ayudará a ser más factible el llevar en mayor cantidad los bioinsecticidas al mercado (Gao y Liu, 2010). Cliquet y Jackson (2005) evaluaron el impacto del carbono y nitrógeno en la producción, germinación, tolerancia a la desecación y estabilidad en almacén de blastoesporas de *P. fumosoroseus* después de 4 días de cultivo a 300 rpm y 28 °C en agitación orbital. La mayor producción se obtuvo con los más altos niveles de nitrógeno y carbono (13.2 y 80 g L⁻¹ de casaminoácidos y glucosa respectivamente) logrando una cifra de 8.5 x 10⁸ blastoesporas mL⁻¹. Por otra parte, la segunda mejor producción, de 5.9 x 10⁸ blastoesporas L⁻¹, fue en el medio con los mismos 13.2 g L⁻¹ de casaminoácidos pero la concentración de glucosa fue reducida a 8 g L⁻¹.

Con la intención de evaluar el medio C Rivas como productor de blastoesporas de *Paecilomyces fumosoroseus*, Lozano-Contreras *et al.* (2007) emplearon un bio-

reactor de 5 litros a una agitación de 520 rpm, recuperaron 2×10^{10} blastoesporas mL^{-1} después de 72 horas de incubación. El medio de cultivo utilizado está formulado con 80 g L^{-1} de glucosa como fuente de carbono y 20 g L^{-1} como fuente de nitrógeno.

Por otra parte, Derakhshan *et al.* (2008) reportaron una producción de 8.33, 6.50 y 6.30×10^8 esporas mL^{-1} para *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas en caldo molasa - levadura, caldo papa-zanahoria y caldo papa - sacarosa, respectivamente; después de 14 días de fermentación líquida inmóvil a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Es claro que estos resultados son afectados significativamente por el tipo de medio de cultivo.

Otra muestra de la influencia de los nutrientes en el medio de producción es la investigación llevada a cabo por Sahayaraj y Namasivayam (2008), donde utilizaron agua de coco, de arroz cocinado y de arroz lavado en la producción de esporas de *B. bassiana*, obteniendo rendimientos de 1.2, 1.0 y 0.8×10^9 esporas mL^{-1} respectivamente. Una posible explicación en los dos últimos medios es que al cocinar el arroz se liberan una mayor cantidad de almidones al solo lavarlo los cuales, constituyen la fuente de carbono que utilizó el hongo. El mismo estudio se realizó con los hongos *I. fumosorosea* y *V. lecanii*; sin embargo, los resultados fueron menos satisfactorios.

Igualmente en 2008 Kassa *et al.*, obtuvieron 5.12×10^7 - 5.8×10^7 con *B. bassiana* GHA-726 y 5.3×10^7 - 6.4×10^7 esporas mL^{-1} para *M. anisopliae* IMI 330189 después de 3 días en cultivo líquido a 125 rpm y $25 \pm 2^\circ\text{C}$ utilizando suero de leche a 62.5, 75 y 87.5 g L^{-1} ; no se lograron cantidades importantes de propágulo a concentraciones menores del sustrato.

En el trabajo de Assaf *et al.* (2009), se pretendía mejorar el rendimiento de conidias sumergidas, para lo cual utilizaron como testigo un medio basal con 50 g L⁻¹ de glucosa así como un conjunto de once sales a diferentes niveles. En la primera etapa de su experimento, lograron incrementar la concentración de 2 x 10⁸ esporas mL⁻¹ dada por el testigo hasta 6.85 x 10⁸ cuando el factor de cambio era el nivel de MgSO₄·7H₂O en el medio.

Se ha observado que además de los nutrientes en un medio de cultivo, la cantidad de los mismos y la cepa de un hongo entomopatógeno podrían ser factores determinantes en el rendimiento de esporas en una fermentación. Para ilustrar lo anterior, Jackson y Jaronski (2009) realizaron una comparación de dos cepas de *M. anisopliae* cultivadas a 28°C y 300 rpm en el siguiente medio basal: KH₂PO₄, 4.0 g; CaCl₂·2H₂O, 0.8 g; MgSO₄·7H₂O, 0.6 g; FeSO₄·7H₂O, 0.1 g; CoCl₂·6H₂O, 37 mg; MnSO₄·H₂O, 16 mg; ZnSO₄·7H₂O, 14 mg; tiamina, riboflavina, pantotenato, niacina, piridoxamina, ácido tiótico, 500 mg de cada uno; ácido fólico, biotina, vitamina B12, 50 mg de cada uno. Las cantidades de fuentes de carbono y nitrógeno así como los resultados se presentan en el Cuadro 2.

Se mencionó anteriormente un estudio realizado por Barajas *et al.* (2010) en el cual llevaron a cabo una dinámica de producción para conidias de *M. anisopliae*. El mismo estudio se realizó en el caso de blastoesporas donde llegaron a la fase de meseta a las 60 horas con niveles superiores a 10⁷ propágulos mL⁻¹.

Cuadro 2. Comparación de la producción de blastoesporas por cepas de *M. anisopliae* después de 4 días de crecimiento a 28 °C y 300 rpm en varios medios de cultivo líquido.

<i>M. anisopliae</i>	Glucosa (g L ⁻¹)	Casaminoácidos (g L ⁻¹)	Blastoesporas (x 10 ⁵ mL ⁻¹)
MA1200	10	10	0.9
	16.6	3.4	6.5
	18	2	4.5
	45	45	1616.7
	75	15	515
	81	9	180
F52	10	10	1.3
	16.6	3.4	0.9
	18	2	0.1
	45	45	3.2
	75	15	1.3
	81	9	26.8
TM109	10	10	0
	16.6	3.4	0
	18	2	0
	45	45	14.5
	75	15	12.1
	81	9	7.9

En un experimento con dos fases líquidas, Chong-Rodríguez *et al.* (2011), lograron una producción de hasta 6.38×10^9 esporas mL⁻¹ de *Beauveria bassiana* GHA después de seis días de cultivo. El medio contenía licor de remojo de maíz como fuente de nitrógeno, mientras que el carbono fue suplementado por 50 g L⁻¹ de glucosa en la primera e igual cantidad de sacarosa en la segunda fase, respectivamente. Además, el medio de cultivo estaba suplementado con: KNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄, CaCl₂× 2H₂O, FeSO₄×7H₂O, CoCl₂×6H₂O, MnSO₄×2H₂O, ZnSO₄×7H₂O. Debido a que estos rendimientos fueron mejores que

los de otros investigadores utilizando la misma cepa, concluyeron que es posible obtener una gran cantidad de propágulo utilizando fuentes de carbono y nitrógeno alternativas a las comúnmente empleadas.

Recientemente, Srikanth y Santhalakshmi (2012) evaluaron el efecto de aditivos como potenciadores de la producción de *Beauveria brongniartii* a un medio de cultivo de melaza al 3%. Cada suplemento se agregó en 7 concentraciones diferentes, al agregar cloruro de calcio al 2.5% lograron una concentración de 8.05×10^{10} esporas en 100 mL. Con quitina en su nivel más alto (0.5%), el testigo de ácido láctico (0.0%) y todas las densidades excepto el testigo de polietilen - glicol; se obtuvieron valores de 3.58 , 4.17 y 3.99×10^{10} esporas en 100 mL del medio de cultivo. Estos resultados se consiguieron después de 20 días de fermentación.

A causa de estos altos rendimientos en tiempos cortos, es importante expandir la evaluación de residuos agro-industriales hacia el cultivo sumergido. De igual modo, buscar nuevas fuentes de desechos para determinar su eficiencia como sustratos para una elaboración más viable de hongos entomopatógenos, y a su vez incrementar la cobertura hacia los productores agrícolas.

2.4. Estabilidad del ingrediente activo formulado

2.4.1. Factores que afectan la estabilidad

Fisiológicamente, la estabilidad está estrechamente relacionada con la acumulación de reservas endógenas y la alteración de la composición de las paredes celulares. Estas diferencias se observan entre el empleo de una fuente de carbono y/o nitrógeno a otra aunque también se puede lograr mediante el uso de aditivos en el medio de cultivo así como la formulación del ingrediente activo posterior a la cosecha (Lozano-Contreras *et al.*, 2007).

Se ha observado que los niveles de trehalosa son altos en los estados de dormancia de las esporas, una parte es consumida por las mismas durante este periodo y la otra permanece como reserva que se va degradando para transformarse en glucosa cuando comienza la germinación. La síntesis de trehalosa comienza justo antes del estado de dormancia, al presentarse un factor estresante como el declive de los nutrientes en el medio durante el crecimiento de los hongos (Feofilova *et al.*, 2012).

Se ha considerado que también la fuente de nitrógeno podría ser un factor que interviene en la viabilidad de las esporas, esto lo observaron Jackson *et al.* (2003) donde evaluaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en la sobrevivencia de blastoesporas liofilizadas de *Paecilomyces fumosoroseus* ARSEF 4491 en un medio basal con 80 g L⁻¹ de glucosa como fuente de carbono y 13.2 g L⁻¹ de la fuente de nitrógeno a evaluar. Mientras que los rendimientos de esporas fueron equiparables al cabo de 4 días de cultivo a 28 °C en agitación de 300 rpm, no fue así con la sobrevivencia después de ser liofilizadas ya que por una parte los casaminoácidos y el extracto de levadura permitieron una germinación de 82 y 79% respectivamente, el líquido de remojo de maíz sostuvo una sobrevivencia del 44% y el digerido de harina

de soya un 38%. Si se desea evaluar el efecto de una fuente de carbono sobre este mismo parámetro, debe tomarse en cuenta utilizar una fuente de nitrógeno que no intervenga en el resultado.

Otro estudio al respecto es el realizado por Iskandarov *et al.* (2006), ellos cultivaron la cepa AIG de *B. bassiana* con el objetivo de evaluar el efecto de la composición nutricional del medio de cultivo en la germinación de esporas de este hongo. Al utilizar agua con glucosa (0.25%) no registraron la germinación de espora alguna al cabo de 48 horas, sucediendo lo mismo cuando la fuente de carbono fue sacarosa. Por otra parte, al utilizar extracto de levadura y bactopectona en las mismas cantidades, lograron porcentajes de germinación de 94.7 y 96.2, respectivamente en menos de 16 horas. Los mismos tratamientos fueron evaluados en *M. anisopliae* M-99 solo que este hongo alcanzó germinaciones cercanas al 80% en presencia de carbono mientras que con nitrógeno logró el 94.2% de sus esporas germinadas en 16 horas. Esto sugiere que la estabilidad de un hongo está dada tanto por los nutrientes en el medio como por el hongo entomopatógeno con el cual que está trabajando. También encontraron que las esporas de ambos hongos comienzan a germinar a partir de 20 °C llegando a su punto óptimo a los 35 °C.

La temperatura es otro factor determinante en la sobrevivencia de las esporas de un hongo entomopatógeno a través del tiempo, eso lo demostraron Cliquet y Jackson (2005) quienes almacenaron a 4 °C blastoesporas frescas de *Paecilomyces fumosoroseus* 612 en su medio de cultivo o en la solución de glucosa al 2.5%. Al transcurrir 4 semanas, lograron conservar una germinación menor a 30% sin importar

los nutrientes del medio de cultivo o si el líquido de almacenado era el propio medio o la solución de glucosa al 2.5% y sin formular; mientras que esporas protegidas por un secado por liofilización no germinaron después de 4 días a 25 °C sin importar los medios de producción o los fluidos de almacén. En ambas pruebas utilizaron las mismas condiciones nutrimentales.

Por otra parte, las especies del género *Isaria* se han localizado predominantemente en trópicos y subtrópicos por lo que podría ser conveniente desarrollar productos para su uso en regiones de climas cálidos. En un estudio realizado por Carrillo-Pérez *et al.* (2013) se evaluó la sobrevivencia de esporas de *I. fumosorosea* P43A y PCC cultivadas del siguiente medio líquido: 50g de dextrosa, 2g de NH_4NO_3 , 2g de KH_2PO_4 , 2g de KCl, 0.2g de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20mg de $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20mg de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 15mg de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (cantidades por L^{-1}). Una vez cosechadas las esporas fueron expuestas a 30, 34, 38 y 42 °C por 30 minutos; la sobrevivencia se sostuvo al 100% para ambas cepas a 30 y 34 °C mientras que a 38 °C disminuyó a 96.4 y 79.6% para P43A y PCC respectivamente. A 42 °C la cepa P43A mantuvo un nivel de sobrevivencia relativamente alto (78.5%), al contrario de la cepa PCC cuya viabilidad declinó hasta alcanzar 7.1% de esporas vivas.

Recientemente, Ansari y Butt (2011) almacenaron conidias de *Metarhizium anisopliae* y *M. brunneum* a 4 y 20 °C. Al transcurrir 4 meses determinaron su porcentaje de germinación encontrando que en *M. anisopliae* F52 a 4°C logró una cifra de 52% mientras que a 20 °C sólo un 32%. Esto fue más notorio con la cepa ARSEF 4556 con 91% y 34% y *M. brunneum* con 82% y 36% ambas a 4°C y 20 °C,

respectivamente. Se debe aclarar que no se menciona si las conidias fueron formuladas.

El método de secado podría afectar la estabilidad de las esporas que se desea almacenar ya que de ser muy agresivo disminuiría considerablemente la sobrevivencia de las mismas. Esto se demostró en el trabajo de Kassa *et al.* (2004) en el cual aplicaron 3 técnicas de secado a esporas de *M. anisopliae* producidas en el medio líquido BH (3% biomalta y 1% extracto de levadura). Después de 24 horas de germinación, las esporas recién cosechadas a las cuales no se les aplicó una técnica de secado presentaron un porcentaje de sobrevivencia del 98.39% mientras que las secadas por aspersion, liofilización y liofilización con pulverizado revelaron una germinación de 92.66, 66.64 y 36.32% respectivamente.

2.4.2. Formulación y vida de anaquel

Un agente de biocontrol debe proveer un beneficio a bajo costo al usuario final, permanecer viable e infectivo durante su periodo de almacén y controlar consistentemente las plagas a nivel campo. La vida de anaquel se acorta debido a que las esporas comienzan a germinar y mueren al no existir las condiciones favorables para su crecimiento. El proceso de germinación requiere tres factores, eliminar uno de ellos significa evitar el evento. Siendo así, el desafío consiste en eliminar o inhibir uno de estos requerimientos sin matar o reducir la eficiencia de la espora. El primer componente se refiere a los nutrientes, éstos son muy difíciles de excluir ya que son parte de las reservas endógenas o están presentes en el medio de

producción así que forman parte del producto final. En cuanto al agua, excluirla o reducirla por debajo de cierto nivel puede prevenir la germinación pero se debe de tener cuidado de no exceder el límite óptimo ya que el remover el agua molecular dañará a las esporas acortando su longevidad. La completa exclusión del oxígeno es difícil de lograr y puede no ser benéfica bajo ciertas condiciones; consecuentemente, de las tres opciones la más utilizada es eliminar la humedad. (Jackson *et al.*, 2010)

La formulación de propágulos de hongos entomopatógenos para su uso como agentes de biocontrol ha sido guiada por la necesidad de mejorar la vida de anaquel del mismo, su eficiencia y/o las características físicas del producto. Las formulaciones que mejoran la tolerancia a la desecación de la espora o la vida de anaquel así como los crioprotectores y aceites pueden inhibir la germinación o el contacto de la espora con su hospedero, resultando en la reducción de la eficiencia del biocontrol (Vega *et al.*, 2009).

Mientras que los propágulos de algunos hongos entomopatógenos como *Lecanicillium* spp. son hidrofílicos y se suspenden bien en agua, otros son hidrofóbicos. Esta hidrofobicidad es en parte responsable por su unión a la cutícula del hospedero, contrariamente al querer formularlos en suspensiones acuosas resulta problemático (Wraight *et al.*, 2007). Los propágulos hidrofóbicos son fácilmente suspendidos en aceites, por lo que muchos bioplaguicidas basados en conidias en el mercado se encuentran disponibles en aceites fluidos o emulsificables.

Un ejemplo de ello es el trabajo de Consolo *et al.* (2003) donde realizaron formulaciones con conidias de *B. bassiana* cultivadas por 10 días a 26 °C en arroz vaporizado. Las formulaciones consistieron en 10^8 conidias ml^{-1} en 95% de aceite vegetal (maíz, girasol o canola) y 5% queroseno las cuales fueron almacenadas a 4, 17 y 26 °C por 4 semanas. Al transcurso de este tiempo, la viabilidad de todos los tratamientos permaneció cercana a 100% sin existir una diferencia estadística entre el tipo de aceite o la temperatura de almacenamiento a la que fueron sometidas las formulaciones. Sin embargo, algunos aceites pueden ser fitotóxicos por lo que su uso no es práctico (Gao y Liu, 2010).

Un soporte muy utilizado para formular propágulos de hongos entomopatógenos es la tierra de diatomeas, esta es una sustancia que existe naturalmente, está compuesta de remanentes fosilizados de diatomeas unicelulares acuáticas. Posee un efecto sinergista cuando se utiliza para formular hongos entomopatógenos debido a que es abrasiva a la cutícula del insecto, lo que facilita la unión y penetración del hongo al hospedero (Batta, 2008).

Se han realizado diversos estudios para evaluar la viabilidad de las esporas de hongos entomopatógenos con diferentes soportes y procesos de conservación. Por ejemplo, en el estudio de producción de *P. fumosoroseus* en bio-reactor llevado a cabo por Lozano-Contreras *et al.* (2007), las blastoesporas obtenidas mantuvieron una viabilidad de 59 - 65 % a 4°C después de 5 meses cuando fueron formuladas con tierra de diatomeas mientras que cuando se almacenaron sin soporte, la sobrevivencia declinó a menos del 46 % en el mismo periodo.

Magalhaes y Boucias (2004) realizaron un tratamiento de secado a conidias de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, después de cosechar las esporas las transfirieron a una cámara de secado donde la humedad relativa se mantuvo alrededor de 5% mientras que por otra parte, almacenaron conidias sin secar en bolsas plásticas; ambos grupos de conidias se mantuvieron a 25 °C. Después de 15 días, encontraron que remover el agua libre no afectó adversamente la germinación ya que tanto conidias frescas como secas desarrollaron tubo germinativo a las 12 horas. Más aún, las conidias secas germinaron a mayor velocidad que las recién cosechadas. El proceso de secado favoreció la viabilidad cercana al 100 % de las conidias después de 100 días mientras que las esporas almacenadas sin secar apenas lograron mantener una sobrevivencia poco superior al 40 % a los 17 días.

Leland *et al.* (2005) secaron diferentes propágulos de *M. anisopliae* var *acridum* utilizando silica gel. Determinaron el porcentaje de germinación después de 42 horas de los propágulos antes y después del secado. En el primer caso solamente el 54% de las blastoesporas germinó mientras que las cifras para las conidias sumergidas y conidias aéreas fueron de 95 y 94% respectivamente. El secado con silica gel redujo drásticamente la viabilidad de los tres tipos de propágulos ya que la viabilidad máxima fue de 47% lograda por las conidias sumergidas mientras que para las blastoesporas fue únicamente del 20%. Estos valores se obtuvieron con los propágulos sin lavar el medio de cultivo ya que en el caso contrario, la cifra se redujo a menos del 5%.

En el estudio realizado por Cliquet y Jackson (2005) donde evaluaron el impacto del carbono y nitrógeno en la producción, germinación, tolerancia a la desecación y estabilidad en almacén de blastoesporas de *P. fumosoroseus*, lograron una viabilidad del 96% de las esporas recién cosechadas después de 4 días de cultivo en el medio con los más altos niveles de nitrógeno y carbono (13.2 y 80 g L⁻¹ de casaminoácidos y glucosa respectivamente) mientras que después de secado por liofilización fue de 74.7% cuando se dejó el medio de cultivo utilizado en su producción y del 73.5% cuando las esporas fueron lavadas y resuspendidas en una solución de glucosa al 2.5%. Por otra parte, el 94% de las blastoesporas recién cosechadas del medio con los mismos 13.2 g L⁻¹ de casaminoácidos pero la concentración de glucosa reducida a 8 g L⁻¹ logran germinar; sin embargo, después del tratamiento de secado la cifra se redujo a 16.2% conservando el medio de cultivo y 86% cuando las esporas se lavaron y resuspendieron en la glucosa al 2.5%. Esto sugiere la importancia de la presencia de fuente de carbono no sólo en la producción de esporas, sino en su capacidad de resistir tratamientos de secado.

Jackson y Payne (2007), utilizaron una cámara de secado con aire, evaluaron el efecto de diferentes porcentajes de humedad relativa dentro de la cámara al momento del secado en la sobrevivencia de blastoesporas de *I. fumosorosea*. Las mediciones fueron después del secado, un mes después y dos meses después de almacenado a 4 °C. Cuando la humedad relativa de la cámara se mantuvo aproximadamente entre 40% y 65%, la viabilidad de las esporas se logró un rango del 64 al 82% mientras que al 30% decreció hasta 35% justo después del tratamiento de secado. Al transcurso de uno y dos meses, la viabilidad de las blastoesporas de *I.*

fumosorosea secadas a >50% de humedad relativa, se mantuvo niveles por encima del 50% mientras que a humedades por debajo del 40% apenas alcanzó el 21%. El contenido de humedad de las esporas con sobrevivencia superior era de 4.5% mientras que el resto fue de 2.4 a 2.7%. Estos resultados sugieren que un secado más lento un nivel de humedad más alto dentro de las células podrían ser necesarios para que las esporas se aclimaten al estado de desecación o para tener la oportunidad de acumular componentes que le ayuden a sobrevivir durante el almacenado en seco.

En un experimento Kim *et al.* (2010) expusieron las conidias de *Isaria fumosorosea* producidas en maíz molido, a 50 °C por 2 horas. Mientras que sin aditivos únicamente lograron sobrevivir el 31.5%, al adicionar aceite de maíz consiguieron elevar la cifra a 91.2%, seguidas de aquellas con KCl con un 82.6%. Esto sugiere la posible relación entre la presión osmótica o el potencial de agua del medio con la termotolerancia de las conidias producidas en el mismo.

Otro ejemplo donde se evaluó el uso de aditivos como protectores para propágulos durante el proceso de liofilización es el estudio realizado por Toegel *et al.* (2010); al congelar y descongelar conidias de *B. brongniartii* sin el uso de un crioprotector se perdió hasta un $58 \pm 8\%$ de la viabilidad, el cloruro de sodio no aportó protección alguna y al agregar cisteína el daño al propágulo incluso fue mayor. Por otra parte, la fructosa proporcionó un buen efecto protector ya que se perdieron únicamente el $4 \pm 3\%$ de las esporas de *B. brongniartii*. En la misma investigación, *M. anisopliae* perdió únicamente el $17 \pm 7\%$ de viabilidad cuando no se utilizaron crioprotectores; otros

aditivos como glucosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, sorbitol y cisteína protegieron significativamente a las esporas mientras que el manitol y el cloruro de sodio dañaron severamente las esporas lo que resultó en sólo un 1% de sobrevivencia.

En otro caso, Chong - Rodríguez *et al.* (2011) monitorearon la viabilidad de esporas de *B. bassiana* formuladas en tierra de diatomeas y secadas por aireación a lo largo de seis meses en dos medios de cultivo cuya diferencia era únicamente en la fuente de carbono y nitrógeno utilizada en cada uno de estos. Mientras que en el medio con sacarosa y líquido de remojo de maíz se registraron valores de 1.14×10^8 esporas mL^{-1} , en el medio con glucosa y peptona la concentración fue de 1.5×10^7 esporas mL^{-1} al transcurrir un mes de almacén a 4 °C. Al cabo de 6 meses, los título del primer medio se mantuvieron en 6.5×10^7 esporas mL^{-1} mientras que en el segundo, el decremento fue más notorio ya que la concentración de esporas mL^{-1} únicamente alcanzó hasta 3×10^5 . Este mismo estudio se realizó a 26 °C, sin embargo, las unidades infectivas se mantuvieron en concentraciones iguales o menores a 10^6 esporas mL^{-1} desde el primer mes de medición.

Recientemente, Mishra *et al.* (2013) evaluaron por 12 meses la vida de anaquel a 30 ± 2 °C de conidias de *B. bassiana* formuladas en encapsulados con cubierta de glucosa o en emulsiones en aceite de linaza. En el primer caso el encapsulado estuvo compuesto de una solución acuosa con 5% de leche desgrasada en polvo, y 1.25% de polivinil pirrolidona K-90; este tratamiento logró sobrevivencias superiores al 90% los primeros seis meses y al cabo del doceavo mes se mantuvo por encima del 78%. Para la emulsión se utilizaron 5 ml de aceite de linaza, 2.5 ml de surfactante

y 45 ml de agua estéril; aunque mantuvo una sobrevivencia mayor al 60% durante los primeros seis meses, gradualmente esta cifra se redujo hasta un 28.87% en el último mes de la evaluación.

La viabilidad de los propágulos debe ser garantizada hasta el momento en que penetre la cutícula del insecto. Una de las principales razones que acortan la vida de anaquel es la inestabilidad de las esporas en temperaturas altas. Un secado forzado puede reducir la termotolerancia conidial debido al calor y al estrés hídrico al que se someterán al término de éste. Por otra parte la inanición, particularmente la pérdida de fuente de nitrógeno se relaciona con la termotolerancia conidial (Kim *et al.*, 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio L2 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

3.2. Preparación de los sustratos

Los sustratos en evaluación consistieron en agua residual de aislado de proteína de soya (generosamente donado por el Dr. Armando del Follo Martínez de la empresa Sigma Alimentos S. A. de C. V.) e infusión de cáscara de plátano (procedencia casera). El primer material se filtró utilizando tela de gasa doble únicamente al detectar restos sólidos. Las cáscaras de plátano fueron expuestas al ambiente hasta la elaboración de la infusión. Posteriormente se les eliminó la humedad colocándose a 60 °C (estufa MAPSA modelo HDP-334) por un lapso de 7 ± 1 horas. Transcurrido este tiempo el material se enfrió en desecador.

Posteriormente, se colocaron 167 g de la materia prima seca en 1000 mL de agua contabilizando 30 minutos a partir de la ebullición a fuego medio utilizando un recipiente con tapa, al término de este periodo se dejó enfriar. El componente sólido se exprimió manualmente mientras que la parte líquida se separó a través de filtración por una tela de gasa doble con el objetivo de eliminar partículas remanentes. (Simon y Anamika, 2011). Finalmente, ambos sustratos se conservaron en recipientes herméticos en congelación a -18 °C hasta su uso, momento en el que se procedió a descongelarlos a temperatura ambiente y homogeneizarlos manualmente con la ayuda de una varilla de vidrio.

3.3. Preservación de las cepas

Las cepas de hongos entomopatógenos utilizadas en el presente estudio son *Beauveria bassiana* GHA e *Isaria fumosorosea* 612. Para su preservación, se pesaron 0.1 g (balanza Mettler Toledo AG204) del formulado, realizándose diluciones en serie hasta 10^{-9} . De las últimas tres diluciones, se estriaron placas con 15 mL de agar papa dextrosa (BD Bioxon) en cuatro cuadrantes utilizando un asa bacteriológica, esterilizándola en cada cuadrante. Se incubaron a temperatura ambiente por dos semanas (Vega *et al.*, 2003).

Una vez transcurrida la incubación, se tomaron porciones de una colonia con un asa bacteriológica estéril para estriar completamente placas Petri con 15 mL de agar papa dextrosa. Se incubaron a temperatura ambiente por 15 días, al final de este tiempo se cortaron cuadros de 5 mm con un bisturí estéril los cuales se colocaron en

crioviales con 2 mL de glicerol estéril al 10 %. Estos crioviales se almacenaron a -80 °C en un ultracongelador vertical Revco, modelo ULT2586-9-A36 (Vega *et al.*, 2003).

3.4. Inóculo

Para la obtención del inóculo, en cada experimento se descongeló un criovial del hongo a utilizar para posteriormente agitarlo con ayuda de un vórtex (Maxi Mix II 37600) con el objetivo de homogeneizarlo. Se estriaron completamente 5 placas Petri con 15 mL de agar papa dextrosa solidificado. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 días (Chong-Rodríguez *et al.*, 2011). Al término del periodo de incubación, las conidias fueron suspendidas agregando Tween 80 al 0.1% estéril a las cajas Petri, con el objetivo de desprender las esporas, balanceando cada placa cuidadosamente, recuperando la suspensión con la ayuda de una micropipeta. Se repitió el proceso tres veces para asegurar la máxima colecta de esporas.

Finalmente, la suspensión se agitó de forma manual vigorosamente para homogeneizarla, se realizaron diluciones en serie hasta 10^{-3} . Para el conteo de esporas se utilizó un microscopio de luz Labomed a 40x colocándose 10 μ L de la última dilución en una cámara de Neubauer Loptik labor.

3.5. Cultivo

La unidad experimental consistió en un matraz bafleado de 250 mL. El volumen total de medio de cultivo fue de 50 mL conteniendo: 20 g L⁻¹ de líquido de remojo de maíz

como fuente de nitrógeno, 5 mL de suspensión de conidias a una concentración de 10^7 mL^{-1} como inóculo, agua destilada y la fuente de carbono. La combinación de los 2 hongos y 2 fuentes de carbono a 5 niveles; dieron lugar a los siguientes 20 tratamientos mostrados en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Tratamientos evaluados en la producción de esporas de hongos entomopatógenos en cultivo líquido.

Tratamiento	Fuente de carbono*	Niveles de fuente de carbono⁺	Hongo entomopatógeno
T1SBb	ARS	0 mL	<i>B. bassiana</i>
T2SBb	ARS	5 mL	<i>B. bassiana</i>
T3SBb	ARS	10 mL	<i>B. bassiana</i>
T4SBb	ARS	25 mL	<i>B. bassiana</i>
T5SBb	ARS	44 mL	<i>B. bassiana</i>
T1SIf	ARS	0 mL	<i>I. fumosorosea</i>
T2SIf	ARS	5 mL	<i>I. fumosorosea</i>
T3SIf	ARS	10 mL	<i>I. fumosorosea</i>
T4SIf	ARS	25 mL	<i>I. fumosorosea</i>
T5SIf	ARS	44 mL	<i>I. fumosorosea</i>

* ARS = Agua residual de aislado de proteína de soya

⁺ Se aforo el volumen a 50 ml con agua destilada

Cuadro 3 (continuación). Tratamientos evaluados en la producción de esporas de hongos entomopatógenos en cultivo líquido.

Tratamiento	Fuente de carbono*	Niveles de fuente de carbono ⁺	Hongo entomopatógeno
T1PBb	ICP	0 mL	<i>B. bassiana</i>
T2PBb	ICP	5 mL	<i>B. bassiana</i>
T3PBb	ICP	10 mL	<i>B. bassiana</i>
T4PBb	ICP	25 mL	<i>B. bassiana</i>
T5PBb	ICP	44 mL	<i>B. bassiana</i>
T1PIf	ICP	0 mL	<i>I. fumosorosea</i>
T2PIf	ICP	5 mL	<i>I. fumosorosea</i>
T3PIf	ICP	10 mL	<i>I. fumosorosea</i>
T4PIf	ICP	25 mL	<i>I. fumosorosea</i>
T5PIf	ICP	44 mL	<i>I. fumosorosea</i>

* ICP = Infusión de cáscara de plátano

⁺ Se aforo el volumen a 50 ml con agua destilada

Los tratamientos T1 fueron tomados como testigos negativos al carecer de fuente de carbono. Los matraces, se incubaron en agitación (agitador Lab Line 3527) a 200 rpm durante 96 horas a 25 °C, basado en el procedimiento realizado por Cliquet y Jackson (2005) con leves modificaciones. Al concluir este periodo, se muestreó 1 mL del medio de cultivo, realizando diluciones hasta 10^{-3} para contar las esporas.

3.6. Cinética del crecimiento y consumo de azúcares totales

Se realizó una cinética del crecimiento en aquellos tratamientos que lograron la mayor producción de esporas así como a sus respectivos testigos. Las condiciones de cultivo, toma de muestra y conteo fueron los ya descritos en el apartado 3.5. Las lecturas se realizaron una vez por día hasta alcanzar el sexto día. A la par, cada dos días durante la cinética se llevó a cabo la cuantificación de azúcares totales como azúcares invertidos utilizando el método volumétrico de Lane-Eynon (AOAC, 1968), únicamente en los tratamientos con fuente de carbono.

3.7. Separación, soporte y secado

Los filtrados fueron divididos en tres partes a una de las cuales les fueron adicionados tierra de diatomeas (Bioxon), ceniza volcánica y a la otra caolín como soportes hasta obtener una mezcla homogénea. Se filtró la mezcla a través de papel Whatman No. 1 en un embudo de porcelana colocado sobre un matraz Kitasato a su vez conectado a una bomba de vacío (GE Motors & Industrial Systems). Las esporas sufrieron un secado a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 horas para posteriormente almacenarse en bolsas herméticas a 4 y $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Lozano-Contreras *et al.*, 2007).

3.8. Viabilidad y vida de anaquel

Se pesó 0.1 g de soporte con esporas para disolverlo en 9.9 mL de Tween 80 0.1% estéril y a continuación se diluyó hasta 10^{-3} . Inmediatamente se tomaron y colocaron

0.10 μL en una superficie de 1.5 cm^2 de una placa con agar bacteriológico (BD Bioxon) dejándose secar e incubar por 12 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se recortó el cuadro de agar colocándolo entre un portaobjetos y cubreobjetos para su observación al microscopio de luz en 40x. Se contaron 100 esporas considerando viables aquellas cuyo tubo germinativo alcanzó al menos la mitad del tamaño de la espora original reportando este dato en porcentaje. Este procedimiento se realizó al término de la producción, después del tratamiento de formulado y secado así como al segundo y cuarto mes de la evaluación de la vida de anaquel.

3.9. Análisis estadístico

Se utilizó el diseño completamente al azar con un arreglo factorial con al menos dos repeticiones por unidad experimental la cual consistió en 1 matraz (producción) o una alícuota de 10 μL de suspensión de esporas (viabilidad). En la etapa de producción el arreglo fue de 2 (hongos) x 2 (fuentes de carbono) x 5 (niveles de fuente de carbono). Para medir la viabilidad de las esporas recién cosechadas el arreglo consistió en 4 (medios de cultivo) x 3 (soportes) mientras que para evaluar la viabilidad durante la vida de anaquel se agregaron los factores temperatura y tiempo de almacenamiento, quedando el arreglo como 4 (los dos tratamientos que mostraron mayor rendimiento y sus testigos) x 3 (soportes) x 2 (4 y 25 °C) x 2 (2° y 4° mes).

La comprobación de la hipótesis se realizó mediante un modelo lineal general, posterior a una transformación con logaritmo natural de la variable respuesta. Debido a que la diferencia entre los tratamientos fue significativa, se realizó la comparación de medias con el método de Diferencia Mínima Significativa (DMS), el intervalo de confianza fue del 95%. Así mismo, se llevó a cabo un análisis de regresión para la estimación de parámetros de crecimiento para ambos hongos entomopatógenos. Los análisis se realizaron con el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales 17.0.0.0 (SPSS por sus siglas en inglés, SPSS Inc. Chicago, Illinois) (Campbell y Wraight, 2007).

4. RESULTADOS

4.1. Producción

Como se puede observar en el Cuadro 4, todos los resultados se deben a la combinación de los tres factores involucrados (cepas, fuente de carbono, niveles de fuente de carbono) ya que la interacción de los mismos es altamente significativa. Los rendimientos máximos fueron de 6.47 y 6.85×10^8 esporas mL^{-1} en los tratamientos T5 con infusión de cáscara de plátano para *I. fumosorosea* (T5PIf) y T3 con agua residual de aislado de proteína de soya para *B. bassiana* (T3SBb), respectivamente. Particularmente, estos datos son superiores y diferentes estadísticamente al resto de los acoplamientos como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 4. Análisis de Modelo Lineal General de la producción de esporas de hongos entomopatógenos después de 4 días de cultivo sumergido.

Fuente	Suma de cuadrados Tipo III	GI	Cuadrado medio	F	Sig.
Modelo corregido	3.306E18	19	1.740E17	111.728	.000
Intercept	2.494E18	1	2.494E18	1601.284	.000
HEntom * FC * NivelesFC	2.150E17	4	5.375E16	34.517	.000
Error	7.942E16	51	1.557E15		
Total	5.918E18	71			
Total Corregido	3.385E18	70			

a. R Cuadrada = .977 (R Cuadrada Ajustada = .968)

Cuadro 5. Producción de esporas de hongos entomopatógenos después de 4 días de cultivo sumergido. Datos con la misma letra no son significativamente diferentes (DMS, $p= 0.05$)

Tratamiento	Rendimiento x 10^7 esporas mL ⁻¹	Tratamiento	Rendimiento x 10^7 esporas mL ⁻¹
T1SBb	34.03 ^c	T1Slf	0.613 ^e
T2SBb	46.78 ^b	T2Slf	2.89 ^d
T3SBb	64.73 ^a	T3Slf	2.73 ^d
T4SBb	1.81 ^d	T4Slf	2.52 ^d
T5SBb	2.18 ^d	T5Slf	2.12 ^d
T1PBb	38.80 ^{bc}	T1Plf	0.60 ^e
T2PBb	43.17 ^b	T2Plf	4.38 ^d
T3PBb	20.77 ^d	T3Plf	7.77 ^d
T4PBb	23.43 ^d	T4Plf	15.53 ^d
T5PBb	17.87 ^d	T5Plf	68.53 ^a

4.2. Cinética del crecimiento y consumo de azúcares totales

Durante la cinética del crecimiento de *B. bassiana* (Figura 1) se reveló que con el tratamiento de 10 mL de agua residual de soya alcanzó su máxima producción a partir del quinto día manteniendo la misma concentración de esporas hasta el día 6. El modelo de mejor ajuste fue el logarítmico cuya ecuación es la siguiente:

$$y = 14.042 + 3.668 \ln x$$

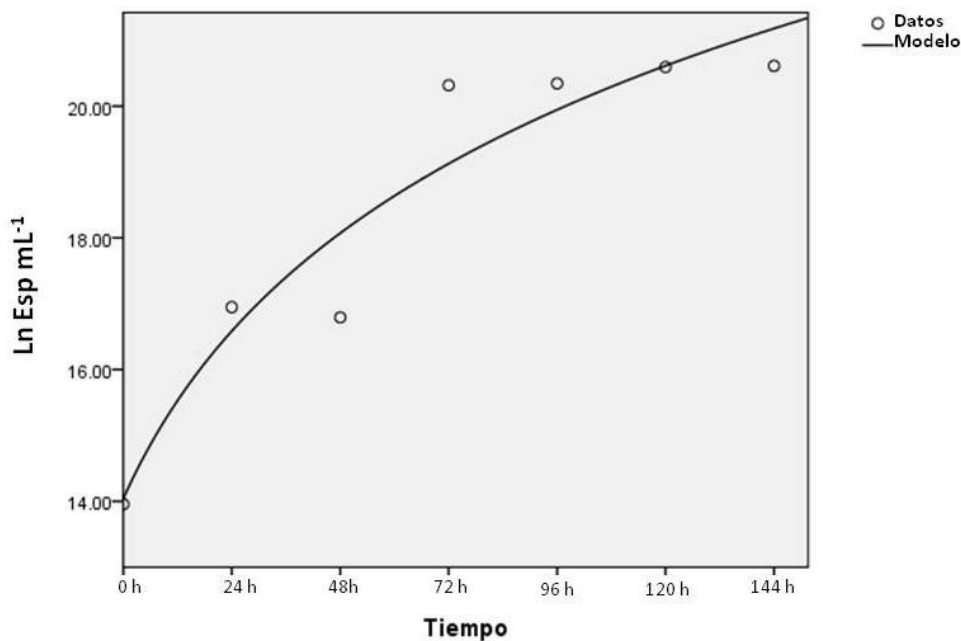


Figura 1. Curva de mejor ajuste para *B. bassiana* GHA en el tratamiento T3SBb

Cuadro 6. Análisis de Varianza de la cinética de producción de esporas de *B. bassiana* GHA.

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Regresión	37.855	1	37.855	51.515	.001
Residual	3.674	5	.735		
Total	41.530	6			

Cuadro 7. Coeficientes para ecuación de modelo cuadrático de la cinética de producción de esporas de *B. bassiana* GHA

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		Sig.
	B	Error Est.	Beta	T	
ln(Tiempo)	3.668	.511	.955	7.177	.001
(Constante)	14.042	.702		20.012	.000

a. R Cuadrada = .912 (R Cuadrada Ajustada = .894)

En el caso de *I. fumosorosea* cultivado en 44 mL de infusión de cáscara de plátano (Figura 2), la mayor producción fue al cuarto día declinando abruptamente a partir de

esta fecha, el resto de las mediciones no reportaron valores sobresalientes. El modelo de mejor ajuste fue el cuadrático (Cuadro 8), los parámetros estimados (Cuadro 9) proporcionan la siguiente ecuación:

$$y = 11.340 + 3.242x - 0.301x^2$$

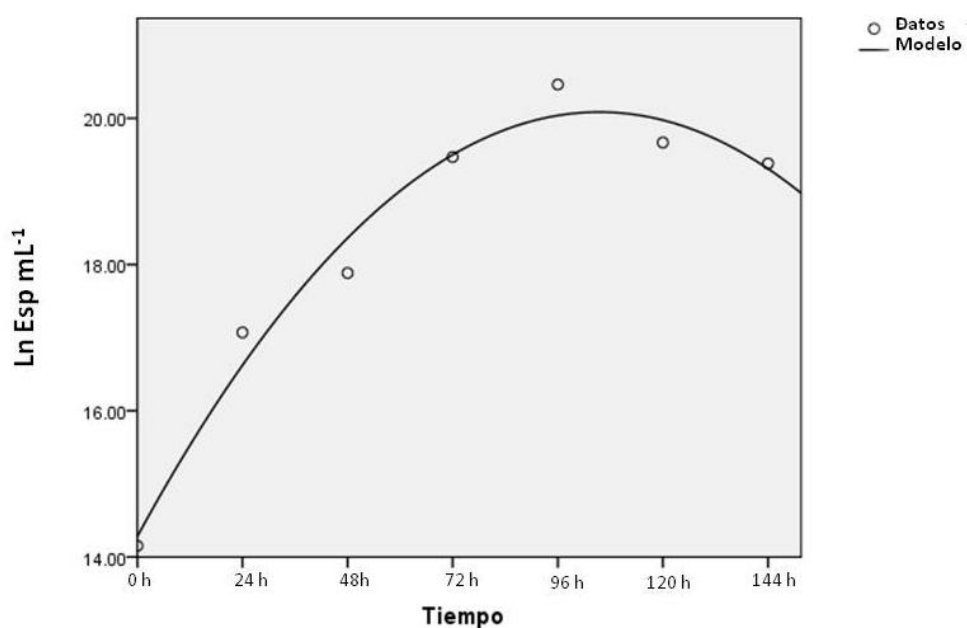


Figura 2. Curva de mejor ajuste para *I. fumosorosea* 612 en el tratamiento T5P1f.

Cuadro 8. Análisis de Varianza de la cinética de producción de esporas de *I. fumosorosea* 612.

	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Regresión	27.251	2	13.626	75.068	.001
Residual	.726	4	.182		
Total	27.978	6			

Cuadro 9. Coeficientes para ecuación de modelo cuadrático de la cinética de producción de esporas de *I. fumosorosea* 612.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes Estandarizados		Sig.
	B	Error Est.	Beta	T	
TiempoL	3.242	.380	3.244	8.521	.001
TiempoL ** 2	-.301	.046	-2.461	-6.465	.003
(Constante)	11.340	.664		17.080	.000

a. R Cuadrada = .974 (R Cuadrada Ajustada = .961)

Por otra parte se encontró que el porcentaje de azúcares totales es mayor en el tratamiento T5PIf que en T3SBb, no obstante es este último quien logró los mejores rendimientos en la producción de esporas al final de la cinética (Cuadro 10).

Cuadro 10. Consumo de azúcares totales por los tratamientos T3SBb y T5PIf con sus rendimientos correspondientes durante la cinética de crecimiento.

Tratamiento	Día	% Azúcares Totales	Rendimiento x 10 ⁷ esporas mL ⁻¹
T3SBb	0	0.33	0.12 ^f
T3SBb	2	0.09	1.98 ^f
T3SBb	4	0.08	64.7 ^b
T3SBb	6	0.07	89.7 ^a
T5PIf	0	2.84	0.14 ^f
T5PIf	2	2.71	5.88 ^f
T5PIf	4	1.44	68.53 ^b
T5PIf	6	0.44	26.3 ^e

*No existe diferencia significativa en datos con la misma letra. DMS ($p = 0.05$)

4.3. Viabilidad

Una vez identificados los mejores tratamientos se les realizó una prueba de viabilidad con las esporas recién cosechadas después de 4 días de cultivo, estas reportaron

una sobrevivencia del 100%. Análogamente, se realizaron las mismas evaluaciones en testigos sin fuente de carbono de estos dos tratamientos obteniendo 99 y 100% en el mismo orden (T1PIf y T1SBb). La sobrevivencia de las esporas después de secado y formulado se presenta en el Cuadro 11. En general, más del 85% de las esporas permanecieron viables a excepción del testigo de *I. fumosorosea* formulado con caolín.

Cuadro 11. Viabilidad de esporas después de formulación y secado.

Producto	Soporte	% Esporas Viables*
T1SBb	Caolín	98 ^a
	T Diat	95 ^a
	Ceniza	97 ^a
T3SBb	Caolín	94 ^a
	T Diat	96 ^a
	Ceniza	95 ^a
T1PIf	Caolín	0 ^b
	T Diat	98 ^a
	Ceniza	100 ^a
T5PIf	Caolín	91 ^a
	T Diat	86 ^a
	Ceniza	92 ^a

*No existe diferencia significativa en datos con la misma letra. DMS (p = 0.05)

4.4. Vida de anaquel

A excepción de T1PIf formulado con caolín, el resto de los tratamientos registraron una sobrevivencia de las esporas cercana o mayor al 70% a los dos meses de almacenamiento a 4°C para los dos hongos entomopatógenos. Sin embargo, al

cuarto mes se observó un decremento notable en la viabilidad, siendo los formulados con tierra de diatomeas los más afectados. Por otra parte, todas las formulaciones de las esporas de *I. fumosorosea* cultivadas en 44 mL de infusión de cáscara de plátano, fueron las únicas que se mantuvieron viables después de 4 meses de estar almacenadas a 26 °C. Esto fue más notable en las que se utilizó caolín como soporte donde el 89% de las esporas germinaron. En general, este soporte resultó ser menos agresivo a excepción de las esporas de *Isaria* producidas en el medio sin fuente de carbono. Los resultados detallados se muestran en el cuadro 12 a continuación:

Cuadro 12. Supervivencia expresada en porcentaje de las esporas de *B. bassiana* GHA e *I. fumosorosea* 612 producidas en los medios de mayor rendimiento y sus respectivos controles a 4 y 26 °C.

Tratamiento	Soporte	4 °C		26 °C	
		2 meses	4 meses	2 meses	4 meses
T1SBb	Caolín	99.67 ^a	75.5 ^a	0 ^d	0 ^d
T1SBb	T Diat	83.5 ^a	36.5 ^b	73 ^a	0 ^d
T1SBb	Ceniza	98 ^a	35.5 ^b	54 ^a	0 ^d
T3SBb	Caolín	99.67 ^a	73 ^a	0 ^d	0 ^d
T3SBb	T Diat	92 ^a	61 ^a	34 ^b	0 ^d
T3SBb	Ceniza	98 ^a	76 ^a	24 ^b	0 ^d
T1PIf	Caolín	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d
T1PIf	T Diat	100 ^a	0 ^d	0 ^d	0 ^d
T1PIf	Ceniza	99.5 ^a	0 ^d	0 ^d	0 ^d
T5PIf	Caolín	98 ^a	47.5 ^a	88.5 ^a	89 ^a
T5PIf	T Diat	68 ^a	21 ^b	33 ^b	13.5 ^c
T5PIf	Ceniza	80 ^a	31 ^b	50 ^a	28.5 ^b

*No existe diferencia significativa en datos con la misma letra. DMS (p = 0.05)

5. DISCUSIÓN

5.1. Producción

El común denominador en los resultados presentados es la producción de esporas de *Beauveria bassiana* GHA y el relativamente nulo crecimiento de *Isaria fumosorosea* 612 en el testigo negativo, el cual no contenía fuente de carbono. Por una parte, el agua residual de aislado de proteína de soya fue muy superior en la producción de esporas de *B. bassiana* que en *I. fumosorosea*, en el nivel 3 principalmente. No obstante en los niveles 4 y 5, el comportamiento fue similar para ambas cepas.

Por su parte, *I. fumosorosea* mostró preferencia por el medio con infusión de cáscara de plátano en el máximo nivel donde *B. bassiana* se desempeñó pobremente; aunque este último obtuvo un buen crecimiento al nivel 2, estadísticamente es similar al nivel 1 el cual no contiene fuente de carbono, restándole relevancia a este tratamiento. Aunque ambos residuos agroindustriales contienen diferentes tipos y proporciones de carbohidratos disponibles aunado a las interacciones resultantes en el análisis estadístico, la variable más influyente en los resultados es la concentración de fuente de carbohidratos (De Fátima Viana *et al.*, 2005; Chen *et al.*,

2011). Todo indica que los requerimientos de carbono por parte de *I. fumosorosea* son superiores a los de *B. bassiana* ya que según revela el análisis de azúcares totales a los tratamientos de mayor rendimiento, el medio con 44 mL de infusión de cáscara de plátano, siendo el máximo nivel de fuente de carbono administrado, es quien contiene una mayor concentración de los mismos. Por otra parte, aparentemente *B. bassiana* bloquea su crecimiento cuando existe un exceso de carbohidratos.

Anteriormente se habían realizado experimentos probando el efecto del medio C Rivas con 80 g L⁻¹ de glucosa como fuente de carbono en *I. fumosorosea*, donde el rendimiento máximo alcanzado después de 72 horas de incubación fue de 2 x 10¹⁰ blastoesporas mL⁻¹ (Lozano-Contreras *et al.*, 2007). Aunque esta producción es mayor a la nuestra, se obtuvo en un bioreactor de 5 litros donde a decir por los mismos autores y por Zelle *et al.* (2010), parámetros importantes en el incremento del crecimiento microbiano aerobio como la transferencia de oxígeno en el medio es más eficiente que en matraz.

Ahora bien, las cifras registradas en el presente estudio son equiparables a las obtenidas por Derakhshan *et al.* (2008) en caldo papa-zanahoria (6.50 x 10⁸ esporas mL⁻¹) y caldo papa-sacarosa (6.30 x 10⁸ esporas mL⁻¹). Más aún, consiguieron una producción máxima de 8.33 x 10⁸ esporas mL⁻¹ en caldo molasa-levadura, solo que nuestros resultados son superiores ya que el tiempo de fermentación fue más de 3 veces menor.

Para el caso de *I. fumosorosea*, se registró un comportamiento similar en un estudio realizado por Assaf *et al.* (2009) quienes utilizaron un medio base con 50 g L⁻¹ de glucosa como fuente de carbono y diferentes combinaciones de sales como tratamientos, logrando una máxima producción de 6.85 x 10⁸ esporas mL⁻¹ con MgSO₄·7H₂O. Cabe destacar que en la presente investigación ninguna sal fue adicionada, por lo que nuestros medios son más eficientes y sencillos.

Por otro lado, se lograron mejores rendimientos de *B. bassiana* comparados con los de Kassa *et al.* (2008), cuyos resultados al tercer día de cultivo fueron de 5.12 x 10⁷ - 5.8 x 10⁷ esporas mL⁻¹ en un medio líquido con suero de leche cuya fuente de carbono fue la lactosa. Sin embargo, Chong-Rodríguez *et al.* (2011) reportaron para la misma cepa, rendimientos de 6.38 x 10⁹ esporas mL⁻¹ después de seis días de fermentación sumergida en un medio con glucosa/sacarosa y líquido de remojo de maíz como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.

Aún así los procesos biotecnológicos de nuestro estudio son más eficientes que los de Chong *et al.* (2011), ya que su medio de cultivo es complejo, utilizaron dos fases líquidas por lo que el tiempo y trabajo invertido en la producción fue mayor. Aunado a ello, emplearon 50 g L⁻¹ de fuente de carbono en cada una de las fases lo que se convierte a 100 g L⁻¹ en total, siendo la mayor cantidad de carbohidratos empleados reportados en la literatura hasta momento.

5.2. Cinética del crecimiento

En los trabajos revisados, los cultivos en medio líquido se realizan en periodos que abarcan entre 3 y 6 días sin especificar la razón. La cinética en el presente estudio revela que el tiempo ideal de cultivo puede variar dependiendo del hongo entomopatógeno; no obstante, las concentraciones más altas de esporas fueron registradas precisamente entre el 3^{er} y 6^o día de cultivo. Los análisis de azúcares totales (Anexos) revelan que en el caso de *B. bassiana* en el medio con 10 mL de agua residual de aislado de proteína de soya, el consumo de los mismos fue a la par con el aumento en el rendimiento de las esporas. A partir del segundo día en que la cantidad de azúcares disminuyó cerca de dos tercios, se observa un consumo a una tasa menor, sin embargo la concentración de esporas continúa en aumento.

Por su parte *I. fumosorosea* se caracterizó por tener un lento consumo de azúcares al principio de la fermentación para posteriormente dar saltos mayores. Lo más relevante radica en el hecho de que el momento de inflexión entre la mayor concentración de esporas y la drástica caída de la misma se presenta justo cuando la reservas de azúcares llegó a la mitad. Esto sugiere que *I. fumosorosea* 612 necesita la presencia de al menos el 1.44% de azúcares disponibles en el medio proporcionado para mantener una producción sin riesgo a que se presente muerte celular. Estos resultados aunado a los modelos matemáticos obtenidos, indican que *B. bassiana* aún se encontraba en crecimiento mientras que *I. fumosorosea* alcanzó un nivel de estrés por el agotamiento de su fuente de carbono, por lo que presumiblemente la síntesis de trehalosa y otros compuestos de reserva se llevaron a cabo (Feofilova *et al.*, 2012).

Al principio de su crecimiento, ambas cepas mantuvieron su etapa de adaptación hasta el segundo día llegando a la fase de meseta a las 96 horas; sin embargo mientras *B. bassiana* continuó en el mismo estado hasta el sexto día, *I. fumosorosea* experimentó muerte celular. En el estudio realizado por Barajas *et al.* (2010) se revela que *M. anisopliae* llegó a fase de meseta a las 60 horas del cultivo. Las diferencias de la duración de las etapas y el crecimiento total en estos hongos marca la importancia del monitoreo de las mismas con el objetivo de proporcionarle a cada género el tiempo que requiere para alcanzar su máxima producción, evitando con ello el riesgo de pérdida de rendimientos.

5.3. Viabilidad

No se localizó una espora viable de *I. fumosorosea* en el tratamiento testigo después del secado y formulado con caolín, aparentemente dicho soporte es agresivo para las esporas de este hongo si crecieron en un medio sin fuente de carbono ya que esta fue la única diferencia con T5PIf. Sin embargo a *B. bassiana* la formulación con este soporte no le afectó aún en ausencia de azúcares en el medio; más aún, ninguno de los soportes representaron una diferencia en los valores de viabilidad. En un estudio realizado por Cliquet y Jackson (2005) *P. fumosoroseus*, lograron una viabilidad del 96% de las esporas recién cosechadas después de 4 días de cultivo en el medio con los más altos niveles de nitrógeno y carbono (13.2 y 80 g L⁻¹ de casaminoácidos y glucosa respectivamente) y resuspendidas en una solución de glucosa al 2.5%. Por otra parte, el 94% de las blastoesporas recién cosechadas del medio con los mismos

13.2 g L⁻¹ de casaminoácidos pero la concentración de glucosa reducida a 8 gL⁻¹ logran germinar; sin embargo, después del tratamiento de secado la cifra se redujo a 16.2% conservando el medio de cultivo y 86% cuando las esporas se lavaron y resuspendieron en la glucosa al 2.5%. Ambos estudios sugieren la importancia de la presencia de fuente de carbono no sólo en la producción de esporas, sino en su capacidad de resistir tratamientos de secado.

Por otra parte, es posible que el secado gradual a temperatura ambiente al que fueron sometidas las esporas representó un factor importante para los altos porcentajes de sobrevivencia ya que se ha observado que la viabilidad de las esporas justo después del tratamiento de secado es variable según los diferentes métodos aplicados a un mismo hongo. Esto lo demostraron Kassa *et al.* (2004) donde aplicaron tres técnicas de secado en esporas de *M. anisopliae* cultivadas en medio líquido. Los métodos fueron aspersión, liofilización y liofilización con pulverizado, obteniendo una sobrevivencia del 92.66, 66.64 y 36.32% respectivamente. El método de aspersión utilizado en el estudio de Kassa *et al.* (2004) y el de secado al ambiente en la presente investigación son equiparables, aparentemente ambos son los más cuidadosos con las esporas y recomendables para la preservación de las mismas ya que en lo general la sobrevivencia de los propágulos fue superior al 90%.

5.4. Vida de anaquel

En general, las esporas formuladas con caolín fueron las que mantuvieron valores relativamente altos en viabilidad. Lozano-Contreras *et al.* (2007) mencionan que la estabilidad de los propágulos se encuentra relacionada entre otras cosas, a la acumulación de reservas endógenas necesariamente a partir de nutrientes disponibles en el medio de cultivo y a la formulación posterior a la cosecha. En este aspecto, es claro que el caolín favoreció la conservación de la vida de las esporas almacenadas, principalmente de las de *I. fumosorosea* producidas en el medio con 44 mL de infusión de cáscara de plátano. Este medio de cultivo es el que contaba con una mayor concentración de fuente de carbono según reveló el estudio de cuantificación de azúcares totales (Cuadro 10) aunado a que a esta fue la dosis más alta de fuente de carbono administrada a los hongos utilizados en el presente estudio. Siguiendo esta línea del pensamiento, era lógico esperar que éste hongo sobreviviera por más tiempo a ambas temperaturas, más aún a 4°C tomando como referencia diferentes estudios que se han realizado sobre vida de anaquel.

Uno de los estudios sobre viabilidad es el realizado precisamente por estos autores, donde lograron que *P. fumosoroseus* mantuviera la sobrevivencia de 59 - 65 % a 4°C después de 5 meses en formulaciones en tierra de diatomeas. Contrariamente, en la presente investigación, la tierra de diatomeas fue el soporte que menos colaboró en la permanencia de la vida de las esporas y más aún, este mismo hongo logró una sobrevivencia apenas del 47.5% en el cuarto mes a 4°C.

Sorpresivamente, estas mismas esporas a 26 °C fueron capaces de sobrevivir por cuatro meses a una razón de 89%. Una posible explicación es la ofrecida por

Carrillo-Pérez *et al.* (2013) donde exponen el hecho de que las especies de *Isaria* se han localizado principalmente en regiones tropicales y subtropicales por lo que 26 °C podría resultar más favorable que 4°C. Para probar su punto, estos investigadores sometieron a esporas de *I. fumorosorea* recién cosechadas de un medio líquido con 50g L⁻¹ de dextrosa, a 30, 34, 38 y 42 °C por 30 minutos. Aún a 38 °C, una cifra cercana o mayor al 80% de las esporas lograron sobrevivir.

En cambio, *B. bassiana* mantuvo en general altas tasas de viabilidad a 4°C independientemente del soporte o si las esporas fueron cosechadas del medio donde se logró la mayor producción o del testigo sin carbohidratos durante los primeros dos meses. Aunque a esta temperatura no existe diferencia en los valores de sobrevivencia entre los propágulos cultivados con o sin carbohidratos cuando fueron formulados con caolín en el segundo mes de vida de anaquel, si se revela una tendencia en la conservación de la sobrevivencia en estas últimas en el cuarto mes al utilizar tierra de diatomeas o ceniza como soporte. Esto sugiere que en el primer caso, el caolín representó para la cepa una protección por mayor tiempo contra los factores adversos e independientemente del medio de cultivo en el que las esporas fueran cultivadas mientras que en el segundo caso, es factible que los carbohidratos presentes en el tratamiento T3SBb hayan sido el factor decisivo para tolerar el efecto dañino de la tierra de diatomeas y las cenizas hacia las esporas de *B. bassiana* al cumplirse los 4 meses en la vida de anaquel, ya que una de las razones por la que la misma se acorta es la falta de nutrientes presentes en el medio de producción y en las reservas endógenas de las esporas (Jackson *et al.*, 2010).

En síntesis, para ambos hongos entomopatógenos las mayores sobrevivencias fueron dadas por las esporas cosechadas a partir de los medios que contenían una fuente de carbono. Revisando nuevamente las curvas de crecimiento (Figuras 1 y 2) se presume que *I. fumosorosea* ya había concluido con la acumulación de sustancias de reserva al momento de la cosecha mientras *B. bassiana* aún estaba en proceso; es decir, ambos hongos ya contaban con nutrientes acumulados que consiguieron hacerlos resistentes al estrés al que fueron sometidos durante la vida de anaquel mediante la conservación de la energía así como de la integridad de la pared celular (Feofilova *et al.*, 2012). Finalmente, la tierra de diatomeas es un soporte que se utiliza con frecuencia para la formulación de hongos entomopatógenos por que es abrasivo a la cutícula del insecto, creando un efecto sinergista con los propágulos al momento de ser administrados para controlar una plaga (Batta, 2008). En cambio, la tierra de diatomeas para ambos hongos fue el peor de los soportes por lo que existe el supuesto de que la capacidad de abrasión mencionada haya afectado también a las cepas del presente trabajo de investigación.

6. CONCLUSIÓN

En el presente estudio, los rendimientos en la producción de esporas de *B. bassiana* GHA e *I. fumosorosea* 612, estuvieron en función tanto de la especie de hongo entomopatógeno, como de la fuente de carbono así como de los niveles en que esta se suministró, demostrando con ello que la infusión de cáscara de plátano y el agua residual de aislado de proteína de soya pueden utilizarse como fuentes de carbono en el cultivo masivo de hongos entomopatógenos siempre y cuando se ejecute un estudio previo para determinar la dosis apropiada de las mismas para el hongo que se desee producir.

El análisis estadístico señaló que la viabilidad de las esporas a lo largo de la vida de anaquel fue por la acción combinada del tiempo de duración de la misma, en conjunto al hongo entomopatógeno, del medio en el cual fue producido, la formulación y la temperatura de almacén. Sin embargo, se observó la marcada tendencia a sobrevivir de parte de las esporas producidas en aquellos medios donde se proporcionó una fuente de carbono, más aún las que fueron formuladas en caolín. Por lo tanto, el agua residual de aislado de proteína de soya y la infusión de cáscaras de plátano, tuvieron la capacidad de proveer una fuente de carbono beneficiosa para la acumulación de reservas endógenas que les permitieron a los hongos entomopatógenos tener una vida de anaquel relativamente persistente.

7. ANEXO



UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología

MUESTRA NUMERO: 130919/N3685
PROPORCIONADO POR: ATANACIO SALAZAR ARVIZU
IDENTIFICADA COMO: T3SB6 FINAL

RESULTADOS:

Determinación	Valor obtenido	Método	Fecha de análisis
AZUCARES TOTALES (%)	0,07	AOAC 968.28	20 de Septiembre del 2013

Estamos a sus órdenes para cualquier aclaración

QFB. Irma Guadalupe. García López
Analizó

P.A. M.C. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Aprobó

Este reporte no podrá ser reproducido total o parcialmente sin autorización por escrito y firmado por los signatarios autorizados por este laboratorio.
Este reporte solo afecta la muestra sometida a prueba

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L. 1 DE OCTUBRE DEL 2013





UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología

MUESTRA NUMERO: 130918/N3657
PROPORCIONADO POR: ATANACIO SALAZAR ARVIZU
IDENTIFICADA COMO: T3SB6 DIA 4

RESULTADOS:

Determinación	Valor obtenido	Método	Fecha de análisis
AZUCARES TOTALES (%)	0,08	AOAC 968.28	19 de Septiembre del 2013

Estamos a sus órdenes para cualquier aclaración


QFB. Irma Guadalupe. García López
Analizó


M.C. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Aprobó

Este reporte no podrá ser reproducido total o parcialmente sin autorización por escrito y firmado por los signatarios autorizados por este laboratorio.
Este reporte solo afecta la muestra sometida a prueba

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L. 1 DE OCTUBRE DEL 2013



UANL



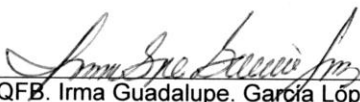
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología



MUESTRA NUMERO: 130918/N3655
PROPORCIONADO POR: ATANACIO SALAZAR ARVIZU
IDENTIFICADA COMO: T3SB6 DIA 2

RESULTADOS:

Determinación	Valor obtenido	Método	Fecha de análisis
AZUCARES TOTALES (%)	0,09	AOAC 968.28	19 de Septiembre del 2013

Estamos a sus órdenes para cualquier aclaración


QFB. Irma Guadalupe. García López
Analizó



P.A. M.C. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Aprobó

Este reporte no podrá ser reproducido total o parcialmente sin autorización por escrito y firmado por los signatarios autorizados por este laboratorio.
Este reporte solo afecta la muestra sometida a prueba

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L. 1 DE OCTUBRE DEL 2013

Ave. Universidad s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., C.P. 66451
Tel.: (81) 83 29 40 00 Ext. 6332, Tel.Directo: (81) 83 52 98 91





UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología

MUESTRA NUMERO: 130913/N3635
PROPORCIONADO POR: ATANACIO SALAZAR ARVIZU
IDENTIFICADA COMO: T35B6 INICIAL

RESULTADOS:

Determinación	Valor obtenido	Método	Fecha de análisis
AZUCARES TOTALES (%)	0,33	AOAC 968.28	13 de Septiembre del 2013

Estamos a sus órdenes para cualquier aclaración


QFB. Irma Guadalupe. García López
Analizó


P.A. M.C. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Aprobó

Este reporte no podrá ser reproducido total o parcialmente sin autorización por escrito y firmado por los signatarios autorizados por este laboratorio.
Este reporte solo afecta la muestra sometida a prueba

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L. 1 DE OCTUBRE DEL 2013



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología



MUESTRA NUMERO: 130919/N3684
PROPORCIONADO POR: ATANACIO SALAZAR ARVIZU
IDENTIFICADA COMO: T5PIF FINAL

RESULTADOS:

Determinación	Valor obtenido	Método	Fecha de análisis
AZUCARES TOTALES (%)	0,44	AOAC 968.28	20 de Septiembre del 2013

Estamos a sus órdenes para cualquier aclaración


QFB. Irma Guadalupe Garza López
Analizó


P.A.
M.C. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Aprobó

Este reporte no podrá ser reproducido total o parcialmente sin autorización por escrito y firmado por los signatarios autorizados por este laboratorio.
Este reporte solo afecta la muestra sometida a prueba

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L. 1 DE OCTUBRE DEL 2013



UANL



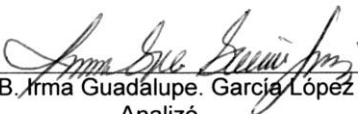
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología

MUESTRA NUMERO: 130918/N3658
PROPORCIONADO POR: ATANACIO SALAZAR ARVIZU
IDENTIFICADA COMO: TSPIF DIA 4

RESULTADOS:

Determinación	Valor obtenido	Método	Fecha de análisis
AZUCARES TOTALES (%)	1,44	AOAC 968.28	19 de Septiembre del 2013

Estamos a sus órdenes para cualquier aclaración


QFB. Irma Guadalupe. García López
Analizó


P.A. M.C. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Aprobó

Este reporte no podrá ser reproducido total o parcialmente sin autorización por escrito y firmado por los signatarios autorizados por este laboratorio.
Este reporte solo afecta la muestra sometida a prueba

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L. 1 DE OCTUBRE DEL 2013



UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología

MUESTRA NUMERO: 130918/N3656
PROPORCIONADO POR: ATANACIO SALAZAR ARVIZU
IDENTIFICADA COMO: TSPF DIA 2

RESULTADOS:

Determinación	Valor obtenido	Método	Fecha de análisis
AZUCARES TOTALES (%)	2,71	AOAC 968.28	19 de Septiembre del 2013

Estamos a sus órdenes para cualquier aclaración


QFB. Irma Guadalupe. García López
Analizó


M.C. Myrna Laura Yeverino Gutiérrez
Aprobó

Este reporte no podrá ser reproducido total o parcialmente sin autorización por escrito y firmado por los signatarios autorizados por este laboratorio.
Este reporte solo afecta la muestra sometida a prueba

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L. 1 DE OCTUBRE DEL 2013



UANL



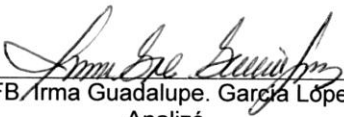
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología

MUESTRA NUMERO: 130913/N3636
PROPORCIONADO POR: ATANACIO SALAZAR ARVIZU
IDENTIFICADA COMO: 'TSPIF INICIAL

RESULTADOS:

Determinación	Valor obtenido	Método	Fecha de análisis
AZUCARES TOTALES (%)	2,84	AOAC 968.28	13 de Septiembre del 2013

Estamos a sus órdenes para cualquier aclaración


 QFB Arma Guadalupe García López
 Analizó


 P.A. M.C. Myrna Laura Yeveerino Gutiérrez
 Aprobó

Este reporte no podrá ser reproducido total o parcialmente sin autorización por escrito y firmado por los signatarios autorizados por este laboratorio.
Este reporte solo afecta la muestra sometida a prueba

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L. 1 DE OCTUBRE DEL 2013

Ave. Universidad s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., C.P. 66451
Tel.: (81) 83 29 40 00 Ext. 6332, Tel.Directo: (81) 83 52 98 91



8. BIBLIOGRAFÍA

Abraham T, S Easwaramoorthy, G Santhalakshmi (2003) Mass production of *Beauveria bassiana* isolated from sugarcane root borer, *Emmalocera depressella* Swinhoe. *Sugar Tech.*, 5 (4): 225 - 229.

Amala U, T Jiji, A Naseema (2012) Mass multiplication of entomopathogenic fungus, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson with solid substrates. *J. Biopest.*, 5 (2): 168 - 170.

Ansari Ma, T M Butt (2011) Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf - life of entomopathogenic fungi. *J. Appl. Microbiol.*, 110: 1460 - 1469.

Asaff A, F Escobar, M de la Torre (2009) Culture medium improvement for *Isaria fumosorosea* submerged conidia production. *Biochem. Eng. J.*, 47: 87 - 92.

Association of Analytical Communities (1968) Total sugars in molasses as invert sugar: Lane-Eynon constant volume volumetric method AOAC 968.28. *J. AOAC Int.*, 51: 755.

Barajas C G, E M del Pozo, I García, A Méndez (2010) Obtención de conidios del aislamiento MA-002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Rev. Prot. Veg.*, 25 (3): 174 -180.

Batta Y A (2008) Control of main stored - grain insects with new formulations of entomopathogenic fungi in diatomaceous earth dusts. *Intern. J. Food Eng.*, 4 (1).

Campbell J J, S P Wraight (2007) Experimental design: statistical considerations and analysis. *In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. L A Lacey and H K Kaya (eds). Springer., pp: 37 - 69.

Carrillo-Pérez E, E Acosta-Smith, R M Montesinos-Cisneros, M De la Torre (2013) Performance of two isolates of *Isaria fumosorosea* from hot climate zones in solid and submerged cultures and thermotolerance of their propagules. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29: 309 - 317.

Chen X-D, G-Y Wei, J-L Zhang, Y-Y Dong (2011) Efficient production of glutathione using hydrolyzate of banana peel as novel substrate. *Korean J. Chem. Eng.*, 28 (7): 1566 - 1572.

Chong-Rodríguez M J, M G Maldonado, J J Hernández, L J Galán, C F Sandoval (2011) Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation -

tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *Afr. J. Biotechnol.*, 10 (30): 5736 - 5742.

Cliquet S, M A Jackson (2005) Impact of carbon and nitrogen nutrition on the quality, yield and composition of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 204 - 210.

Consolo V F, G L Salerono, C M Beron (2003) Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Dabrotica speciosa*. *BioCont.*, 48: 705 - 712.

De Fátima Viana S, V Monteze Guimaraes, I Chamel José, M G De Alemida e Oliveira, N M Brunoro Costa, E Goncalves de Barros, M Alves Moreira, S Tavares de Rezende (2005). Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidasa. *Food Chem.*, 93: 665 - 670.

Derakhshan A, R J Rabindra, B Ramanujam, M Rahimi (2008) Evaluation of different media and methods of cultivation on the production and viability of entomopathogenic fungi, *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. *Pak. J. Biol. Sci.*, 11 (11): 1506 - 1509.

Feng S, C L Saw, Y K Lee, D Huang (2008) Novel process of fermenting black soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] yogurt with dramatically reduced flatulence-

causing oligosaccharides but enriched soy phytoalexins. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 10078 - 10084.

Feofilova E P, A A Ivashechkin, A I Alekhin, Y E Sergeeva (2012) Fungal Spores: Dormancy, Germination, Chemical Composition, and Role in Biotechnology (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 48 (1): 1 - 11.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2012) <http://faostat3.fao.org/home/index.html#HOME>. Revisado el 02 de noviembre de 2012.

Garza - López P M, M Konigsberg, L E Gómez - Quiroz, O Loera (2012) Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 28 (1): 353 - 359.

Gao L, X Z Liu (2010) Effects of carbon concentrations and carbon to nitrogen ratios on sporulation of two biological control fungi as determined by different culture methods. *Mycopathol.*, 169: 475 - 481.

Gao L, M H Sun, X Z Liu, Y S Che (2007) Effects of carbon concentration and C/N ratio on the growth and sporulation of several biological control fungi. *Mycol. Res.*, 111: 87 - 92.

He M, J Hu, Y Xia (2012) Large scale expressed sequence tag (EST) analysis of *Metarhizium acridum* infecting *Locusta migratoria* reveals multiple strategies for fungal adaptation to the host cuticle. *Curr. Genet.*, 58: 265 - 279.

Heydari A, M Pessarakli (2010) A review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. *J. Biol.Sci.*,10 (4): 273 - 290.

Iskandarov U S, A G Guzalova, K D Davranov (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*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 42 (1): 72 - 76.

Jackson M A, S Cliquet, L B Iten (2003) Media and fermentation processes for the rapid production of high concentrations of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocont. Sci. Technol.*, 13: 23 - 33.

Jackson M A, C A Dunlap, S T Jaronski (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioCont.*, 55: 129 - 145.

Jackson M A, S T Jaronski (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycol. Res.*, 113: 842 - 850.

Jackson M A, A R Payne (2007) Evaluation of the desiccation tolerance of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) using a lab-scale, air-drying chamber with controlled relative humidity. *Biocont. Sci. and Technol.*, 17 (7): 709 - 719.

Jackson M A, A R Payne, D A Odelson (2004) Liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 149 - 154.

Karki B, B P Lamsal, D Grewell, A L Pometto III, J van Leeuwen, S K Khanal, S Jung (2009) Functional properties of soy protein isolates produced from ultrasonicated defatted soy flakes. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 86: 1021 - 1028.

Kassa A, D Stephan, S Vidal, G Zimmermann (2004) Production and processing of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* submerged conidia for locust and grasshopper control. *Mycol. Res.*, 108 (1): 93 - 100.

Kassa A, M Brownbridge, B L Parker, M Skinner, V Gouli, S Gouli, M Guo, F Lee, T Hata (2008) Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.*, 112: 583-591.

Khachatourians G G, S S Qazi (2008) Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and Molecular Biology. *In: Human and Animal Relationships*, 2nd Edition. The Mycota VI. A A Brakhage and P F Zipfel (eds). Springer - Verlag Berlin Heidelberg., pp: 32 - 61.

Kim J S, Y H Je, J Y Roh (2010) Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP - 198 conidia in corn - corn oil mixture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 419 - 423.

Kim J S, A Kassa, M Skinner (2011) Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grain. *J. In. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 697 - 704.

Kocharin K, P Wongsu (2006) Semi - defined medium for *in vitro* cultivation of the fastidious insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis*. *Mycopathol.*, 161: 255 - 260.

Krishna C (2005) Solid - State fermentation systems. An overview. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 25: 1 - 30.

Leland J E, D E Mullins, L J Vaughan, H L Warren (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. *Biocont. Sci. Technol.*, 15 (4): 379 - 392.

Lokuruka MNI (2010) Soybean nutritional properties: the good and the bad about soy foods consumption. A review. *Afr. J. Food Agric. Nutr. and Devel.*, 10 (4): 2439 - 2459.

Lozano-Contreras MG, M Elías-Santos, C Rivas-Morales, H A Luna-Olivera, L J Galán-Wong, M G Maldonado-Blanco (2007) *Paecilomyces fumosoroseus* blastospore production using liquid culture in a bioreactor. *Afr. J. Biotechnol.*, 6 (18): 2095 - 2099.

Magalhaes B P, D G Boucias (2004) Effects of drying on the survival of conidiospores of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver & Milner. *J. Orthopt. Res.*, 13 (1): 155 - 159.

Mahawar M, A Singh, K Jalgaonkar (2012) Utility of apple pomace as a substrate for various products: A review. *Food and Bioprod. Process.*, 90: 597 - 605.

Maller A, A R Lima - Damasio, T M da Silva, J A Jorge, H F Terenzi, M L T M Polizeli (2011) Biotechnological potential of agro - industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. *Enz. Res.*

Méndez A, E del Pozo, I García, A González (2010) Evaluación de sustratos sólidos para la producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Rev. Prot. Veg.*, 25 (2): 108 - 112.

Mishra S, P Kumar, A Malik (2013) Preparation, characterization, and insecticidal activity evaluation of three different formulations of *Beauveria bassiana* against *Musca domestica*. *Parasitol. Res.*, 112: 3485 - 3495.

Mohapatra D, S Mishra, C B Singh, D S Jayas (2011) Post-harvest processing of banana: opportunities and challenges. *Food Bioprocess. Technol.*, 4: 327 - 339.

Okonko I O, A A Ogun, O B Shittu, T A Ogunnusi (2009) Waste utilization as a means of ensuring environmental safety. An overview. *E. J. Environm. Agr. Che.*, 8 (9): 836 - 855.

Padam B S, H S Tin, F Y Chhye (2012) Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass with great potential. *J. Food Sci. Technol.*

Pham T A, J J Kim, K Kim (2010) Optimization of solid-state fermentation for improved conidia production of *Beauveria bassiana* as mycoinsecticide. *Mycobiol.*, 38 (2):137 - 143.

Posada - Flórez F J (2008) Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. *J. Insect Sci.*, 8 (41): 1 - 13.

Pucheta - Díaz M, A Flores - Macías, S Rodríguez - Navarro, M De la Torre (2006)

Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31 (12): 856 - 860.

Rajanikanth P, G V Subbaratnam, S J Rahaman (2011) Evaluation of pathogenicity

of *Spodoptera litura* Fabricius of different *Beauveria bassiana* Vuillemin isolates mass multiplied on economically viable substrates. *Int. J. Bio-res. Stress Mgmt.*, 2 (3):293 - 297.

Robl D, L B Sung, J H Novakovich, P R D Marangoni, M A C Zawadneak, P R

Dalzoto, J Gabardo, I C Pimentel (2009) Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson strains on agro-industrial residues. *Braz. J. Microbiol.*, 40: 296 - 300.

Sahayaraj K, S K R Namasivayam (2008) Mass production of entomopathogenic

fungi using agricultural products and by products. *Afr. J. Biotechnol.*, 7 (12): 1907 - 1910.

Shah P A, J K Pell (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl.*

Microbiol. Biotechnol., 61: 413 - 423.

Sharma N, K L Kalra, H S Oberoi, S Bansal (2007) Optimization of fermentation

parameters for production of ethanol from kinnow waste and banana peels by simultaneous saccharification and fermentation. *Indian J. Microbiol.*, 47: 310 - 316.

Shi Y, X Xu, Y Zhu (2009) Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid - state fermentation on sugarcane bagasse. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82: 921 - 927.

Simon S, Anamika (2011) Agro-based waste products as a substrate for mass production of *Trichoderma spp.* *J. Agr. Sci.*, 3 (4): 168 - 171.

Slininger P J, R W Behle, M A Jackson, D A Schisler (2003) Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotropic. Entomol.*, 32: 183 - 195.

Soundarapandian P, R Chandra (2007) Mass production of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota; Hyphomycetes) in the laboratory. *Res. J. Microb.*, 2 (9): 690 - 695.

Srikanth J, G Santhalakshmi (2012) Effect of media additives on the production of *Beauveria brongniartii*, an entomopathogenic fungus of *Holotrichia serrata*. *Sugar Tech.*, 14 (3): 284 - 290.

Srivastava C N, P Maurya, P Sharma, L Mohan (2009) Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. *Entomol. Res.*, 39: 341 - 355.

Thakre M, M Thakur, N Malik, S Ganger (2011) Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. *J Biop.*, 4(2): 176 - 179.

Toegel S, S Salar-Behzadi, A Horaczek-Clausen, H Viernstein (2010) Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization. *J. Invert. Patholog.*, 105: 16 - 23.

United States Department of Agriculture (2013) USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 26. <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=8964>. Revisado el 20 de octubre de 2013.

Vega F E, M S Goettel, M Blackwell, D Chandler, M A Jackson, S Keller, M Koike, N K Maniania, A Monzón, B H Ownley, J K Pell, D E N Rangel, H E Roy (2009) Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fung. Ecol.*, 2: 149 - 159.

Vega F E, M A Jackson, G Mercadier, T J Poprawski (2003) The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 363 - 368.

Villalba M P L, H Grillo R, R Cupull S (2009) Producción de esporas de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre polvos de arroz, sorgo y maíz. *Centro. Agr.*, 36 (4): 25 - 32.

Wraight S P, G D Inglis, M S Goettel (2007) Fungi. *In: Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. L A Lacey, H K Kaya (eds). Springer., pp 223 - 248.

Yew Se, T J Lim, L C Lew, R Bhat, A Mat-Easa, M T Liong (2011) Development of a probiotic delivery system from agrowastes, soy protein isolate, and microbial transglutaminase. *J. Food Sci.*, 76 (3): 108 - 115.

Zelle R MJ, E de Hulster, W Kloezen, J T Pronk, A J A van Maris (2010) Key process conditions for production of C₄ dicarboxylic acids in bioreactor batch cultures of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 (3): 744 - 750.

Zimmermann G (2008) The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocont. Sci. and Technol.*, 18 (9): 865 - 901.