



Casa abierta al tiempo

## UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

<b>UNIDAD:</b>	IZTAPALAPA
<b>DIVISION:</b>	CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD
<b>CARRERA:</b>	MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
<b>MATERIA:</b>	TESIS DE GRADO
<b>TITULO:</b>	Producción y extracción de esporas del hongo entomopatógeno <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin por fermentación en medio sólido.
<b>FECHA:</b>	12 de Noviembre de 1996
<b>ALUMNO:</b>	JUAN MANUEL ROMANO MACHADO
<b>MATRICULA:</b>	9 4 3 4 8 7 0 4
<b>ASESORES:</b>	Dr. MARIANO GUTIERREZ ROJAS Dr. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA



COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

97349709

DENOMINACION DE LA TESIS

Producción y extracción de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin por fermentación en medio sólido.

En México, D. F. se presentaron a las 10:00 horas del día 12 del mes de noviembre del año 1996 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda;

Dr. Leonel González Penichet;

Dr. José Angel Rodríguez León y

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron para proceder al examen de grado de

Maestro en: Biotecnología

de Juan Manuel Romano Machado



presentó una comunicación de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 33 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios de Posgrado de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

- Aprobarlo -

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

Juan Manuel Romano Machado  
FIRMA DEL INTERESADO

REVISO

[Signature]  
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

[Signature]  
Dr. Gerardo Saucedo C.  
PRESIDENTE

[Signature]  
Dr. Leonel González P.  
Dr. José Angel Rodríguez L.  
VOCAL

[Signature]  
Dr. Mariano Gutiérrez R.  
SECRETARIO

El suscrito Director de División de C.B.S. hace constar que las firmas que aparecen son auténticas y corresponden a los señores Miembros del Jurado cuyos nombres aparecen en esta acta.

[Signature]  
Dr. José Luis Arredondo F.  
DIRECTOR DE DIVISION

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



**Casa abierta al tiempo**

**T E S I S**

Presentada para obtener el grado de:  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

TITULO

**Producción y extracción de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin por fermentación en medio sólido.**



COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

PRESENTADA POR

**IQ. JUAN MANUEL ROMANO MACHADO**

**Investigador Agregado, ICIDCA (CUBA)**

ASESORES

**Dr. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS**

**Dr. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA**

1996

222266

*para Adis por ser tan paciente  
y ser parte de mi  
para Dario por venir al mundo  
y ser también mi otra parte*

*Juan Manuel Romano Machado*

*Enero-Abril 1996*

## **PRESENTACION**

El presente trabajo está enmarcado dentro del plan de estudios de la Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) de México. Forma parte de un proyecto conjunto de colaboración científica, entre la UAM y el Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) para el aprovechamiento de los residuos urbanos y forestales utilizando la fermentación en medio sólido (FMS) como herramienta para elevar el nivel de conocimiento actual en este campo.

El cultivo de hongos por FMS no es un tema nuevo, sin embargo el estudio y desarrollo de procesos utilizando los recursos disponibles en cada región, y la infraestructura tecnológica propia de nuestros países, hacen que cada proyecto de investigación abra un amplio campo de estudios. Este el caso del desarrollo de hongos entomopatógenos para el control de plagas en cultivos.

El desarrollo de un bioinsecticida comprende varias etapas que van desde la selección de las cepas con las características entomopatógenas requeridas, el desarrollo de la producción masiva de las esporas o el micelio del hongo, y la formulación del producto para su conservación y aplicación. Para afrontar esta tarea se requiere de la participación interdisciplinaria de grupos de investigación afines a cada etapa del proceso.

En este trabajo se estudia la producción de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en cultivo superficial y por FMS sobre bagazo de caña a escala de laboratorio y a diferentes escalas de FMS. Este hongo presenta características entomopatógenas y de resistencia a los cambios climáticos que han permitido su aplicación como bioinsecticida en varias regiones del mundo. Los resultados obtenidos pretenden contribuir al conocimiento sobre estos procesos biotecnológicos.

## AGRADECIMIENTOS

En la realización de este trabajo han colaborado muchos compañeros con su apoyo y conocimientos para todos vayan mis más sinceros agradecimientos. Quiero agradecer a las siguientes personas su colaboración en este empeño:

Al Ing. Gustavo Saura Laria por haber depositado en mi toda su confianza en esta tarea y por su apoyo constante para que fuera un hecho, y a mis compañeros del ICIDCA por cumplir con mi parte del trabajo en el instituto durante mi ausencia.

Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas por las ideas aportadas para este trabajo, su paciente dirección, ayuda y estímulo durante todo el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda por todo su apoyo, enseñanzas y dirección en la realización de este trabajo.

Al Dr. Ernesto Favela Tórres quien ha sido además de maestro, amigo aportando ideas, enseñanzas y su inapreciable ayuda durante la realización de este trabajo.

Al Dr Sergio Huerta Ochoa por la ayuda brindada en todo momento.

A los compañeros de la Planta Piloto de Fermentación Sólida de la UAM-Iztapalapa: Tania, Mayola, Inés, Rosario, Luís Oscar, Alejandro, Oscar, Marcos, Rosaura, Linda y todos los demás compañeros de la UAM que trabajaron a mi lado y me apoyaron en todo momento. A mis compañeros de la Maestría en Biotecnología.

A mis amigos Jorge, Mónica, Gustavo, Alma, Rene, a la Sra. Martha Tórres y a Teresa Favela, y todos los demás que me han ayudado durante mi estancia en México.

**RESUMEN**

El objetivo fundamental de este trabajo fue estudiar la producción de esporas (conidias) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin para esto se estudió el crecimiento y la producción del hongo en cultivo superficial y fermentación en medio sólido a escala de laboratorio. Además se estudió la influencia del cambio de escala en la producción de esporas del hongo.

Estudios en cultivo superficial mostraron que el medio semisintético y la temperatura de 29 °C (límite) aumentaron la velocidad de crecimiento radial y la producción de esporas, la viabilidad de las esporas fue de 55 % y su hidrofobicidad se mantuvo constante y por encima de 95 % lo que mostró que las esporas tienen un alto poder como bioinsecticidas.

En los estudios de fermentación en medio sólido a escala de laboratorio se logró producir hasta 10<sup>9</sup> esporas por gramo de sustrato húmedo utilizando concentraciones de glucosa menores a 100 g/l, , concentraciones fosfato de potasio entre 0.18 y 0.68 g/ l y de sulfato de amonio menores de 7.57 g/ l concentraciones superiores inhibieron la producción de esporas. Se estimó que son necesarias 48 extracciones para recuperar el 99 % de las esporas producidas en bagazo de caña.

El aumento de escala, con un factor de escalamiento de 480 en peso, no afectó la actividad respiratoria ni la producción de esporas. Se encontró que el número de Reynolds para lechos empacados puede ser utilizado como un criterio de escalamiento para este proceso. La concentración de esporas obtenidas estuvo en el orden de 10<sup>9</sup> esporas/ g de sustrato húmedo en todas las escalas.

Sería interesante en trabajos posteriores continuar con los estudios de producción para aumentar los niveles de esporas que se obtienen en FMS y realizar estudios de escalamiento hasta nivel piloto para comprobar la validez de los resultados obtenidos en este trabajo.

INDICE

PRESENTACION	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii

**PARTE I. ANTECEDENTES**

1. INTRODUCCION	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1. EL HONGO ENTOMOPATOGENO <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin	4
2.1.1. CLASIFICACION TAXONOMICA DE <i>B. bassiana</i>	4
2.1.2. DESCRIPCION MORFOLOGICA DE <i>B. bassiana</i>	5
2.1.3. CARACTERISTICAS DEL PROCESO DE INFECCION DE <i>B. bassiana</i>	5
1. <i>Unión de las conidias a la cutícula de los insectos</i>	7
2. <i>Germinación de la conidias y penetración en la cutícula de los insectos</i>	7
3. <i>Producción de compuestos tóxicos</i>	9
4. <i>Fase de crecimiento micelial y producción de esporas</i>	10
2.1.4. CARACTERISTICAS DE LAS ESPORAS DE <i>B. bassiana</i>	11
2.2. PRODUCCION DE ESPORAS DE <i>B. bassiana</i>	11
2.2.1. INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCION DE ESPORAS DE <i>B. bassiana</i>	12
1. <i>Medios de cultivo utilizados</i>	13
2. <i>Influencia de la concentración de carbono en la esporulación</i>	13
3. <i>Influencia de la composición de fosfato y nitrógeno en la esporulación</i>	15
2.2.2. METODOS DE PRODUCCION DE ESPORAS DE <i>B. bassiana</i>	16
2.2.3. FORMULACION Y APLICACION DE ESPORAS DE <i>B. bassiana</i>	18
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIALES Y METODOS	21
4.1. MICROORGANISMO	21
4.2. MEDIOS DE CULTIVO Y SOPORTE	21
4.2.1. MEDIO PARA CONSERVACION Y DESARROLLO DE INOCULOS	21
4.2.2. MEDIO PARA CULTIVOS EXPERIMENTALES	22
4.2.3. TRATAMIENTO DEL SOPORTE UTILIZADO EN FMS	22
4.3. CONDICIONES DE CULTIVO Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	24
4.3.1. CULTIVO SUPERFICIAL	24

1. <i>Cultivo en cajas de Petri</i>	24
2. <i>Cultivo en matraces Erlenmeyer</i>	24
3. <i>Preparación y tratamiento de muestras</i>	24
4.3.2. CULTIVO EN FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO	25
1. <i>Desarrollo de los inóculos</i>	25
2. <i>Preparación de los cultivos</i>	26
3. <i>Condiciones de cultivo</i>	26
4. <i>Dispositivo de fermentación y reactores utilizados</i>	27
5. <i>Preparación y tratamiento de las muestras</i>	29
4.4. DETERMINACIONES ANALITICAS	31
4.4.1. CONTEO DE ESPORAS	31
4.4.2. VIABILIDAD	32
4.4.3. HIDROFOBICIDAD	33
4.4.4. MATERIA SECA	33
4.4.5. MEDICION DE pH	34
4.4.6. COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE C, H y N	34
4.4.7. ANALISIS DE GASES	35
1. <i>Cromatografía de gases</i>	35
2. <i>Medición de CO<sub>2</sub> por infrarrojo y O<sub>2</sub> por paramagnético</i>	35

## **PARTE II RESULTADOS Y DISCUSION**

5. ESTUDIO DEL CULTIVO SUPERFICIAL DE <i>B. bassiana</i>	38
5.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO RADIAL Y LA PRODUCCION DE ESPORAS	38
5.2. INFLUENCIA DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y FOSFATO EN LA PRODUCCION DE BIOMASA Y ESPORAS	42
5.3. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CULTIVO EN LA VIABILIDAD E HIDROFOBICIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS EN CULTIVO SUPERFICIAL	47
5.3.1. VIABILIDAD	47
5.3.2. HIDROFOBICIDAD	47
5.4. INFLUENCIA DE LA FORMA DE INOCULACION Y EL VOLUMEN DE MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCION DE BIOMASA Y ESPORAS	49
5.5. ESTUDIO DE LA EXTRACCION DE ESPORAS OBTENIDAS EN CULTIVO SUPERFICIAL	52
5.6. CONCLUSIONES	56

6. PRODUCCION DE ESPORAS DE <i>B. bassiana</i> POR FMS	57
6.1. EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y FOSFATO Y LA DENSIDAD DE EMPAQUE EN LA PRODUCCION DE ESPORAS	59
6.2. EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE ESPORAS DE <i>B. bassiana</i>	69
6.3. EFECTO DE LA VARIACION EN LAS CONCENTRACIONES DE CARBONO Y NITROGENO EN LA PRODUCCION DE ESPORAS	71
6.4. ESTUDIO DE LA EXTRACCION DE ESPORAS OBTENIDAS POR FMS	76
6.5. ESTIMACION DEL NUMERO MAXIMO DE ESPORAS OBTENIDAS	79
6.6. CONCLUSIONES	83
7. ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE ESPORAS DE <i>B. bassiana</i> POR FMS A DIFERENTES ESCALAS	85
7.1. USO DEL NUMERO DE REYNOLDS COMO CRITERIO DE ESCALAMIENTO	85
7.2. INFLUENCIA DEL CAMBIO DE ESCALA SOBRE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE <i>B. bassiana</i>	91
7.3. CONCLUSIONES	98
8. CONCLUSIONES GENERALES	99
9. BIBLIOGRAFIA	101
10. ANEXOS	

# **PARTE I. ANTECEDENTES**

## **INTRODUCCION**

## 1. - INTRODUCCION

La apreciación que tiene el hombre acerca de los hongos que atacan insectos no está limitada al concepto moderno de su utilización para el control biológico de plagas. Dos milenios atrás los chinos estaban conscientes de la momificación de gusanos de seda por especies de *Cordyceps* e *Isaria*. Colocaban efigies de estos gusanos elaboradas en piedras preciosas y semipreciosas en la boca de sus muertos, para conferirles el mismo grado de inmortalidad. Las orugas infectadas por *Cordyceps* se utilizan en la medicina tradicional china, por lo menos desde hace mil años, para el tratamiento de un gran número de enfermedades. Sus usos van desde el tratamiento de la adicción al opio hasta su consumo como tónicos y aun como afrodisiacos (Roberts y Humber, 1981).

Los hongos insecticidas nunca fueron tomados en cuenta en las tradiciones occidentales, pero despertaron gran curiosidad y suscitaron especulaciones entre diferentes observadores. En 1779 de Geer (citado por Roberts y Humber, 1981) caracterizó una infección de *Entomophthora* en moscas y supuso erróneamente que estas podrían haber ingerido alguna sustancia perjudicial. Hasta mediados del siglo XIX se comenzó a tomar en consideración la posibilidad de aplicar las infecciones fúngicas al control de plagas de insectos.

Hasta la década pasada la mayor cantidad de investigaciones enfocadas al control biológico se realizaban con bacterias y virus, aunque los hongos representan el grupo más amplio de patógenos a insectos. Al parecer existía cierto rechazo a utilizar los hongos entomopatógenos como agentes biocontroladores. Debido a limitaciones ambientales que no favorecen su uso exitoso y a dificultades que se presentan en su producción a gran escala y en la formulación adecuada de los bioinsecticidas. No obstante los hongos se han utilizado para el control de malezas desde la década de 1950. Siendo producidos los primeros microherbicidas a principios de la década de 1980 en USA (Auld, 1991).

Agostino Bassi (citado por Roberts y Humber, 1981) estableció la teoría de los gérmenes que provocan enfermedades en animales a mediados de la década de 1830, con sus estudios sobre las infecciones de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (*B. bassiana*) en larvas del gusano de seda. Este es el hongo que con mayor frecuencia se ha aislado de insectos muertos colectados en el campo; particularmente después de periodos invernales. Su espectro de infección es extenso e incluye a la mayoría de los órdenes de insectos. Muchas de las pruebas para el control microbiano con hongos se han realizado con cepas de *B. bassiana* y *B. brongniartii* (Roberts y Humber, 1981).

*B. bassiana* es un candidato fúngico interesante para emplearse como bioinsecticida pues tiene ventajas con respecto a otros microorganismos estudiados como *Bacillus thuringiensis* (Bt.) y los virus: las cepas aisladas tienen un rango de hospederos amplio e infectan por invasión a través de la cutícula, de tal forma que pueden atacar áfidos, larvas de lepidópteros y coleópteros, y otros insectos masticadores (Ibarra, 1994).

El potencial de *B. bassiana* como agente biocontrolador económicamente efectivo se menciona por varios autores. Actualmente se realizan estudios para mejorar los métodos de producción y esclarecer los mecanismos que emplea para infectar los hospederos (Hegedus y Khachatourians, 1994).

Este hongo se ha producido por fermentación en medio sólido (FMS) en Rusia, la República Popular China y en Brasil (Auld, 1991; Mendonça, 1991). La producción de esporas (conidias) de *B. bassiana* por FMS representa una alternativa interesante para la obtención de un biopesticida económicamente efectivo, pues además de las ventajas antes mencionadas, pueden aprovecharse algunas de las ventajas de la FMS que harían posible la producción en áreas agrícolas.

Los medios de cultivos utilizados en la FMS son sencillos, consisten en residuos o productos agrícolas que pueden contener todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos, y pueden obtenerse a bajo costo cerca de las áreas de aplicación. Requieren de pretratamientos simples: frecuentemente solo es necesario molerlos para reducir el tamaño de partícula. El bajo contenido de agua en los sólidos permite trabajar con requerimientos de asepsia mínimos en el proceso. Esto simplifica la tecnología y hace viable su aplicación práctica, sobre todo en zonas donde la mano de obra no es calificada. Por otro lado la utilización de todo el material procesado en la formulación del producto final elimina la posibilidad de generación de corrientes residuales con altas cargas orgánicas, y los consiguientes problemas de contaminación del medio ambiente (Mitchell y Lonsane, 1992).

Un problema grave de contaminación ambiental resulta de la utilización indiscriminada de pesticidas químicos; que se ha venido haciendo desde su descubrimiento a mediados de los años treinta. La presencia de insecticidas en una gran cantidad de alimentos, en la leche materna, en la sangre de los niños, en el agua potable, en la lluvia, en el mar, en las nieves polares, en el plancton, etc. indica que sus efectos tóxicos están presentes en toda la biosfera. El movimiento Greenpeace calcula que existen 25 millones de intoxicaciones y 220 mil muertes al año, causadas por pesticidas, a nivel mundial (Ibarra, 1994).

## INTRODUCCION

La solución a este problema no es sencilla. La población mundial continua su crecimiento geométrico por lo que se calcula que en los próximos cuarenta años deberá producirse la misma cantidad de alimentos que los producidos desde el surgimiento de la agricultura hasta la fecha. Aparentemente en la realidad actual resulta imposible enfrentar este reto sin recurrir al uso de insecticidas químicos. Es en este punto donde los entomopatógenos entran a jugar un papel importante pues se pueden utilizar de la misma forma como se encuentran en la naturaleza. Además tienen potencialidad para reemplazar, o al menos complementar, los tratamientos con insecticidas químicos (Ibarra, 1994).

**REVISION BIBLIOGRAFICA**

## 2. - REVISION BIBLIOGRAFICA

En este capítulo se abordan dos temas que se tratan en este trabajo. En la primera sección se describen las características morfológicas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin así como aspectos sobre su mecanismo de infección a los insectos. En la segunda se analiza la influencia que tiene la composición del medio de cultivo sobre la esporulación de este hongo y se presentan los métodos de producción de sus esporas desarrollados hasta el momento.

### 2.1. - EL HONGO ENTOMOPATOGENO *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Vuillemin

#### 2.1.1. - CLASIFICACION TAXONOMICA DE *Beauveria bassiana*

En la **Tabla 2.1** se presenta la clasificación taxonómica del hongo *B. bassiana* obtenida a partir de las características descritas por Fassatiová (1986) y del esquema de clasificación general para hongos utilizado por Pelczar *et al.* (1982).

**Tabla 2.1** Clasificación taxonómica del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

<b>Nombre</b>	<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin
<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>División</b>	<i>Micota</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Eumicotina</i>
<b>Clase</b>	<i>Deuteromicetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Moniliales</i>
<b>Familia</b>	<i>Moniliaceae</i>
<b>Genero</b>	<i>Beauveria</i>
<b>Especie</b>	<i>bassiana</i>

Fuentes: Fassatiová, 1986; Pelczar *et al.*, 1982

### **2.1.2. - DESCRIPCION MORFOLOGICA DE *B. bassiana***

*B. bassiana* es un hongo filamentoso que produce micelio de color blanco o ligeramente coloreado (amarillento o rosado claro), dentro del sustrato o aéreo. Forma conidióforos constituidos por fiálides simples, en manojos o en ramilletes esféricos de simpódulos que crecen en forma de cuellos ramificados. Las conidias (simpodulosporas o fialoconidias) son unicelulares y transparentes, crecen en los plegamientos de los cuellos de los simpódulos, y pueden tener formas diferentes: globosas, ovales o elipsoidales. Las colonias crecidas sobre medio PDA son de color blanco, aspecto lanoso y alcanzan una altura de 1- 2 mm. Durante la esporulación intensa adquieren forma circular (con aspecto de algodón con polvo), de color blanco o cremoso. El reverso de las colonias es incoloro (Fassatiová, 1986).

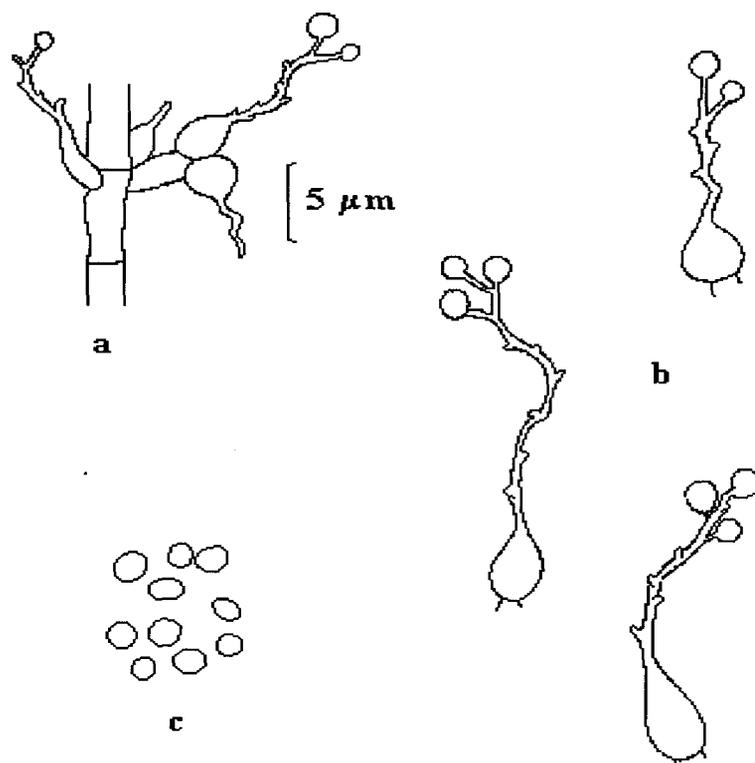
En la **Figura 2.1** se presenta un esquema de las estructuras de *B. bassiana* donde se observa que de las hifas del micelio aéreo surgen los simpódulos en forma de verticilos o fiálides esparcidos en racimos o en manojos de forma esférica. Los fiálides pueden tener forma de botellas o de brazos alargados que se estrechan en cuellos finos de los que surge la primera conidia. La segunda conidia crece lateralmente desde el extremo del cuello del verticilo, por debajo de la primera de tal manera que esta última es proyectada hacia el lado opuesto. El proceso se repite muchas veces y por esto los cuellos de los verticilos adquieren una forma angular (Fassatiová, 1986).

Las conidias se desprenden inmediatamente y los plegamientos en forma de "zig zag" de los cuellos de los verticilos se mantienen. En ocasiones los simpódulos se forman en capas (primaria y secundaria) y su tamaño, en particular su longitud, varía considerablemente. Los pequeños, de forma ovoide o globular, miden 1.5 - 3.5  $\mu\text{m}$ , los cilíndricos 4 - 15 x 2 - 3  $\mu\text{m}$ . Las conidias tienen un tamaño medio de 1.5 - 4 x 1.5 - 3  $\mu\text{m}$  (Fassatiová, 1986).

### **2.1.3. - CARACTERISTICAS DEL PROCESO DE INFECCION DE *B. bassiana***

A diferencia de otros patógenos de insectos, que deben ser ingeridos para poder infectar a los hospederos, *B. bassiana* usualmente invade a través de la cutícula (exoesqueleto quitinoso) del insecto. Las unidades infecciosas casi siempre son las esporas, que se unen a la superficie del integumento, germinan y penetran la cutícula. En algunos casos penetra a través del tracto digestivo o de las espirales abdominales (Debach y Rosen, 1991).

En el interior del insecto *B. bassiana* se propaga y coloniza el hemolinfa. En esta etapa puede producir toxinas provocando la muerte del hospedero en corto tiempo. Cuando esto no ocurre, la muerte se retarda y generalmente es el resultado del consumo de los nutrientes del hemolinfa por el hongo. Después de la muerte de los hospederos el hongo emerge de los cadáveres y, en presencia de humedades relativas altas, esporula sobre las superficies de los cadáveres( Roberts y Humber, 1981).



**Figura 2.1.** Representación esquemática de *Beauveria bassiana*. a: hifa con fiálides y conidias, b: fiálides con racimos de conidias, c: conidias.

Fuente: Botton *et al.*, 1985.

Roberts y Humber (1981) dividieron el proceso de infección en insectos en diez pasos estos son: unión de las conidias a la cutícula de los insectos, germinación de las conidias en la cutícula, penetración de la cutícula, crecimiento del hongo en el hemolinfa, producción de toxinas, muerte del hospedero, crecimiento micelial e invasión de todos los órganos del

hospedero, salida de las hifas a través de la cutícula, producción de unidades infectivas (conidias) en el exterior del hospedero, y dispersión de las conidias por el entorno.

En este trabajo se resume el proceso de infección en cuatro pasos, en los que se describen las características fundamentales del mismo que reúnen aspectos de interés para el desarrollo de este trabajo pues se abordan aspectos de la fisiología de *B. bassiana* importantes para comprender su forma de crecimiento y esporulación.

### **1. - Unión de las conidias a la cutícula de los insectos**

La unión de las conidias a la cutícula de los insectos es el evento inicial en el establecimiento de la micosis. Cuando se produce el contacto las esporas se unen fuertemente a la epicutícula (superficie externa de la cutícula) mediante interacciones hidrófobas no específicas que juegan un papel fundamental en la adhesión (Boucias *et al.*, 1988).

La superficie exterior de la pared de las esporas y la epicutícula contienen los elementos determinantes para la unión. La superficie de las conidias de *B. bassiana* está cubierta de una capa bien organizada de haces entrelazados de fibras, compuestas fundamentalmente por carbohidratos que le confieren resistencia contra la deshidratación, su hidrofobicidad característica, y facilitan su dispersión en el aire (Boucias *et al.*, 1988).

Los carbohidratos como  $\alpha$ -D-manosa,  $\alpha$ -D-glucosa y  $\beta$ -galactosamina y glicoproteínas como las lectinas, presentes en la pared de las conidias, están implicados en procesos de quimiotaxis, adhesión e infección (Hegedus *et al.*, 1992). Es probable que la formación de estos carbohidratos pueda ser facilitada con la correcta formulación del medio de cultivo utilizado en la producción de esporas (Lane *et al.*, 1991)

### **2. - Germinación de las conidias y penetración en la cutícula de los insectos**

Aunque la adhesión de las esporas a la cutícula de los insectos es un proceso no específico como se mencionó anteriormente; para la germinación de las conidias y posterior penetración del tubo de germinación en la cutícula se requieren condiciones específicas (Charnley, 1991). Estas condiciones se relacionan a continuación según lo reportado por varios autores.

- Las lectinas presentes en la pared de las conidias podrían formar enlaces específicos con las proteínas de la cutícula después de la adhesión inicial (Lane *et al.*, 1991).
- Para la germinación de las esporas de *B. bassiana* es necesaria una humedad relativa alta (> 90%), esto no representa una limitación grave pues el microclima del follaje de las plantas, particularmente durante los periodos de lluvia, asegura las condiciones apropiadas para la germinación (Roberts y Humber, 1981).
- Los estimuladores y los inhibidores de la germinación se encuentran en la cutícula por lo que el hongo debe estar adaptado a las condiciones de su superficie (Charnley, 1991).
- Las bacterias presentes en la cutícula pueden tener un marcado efecto inhibitorio en la germinación (Roberts y Humber, 1981).
- La dureza y la composición de nutrientes de la cutícula influyen en el desarrollo de las estructuras de infección (llamadas apresorias) (Charnley, 1991).

Después que la espora se fija a la cutícula mediante las apresorias el tubo de germinación penetra directamente en la cutícula. Este proceso involucra mecanismos enzimáticos y procesos físicos relacionados con la extensión de la hifa. Las enzimas que participan en la penetración son hidrolasas extracelulares que incluyen proteasas, quitinasas y lipasas (Charnley, 1991).

Estas enzimas actúan de forma secuencial durante la penetración. La importancia de cada una de estas enzimas en la penetración depende de las características de la cutícula del insecto atacado y del mecanismo de invasión del hongo (Roberts y Humber, 1981).

La relación entre la acción de las enzimas que produce *B. bassiana* durante la penetración puede entenderse mejor si se analiza primero la composición de la cutícula. Como se muestra en la **Tabla 2.2** las proteínas son el componente fundamental de la cutícula y se encuentran rodeando las fibrillas de quitina. La quitina existe como un polímero de  $\beta$ -1,4-N-acetil-D-glucosamina (Bidochka y Khachatourians, 1988; Bidochka y Khachatourians, 1992; Ulhoa y Peberdy, 1991). Los lípidos se encuentran en una pequeña proporción asociados a las proteínas (Charnley, 1991; Hegedus y Khachatourians, 1988).

Las proteasas de *B. bassiana* juegan un papel primordial en la degradación de las capas de la cutícula de los insectos susceptibles pues las proteínas son el componente fundamental de la cutícula (Bidochka y Khachatourians, 1987; Charnley, 1991).

**Tabla 2.2.** Composición de la cutícula de los insectos.

<b>Componente</b>	<b>% (p/p)</b>
Proteínas	61.4 <sup>a</sup> (55 - 80) <sup>b</sup>
Quitina	30.1 <sup>a</sup> (25 - 40) <sup>b</sup>
Lípidos	7.4 <sup>a</sup>
Cenizas	1.1 <sup>a</sup>

Fuentes: a: Composición de la cutícula del saltamontes migratorio *Melanoplus sanguinipes* (Bidochka y Khachatourians, 1992).

b: Composición general de la cutícula de insectos (Neville, 1975).

Las quitinasas constituyen en realidad un sistema quitinolítico de dos hidrolasas cuya acción es secuenciada. La exoquitinasa (NAGasa1) hidroliza polímeros de N-acetil-D-glucosamina (NAcGLc) hasta tetrameros y, en menor grado, trimeros. La quitobiasa (NAGasa2) hidroliza quitobiasas (dímeros de NAcGLc) y quitotriosas (trimeros de NAcGLc) hasta monómeros de GLcNAc (Bidochka *et al.*, 1993).

Las lipasas no juegan un papel significativo en la penetración de la cutícula debido a que sus sustratos potenciales, triacilglicéridos y ésteres de ceras, se encuentran en pequeñas proporciones en la cutícula (Hegedus y Khachatourians, 1988). Posiblemente su actividad se exprese durante el crecimiento posterior en el hemolinfa que tiene una composición de lípidos entre 1.5- 5.5 % (p/v) (Charnley, 1991).

### **3. - Producción de compuestos tóxicos**

*B. bassiana* puede matar a sus hospederos, antes de invadir todos sus órganos, mediante la producción de toxinas (Charnley, 1991). Se supone que las toxinas son producidas por el hongo

pero pueden ser producidas también por el hospedero como un mecanismo de defensa contra la infección (Roberts y Humber, 1981).

Como en muchos otros patógenos a insectos en este se han detectado varios compuestos de bajo peso molecular biológicamente activos en filtrados de cultivos *in vitro* como: péptidos cíclicos, dextruxinas, la llamada beauvericina, sus análogos las eniantinas, la bassianolida o la citocalasina B han mostrado tener poder insecticida (Bidochka y Khachatourians, 1991). El pigmento rojo oosporeína detectado en filtrados de cultivos *in vitro* y en insectos infectados con *B. bassiana* tiene actividad antibacteriana (Mazet *et al.*, 1994).

Hasta el momento se conoce poco acerca de los metabolitos producidos durante el desarrollo *in vivo* de *B. bassiana*. Recientemente se han detectado en el micelio de este hongo metabolitos con actividad inmunorrepresora (las ciclosporinas A y C). Además se han aislado compuestos de alto peso molecular (> 10,000 Da) solubles en el hemolinfa y se supone que estos sean responsables de la actividad biológica, en lugar de los de bajo peso molecular (Mazet *et al.*, 1994).

También se ha estudiado la relación entre la producción de ácidos orgánicos como el ácido oxálico y la patogenicidad de *B. bassiana* pero no se ha logrado establecer claramente cual es la relación entre ambas (Bidochka y Khachatourians, 1991; Bidochka y Khachatourians, 1993b).

#### **4. - Fase de crecimiento micelial y producción de esporas**

En esta etapa el hongo invade prácticamente todos los órganos del insecto provocando su muerte. Si las condiciones de humedad y temperatura ambientales no son las adecuadas, el hongo permanece dentro del cadáver que sirve como su reservorio. Cuando se restablecen las condiciones apropiadas el hongo emerge a través de la cutícula y produce esporas (conidias), que se dispersan con las corrientes de aire o agua (Roberts y Humber, 1981).

Es en esta fase donde *B. bassiana* puede establecer relaciones endofíticas con diferentes plantas, colonizarlas sin dañarlas o interactuar de forma específica con estas, pues no es un hongo fitopatógeno. Se ha demostrado que este hongo puede colonizar plantas de maíz a nivel de los verticilos, moverse por su sistema vascular de forma pasiva, y persistir en su interior por

largos periodos. Esta capacidad puede aprovecharse para su utilización en el control de plagas (Bing y Lewis, 1993).

#### **2.1.4. -CARACTERISTICAS DE LAS ESPORAS DE *B. bassiana***

*B. bassiana* produce dos tipos de esporas durante las fases de infección del hospedero: las blastosporas que son cuerpos de hifas unicelulares que se producen durante el crecimiento en el hemolinfa y las conidias que se forman una vez que el hongo emerge del insecto (Roberts y Humber, 1981). Durante la producción por fermentación *B. bassiana* produce esporas de acuerdo al método de cultivo empleado; en cultivo sumergido produce blastosporas y conidias mientras que en cultivo superficial y fermentación en medio sólido produce solo conidias (Hegedus *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1987)

En la **Tabla 2.3** se presenta una comparación entre las características de los dos tipos de esporas que producidas por *B. bassiana*. Se observa que las conidias tienen mejores características que las blastosporas para ser utilizadas en el control de plagas de insectos. A pesar de que las blastosporas germinan en menos tiempo; las conidias son más resistentes durante el almacenamiento y frente a condiciones ambientales adversas. Por otro lado la hidrofobicidad es superior en las conidias. Esta característica contribuye a protegerlas contra la deshidratación y aumenta su capacidad de adhesión a la cutícula de los insectos (Hegedus *et al.*, 1992).

La resistencia de las conidias frente a condiciones ambientales adversas representa una gran ventaja de *B. bassiana* sobre los pesticidas convencionales debido a que produce efectos prolongados sobre las plagas de insectos (Goettel y Roberts, 1991). La duración de la actividad de las conidias de *B. bassiana*, introducidas en el suelo contra el escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), fue estimada en dos años (Roberts y Humber, 1981).

#### **2.2. - PRODUCCION DE ESPORAS DE *B. bassiana***

En esta sección se hace un análisis de la influencia que tiene la composición del medio de cultivo sobre la esporulación de *B. bassiana*. Además se comparan los métodos utilizados para la producción de esporas con vistas a su aplicación para el control de plagas. Los métodos de fermentación incluyen cultivo sumergido CS y fermentación en medio sólido FMS.

**Tabla 2.3** Comparación entre las características de las esporas producidas por *B. bassiana*.

<b>Conidias<sup>a</sup></b>	<b>Blastosporas<sup>b</sup></b>
- Son resistentes en condiciones adversas, por ejemplo al secado y/o temperaturas extremas pues tienen una pared celular más gruesa como resultado de la acumulación continua del material de la pared celular (1, 4).	- Se consideran de "vida corta" para el control de insectos pues tienen una pared celular muy fina, factor provoca su poca resistencia a las condiciones ambientales adversas(1, 4).
- Son más pequeñas $3.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (n = 300). Tienen forma esférica, tamaño uniforme, pared rugosa y apariencia cristalina (4).	- Tienen mayor tamaño, pared lisa, forma cilíndrica y dimensiones variables (4).
- Su hidrofobicidad es de 89 % (2).	- Su hidrofobicidad es de 79 % (2).
- Pueden almacenarse por varios meses, a bajas temperaturas, sin que disminuya su viabilidad (2, 3).	- No son estables a las mismas condiciones. Pérdida de viabilidad asociada con la pérdida de potencial infeccioso (2, 3).
- Su tiempo de germinación es de 24 h (4).	- Germinan en menos de 16 h (4).

a: conidias producidas en cultivo superficial.

b: blastosporas producidas en cultivo sumergido.

Fuentes: Hegedus *et al.*, 1990 (1); Hegedus *et al.*, 1992 (2); Lane *et al.* 1991 (3); Thomas *et al.*, 1987 (4).

### **2.2.1. - INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCON DE ESPORAS DE *B. bassiana***

En esta sección se presentan las composiciones de varios medios de cultivo utilizados para la producción de esporas de *B. bassiana* en cultivo sumergido y sólido superficial. Además se analizan los trabajos publicados sobre la influencia de las concentraciones de fuente de carbono, fosfato y nitrógeno en el medio de cultivo sobre la esporulación de este hongo.

### **1. - Medios de cultivo utilizados**

*B. bassiana* puede utilizar muchos componentes de la cutícula y el hemolinfa de los insectos como son: ácidos grasos de C<sub>10</sub> y C<sub>24</sub>; trealosa y glucosa; combinaciones de aminoácidos; quitina; glucosamina y GLcNAc (Bidochka y Khachatourians, 1988).

La formación de esporas de *B. bassiana* esta asociada estrechamente con la composición del medio de cultivo, la actividad de agua y los niveles de carbono, fósforo y nitrógeno (Bidochka *et al.*, 1990). La concentración de carbohidratos afecta la producción de biomasa y esporas, y la síntesis de enzimas extracelulares de *B. bassiana*. El rendimiento de biomasa y la proporción de los dos tipos de esporas esta determinado por la cantidad y tipo de carbohidratos suministrados en cultivo sumergido (Thomas *et al.*, 1987).

En la **Tabla 2.4** se presentan cuatro de los medios de cultivo utilizados para la producción de esporas de *B. bassiana* en estudios a escala de laboratorio para probar la influencia de varias fuentes de carbono y nitrógeno, así como diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo de potasio sobre la esporulación y las características de las esporas obtenidas tanto en cultivo superficial como en medio líquido. La composición de estos medios varía de acuerdo a los objetivos de cada investigación.

### **2. - Influencia de la concentración de carbono en la esporulación**

En la **Tabla 2.5** se presentan los resultados obtenidos por Thomas *et al.* (1987) con la utilización de varias fuentes de carbono en la producción de conidias de *B. bassiana* en cultivo sumergido. Como puede observarse la utilización de fructosa, glicerol y glucosa favorece la producción de conidias mientras que con maltosa, sorbitol, y almidón la proporción de blastosporas obtenida es mayor. Aunque la utilización de citrato y lactosa favorece la formación de conidias las concentraciones de estas son muy bajas.

A partir de los resultados presentados por Thomas *et al.* (1987) se calcularon los rendimientos de conidias en base a la biomasa obtenida como se muestra en la **Tabla 2.5**. Los resultados de este análisis muestran que con la utilización de glucosa los rendimientos de conidias aumentan más de dos veces los obtenidos con fructosa, maltosa y glicerol mientras que con las restantes fuentes de carbono los rendimientos fueron todavía menores. Lo anterior indica que la glucosa fue la mejor fuente de carbono para la producción de conidias en cultivo sumergido.

**Tabla 2.4** Medios de cultivo empleados en la producción de esporas de *B. bassiana* en estudios de laboratorio.

<b>Medio</b>	<b>Composición (g/l)</b>	<b>Fuentes</b>
YPG	extracto de levadura (2); peptona (10); glucosa, sacarosa, almidón (20); agar (15)	Hegedus <i>et al.</i> , 1990, 1992 Thomas <i>et al.</i> , 1987
glucosa- extracto de levadura-sales minerales	glucosa (10); extracto de levadura (5); Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (1.05); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.36); KCL (1); NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (0.7); MgSO <sub>4</sub> (0.6); agar (20)	Boucias <i>et al.</i> , 1988
TKI	fuentes de carbono * (50); KNO <sub>3</sub> (10); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (5); MgSO <sub>4</sub> (2); CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (0.05); FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.012); MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (0.0025); Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (0.00025); Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (0.0002); ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (0.0025); CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (0.0005)	Thomas <i>et al.</i> , 1987
medio compuesto	solución tampón de 2(N-morfolino)etano ácido sulfónico-NaOH pH 6.0 (0.01 M) conteniendo: fuentes de carbono y nitrógeno **; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0, 0.05, 0.5 y 5)	Hegedus <i>et al.</i> , 1990

\*: Citrato, lactosa, sorbitol, almidón, fructosa, maltosa, glicerol y glucosa.

\*\* : NAcGlc, N-acetil-D-galactosamina (NAcGal) y glucosa + 0.01 % de NH<sub>4</sub>Cl (5 g/ l), quitina cruda y purificada de caparazón de cangrejo (10 (g/ l)).

También se estudió la esporulación, en cultivo superficial, de micelio seco obtenido en medio salino mínimo complementado con diferentes concentraciones de sacarosa, maltosa y extracto de levadura. La mayor producción de conidias se obtuvo en el micelio crecido en medio con maltosa (0.75 %)/ extracto de levadura (0.75 %), y fue de 4.62 x 10<sup>6</sup> conidias/ mg (Rombach *et al.*, 1988).

En trabajos posteriores Bidochka y Khachatourians (1992) estudiaron la germinación y el crecimiento de *B. bassiana* en medios que contenían diferentes componentes de la cutícula del saltamontes migratorio *Melanoplus sanguinipes*. Encontraron que los ácidos grasos fueron fuentes de carbono y energía muy pobres para la germinación y el crecimiento, aunque con el

oleico y el linolénico hubo crecimiento de las hifas. En la cutícula de otros insectos se encontró que los ácidos grasos de cadena corta (C8 - C12) inhiben la germinación del hongo. Además los lípidos que cubren la cutícula no fueron bien asimilados, por lo que podrían existir compuestos lipídicos que tengan efectos micostáticos.

**Tabla 2.5.** Efecto de varias fuentes de carbono en el crecimiento y la esporulación de *B. bassiana* en cultivo sumergido.

<b>Fuente de carbono</b>	<b>Conidias * (1)</b>	<b>Blastosporas * (2)</b>	<b>Relación (1)/ (2)</b>	<b>Biomasa (mg/ml)</b>	<b>Rendimiento de conidias **</b>
Citrato	2.0	< 0.01	> 200	0.75	2.67
Lactosa	2.5	0.20	12.5	0.73	3.42
Sorbitol	35	150	0.2	2.0	17.5
Almidón	68	250	0.3	4.0	17.0
Fructosa	86	1.2	72.0	2.8	30.71
Maltosa	128	190	0.7	5.3	24.15
Glicerol	210	180	1.2	6.7	31.34
Glucosa	491	10	49.1	7.2	68.19

\*: esporas/ ml x 10<sup>6</sup>.

\*\* : conidias/ mg de biomasa x 10<sup>6</sup>.

Fuente: Thomas *et al.*, 1987

### **3. - Influencia de la composición de fosfato y nitrógeno**

Hegedus *et al.* (1990) reportan que la limitación del crecimiento cuando las concentraciones de fosfato o nitrógeno en el medio de cultivo son bajas, favorece la esporulación en cultivos sumergidos. Aun en medios sólidos observaron que cuando las condiciones favorecen un fuerte crecimiento del micelio la formación de conidias es lenta o muy pobre. Utilizando el medio TKI sin fosfato lograron producir conidias pero el rendimiento fue 10 veces menor que el obtenido cuando se añadió fosfato.

Hegedus *et al.* (1990) probaron fuentes de carbono y nitrógeno complejas como: medio YPG, GlcNAc, galactosamina (GalNAc), y quitina cruda y purificada de caparazón molido de cangrejo. En todos los casos la adición de 0.5 g/ l de fosfato en el medio redujo

significativamente los niveles de conidias producidas, mientras que en los medios libres de fosfato, utilizando GLcNAc y quitina cruda como fuentes de carbono y nitrógeno, la producción de conidias fue superior. Utilizando un medio con 0.5 % de GlcNAc y 0.3 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  encontraron que, cuando la concentración de fosfato disminuye por debajo de 0.15 g/l, se incrementan los niveles de conidias producidas y se detiene la producción de blastosporas.

Thomas *et al.* (1987) utilizaron fuentes de nitrógeno complejas como: peptona, neopeptona, triptona y extracto de levadura, en medio salino mínimo, estas no favorecieron la formación de conidias, pero sí de blastosporas. Cuando se añadió fuente de carbono y nitrato de potasio con una relación 5:1 se obtuvieron los niveles de esporulación más altos. Al aumentar la concentración de nitrato disminuyó el rendimiento de conidias y aumentó la producción de micelio.

Bidochka y Khachatourians (1992) encontraron que las proteínas de la cutícula de *M. sanguinipes* fueron utilizadas en igual magnitud, independientemente de su hidrofobicidad, por la acción de las proteasas y posiblemente de los ácidos orgánicos que facilitan su solubilización. El crecimiento en quitina sola fue menor que cuando se combinó con proteínas y lípidos.

Los análisis de los resultados reportados en la literatura consultada indican que la esporulación de *B. bassiana* depende de la concentración y tipo de fuente de carbono en el medio de cultivo y que este hongo es capaz de utilizar fuentes complejas de carbono y nitrógeno. Además que las concentraciones de fosfato y nitrógeno en el medio influyen en la producción de esporas.

### **2.2.2. - METODOS DE PRODUCCION DE ESPORAS DE *B. bassiana***

En la **Tabla 2.6** se comparan los aspectos principales de los procesos de cultivo sumergido CS y fermentación en medio sólido FMS empleados en la producción de esporas de *B. bassiana*. Como puede observarse en el proceso de CS se requiere un mayor número de pasos para obtener el producto final. No obstante en la actualidad los estudios básicos sobre la producción de esporas y las características de estas se realizan utilizando este proceso.

La preferencia por la utilización del CS se debe a dos razones fundamentales: i) a partir de 1940 la FMS fue prácticamente ignorada en occidente debido al rápido desarrollo del CS

(Ramana-Murthy *et al.*, 1992), ii) se plantea que el proceso de FMS requiere mayor tiempo y costos de mano de obra más altos (Hegedus *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1987).

Sin embargo la FMS se utiliza con mayor frecuencia en aplicaciones prácticas para la producción de biopesticidas a partir de *B. bassiana* (Auld, 1991). Esta preferencia por el uso de la FMS se debe a que en este proceso se obtienen conidias mientras en CS se obtienen generalmente blastosporas. Las conidias tienen mejores características que las blastosporas para la formulación y aplicación de biopesticidas como se vió en la sección 2.1.4.

**Tabla 2.6** Comparación de las características de la producción de esporas de *B. bassiana* por cultivo sumergido y fermentación en medio sólido.

<b>Cultivo Sumergido</b>	<b>Fermentación en Medio Sólido</b>
- Los inóculos se desarrollan en cultivo sumergido.	- Los inóculos se desarrollan en cultivo sumergido o por FMS.
- Se utilizan biorreactores convencionales para cultivo líquido sin tener que modificarlos.	- Se utilizan botellas de vidrio, bolsas de polietileno, bandejas planas y canales abiertos en el suelo.
- El cultivo puede realizarse por lote, lote alimentado o continuo.	- Muchas de las operaciones necesarias para realizar el cultivo se hacen de forma manual.
- Los medios de cultivo son sencillos, se utilizan un conjunto estándar de sales inorgánicas y fuentes de carbono y nitrógeno naturales como melazas y harina de soya.	- Como medios de cultivo se utilizan semillas y granos molidos o enteros de arroz, frijol, trigo, cebada. Además desechos de la cosecha como: salvado de trigo, tallos molidos, polvo de arroz, etc.
- La producción de esporas puede ser incrementada utilizando mayores volúmenes o concentraciones de los inóculos y mediante cambios en los medios de cultivo o por la simple dilución de los mismos.	- La producción de esporas puede ser incrementada adicionando soluciones de sales de nutrientes a los sustratos sólidos.

Fuentes: Auld, 1991; Goettel y Roberts, 1991; Mendonça, 1991

**Tabla 2.6** Comparación de las características de la producción de esporas de *B. bassiana* por cultivo sumergido y fermentación en medio sólido (continuación).

<b>Cultivo Sumergido</b>	<b>Fermentación en Medio Sólido</b>
- Se requieren centrífugas de gran capacidad para separar las esporas de los hongos filamentosos. Los métodos de filtración dejan gran cantidad de esporas dentro de la masa de micelio.	- No es necesario separar las esporas del soporte sólido después de la fermentación.
- Las esporas deben ser lavadas durante la recuperación, pero en este paso se pueden eliminar también enzimas que se encuentran en la matriz que rodea las esporas y participan en los procesos de fijación a la cutícula. Esto que puede disminuir la efectividad del biopreparado.	- No se realiza lavado alguno del material fermentado.
- Las esporas deben secarse en corto tiempo para evitar pérdidas de viabilidad y en condiciones de limpieza para prevenir la contaminación con bacterias.	- El secado de las esporas debe tener los mismos requerimientos que en CS.
- Generalmente las esporas se mezclan con soportes sólidos o se suspenden en aceite o agua para su aplicación en campo.	- El soporte seco con las esporas puede reducirse a polvo para facilitar su almacenamiento y aplicación en campo.

Fuentes: Auld, 1991; Goettel y Roberts, 1991; Mendonça, 1991

### **2.2.3. - FORMULACION Y APLICACION DE ESPORAS DE *B. bassiana***

En la formulación de un biopesticida se debe tener en cuenta tres aspectos importantes: (i) los agentes activos deben proveerse en formas económicas y fáciles de aplicar, que permitan almacenarlos por largos periodos; (ii) aumentar su persistencia y efectividad en el campo; (iii) deben incorporarse aditivos como: humectantes, aglutinantes, protectores contra la radiación UV, y agentes tixotrópicos. Los tipos de formulaciones incluyen polvos secos y para suspender, preparados granulares y microencapsulados, emulsiones en agua y aceites, y

concentrados para preparar emulsiones con agua. Otros factores que se deben tener en cuenta son: el modo de infección, el hábitat del hospedero y el método de aplicación (Auld, 1991; Goettel y Roberts, 1991).

Debido a su pequeño tamaño, las esporas de los entomopatógenos pueden ser aplicadas con los equipos convencionales utilizados para los pesticidas y herbicidas químicos. Por lo tanto el número de técnicas de aplicación es grande y pueden adaptarse también a una formulación específica. Debido a que las formulaciones disponibles son pocas, la mayoría de las pruebas preliminares de campo se realizan con los principios activos sin formular o con preparados crudos (Goettel y Roberts, 1991).

Se han hecho formulaciones y aplicaciones de *B. bassiana* en forma de polvos, que incluyen cáscaras molidas, harinas de salvados, cenizas y tierras minerales. El uso de aceites en bajas concentraciones, con la adición de agentes emulsionadores, puede ser también una línea de investigación promisoría. Las pruebas realizadas con varios aceites han mostrado que se pueden disminuir los niveles de aplicación de esporas en el campo (Auld, 1991; Goettel y Roberts, 1991).

Goettel y Roberts (1991) reportaron la aplicación de esporas de *B. bassiana* obtenidas según un método de cultivo superficial desarrollado por la firma Mycotech. La formulación de las esporas se hizo en aceite y la aplicación se hizo a razón de  $10^{13}$  esporas/ hectárea en un volumen total de tres litros.

## **OBJETIVOS**

### 3. - OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la obtención de esporas (conidias) del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, utilizando como modelo de estudio el cultivo por FMS con un soporte inerte, en este caso el bagazo de caña. La utilización del modelo bagazo- medio de cultivo químicamente definido- hongo en lecho empacado, permitirá estudiar diferentes composiciones del medio de cultivo, condiciones de operación y abordar el escalamiento de la FMS, en un sistema controlado que se acerca a las condiciones reales de los procesos de FMS.

En los trabajos iniciales se estudia el crecimiento y la esporulación del hongo en cultivo superficial, sobre placas de agar, para determinar las condiciones de operación como temperatura y composición del medio de cultivo empleado. Además se evalúan diferentes métodos de extracción de las esporas, tanto en cultivo superficial como en cultivo sobre soporte sólido, así como las características de las esporas obtenidas en cultivo superficial, como viabilidad e hidrofobicidad, que influyen directamente en el potencial de *B. bassiana* como agente entomopatógeno.

Los trabajos siguientes se enfocan al estudio de la influencia de la composición del medio de cultivo en la producción de esporas de *B. bassiana*, utilizando el modelo de FMS antes descrito, en columnas de vidrio. Como variables de estudio se toman la relación carbono/nitrógeno y el nivel de fosfato en el medio de cultivo. También se analiza como variable la densidad de empaque de las partículas sólidas, que no es una variable propia de la composición del medio de cultivo, pero puede influir en la esporulación de los hongos debido a que define el volumen de espacios vacíos dentro del lecho de sólidos.

Por último se analizan aspectos del escalamiento del proceso, usando el mismo modelo de FMS y con las mejores condiciones obtenidas en la etapa anterior, para estudiar diferentes condiciones de cultivo que pueden influir en la esporulación del hongo con el cambio de escala.

## **MATERIALES Y METODOS**

## **4. - MATERIALES Y METODOS**

En este capítulo se describen los materiales y métodos generales utilizados en el trabajo experimental. Los materiales y métodos específicos utilizados para cada experimento se describen en las secciones correspondientes del capítulo RESULTADOS Y DISCUSION.

### **4.1. - MICROORGANISMO**

Se utilizó la cepa de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin CDBB H- 987 perteneciente a la colección de microorganismos del CINVESTAV (IPN). Este microorganismo fue aislado en una región agrícola de Cuba a partir de muestras de insectos infectados colectadas en el campo.

La cepa fue transferida a tubos de cultivo, con el medio de cultivo para conservación (ver **Tabla 4.1**). Se incubó durante 7 días a 27 °C, para asegurar el crecimiento y la esporulación (Boucias *et al.*, 1988; Hegedus *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1987). La cepa se mantuvo en refrigeración a 4 °C para su posterior utilización en el desarrollo de los inóculos. Para conservar las esporas por largos periodos se utilizaron dos técnicas de conservación: i) en suspensión de glicerol 10 % y refrigeración a -20 °C; ii) liofilización.

### **4.2. - MEDIOS DE CULTIVO Y SOPORTE**

#### **4.2.1. - MEDIO PARA CONSERVACION Y DESARROLLO DE INOCULOS**

Se utilizó un medio semisintético con los componentes comúnmente utilizados para el desarrollo de inóculos de *B. bassiana* en la literatura consultada (Boucias *et al.*, 1988; Hegedus *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1987). La composición del medio semisintético se presenta en la **Tabla 4.1**.

**Tabla 4.1** Medio de cultivo semisintético utilizado en la conservación de esporas y el desarrollo de inóculos.

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
glucosa	20.0
agar	20.0
extracto de levadura	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
NaNO <sub>3</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.0
FeSO <sub>4</sub>	0.01

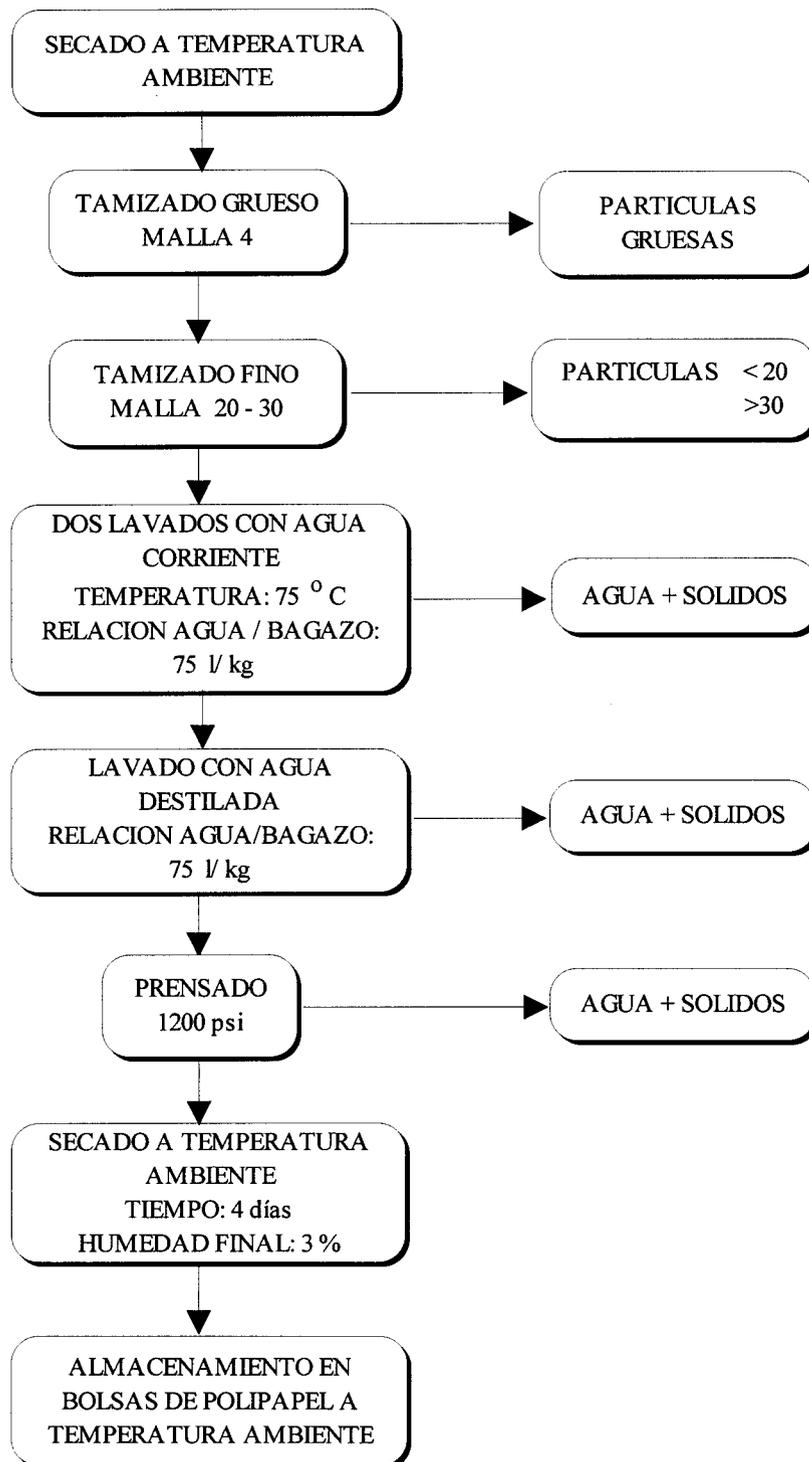
#### **4.2.2. - MEDIO PARA CULTIVOS EXPERIMENTALES**

La formulación de este medio varió de acuerdo a los diseños de experimentos realizados para analizar la influencia que tenían las concentraciones de varios componentes sobre la producción de esporas del hongo. Los componentes se dividieron en dos grupos para facilitar el trabajo: i) medio basal: extracto de levadura (1.0 g/l), MgSO<sub>4</sub> (1.0 g/l), solución de oligoelementos (2.0 ml/l); ii) componentes variables: glucosa, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Para cada experimento se preparó la cantidad necesaria de solución de oligoelementos con la siguiente composición (g/l): FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (5.0); MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (1.6); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1.4); CaCl<sub>2</sub> (2.0) (Saucedo- Castañeda, 1991).

#### **4.2.3. - TRATAMIENTO DEL SOPORTE UTILIZADO EN FMS**

Como soporte se utilizó bagazo de caña proveniente del ingenio “Emiliano Zapata”, Zacatepec, Mor. Para acondicionarlo como soporte fue necesario lavarlo y tamizarlo adecuadamente, para eliminar los contaminantes y homogeneizar el tamaño de las partículas. El esquema de tratamiento se describe en la **Figura 4.1**. Se procesó la cantidad de bagazo suficiente para todos los experimentos. Las características del soporte al término del tratamiento fueron: tamaño de partículas: 0.59 - 0.80 mm, humedad: 2.43 %, composición C, H, N: 4.76, 6.00, 0.37 (%).



**Figura 4.1** Esquema del tratamiento de bagazo caña utilizado como soporte inerte.

### **4.3. - CONDICIONES DE CULTIVO Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

#### **4.3.1. - CULTIVO SUPERFICIAL**

##### **1. - *Cultivo en cajas de Petri***

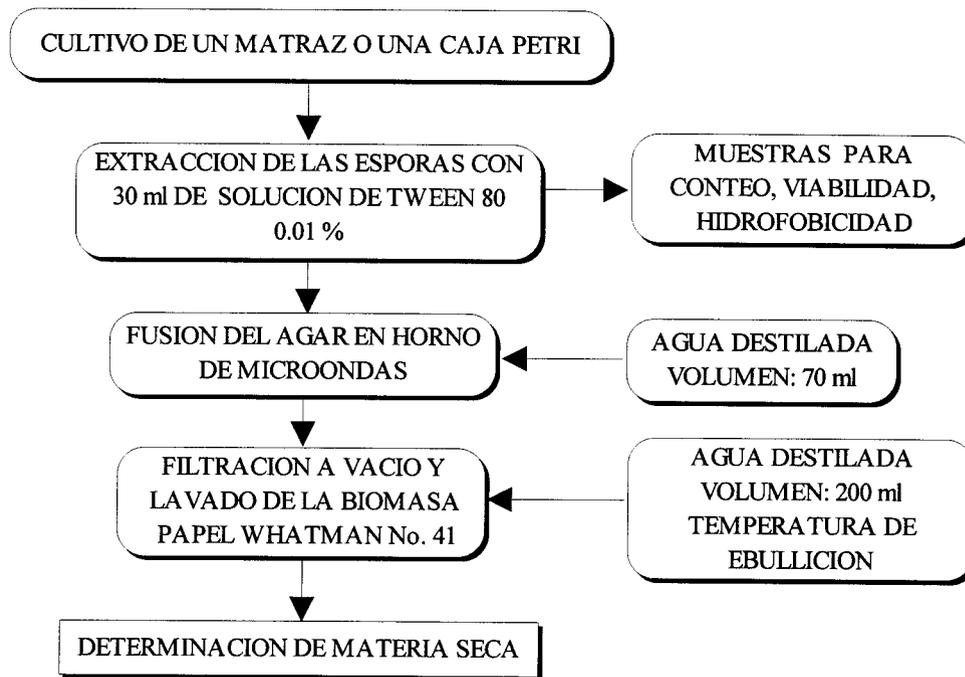
Se utilizaron cajas de Petri de 8 cm de diámetro en las que se añadieron 10 ml de medio de cultivo, se dejó solidificar el medio y se inocularon por piquete en el centro del disco de agar. Se incubaron a una temperatura de 27 °C durante el tiempo necesario para que las colonias cubrieran toda el área de la caja.

##### **2. - *Cultivo en matraces erlenmeyer***

En matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad se adicionaron diferentes volúmenes de medio de cultivo para inóculos. Se inocularon con 0.5 ml de suspensión de esporas que contenía  $10^7$  esporas/ ml. El inóculo se adicionó sobre la superficie del medio solidificado y en forma masiva. Los matraces se incubaron a una temperatura de 29 °C durante 7 días.

##### **3. - *Preparación y tratamiento de las muestras***

Las muestras provenientes de cajas de Petri o matraces Erlenmeyer se procesaron siguiendo el esquema descrito en la **Figura 4.2**. Las muestras de cajas de Petri se pasaron a vasos de precipitado para facilitar su manejo. Las muestras de matraces Erlenmeyer se procesaron en los matraces. Primero se extrajeron las esporas con 30 ml de solución de Tween 80 (0.01 %) y se tomaron muestras para conteo de esporas. A continuación se adicionaron 70 ml de agua destilada y se fundió el agar en horno de microondas. Posteriormente se separó el agar fundido de la biomasa por filtración a vacío utilizando papel de filtro Whatman No. 41 para garantizar que toda la biomasa, incluidas las esporas, fuera retenida. Durante la filtración se lavó la biomasa con 200 ml de agua destilada a temperatura de ebullición para eliminar los restos de agar. La muestras de biomasa sobre el papel de filtro se utilizaron para determinar materia seca.



**Figura 4.2** Esquema de preparación y tratamiento de las muestras obtenidas de cajas de Petri y matraces.

### **4.3.2. - CULTIVO EN FEMENTACION EN MEDIO SOLIDO**

#### **1. - Desarrollo de los inóculos**

A partir del cultivo conservado en un tubo de cultivo con agar inclinado, las esporas se transfirieron a varios tubos de cultivo con 10 ml de medio semisintético (ver **Tabla 4.1**), y se hicieron crecer a 29 °C durante 7 días. Las esporas obtenidas en un tubo se suspendieron con 3 ml de solución de Tween 80 (0.01 %) y se inocularon 0.5 ml de esta suspensión en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 20 ml de medio semisintético o 2 ml de suspensión de esporas en matraces de 1000 ml que contenían 80 ml de medio semisintético. La inoculación se realizó en forma masiva. Los matraces Erlenmeyer se incubaron a 29 °C durante 7 días. La extracción de las esporas se hizo con 30 ml (matraces de 250 ml) ó 120 ml (matraces de 1000 ml) de solución de Tween 80 (0.01 %) y agitación magnética.

## **2. - Preparación de los cultivos**

En la **Figura 4.3** se muestra el esquema de la preparación de los cultivos para los experimentos de FMS. Las cantidades de agua y bagazo necesarias se determinaron mediante un balance de materiales para sólidos y agua, teniendo en cuenta la humedad del bagazo, los contenidos de sólidos en los diferentes medios de cultivo y la humedad requerida en el medio sólido al inicio de las fermentaciones.

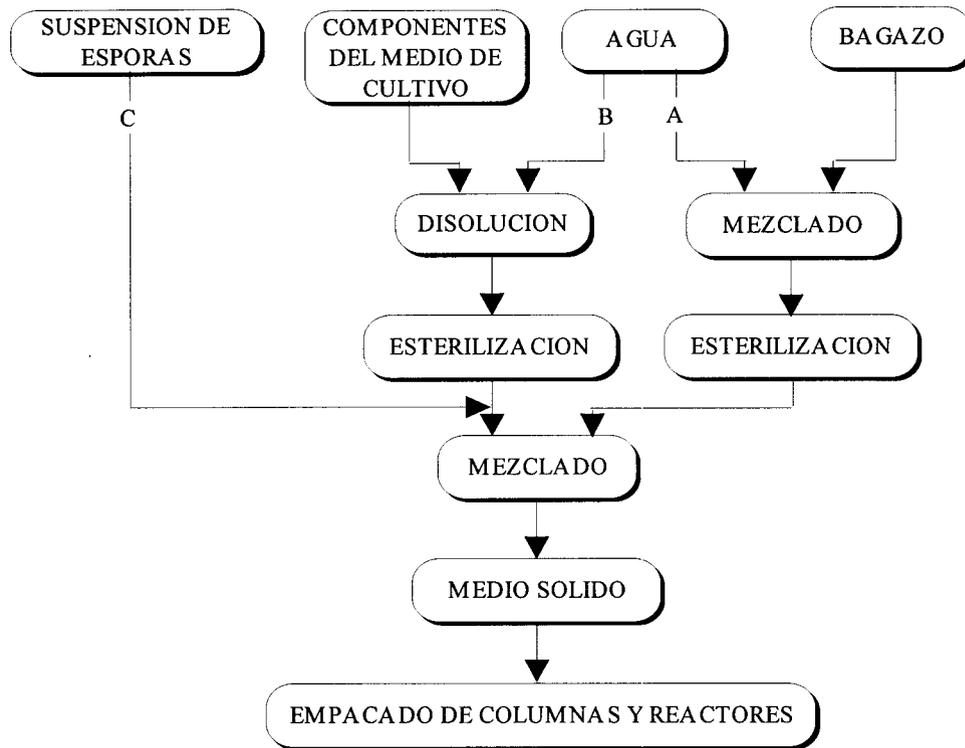
La cantidad de agua necesaria se dividió en tres fracciones: A con el 20 % se mezcló con el bagazo para garantizar su esterilización completa; B con el 70 % se utilizó para disolver los componentes del medio de cultivo; C con el 10 % se completó con el volumen de suspensión de esporas necesario para el inóculo y agua estéril. La cantidad de bagazo necesaria humedecida con la fracción A de agua y los componentes del medio de cultivo disueltos en la fracción B se esterilizaron por separado en autoclave durante 15 min a 15 psi.

Después de la esterilización, el volumen de suspensión de esporas necesario para el inóculo se mezcló primero con la solución de componentes medio de cultivo y la mezcla resultante se adicionó poco a poco al bagazo esteril, agitando continuamente para homogeneizar el medio sólido. Por último se empacaron las columnas de vidrio y los reactores metálicos de manera tal que la densidad del empaque fuera homogénea en toda la altura del lecho de sólidos.

## **3. - Condiciones de cultivo**

Las condiciones de cultivo empleadas en los experimentos de FMS se relacionan a continuación:

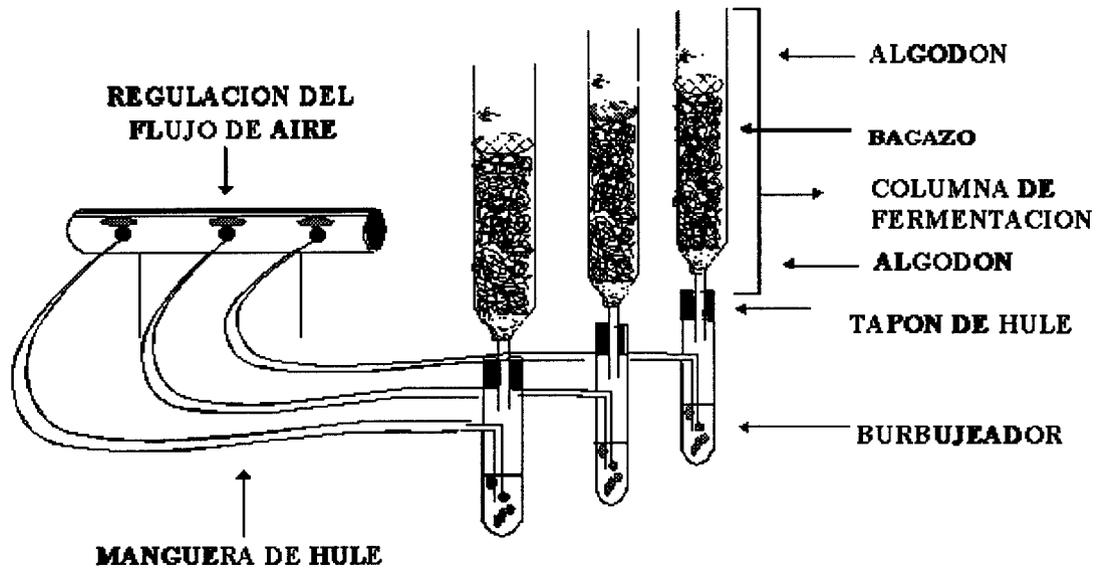
<b>Inóculo:</b>	$10^7 \text{ g}^{-1}$ (esporas/ g de medio sólido húmedo)
<b>Humedad inicial:</b>	75 % (75 g de agua/ 100 g de medio sólido húmedo)
<b>Flujo de aire:</b>	0.75 vkgm (l de aire/ kg de medio sólido húmedo/ min)
<b>Temperatura:</b>	29 °C



**Figura 4.3** Esquema de preparación de los cultivos para los experimentos de FMS.

#### ***4. - Dispositivo de fermentación y reactores utilizados***

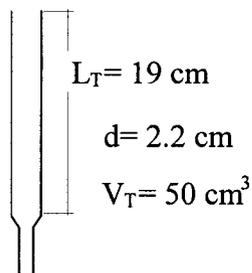
El dispositivo básico de fermentación empleado en los experimentos realizados a pequeña escala se muestra en la **Figura 4.4**. El principio de funcionamiento del sistema se basó en el mantenimiento de condiciones controladas de temperatura, humedad y aireación en lechos de substrato sólido estáticos, empacados reactores de vidrio. Por dentro de los lechos se hicieron circular flujos controlados de aire, que se saturaron previamente haciéndolos burbujear en el agua contenida en los recipientes colocados en la parte inferior de las columnas. El conjunto de las columnas con los burbujeadores se colocó dentro de un baño de agua con temperatura controlada (Raimbault, 1980; Saucedo- Castañeda, 1991; Soccol, 1992).



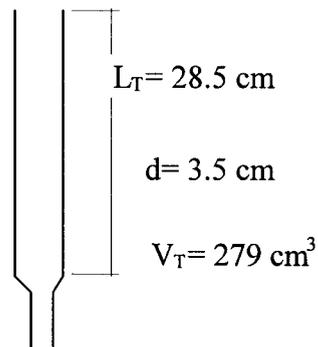
**Figura 4.4** Esquema del dispositivo básico empleado en las FMS en pequeña escala.

En los experimentos a pequeña escala se emplearon reactores de vidrio en forma de columnas de dos tamaños, las dimensiones de estos se muestran a continuación:

**Reactores pequeños**

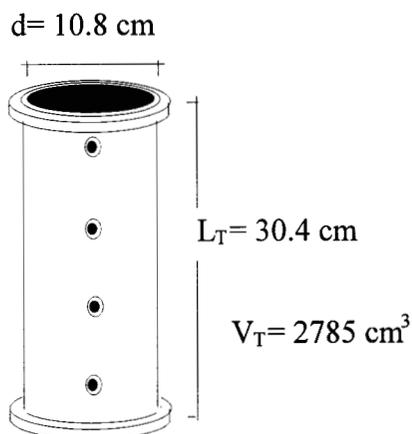


**Reactores medianos**



Donde:  $L_T$ , longitud total de la columna;  $d$ , diámetro interno de la columna;  $V_T$ , volumen total de la columna que puede ocupar el medio sólido.

Para los experimentos a escala semipiloto se emplearon reactores modulares de acero inoxidable en forma de columna. A continuación se muestra el esquema de un módulo con sus dimensiones. Los reactores se formaron con uno o más módulos similares.



Donde:  $L_T$ , longitud total del módulo;  $d$ , diámetro interno del módulo;  $V_T$ , volumen total del módulo que puede ocupar el medio sólido. Los puntos indicados con flechas corresponden a los puertos para termopares, entrada y salida de aire.

### ***5. - Preparación y tratamiento de las muestras***

En la **Figura 4.5** se muestra el esquema que se empleó para la preparación y el tratamiento de las muestras de las FMS realizadas. El medio sólido fermentado, se obtenía de una columna de vidrio o de una muestra de los reactores metálicos y se mezcló bien para garantizar homogeneidad en la muestra. Después se tomó una muestra de 1 g aproximadamente para determinación de materia seca, a continuación se pesó otra muestra que se mezcló con solución de Tween 80 (0.01 %) en proporción 1:1 y se mantuvo en agitación con mosca magnética durante 20 min para extraer las esporas.

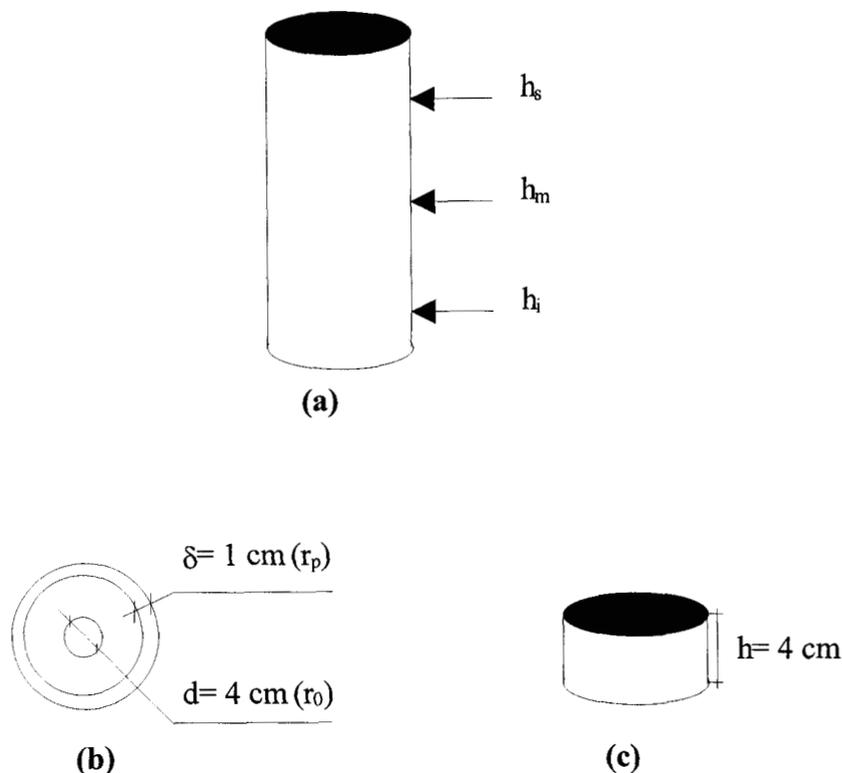
La suspensión resultante del mezclado se filtró por lana de vidrio para eliminar los restos de micelio que dificultaban la determinación del número de esporas. A la suspensión filtrada se le midió el pH y se tomó una muestra para realizar los conteos de esporas. Finalmente la suspensión restante se centrifugó para determinar la hidrofobicidad de las esporas.



**Figura 4.5** Esquema de preparación y tratamiento de las muestras obtenidas de la FMS.

En la **Figura 4.6** se muestra la forma en que se tomaron las muestras de los reactores metálicos se tomaron a diferentes alturas en el lecho de sólidos: altura inferior ( $h_i$ ), altura media ( $h_m$ ), altura superior ( $h_s$ ), y en el centro ( $r_0$ ) y la periferia ( $r_p$ ) del cilindro formado por el medio sólido. Las muestras coincidieron con las posiciones de los termopares colocados en los reactores para la medición de la temperatura durante el transcurso de las fermentaciones. Para ver detalles sobre los registros de temperatura remitirse a los ANEXOS.

222266



**Figura 4.6** Representación esquemática de las posiciones y la forma de las tomas de muestras en los medios sólidos provenientes de los reactores metálicos. a: posiciones para la toma de muestras en el lecho de sólidos; b: corte transversal del lecho mostrando el diámetro ( $d$ ) de la muestra tomada en el centro espesor ( $\delta$ ) de la muestra tomada en la periferia c: corte longitudinal de la cama de sólidos mostrando la altura ( $h$ ) de los cortes para las muestras tomadas.

#### 4.4. - DETERMINACIONES ANALITICAS

##### 4.4.1. - CONTEO DE ESPORAS

El número de esporas se determinó por conteo directo en cámara de Neubauer de 16 cuadros por cuadrícula, se contaron 9 cuadrículas de las 25 de la cámara, utilizando la dilución adecuada. Las fórmulas empleadas para expresar el número de esporas obtenido se describen a continuación:

**- Número de esporas por ml de suspensión inicial**

$$N = n * F * 1/D \quad (4.1)$$

Donde: N: número de esporas/ ml de suspensión inicial

n: promedio del número de esporas contadas en la cámara de Neubauer

F: factor de la cámara empleada ( $25 \times 10^4$ )

D: dilución empleada para el conteo

**- Número de esporas por unidad de área de la colonia formada**

$$S = N / a \quad (4.2)$$

Donde: S: número de esporas/  $\text{cm}^2$  de colonia formada

a: área superficial de la colonia formada ( $\text{cm}^2$ )

**- Número de esporas por unidad de peso de biomasa formada**

$$M = N / B \quad (4.3)$$

Donde: M: número de esporas/ mg de biomasa seca formada

B: peso de la biomasa (micelio) del hongo formada en los cultivos superficiales, obtenida por determinación de materia seca (mg)

**- Número de esporas por unidad de peso de sustrato**

$$G = N * v / g \quad (4.4)$$

Donde: G: número de esporas/ g de sustrato sólido húmedo

v: volumen de solución de Tween 80 utilizado para extraer las esporas de la muestra (ml)

g: peso de la muestra de sustrato utilizada para extraer las esporas (g)

**4.4.2. - VIABILIDAD**

La viabilidad de las esporas se determinó haciendo diluciones sucesivas (1/ 10) en agua destilada estéril, hasta obtener concentraciones de esporas de 10, 100 y 1000/ ml. Estas tres diluciones se sembraron, por triplicado, en cajas de Petri que contenían 20 ml de medio PDA,

y se contaron las esporas germinadas a las 72 h de incubación a una temperatura de 29 °C. El porcentaje de viabilidad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{(c * f) * 100}{N} \quad (4.5)$$

Donde: P: porcentaje de esporas viables (%)

c: número promedio de colonias contadas en tres cajas de Petri

f: factor de dilución

#### **4.4.3. - HIDROFOBICIDAD**

Se determinó mediante el método de exclusión de fases (Boucias *et al.*, 1988). Las suspensiones de esporas se centrifugaron (8000 x g) durante 30 min, en una centrífuga Hettich Universal. Las esporas recuperadas se lavaron dos veces con agua destilada a una temperatura de 60 °C y se suspendieron en solución amortiguadora de acetato de sodio (pH= 6.0). Después se mezclaron con iguales volúmenes de tolueno y se mantuvieron en refrigeración durante una noche, para asegurar la separación total de los solventes. Se recuperó la fase acuosa excluida de la fase orgánica, y se midió la absorbancia a 600 nm contra un testigo de solución amortiguadora. La hidrofobicidad de las esporas se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$HB = \frac{(abs - abf) * 100}{abs} \quad (4.6)$$

Donde: HB: hidrofobicidad de las esporas (%)

abs: absorbancia de la suspensión de esporas en solución amortiguadora de acetato de sodio (nm)

abf: absorbancia de la fase acuosa excluida del solvente orgánico (nm)

#### **4.4.4. - MATERIA SECA**

Se determinó por secado de las muestras de micelio del hongo y de sustrato húmedo, en estufa a una temperatura de 60 °C durante 24 h. Las muestras de sustrato húmedo se pesaron, por duplicado, en charolas de aluminio y se colocaron en estufa. Las muestras secas se pasaron a una desecadora con silicagel para evitar que absorbieran humedad, se dejaron enfriar y se

pesaron en balanza analítica. Las fórmulas empleadas para expresar los resultados se muestran a continuación:

**- Peso seco de biomasa de hongo formada en cultivos superficiales**

$$B = ps - pp \quad (4.7)$$

Donde: ps: peso seco del micelio más el papel de filtro (mg)

pp: peso seco del papel de filtro (mg)

**- Materia seca de las muestras de sustrato sólido**

$$H = \frac{(ph - ps)}{ph} * 100 \quad (4.8)$$

$$MS = 100 - H \quad (4.9)$$

Donde: H: contenido de humedad de la muestra (%)

ph: peso húmedo de la muestra (g)

ps: peso seco de la muestra (g)

MS: materia seca de la muestra (%)

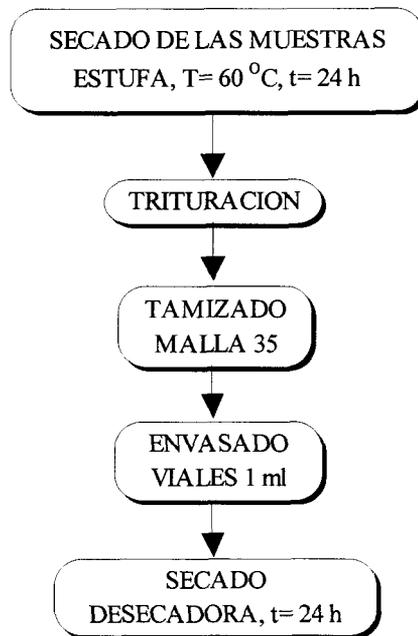
**4.4.5. - MEDICION DE pH**

La medición de pH se realizó directamente en la suspensión obtenida de las muestras de las fermentaciones sólidas (**Figura 3.5**). Para realizar las mediciones se utilizó un potenciómetro digital Conductronic pH 20 provisto de un electrodo combinado. El potenciómetro se calibró previamente con soluciones amortiguadoras (Sigma de México S. A. de C. V.) de pH 4.0 y 7.0.

**4.4.6. - COMPOSICION ELEMENTAL DE C, H y N**

Las composiciones elementales de carbono, hidrógeno y nitrógeno del bagazo y las muestras de medio sólido se determinaron en un analizador Perkin Elmer 2400. Este equipo está provisto de dos columnas, en la primera se efectúa la combustión de la muestra a una temperatura de 900 °C, y en la segunda se reducen los gases que salen de la combustión a una temperatura de 640 °C. El gas acarreador es helio y la detección de los compuestos se realiza en un detector de conductividad térmica.

La cantidad de muestra sólida con la que opera el equipo, es muy pequeña, entre 1.5 y 2.5 mg, por lo que fue necesario procesar las muestras como se describe en la **Figura 4.7**; para poder pesar las cantidades adecuadas. Los resultados se expresaron en porcentaje (%) de cada compuesto referido a la materia seca de la muestra



**Figura 4.7** Esquema de la preparación de las muestras para los análisis de C, H y N.

#### **4.4.7. - ANALISIS DE GASES**

Para el análisis de gases de salida de las FMS se emplearon dos sistemas de análisis de gases: cromatografía de gases y detección

##### **1. - Cromatografía de gases**

Se empleó un sistema que consta de un cromatógrafo de gases Gow-Mac 580 equipado con un sistema de inyección automático que permite el análisis en línea de 16 muestras, una columna concéntrica Alltech (CTR1) para la separación de los gases, y un detector que registra la conductividad térmica de los gases. El cromatógrafo está acoplado a una computadora provista del programa Chroma de la sociedad Biosysteme. El programa permite controlar la secuencia de análisis en el cromatógrafo, la programación de la frecuencia de análisis, la integración

automática de los cromatogramas, y el almacenamiento de los resultados de oxígeno (O<sub>2</sub>), bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y nitrógeno (N<sub>2</sub>), en porciento.

Los parámetros de operación del sistema de cromatografía fueron los siguientes:

Detector	Conductividad térmica
Temperatura del detector	45 °C (isotérmica)
Corriente del detector	150 mA
Fase móvil	Helio
Flujo de la fase móvil	40 ml/ min
Presión de la fase móvil	1 bar
Volumen de muestra inyectado	0.5 ml/ min

Antes de comenzar el análisis de muestras fue necesario calibrar el detector de conductividad térmica, debido a que este registra la diferencia de corriente producida entre el gas que está pasando por la celda de medición y el gas de referencia. La calibración se realizó con diferentes mezclas de concentraciones conocidas de los gases que se detectaron (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>). Con los resultados de los análisis de estas mezclas se determinaron las curvas de calibración para cada gas.

## ***2. - Medición de CO<sub>2</sub> por infrarrojo y de O<sub>2</sub> por paramagnético***

Se utilizó un sistema desarrollado en la UAM- Iztapalapa que consta de los elementos siguientes:

- **Medidor de flujo de la mezcla de gases:** Neumotacómetro Hans Rudolf Inc. 8300A, su principio de funcionamiento se basa en detectar la diferencia de presión que se crea en el flujo de gases al pasar por una malla muy fina, la diferencia de presión se convierte en una señal eléctrica proporcional al flujo de gases.

- **Detector de CO<sub>2</sub>:** Espectrofotómetro de absorción en el infrarrojo Servomex 1505, su principio de funcionamiento se basa en detectar la diferencia de presión que se produce en un diafragma que separa dos cámaras una de medición y una de referencia, la diferencia de presión se relaciona con la diferencia de concentraciones de CO<sub>2</sub> entre el gas de referencia y el

gas medido y se convierte en una señal eléctrica proporcional a la concentración de CO<sub>2</sub> en el gas medido.

- **Detector de O<sub>2</sub>**: Paramagnético Servomex 1111/000, su principio de funcionamiento se basa en que las moléculas de oxígeno se orientan cuando al gas se le aplica un campo magnético, el sensor consta de una varilla con sendas esferas en los extremos suspendida en un campo magnético dentro de una cámara que se sella cuando entra el gas medido de tal forma que la varilla es empujada fuera del campo con una fuerza de torque proporcional a la concentración de O<sub>2</sub> en la muestra, para contrarrestar este torque el sistema genera una corriente de retroalimentación proporcional al torque y se mide por un voltage de salida proporcional.

Además este sistema posee una computadora provista de un programa, desarrollado también en la UAM- Iztapalapa, que permite realizar la calibración automática de los detectores, la programación de la frecuencia de los análisis, y el almacenamiento de forma continua de los resultados de 11 muestras de flujo de gases. La calibración se realizó cada 4 horas mediante el suministro de flujos de N<sub>2</sub> y de una mezcla de concentraciones conocidas de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. El programa almacena en forma de tablas los resultados de los análisis de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en porciento y el flujo de gas (ml/ min) que entra al sistema.

## **PARTE II. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **CULTIVO SUPERFICIAL**

## **5. - ESTUDIO DEL CULTIVO SUPERFICIAL DE *B. bassiana***

El estudio del crecimiento superficial de un hongo es un método básico para definir su comportamiento frente a diferentes condiciones de cultivo. El diámetro de las colonias y la velocidad de crecimiento radial se utilizan frecuentemente en bioensayos e investigaciones fisiológicas. La velocidad de crecimiento radial es un parámetro confiable para establecer la temperatura óptima de crecimiento de un hongo (Trinci, 1969).

Con el objetivo de establecer bases para los trabajos posteriores, se decidió estudiar el cultivo superficial de *B. bassiana* ensayando diferentes concentraciones del medio de cultivo, en donde se analiza: la velocidad de crecimiento radial, la esporulación, la viabilidad y la hidrofobicidad de las esporas producidas. Se probaron diferentes formas de inoculación y volúmenes de medio de cultivo. Por último se estudiaron diferentes formas de recuperación de las esporas producidas en matraces Erlenmeyer.

### **5.1. - EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO RADIAL Y LA PRODUCCION DE ESPORAS**

Este estudio se realizó en cajas de Petri de 8 cm de diámetro. Para los experimentos se utilizaron dos medios de cultivo semisintético y PDA. Se probaron cinco temperaturas de incubación: 26, 29, 32, 35 y 38 °C durante el tiempo necesario para que las colonias que crecieron más rápido cubrieran toda la superficie del agar. Se establecieron tres réplicas para cada condición experimental. Durante el desarrollo de los cultivos se tomaron mediciones del radio de las colonias en 5 direcciones de crecimiento, a partir del punto central de inoculación. Al término de los experimentos se hicieron análisis de conteo de esporas y contenido de biomasa en los cultivos.

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de clasificación múltiple, con probabilidad de 95 % para aceptar la hipótesis nula ( $p < 0.05$ ). Los valores promedio fueron

## RESULTADOS Y DISCUSION

comparados por la prueba de Tukey con la misma probabilidad de aceptación. Los cálculos se realizaron con el paquete de programas estadísticos STATGRAPHICS<sup>MR</sup> de Statistical Graphics Corporation. Para señalar las diferencias significativas entre las medias se utilizaron letras diferentes. En los casos que no existieron diferencias se utilizaron letras iguales.

Los resultados mostraron que el hongo es capaz de crecer en los dos medios de cultivo empleados. Solo se observó crecimiento para las temperaturas de 26 y 29 °C. Para temperaturas mayores no se observó crecimiento alguno como se aprecia en la **Tabla 5.1**. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente, por ejemplo Studdert y Kaya (1990b) utilizando diferentes tipos de suelo y niveles de actividad de agua encontraron las mayores velocidades de crecimiento para las colonias a temperaturas de 20 y 28 °C. Por otra parte la germinación de las conidias fue más rápida entre 25 y 30 °C aunque los máximos de crecimiento para las colonias estaban entre 23 y 25 °C (Studdert y Kaya, 1990a).

**Tabla 5.1** - Influencia del medio de cultivo utilizado y la temperatura de incubación en el crecimiento y la esporulación de *B. bassiana* en cajas de Petri.

Medio de cultivo	PDA		Semisintético	
	26	29	26	29
<b>Temperatura</b> (°C)				
<b>Biomasa</b> (mg/cm <sup>2</sup> )	7.79 ± 0.75 a	8.42 ± 1.39 a	3.64 ± 0.44 b	2.64 ± 0.04 b
<b>Esporas</b> (10 <sup>5</sup> /mg)	1.32 ± 0.18 c	1.69 ± 0.20 c	3.23 ± 0.83 d	4.18 ± 0.25 d
<b>V<sub>r</sub></b> (cm/h)	0.008 ± 0.0001 e	0.007 ± 0.0001 f	0.012 ± 0.0001 g	0.011 ± 0.0001 h

V<sub>r</sub>: Velocidad de crecimiento radial.

Letras iguales en una fila indican que no existen diferencias significativas entre las medias (p < 0.05).

Studdert *et al.* (1990), en estudios sobre la influencia de la temperatura en la supervivencia de las conidias de *B. bassiana* en suelo, encontraron una disminución en los tiempos medios de

supervivencia entre 2 y 50 °C, que fue el punto de muerte térmica para *B. bassiana* pues las esporas no sobrevivieron. Para 30 y 40 °C encontraron tiempos medios de supervivencia muy bajos (entre 1 y 4 semanas) comparados con los obtenidos para 10 y 20 °C (entre 7 y 44 semanas). Hegedus y Khachatourians, 1994 encontraron para la cepa de *B. bassiana* GK2016 que la temperatura límite para el crecimiento estaba cercana a 35 °C. Para mutantes termosensibles de esta cepa reportaron como temperatura límite para el crecimiento 30 °C.

Los resultados mencionados en los párrafos precedentes indican que el intervalo de temperatura para el crecimiento de este hongo puede estar determinado por las condiciones de cultivo y por las características de la cepa empleada. Además que la temperatura límite para el crecimiento es de 30 °C. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la cepa de *B. bassiana* utilizada puede crecer entre 26 y 30 °C, pero no por encima de este intervalo.

En la **Figura 5.1** se presentan las cinéticas de crecimiento radial en los dos medios de cultivo empleados para las dos temperaturas en que hubo crecimiento. El aumento del radio con el tiempo fue más rápido en el medio semisintético que en el medio PDA. El perfil lineal de aumento del radio con el tiempo de cultivo coincide con el descrito por Trinci (1969) para la fase del crecimiento superficial con velocidad constante.

Para calcular las velocidades de crecimiento radial se utilizó la ecuación enunciada por Trinci (1971) y Pirt (1985):

$$r = \mu w (t) \quad (4.1)$$

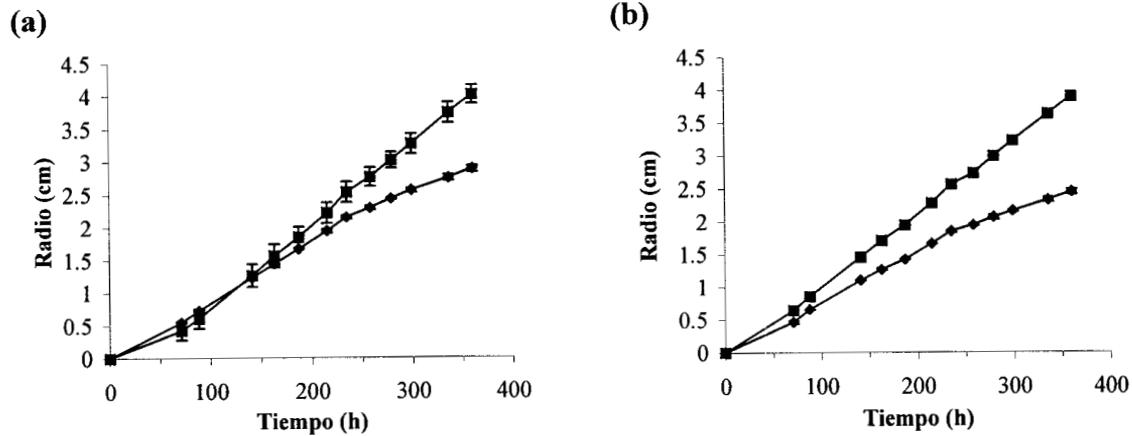
Donde: r: radio de la colonia (cm)

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )

w: ancho de la zona de crecimiento en la periferia de la colonia (cm)

t: tiempo de cultivo (h)

El término w es característico para cada especie de hongo y no varía con la temperatura de cultivo. Por tanto se definió  $\mu w = V_r$ , velocidad de crecimiento radial (Pirt, 1985).



**Figura 5.1** Crecimiento radial de *B. bassiana* en medio PDA (♦) y en medio semisintético(■) a las temperaturas de 26 °C (a) y 29 °C (b).

En la **Tabla 5.1** se muestran los resultados de los análisis de varianza para la densidad de biomasa, el rendimiento de esporas en base a biomasa y  $V_r$ . La densidad de biomasa obtenida en medio PDA fue significativamente superior que en medio semisintético. Caso contrario ocurrió para el rendimiento de esporas y  $V_r$ . La densidad de biomasa y el rendimiento de esporas no variaron con la temperatura,  $V_r$  fue superior en 0.001 cm/ h a 26 °C para los dos medios de cultivo.

Trinci (1969) reportó una relación inversa entre  $V_r$  y la densidad de crecimiento de las hifas, en cultivo superficial de *A. nidulans*, con concentraciones de glucosa de 20.48 g/ l. Por otra parte, Jennings (1976) planteó que el transporte de solutos a través de la membrana celular depende del área superficial de esta y de las concentraciones de los nutrientes en el medio de cultivo. En un medio con mayor concentración, como en el caso del semisintético, las hifas se ramifican menos pues se requiere una menor área superficial para el transporte de nutrientes. Esto hace que la densidad de crecimiento sea menor y que aumente  $V_r$ ; ya que disminuye la frecuencia de ramificación de las hifas, de acuerdo a las observaciones de Trinci (1969).

No obstante las diferencias en el crecimiento, el rendimiento de esporas en medio semisintético fue significativamente superior que en PDA. Este comportamiento se explica si se tiene en cuenta que las condiciones necesarias para el crecimiento vegetativo y para la esporulación son diferentes. Se requiere primero de una etapa de crecimiento vegetativo para que comience la esporulación, después un cambio en el metabolismo, provocado por deficiencia o agotamiento de uno o varios nutrientes esenciales, induce la producción de esporas. La esporulación se puede inducir también por cambios en los factores ambientales (Smith, 1975).

Se supone que la etapa de esporulación se alcanzó primero en medio semisintético que en PDA, pues una  $V_r$  mayor provocó un agotamiento más rápido de los nutrientes. Además en medio semisintético se produjo un micelio con mayores reservas energéticas, por tener mayor disponibilidad de nutrientes durante el crecimiento vegetativo. Por tanto el hongo produjo un mayor número de esporas aunque la densidad de crecimiento fuera menor.

Los resultados mostraron que la utilización de medio semisintético mejoró la velocidad de crecimiento y producción de esporas de *B. bassiana* en cultivo superficial. Se obtuvo un rendimiento promedio de  $3.7 \times 10^5$  esporas/ mg de biomasa. Además fue posible cultivar el hongo a 29 °C sin afectar el crecimiento y la producción de esporas. Por tanto estas condiciones de cultivo se utilizaron en los siguientes experimentos.

## **5.2. - INFLUENCIA DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y FOSFATO EN LA PRODUCCION DE BIOMASA Y ESPORAS**

Los resultados de la sección 5.1 mostraron la influencia de la composición del medio de cultivo en el crecimiento y la esporulación de *B. bassiana*. Además el análisis hecho en la sección 2.2.1 sobre los estudios realizados por diferentes autores (Thomas *et al.*, 1987; Rombach *et al.*, 1988 y Bidochka *et al.*, 1990) evidenció que la variación en la concentración de carbono y la disminución en la de fosfato influyen en la producción de biomasa y esporas

en cultivo sumergido. Por lo tanto se decidió diseñar un experimento factorial  $3^2$  que permitió evaluar tres niveles de las variables independientes: concentración de glucosa y fosfato de potasio. Además analizar su efecto conjunto (interacción) en la producción de biomasa y el rendimiento de esporas.

En la **Tabla 5.2** se muestra el diseño completo con las variables codificadas. Para los cálculos estadísticos se utilizó la metodología descrita en la sección **5.1**.

**Tabla 5.2** Variables codificadas en el diseño del experimento  $3^2$ .

<b>Experimento</b>	<b>X1</b>	<b>X2</b>
<b>1</b>	-1	-1
<b>2</b>	0	-1
<b>3</b>	1	-1
<b>4</b>	-1	0
<b>5</b>	0	0
<b>6</b>	1	0
<b>7</b>	-1	1
<b>8</b>	0	1
<b>9</b>	1	1

Los niveles de concentración para las variables se muestran en la **Tabla 5.3**. Se utilizó como medio basal el semisintético. La concentración de glucosa se varió  $\pm 10$  g/l de la empleada en la formulación inicial. La concentración de fosfato de potasio se varió 0.25 g/l en cada nivel.

**Tabla 5.3** Niveles reales de las variables en el experimento factorial  $3^2$ .

<b>Variable</b>	<b>Niveles</b>		
	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>X1: Glucosa (g/l)</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
<b>X2: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (g/l)</b>	<b>0.25</b>	<b>0.50</b>	<b>0.75</b>

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer, con 20 ml cada uno de medio de cultivo. Se inocularon sobre la superficie del agar y se tomaron muestras por triplicado a los 3, 5, 7,10, 13 y 16 días de cultivo, se realizaron análisis de conteo de esporas y biomasa. La temperatura de incubación fue de 29 °C.

En la **Tabla 5.4** se presentan los resultados obtenidos y los análisis de estadísticos para el índice de esporulación ( $\Omega$ ) (esporas/ g de glucosa inicial), la producción de biomasa (mg) y el rendimiento de esporas por miligramo de biomasa. Los resultados mostrados corresponden a 7 días de incubación. Las concentraciones de glucosa y fosfato de potasio estudiadas (letras iguales en las filas) no influyeron significativamente en el crecimiento y la esporulación de *B. bassiana*. Además la interacción entre estas variables no fue significativa en las respuestas de  $\Omega$ , biomasa y rendimiento de esporas/ mg de biomasa (letras iguales en las columnas). Para los restantes tiempos de incubación los resultados de los análisis estadísticos fueron similares.

**Tabla 5.4** Influencia de las concentraciones de glucosa y fosfato de potasio sobre el crecimiento y la esporulación de *B. bassiana* en cultivo superfivial a los 7 días de incubación.

Variables	-1	0	1
	$\Omega$ (esporas/ g x 10 <sup>9</sup> )		
X1: Glucosa (g/ l)	1.97 ± 0.38 a	0.93 ± 0.28 a	1.35 ± 0.24 a
X2: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/ l)	1.79 ± 0.25 a	0.96 ± 0.22 a	1.50 ± 0.45 a
	Biomasa (mg)		
X1: Glucosa (g/ l)	72.18 ± 11.52 b	80.00 ± 2.15 b	81.25 ± 17.96 b
X2: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/ l)	88.71 ± 5.76 b	73.03 ± 13.51 b	71.68 ± 5.76 b
	Esporas/ mg x 10 <sup>5</sup>		
X1: Glucosa (g/ l)	3.26 ± 0.88 c	2.39 ± 0.75 c	4.81 ± 1.31 c
X2: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/ l)	3.73 ± 0.68 c	3.44 ± 1.51 c	3.29 ± 0.95 c

$\Omega$ : Índice de esporulación (esporas/ g de glucosa inicial)

Letras iguales en filas y columnas indican que no existen diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSION

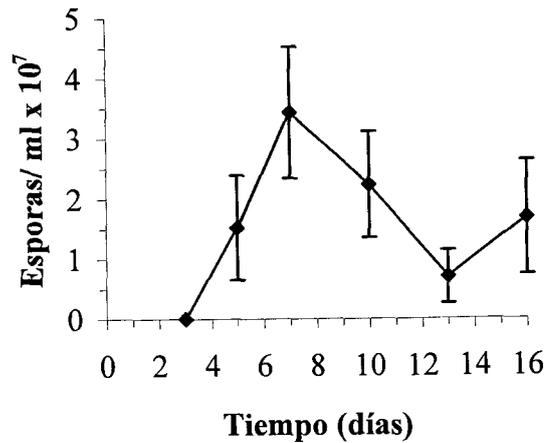
El índice de esporulación promedio obtenido fue de  $1.42 \times 10^9$  esporas/ g de glucosa inicial. Resultado que concuerda con los obtenidos por Thomas *et al.* (1987) y Rombach *et al.* (1988), para la producción de esporas de *B. bassiana* en cultivo sumergido en matraces, que fueron de  $3.6 \times 10^9$  y  $1.09 \times 10^9$  esporas (conidias)/ g, respectivamente. Roussos (1985) reportó un  $\Omega$  de  $6.17 \times 10^9$  esporas/ g en cultivo superficial de *T. harzianum* a las 30 horas de cultivo.

La producción de biomasa promedio (77.8 mg por matraz) fue menor que los máximos reportados por Thomas *et al.* (1987) de 580 mg y Rombach *et al.* (1988) de 380 mg, para cultivo sumergido. Estas diferencias se debieron a que estos autores utilizaron concentraciones más altas de fuente de carbono en el medio y mayores volúmenes de cultivo. Además en cultivo sumergido los hongos filamentosos crecen de forma exponencial, debido a que todos los nutrientes se encuentran en exceso y los inhibidores del crecimiento no se acumulan (Trinci, 1969).

El rendimiento promedio de esporas en base a biomasa fue de  $3.49 \times 10^5$  esporas/ mg, resultado similar al obtenido en cajas de Petri, con medio semisintético a  $29^\circ\text{C}$  (sección 5.1).

A partir de los resultados obtenidos se decidió utilizar las concentraciones de glucosa y fosfato de potasio correspondientes al punto central del diseño, 20 g/ l y 0.5 g/ l respectivamente en la formulación del medio semisintético. Esto permitió mantener rendimientos de esporas estables tanto en los experimentos de cultivo superficial como en la producción de inóculos para los experimentos de FMS.

En la **Figura 5.2** se presenta la cinética de producción de esporas para las condiciones del diseño experimental descrito en la **Tabla 5.2**. Se observa que la esporulación comenzó entre 3 y 5 días. Después continuó aumentando hasta el séptimo día, tiempo en el cual se obtuvo la mayor producción. A partir de este tiempo se produjo una disminución de las esporas en el cultivo provocada por la germinación. Aparentemente la germinación pudo producirse cuando la lisis celular del micelio permitió que ciertas cantidades de nutrientes pasaran de nuevo al medio.



**Figura 5.2** Cinética de producción de esporas de *B. bassiana* en cultivo superficial a 29 °C.

A partir de 13 días comenzó a repetirse el ciclo de esporulación. A los 16 días de incubación se alcanzó un nivel de producción de esporas similar al obtenido a los cinco días de cultivo. No obstante en este nuevo ciclo de esporulación no se alcanzaría la producción obtenida a los 7 días, pues posiblemente la disponibilidad de nutrientes sería menor y por tanto la producción de biomasa y esporas.

Los tiempos empleados para la obtención de esporas de *B. bassiana* en cultivo superficial varían desde 7 días (Bidochka *et al.*, 1990; Griffiths *et al.*, 1992), hasta 10 días (Hegedus y Khachatourians, 1994; Thomas *et al.*, 1987), hasta 14 días (Boucias *et al.*, 1988). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que un tiempo de 7 días de incubación fue suficiente para alcanzar la máxima producción de esporas, coincidiendo con lo planteado por otros autores.

**5.3. - INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CULTIVO EN LA VIABILIDAD E  
HIDROFOBICIDAD DE LAS ESPORAS OBTENIDAS EN CULTIVO  
SUPERFICIAL**

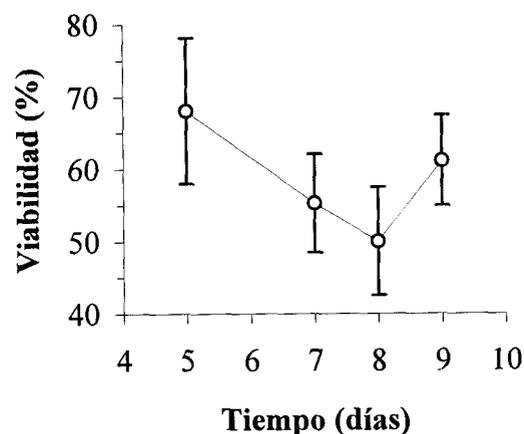
**5.3.1. - VIABILIDAD**

La determinación de la proporción de esporas que pueden germinar del total de esporas producidas (viabilidad) es un aspecto importante para determinar si las condiciones de cultivo empleadas no influyen en la efectividad de las esporas producidas. Para determinar el comportamiento de la viabilidad se realizaron experimentos a diferentes tiempos de cultivo. Los cultivos se mantuvieron a 29 °C durante 5, 7, 8 y 9 días. Se utilizaron 20 ml de medio semisintético por matraz y se inocularon de forma superficial. Al término de los tiempos de cultivo se recuperaron las esporas y se determinó su viabilidad como se describió en la sección 4.4.2.

En la **Figura 5.3** se muestra el comportamiento de la viabilidad de las esporas para diferentes tiempos de cultivo. Los resultados corresponden a determinaciones de tres cultivos para cada tiempo. Se observó que la viabilidad disminuyó desde 68 % para 5 días de cultivo hasta 55 % para 7 días de cultivo. Para 8 días de cultivo descendió hasta 50 %, aumentando posteriormente hasta 61 % a los 9 días.

**5.3.2. - HIDROFOBICIDAD**

La hidrofobicidad es una característica importante para determinar si las esporas de *B. bassiana* producidas poseen el potencial requerido para ser utilizadas como bioinsecticidas. La unión de las esporas a la cutícula de los insectos ocurre primero debido a interacciones hidrófobas. Además las capas hidrófobas exteriores de las esporas las protegen contra condiciones adversas en el ambiente (Boucias *et al.*, 1988).

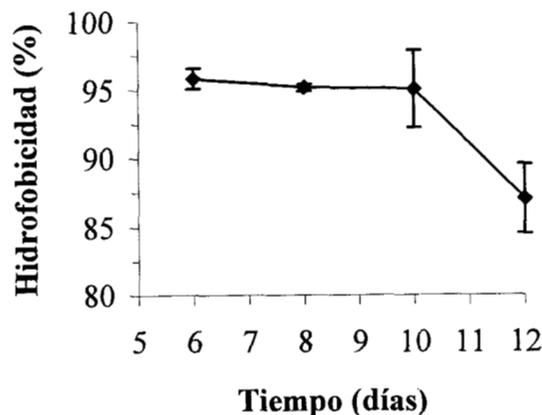


**Figura 5.3** Comportamiento de la viabilidad de las esporas de *B. bassiana* obtenidas en cultivo superficial a 29 °C.

Con el objetivo de establecer los niveles de hidrofobicidad que se alcanzaban para diferentes tiempos de cultivo se realizaron experimentos similares a los descritos en párrafos anteriores. Se tomaron muestras por triplicado de las esporas producidas a los 6, 8 10 y 12 días de cultivo y se determinó su hidrofobicidad como se describió en la sección 4.4.3.

En la **Figura 5.4** se muestra el comportamiento de la hidrofobicidad con el tiempo de cultivo. Los resultados mostraron que entre 6 y 10 días de cultivo la hidrofobicidad de las esporas se mantuvo por encima de 95 %.. Estos valores coinciden con los obtenidos por Boucias *et al.* (1988), que se mantuvieron entre 96 y 100 %, para preparaciones de conidias de *B. bassiana*.

La hidrofobicidad disminuyó entre 10 y 12 días de cultivo hasta 87 %. Hegedus *et al.* (1992) encontraron valores de hidrofobicidad inferiores, entre 86 y 89 % para 10 días de cultivo. Esta disminución fue debida probablemente a una menor disponibilidad de carbohidratos asimilables en el medio de cultivo para estos tiempos de incubación. Esto podría provocar que durante la formación de la pared de las esporas no se incorporen las cantidades suficientes de carbohidratos, y por tanto no se mantengan los niveles de hidrofobicidad. No obstante a pesar de la disminución en la hidrofobicidad los niveles de esta siguieron siendo superiores a 85 %.



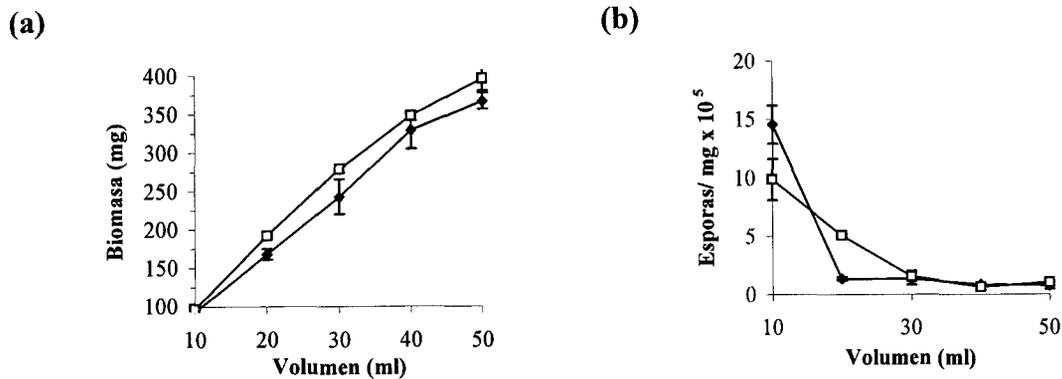
**Figura 5.4** Comportamiento de la hidrofobicidad de las esporas de *B. bassiana* obtenidas en cultivo superficial a 29 °C.

#### **5.4. - INFLUENCIA DE LA FORMA DE INOCULACION Y EL VOLUMEN DE MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCION DE BIOMASA Y ESPORAS**

Con el objetivo de encontrar las mejores condiciones para el desarrollo de los inóculos se estudiaron dos factores importantes para el cultivo en matraces Erlenmeyer. Se evaluaron dos formas de inoculación: masiva y superficial. Además se probaron diferentes volúmenes de medio: 10, 20, 30, 40 y 50 ml. Los cultivos se desarrollaron en medio semisintético (ver sección 4.2.1 de materiales y métodos), durante 7 días a 29 °C por triplicado.

Las formas de inoculación superficial y masiva fueron comparadas por Roussos (1986) para el desarrollo de inóculos de *T. harzianum*. Con la inoculación masiva obtuvo mejores resultados de rendimiento de esporas. Además en el presente trabajo se estudió el efecto del volumen de medio de cultivo para aumentar la producción de biomasa y el número total de esporas producidas por matraz.

En la **Figura 5.5** se muestra el comportamiento de la producción de biomasa y el rendimiento de esporas, en base a la biomasa producida, en función de los diferentes volúmenes de medio de cultivo utilizados.



**Figura 5.5** Comportamiento de la producción de biomasa **(a)** y el rendimiento de esporas **(b)** en función del volumen de medio de cultivo utilizado. Para dos formas de inoculación: masiva (◆) y superficial (□).

La producción de biomasa mostró el comportamiento esperado al aumentar de forma proporcional con el volumen de medio de cultivo utilizado, para las dos formas de inoculación. Con la inoculación superficial se obtuvo una producción ligeramente superior a la obtenida con la forma masiva, para todos los volúmenes de medio de cultivo estudiados. Sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas entre los valores ( $p < 0.05$ ). Para 30 ml de medio de cultivo se obtuvo una producción promedio de 261 mg/ matraz, inferior a la obtenida por Rombach, *et al.* (1988) de 380 mg/ matraz, para cultivo sumergido con el mismo volumen de medio.

El rendimiento de esporas en base a biomasa producida fue significativamente superior ( $p < 0.05$ ) con 10 ml de volumen de medio. A partir de 20 ml se mantuvo prácticamente constante para las dos formas de inoculación y sin diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). El promedio de rendimiento para los volúmenes de 20, 30, 40 y 50 ml, para las dos formas de inoculación, fue

de  $1.57 \times 10^5$  esporas/ mg. Este valor se corresponde con los obtenidos en los experimentos en cajas de Petri (ver sección 5.1).

**222266**

A pesar de que para 10 ml de volumen se obtuvieron los mejores rendimientos de esporas, se seleccionó el volumen de 20 ml y la forma de inoculación masiva para desarrollar los inóculos en matraces en los ensayos siguientes. Esta decisión se fundamentó en las siguientes razones prácticas:

- El crecimiento del hongo sobre la superficie del agar siempre fue más homogéneo cuando se utilizó la inoculación masiva. Esto se debe a que las esporas se distribuyen en toda la masa de agar, germinando en el interior de esta. Cuando el micelio emerge ya posee hifas desarrolladas que invaden rápidamente la superficie a partir de muchos puntos.
- Cuando se inocula de forma superficial se corre el riesgo que el volumen de suspensión de esporas no cubra toda la superficie del agar. Esto provoca que el crecimiento comience en forma de manchas , que en algunas ocasiones no llegan cubrir totalmente la superficie. Lo cual disminuye los rendimientos y facilita la aparición de contaminaciones. Sobre todo en hongos de crecimiento lento como *B. bassiana*.
- Por otra parte, la agitación con barra magnética y la adición de la solución de Tween 80, durante la extracción de esporas, provocó el desprendimiento del disco de agar en los cultivos con 10 ml de medio. Esto dificultó el proceso de extracción debido a que la barra quedó por debajo del agar. Entonces fue necesario suspender la agitación varias veces, en cada extracción, para corregir este problema. Esto retrasó el proceso y provocó errores en las extracciones realizadas.

### 5.5. - ESTUDIO DE LA EXTRACCION DE ESPORAS OBTENIDAS EN CULTIVO SUPERFICIAL

La extracción eficiente de esporas es un paso importante en el desarrollo de inóculos para los estudios de FMS. Comúnmente se utiliza una solución de Tween 80 en agua destilada para formar una suspensión homogénea de esporas. La extracción se facilita mediante una barra magnética que se hace girar sobre la superficie del cultivo. Soccol (1992) encontró que con la adición de 45 g de perlas de vidrio para la extracción de esporas de *R. oryzae* obtenía  $4.74 \times 10^7$  esporas/ ml. Además utilizó un homogenizador de tejidos (Ultra-Turrax) pero obtuvo una extracción de esporas inferior,  $3.73 \times 10^7$  esporas/ ml.

Con el objetivo de encontrar las mejores condiciones para la extracción de las esporas de *B. bassiana* producidas en matraces Erlenmeyer se diseñaron dos experimentos factoriales  $2^2$  para probar el efecto de dos variables a dos niveles. En el primero se evaluó el efecto de la variación en el volumen y la concentración de la solución de Tween 80. En el segundo se estudió el efecto de la adición de perlas de vidrio en la extracción y agitación con barra magnética durante 10 y 20 min.

En la **Tabla 5.5** se muestra el diseño completo de los experimentos  $2^2$  con las variables codificadas. Para los cálculos estadísticos se utilizó la metodología descrita en la sección 4.1. Los cultivos se realizaron por triplicado con 20 ml de medio semisintético, a temperatura de 29 °C durante 7 días.

**Tabla 5.5** Diseño de los experimentos factoriales  $2^2$  con las variables codificadas.

Experimento No	X1	X2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1

En la **Tabla 5.6** se muestran los volúmenes y concentraciones de la solución de Tween 80 evaluados en el primer experimento. Se hicieron dos extracciones sucesivas a cada cultivo, utilizando iguales volúmenes de solución de Tween 80 para ambas. En las dos extracciones se empleó solamente barra magnética, con un tiempo de agitación de 10 min.

**Tabla 5.6** Niveles reales de las variables en el experimento 2<sup>2</sup>.

Variable	Niveles	
	-1	1
<b>X1: Volumen *(ml)</b>	30	40
<b>X2: Concentración** (%)</b>	0.01	0.06

\*: Volumen de la solución de Tween 80 utilizado en la extracción.

\*\* : Concentración de la solución de Tween 80 utilizada en la extracción.

En la **Tabla 5.7** se presentan los resultados obtenidos y los análisis estadísticos de los mismos. Las concentraciones de esporas en las suspensiones no mostraron aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) con el aumento del volumen y la concentración de la solución de Tween 80 (letras iguales en las filas). La interacción entre las variables tampoco fue significativa (letras iguales en las columnas). En las dos extracciones realizadas se observó el mismo comportamiento.

**Tabla 5.7** Comportamiento de la extracción de esporas de *B. bassiana* al aumentar el volumen y la concentración de la solución de Tween 80.

Variables	-1		1	
<b>Primera extracción (Esporas/ ml x 10<sup>7</sup>)</b>				
<b>X1: Volumen (ml)</b>	2.39 ± 0.67	a	3.05 ± 0.53	a
<b>X2: Concentración (%)</b>	2.70 ± 0.47.	a	2.74 ± 0.77	a

Letras iguales en las filas y columnas indican que no existen diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 5.7** Resultados de la extracción de esporas de *B. bassiana* al aumentar el volumen y la concentración de la solución de Tween 80 (continuación).

<b>Variables</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>
<b>Segunda extracción (Esporas/ ml x 10<sup>6</sup>)</b>		
<b>X1: Volumen (ml)</b>	9.93 ± 3.14    a	8.06 ± 3.11    a
<b>X2: Concentración (%)</b>	8.27 ± 3.05    a	9.72 ± 3.24    a

Letras iguales en las filas y columnas indican que no existen diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ).

En la **Tabla 5.8** se muestra el análisis comparativo de las extracciones realizadas en el primer diseño experimental. En el primer paso de extracción se obtuvo un promedio de  $2.72 \times 10^7$  esporas/ ml, 76.42 % del total extraído. En el segundo paso se obtuvo solo  $9.0 \times 10^6$  esporas/ ml, ósea 23.58 % del total extraído. Estos resultados mostraron que un solo paso de extracción fue suficiente para obtener el 76.2 % de esporas del cultivo.

**Tabla 5.8** Resultados obtenidos en dos extracciones sucesivas con las condiciones del diseño experimental de la **Tabla 5.6**.

<b>Experimento No.</b>	<b>Primera extracción (1)*</b>	<b>Segunda extracción (2)*</b>	<b>Total extraído (3)**</b>	<b>Extracción en (1) (%)</b>	<b>Extracción en (2) (%)</b>
1	2.15	0.47	2.62	82.06	17.94
2	3.25	1.18	4.43	73.36	26.64
3	2.63	1.52	4.15	63.37	36.63
4	2.85	0.43	3.28	86.89	13.11

\*: esporas/ ml x 10<sup>7</sup>.

\*\* : (3)= (1)+ (2)

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el segundo diseño experimental se utilizó un volumen de 30 ml y una concentración de 0.01 % de la solución de Tween 80 para todas las extracciones. Los resultados obtenidos mostraron que la adición de 1.7 g de perlas de vidrio (corresponden a 10 perlas), no aumentó significativamente la cantidad de esporas extraídas ( $p < 0.05$ ). Mismo comportamiento observado al aumentar el tiempo de extracción a 20 min.

En pruebas realizadas adicionando 3.4 g de perlas (20 perlas) y tiempo de agitación de 20 min no se obtuvieron aumentos significativos en las concentraciones de esporas extraídas. Además se produjo un fuerte desprendimiento del micelio debido a la fricción de las perlas sobre el cultivo. Este efecto fue indeseable pues el micelio extraído dificultó el conteo de esporas. Además esto alteraría la composición del inóculo, que debe contener solo esporas para garantizar las condiciones de los inóculos de FMS.

Los resultados mostraron que la aplicación de condiciones de extracción más drásticas no incrementaron los niveles de extracción de esporas. El aumento del volumen y la concentración de la solución de Tween 80, así como la adición de perlas de vidrio y el aumento del tiempo de extracción no incrementaron los niveles de esporas extraídas. Fue suficiente una sola extracción para obtener la mayor cantidad de esporas en la suspensión.

Las condiciones de extracción que se utilizaron en los experimentos iniciales se emplearon en las extracciones para la producción de inóculos en ensayos posteriores. Estas condiciones fueron:

- solución de Tween 80: volumen 30 ml, concentración 0.01 %
- elemento de extracción: barra magnética
- tiempo de agitación: 10 min.

## **5.6. - CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos del estudio sobre el crecimiento superficial de *B. bassiana* permitieron arribar a las conclusiones siguientes:

1. - La cepa de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin CDBB H- 987 es capaz de crecer a una temperatura de 29 °C. Temperaturas superiores a 30 °C inhiben completamente la germinación de las esporas.
2. - El medio semisintético mejoró el crecimiento y la esporulación del hongo con respecto a la utilización del medio PDA.
3. - Las concentraciones de glucosa y fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) para la formulación del medio semisintético utilizado en la producción de inóculos se mantuvieron en 20 g/ l y 0.5 g/ l respectivamente.
4. - El tiempo de cultivo para la obtención de un mayor número de esporas fue de 7 días.
5. - La viabilidad de las esporas se reduce un 16 % entre 3 y 5 días de cultivo pero no la hidrofobicidad que se mantiene por encima de 95 % hasta los 10 días.
6. - La forma de inoculación masiva permitió obtener crecimientos homogéneos de los cultivos.
7. - Un volumen de 20 ml de medio de cultivo por matraz Erlenmeyer facilitó la extracción de las esporas.
8. - Las condiciones para la extracción de las esporas fueron: volumen y concentración de la solución de Tween 80, 30 ml y 0.01 % respectivamente; elemento de extracción, barra magnética; tiempo de agitación, 10 min.

**FERMENTACION EN MEDIO SOLIDO**

## **6. - PRODUCCION DE ESPORAS DE *B. bassiana* POR FMS**

La FMS puede definirse como el cultivo de microorganismos sobre sustratos sólidos húmedos y está caracterizada por la ausencia de agua libre (Roussos, 1985). La FMS se ha utilizado para la producción en masa de esporas con fines diversos: transformación de compuestos orgánicos como esteroides, antibióticos, ácidos grasos y carbohidratos. Obtención de olores y sabores en alimentos (Mudgett, 1986) y biopesticidas (Auld, 1991). Entre las ventajas que tiene la FMS para la producción de esporas están: facilidad de operación, altos rendimientos y homogeneidad de las preparaciones de esporas (Vezina y Singh, 1975).

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en los estudios para la producción de esporas de *B. bassiana* por FMS. Para los experimentos se empleó la técnica de FMS descrita primero por Raimbault (1980) y desarrollada por varios autores en trabajos posteriores (Roussos, 1985; Saucedo, 1991; Soccol, 1992). La técnica se basó en utilizar bagazo de caña previamente tamizado y lavado como soporte inerte. El bagazo se mezcló con una suspensión homogénea de esporas de *B. bassiana* como inóculo y medio líquido para cultivos experimentales (ver sección 4.2.2).

Los objetivos de este trabajo se orientaron hacia el estudio de los componentes del medio de cultivo que influyen sobre la producción de esporas de *B. bassiana*. Se evaluó la influencia de las concentraciones de carbono, fosfato y nitrógeno. Se utilizó el medio basal descrito en la sección 4.2.2. Se estudió también la influencia de la densidad de empaque aparente del medio sólido ( $\epsilon$ ) en la producción de esporas.

El sistema de FMS utilizado en los experimentos consistió de reactores pequeños, columnas de vidrio, inmersos en un baño de agua con temperatura controlada. Cada columna contenía un lecho empacado de 10 g de medio sólido húmedo, por el que se hizo pasar un flujo de aire saturado.

Las condiciones iniciales de la FMS se mantuvieron constantes para todos los experimentos, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

**Tamaño de partícula:** 0.59 - 0.8 mm. Este intervalo de longitud de las fibras del bagazo facilitó el mezclado con la suspensión de esporas y el medio líquido. Además permitió mantener homogéneos en todo el lecho de sólidos la porosidad ( $\epsilon$ ) y la distribución de humedad (Mudgett, 1986). Partículas más pequeñas aumentan la  $\epsilon$  y dificultan el paso de aire a través del lecho de sólidos (Johns, 1992).

**Nivel de inóculo:**  $10^7$  esporas/ g de soporte húmedo inicial. Niveles inferiores facilitan el desarrollo de contaminantes y disminuyen los rendimientos (Soccol, 1992). Para niveles por encima de  $10^8$  esporas/ g se producen fenómenos de inhibición en la germinación de las esporas (Barrios *et al.*, 1989).

**Humedad inicial:** 75 (%). Roussos (1985), encontró que una humedad de 74 % era óptima para el crecimiento de *T. harzianum* en medio sólido. En experimentos preliminares se demostró que humedades entre 55 y 65 % retardaron la germinación de las esporas. Niveles por encima de 80 % limitaron el crecimiento y la esporulación debido a la limitación de la transferencia de oxígeno.

**Suministro de aire:** 0.75 vkgm (litro de aire/ kilogramo de medio húmedo por minuto). En pruebas preliminares (resultados no reportados) se encontró que el aumento de flujo de aire no produjo un incremento en la producción de esporas de *B. bassiana*. Este resultado determinó seleccionar el flujo más bajo para evitar problemas de secado del lecho y reducir los contaminantes.

**Temperatura:** 29 °C. Determinada en los experimentos del capítulo 5 como óptima para el crecimiento de la cepa de *B. bassiana* utilizada.

**pH:** 5.0 - 6.0. Este es el intervalo óptimo para los cultivos de *B. bassiana* (Hegedus *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1987).

### **6.1. - EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA Y FOSFATO Y LA DENSIDAD DE EMPAQUE EN LA PRODUCCION DE ESPORAS**

Para analizar el efecto de estas variables sobre la producción de esporas de *B. bassiana* se utilizó un diseño factorial central compuesto (DCC)  $2^3$  en este diseño se analizó la influencia de tres variables con dos niveles cada una. Este tipo de diseño permite analizar los resultados mediante la metodología de superficies de respuesta (MSR). La MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influida por varias variables, y el objetivo es optimizar esta respuesta (Montgomery, 1991).

Para el desarrollo del DCC  $2^3$ , los ajustes de los modelos de regresión y la determinación de las superficies de respuesta y líneas de niveles constantes (también llamadas curvas de nivel) se realizaron utilizando el paquete de programas estadísticos STATGRAPHICS<sup>MR</sup> de Statistical Graphics Corporation.

En la **Tabla 6.1** se presenta la matriz completa del DCC  $2^3$  con las variables codificadas. El diseño constó de 3 partes según Myers *et al.* (1989): (i)  $2^3$  vértices de un cubo, (ii)  $2*3$  vértices de una porción axial (llamada “estrella”) con el parámetro  $\alpha= 1.68$  que define la distancia de los puntos colocados en la estrella al origen de coordenadas de la región de experimentación, y (iii) 6 repeticiones en el punto central. Se realizaron 20 experimentos divididos en 3 bloques, los experimentos correspondientes a los puntos centrales se distribuyeron en los bloques para distribuir de forma homogénea el error experimental.

**Tabla 6.1** Matriz de diseño del DCC 2<sup>3</sup> con las variables codificadas.

# Experimento	# Bloque	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>
1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	1	1
3	1	1	-1	1
4	1	1	1	-1
5	1	0	0	0
6	1	0	0	0
7	2	-1	-1	1
8	2	-1	1	-1
9	2	1	-1	-1
10	2	1	1	1
11	2	0	0	0
12	2	0	0	0
13	3	1.68	0	0
14	3	-1.68	0	0
15	3	0	1.68	0
16	3	0	-1.68	0
17	3	0	0	1.68
18	3	0	0	-1.68
19	3	0	0	0
20	3	0	0	0

En la **Tabla 6.2** se muestran los niveles de concentraciones iniciales de glucosa y fosfato de potasio, así como  $\epsilon$  inicial utilizada en el DCC 2<sup>3</sup>.

**Tabla 6.2** Niveles iniciales de las variables en el DCC 2<sup>3</sup>.

Variable	Niveles				
	-1.68	-1	0	1	1.68
x <sub>1</sub> : Glucosa (g/ l)	17.3	32.5	55.0	77.5	93.0
x <sub>2</sub> : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/ l)	0.18	0.29	0.43	0.58	0.68
x <sub>3</sub> : $\epsilon$ (g/ ml)	0.17	0.20	0.25	0.30	0.33

$\epsilon$ : Densidad de empaque aparente del medio sólido

El nivel central de glucosa se fijó en 55 g/ l, que corresponden a 22 g/ l de carbono en el medio de cultivo al inicio de la fermentación. Esta concentración de glucosa es 2.75 veces superior a la utilizada en los cultivos superficiales (20g/ l). En el punto axial máximo (1.68) se alcanza una concentración de 93 g/ l, considerablemente elevada si se tiene en cuenta que las empleadas en cultivo sumergido no rebasan 30 g/ l (Hegedus *et al.*, 1990; Mendonça, 1991; Thomas *et al.*, 1987). La hipótesis planteada fue que estos niveles de concentración debían aumentar la producción de esporas de *B. bassiana*.

El aumento en la concentración de glucosa se basó en que los microorganismos resisten concentraciones altas de nutrientes cuando crecen en medios sólidos. Esta característica se debe a que la difusión de los solutos en las partículas del sólido trae como consecuencia que los microorganismos no estén en presencia del máximo de concentración de los nutrientes (Prior *et al.*, 1992).

Los niveles de fosfato de potasio se definieron teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Hegedus *et al.* (1991). Estos resultados mostraron que concentraciones de fosfato de potasio inferiores a 0.25 g/ l incrementaron la producción de conidias de *B. bassiana* en cultivo sumergido. Además el nivel central se estableció a 0.43 g/ l para que en el punto axial superior (1.68) la concentración no rebasara el valor de 1 g/ l y evitar posibles inhibiciones en la esporulación de *B. bassiana*.

Los resultados obtenidos por Barrios *et al.* (1993) mostraron que la esporulación de *P. chrysogenum* disminuyó significativamente cuando se aumentó  $\epsilon$  entre 0.23 y 0.35 g/ ml. El objetivo de probar diferentes niveles de  $\epsilon$  fue estudiar el efecto de esta variable en la producción de esporas de *B. bassiana*.

Debido a que en los cultivos superficiales se observó que la esporulación comenzó entre 3 y 5 días de cultivo y alcanzó un máximo a los 7 días se realizaron análisis de las fermentaciones a los 5 y 7 días, en cultivo en FMS.

El comportamiento de la producción de esporas por gramo de soporte húmedo, para 5 y 7 días de fermentación, fue evaluado utilizando un modelo en forma de polinomio de segundo orden. La forma general del modelo de regresión fue la siguiente (Himmelblau, 1969):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + e \quad (6.1)$$

Donde: Y: variable dependiente

$x_i, x_j$ : variables independientes

$\beta_0$ : coeficiente para el término independiente

$\beta_i$ : coeficientes para los términos lineales

$\beta_{ii}$ : coeficientes para los términos elevados al cuadrado

$\beta_{ij}$ : coeficientes para los términos de las interacciones de primer orden

e: error del modelo

Este modelo tenía 9 términos, para ajustarlo se empleó el método de exclusión de variables, también llamado regresión paso a paso (Montgomery, 1991).

En la **Tabla 6.3** se presentan los resultados del ajuste del modelo de regresión para 5 días de cultivo. Los términos representados fueron incluidos en la regresión final para el ajuste. Como puede observarse los términos significativos para el ajuste del modelo fueron solamente los elevados al cuadrado ( $p < 0.05$ ). Los tres términos correspondientes a las interacciones de primer orden ( $x_1x_2, x_1x_3, x_2x_3$ ) fueron excluidos del ajuste final del modelo

El modelo ajustado para 5 días de fermentación tenía la forma siguiente:

$$\text{esporas/ g} = 2.94 \times 10^7 (\text{glucosa})^2 + 2.24 \times 10^7 (\text{KH}_2\text{PO}_4)^2 + 2.81 \times 10^7 (\epsilon)^2 \quad (6.2)$$

Donde: esporas/ g: variable dependiente (esporas/ gramo de soporte húmedo)

glucosa: término correspondiente a la concentración inicial de glucosa

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ : término correspondiente a la concentración inicial de fosfato de potasio

$\epsilon$ : término correspondiente a la densidad de empaque inicial

**Tabla 6.3** Resultados obtenidos en el ajuste del modelo de regresión (6.2) a los 5 días de fermentación.

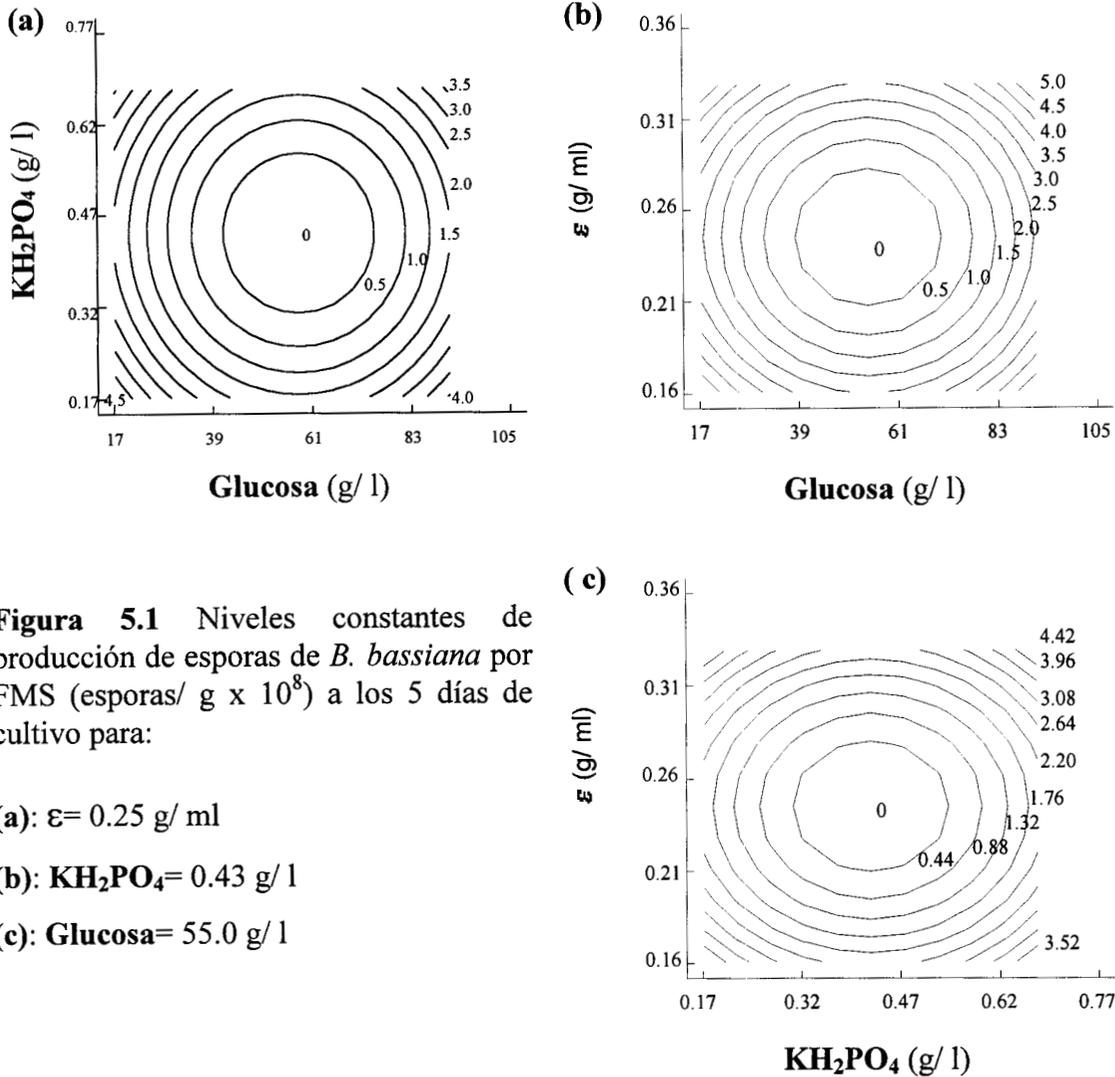
<b>Término</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Probabilidad <sup>a</sup></b>
$x_1$	$-9.89 \times 10^6$	$7.86 \times 10^6$	0.2167
$x_2$	$-4.47 \times 10^6$	$7.86 \times 10^6$	0.5732
$x_3$	$4.78 \times 10^6$	$7.86 \times 10^6$	0.5472
$x_1^2$	$2.94 \times 10^7$	$6.49 \times 10^6$	0.0001 **
$x_2^2$	$2.24 \times 10^7$	$6.49 \times 10^6$	0.0015 **
$x_3^2$	$2.81 \times 10^7$	$6.49 \times 10^6$	0.0001 **

a: Mínimo valor de probabilidad para rechazar la hipótesis nula (Montgomery, 1991).

\*\* : Parámetros significativos en el modelo de regresión ajustado ( $p < 0.05$ ).

En la **Figura 6.1** se muestran las curvas de niveles constantes de producción de esporas, a los 5 días fermentación, para el modelo ajustado (6.2). Los gráficos representados corresponden a la proyección en el plano correspondiente a dos de las variables cuando la tercera toma el valor central en el DCC 2<sup>3</sup>.

La tendencia de la producción de esporas fue similar en los tres casos. Se encontró un mínimo central y un ascenso cuando aumentaban o disminuían los niveles de las variables, aumentando en la dirección de la periferia de la región de experimentación. El nivel más alto de rendimiento en la periferia de la región de experimentación se alcanzó para la concentración de fosfato correspondiente al punto central y fue de  $5.0 \times 10^8$  esporas/ gramo de soporte húmedo (**Figura 6.1- b**), mientras que para los niveles centrales de  $\epsilon$  y glucosa se alcanzaron niveles inferiores,  $3.5 \times 10^8$  y  $4.42 \times 10^7$  esporas/ g de soporte húmedo (**Figuras 6.1 - a y c**) respectivamente.



**Figura 5.1** Niveles constantes de producción de esporas de *B. bassiana* por FMS (esporas/ g x 10<sup>8</sup>) a los 5 días de cultivo para:

- (a):  $\epsilon = 0.25$  g/ml
- (b):  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.43$  g/l
- (c): Glucosa = 55.0 g/l

En la **Tabla 6.4** se muestran los resultados del ajuste del modelo de regresión para 7 días de fermentación. En este caso el término significativo fue el correspondiente a la concentración inicial de glucosa elevada al cuadrado. También se incluyó en el modelo el término de fosfato elevado al cuadrado por considerar importante el análisis de su efecto en la producción de esporas de *B. bassiana*. El valor mínimo de probabilidad estaba en la zona de aceptación de la hipótesis nula, pero muy cercano al valor de probabilidad de rechazo ( $p = 0.05$ ). los términos correspondientes a las interacciones de primer orden tampoco fueron incluidas en el ajuste final del modelo.

El modelo ajustado para 7 días de fermentación tenía la forma siguiente:

$$\text{esporas/ g} = 7.25 \times 10^7 (\text{glucosa})^2 + 2.29 \times 10^7 (\text{KH}_2\text{PO}_4)^2 \quad (6.3)$$

**Tabla 6.4** Resultados obtenidos en el ajuste del modelo de regresión (6.3) para 7 días de cultivo.

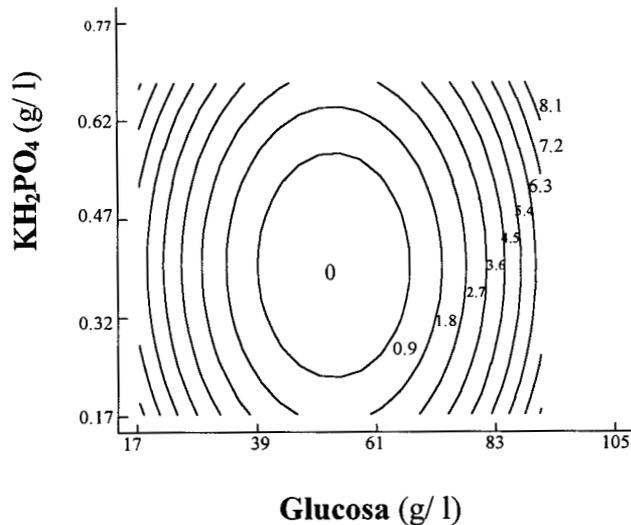
<b>Término</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Probabilidad <sup>a</sup></b>
<b>X<sub>1</sub></b>	7.47 x 10 <sup>6</sup>	1.45 x 10 <sup>7</sup>	0.6101
<b>X<sub>2</sub></b>	7.84 x 10 <sup>6</sup>	1.45 x 10 <sup>7</sup>	0.5925
<b>X<sub>3</sub></b>	-2.71 x 10 <sup>6</sup>	1.45 x 10 <sup>7</sup>	0.8528
<b>X<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	7.25 x 10 <sup>7</sup>	1.20 x 10 <sup>7</sup>	0.0001 **
<b>X<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	2.29 x 10 <sup>7</sup>	1.20 x 10 <sup>7</sup>	0.0645 *
<b>X<sub>3</sub><sup>2</sup></b>	1.67 x 10 <sup>7</sup>	1.20 x 10 <sup>7</sup>	0.1706

a: Mínimo valor de probabilidad para rechazar la hipótesis nula.

\*\* : Parámetro significativo en el modelo de regresión ajustado (p < 0.05).

\* : Parámetro no significativo incluido en el modelo de regresión (p < 0.05).

En la **Figura 6.2** se presentan los niveles constantes de producción de esporas a los 7 días de fermentación, para el modelo ajustado (6.3). El comportamiento obtenido fue similar al de 5 días. Se observó una tendencia de aumento en los niveles constantes más marcada con la variación de la concentración de glucosa que con la de fosfato de potasio. Además el nivel máximo alcanzado fue 1.6 veces superior al valor más alto alcanzado para 5 días.



**Figura 6.2** Niveles constantes de producción de esporas (esporas/ g x 10<sup>8</sup>) a los 7 días de cultivo para las concentraciones iniciales de glucosa y fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Con el objetivo de comparar los efectos relativos de cada variable considerada en los modelos en la producción de esporas a 5 y 7 días se utilizó la ecuación de los gradientes normalizados de la respuesta mediante la ecuación siguiente (Himmelblau, 1969):

$$\frac{\nabla \hat{Y}}{\|\nabla \hat{Y}\|} = \frac{\sum \left( \frac{\partial \hat{Y}_i}{\partial x_i} \right) \delta_i}{\left[ \sum \left( \frac{\partial \hat{Y}_i}{\partial x_i} \right)^2 \right]^{1/2}} \quad (\text{Ec. 6.4})$$

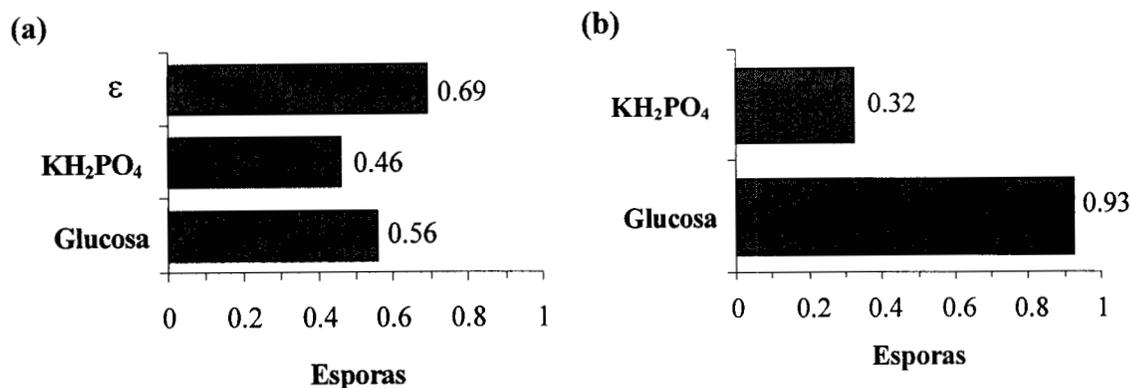
Donde:  $\nabla Y$ : gradiente del modelo

$\|\nabla Y\|$ : gradiente normalizado del modelo

$\partial Y_i / \partial x_i$ : derivada parcial del modelo con respecto a cada variable

Esta ecuación representa un vector unitario constante que no depende de x. Los componentes indican los efectos relativos de las variables independientes sobre la respuesta (Himmelblau, 1969).

En la **Figura 6.3** se presentan los efectos relativos de las variables incluidas en los modelos ajustados sobre la producción de esporas, a los 5 y 7 días de fermentación. En los dos tiempos los efectos de las variables fueron positivos sobre la producción de esporas



**Figura 6.3** Efectos relativos de las variables sobre la producción de esporas para 5 días (a) y 7 días (b) de fermentación; para los parámetros significativos del modelo de regresión ajustado.

A los 5 días de fermentación se encontraron efectos similares de las variables, aunque es necesario señalar que  $\epsilon$  tuvo una influencia ligeramente superior sobre la producción de esporas. A los 7 días de cultivo el efecto relativo del aumento de la concentración inicial de glucosa fue muy marcado. El efecto del aumento en la concentración inicial de fosfato no fue relevante en comparación con el de la glucosa.

La variable  $\epsilon$  no fue incluida en el análisis pues no influyó significativamente en la producción de esporas para 7 días de fermentación. Como se vio en los resultados del ajuste del modelo de regresión. La influencia de  $\epsilon$  sobre la esporulación desapareció a medida que transcurrió la fermentación. Esto fue provocado posiblemente por las características del crecimiento del hongo y las características físicas del sistema de FMS. El crecimiento miceliar del hongo provocó que fuera ocupando gradualmente los espacios vacíos entre las partículas del sólido, hasta que se estableció una  $\epsilon$  única en el lecho de sólidos de 0.15 g/ ml, reportada por

Laukevics *et al.* (1985) para el crecimiento de hongos en FMS. Este valor se alcanzó después de 5 días de cultivo independientemente de  $\epsilon$  inicial.

Los resultados obtenidos mostraron que en la región de experimentación analizada no se obtuvo un máximo en la producción de esporas de *B. bassiana*. No obstante se lograron establecer criterios para continuar los estudios de FMS; estos fueron:

La producción de esporas fue superior a los 7 días de cultivo. Resultado que coincidió con el obtenido en cultivo superficial. Por lo que se estableció este tiempo de fermentación para los estudios siguientes en FMS.

- La concentración de fosfato de potasio no afectó la producción de esporas en el intervalo estudiado. Su influencia fue poco relevante alrededor del punto central del diseño. Debido a esto se determinó utilizar la concentración correspondiente al punto central del DCC 2<sup>3</sup> (0.43 g/l) en la preparación del medio basal en los estudios posteriores.
- Se determinó utilizar una densidad de empaque aparente de 0.25 g/ml, correspondiente al punto central del DCC 2<sup>3</sup> pues esta variable no tuvo ninguna influencia en la producción de esporas al término de la fermentación.
- El aumento en la concentración de glucosa podría tener un efecto significativo sobre la producción de esporas de *B. bassiana* por FMS, por lo que se decidió continuar estudiando la influencia de esta variable.

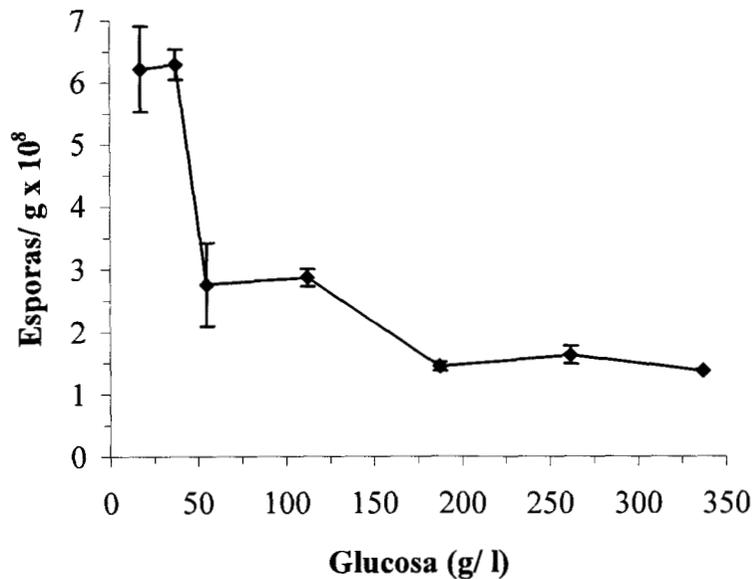
## **6.2. - EFECTO DEL AUMENTO DE LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA EN LA PRODUCCION DE ESPORAS DE *B. bassiana***

Con el objetivo de determinar hasta que nivel se podía aumentar la concentración inicial de glucosa en el medio, sin afectar la esporulación del hongo, se probaron concentraciones de 17, 38, 55, 112, 188, 262, 337 g/ l en el medio de cultivo. Las restantes condiciones para la FMS fueron similares a las descritas en la sección 6.1. Además se emplearon los niveles de fosfato y densidad de empaque aparente establecidos en dicha sección. Como medio basal se utilizó el descrito en la sección 4.2.2. El tiempo de fermentación fue de 7 días.

En la **Figura 6.4** se muestra el comportamiento de la producción de esporas obtenido cuando se aumentó la concentración de glucosa. Los resultados mostraron una disminución escalonada de la esporulación con el incremento de la concentración inicial de glucosa. Los valores más altos de producción de esporas ( $6.3 \times 10^8$  esporas/ g) se alcanzaron para concentraciones de glucosa inferiores a 50 g/ l. Para concentraciones entre 50 y 120 g/ l la producción fue de  $2.8 \times 10^8$  esporas/ g. Mientras que para concentraciones de glucosa por encima de 180 g/ l la producción de esporas descendió un 50 % con respecto a la obtenida para concentraciones entre 50 y 120 g/ l.

El aumento de la concentración inicial de glucosa posiblemente provocó un aumento de la presión osmótica en el medio de cultivo. Frente a estas condiciones los hongos sintetizan solutos compatibles, por ejemplo glicerol, eritrol, arabinol o manitol, para aumentar la presión osmótica intracelular y contrarrestar el efecto adverso de la alta presión osmótica en el exterior de las células (Gutiérrez- Rojas *et al.*, 1995).

Se ha encontrado producción y acumulación de eritrol ,durante todo el tiempo de fermentación, en la producción de ácido cítrico por FMS con *A. niger* en presencia de 300 y 400 g/ l de glucosa en el medio (Gutiérrez- Rojas *et al.*, 1995). Utilizando el mismo sistema Córdova (1994) encontró una disminución del 50 % en la producción de esporas entre 300 y 400 g/ l de glucosa.



**Figura 6.4** Comportamiento de la producción de esporas de *B. bassiana* con el aumento de la concentración inicial de glucosa en el medio de cultivo.

Bidochka *et al.* (1990) encontraron presencia de carbohidratos en el micelio de *B. bassiana* cuando se utilizó un medio de cultivo con gelatina y glucosa. Los carbohidratos sintetizados por *B. bassiana* fueron: glucógeno y los polioles manitol, eritrol, glicerol y arabitol. Estos resultados mostraron que este hongo es capaz de producir compuestos de reserva, que sirven también como osmorreguladores. La producción de compuestos osmorreguladores durante la fase de esporulación pudo reprimir la producción de esporas en el caso de estudio debido a la competencia que se estableció entre ambos procesos por el sustrato, como se ha sugerido anteriormente (Johns, 1992).

Los resultados obtenidos indican que concentraciones de glucosa en el medio de cultivo superiores a 100 g/l provocaron una fuerte inhibición en la formación de esporas de *B. bassiana*. Roussos (1985) encontró resultados similares para la esporulación de *T. harzianum* utilizando 100 g/l de harina de yuca en el medio de cultivo. En el caso del sistema estudiado en este trabajo se alcanzaron los máximos de producción de esporas de *B. bassiana* para concentraciones de glucosa por debajo de 50 g/l.

### 6.3. - EFECTO DE LA VARIACION EN LAS CONCENTRACIONES DE CARBONO Y NITROGENO EN LA PRODUCCION DE ESPORAS

En la sección 6.1 se vio que la concentración de glucosa tenía una influencia marcada en la producción de esporas de *B. bassiana* por FMS. Además los resultados obtenidos en la sección 6.2 permitieron concluir que para concentraciones de glucosa por encima de 100 g/ l se producía una fuerte inhibición en la esporulación.

En otros trabajos se ha evaluado el efecto de la concentración de nitrógeno sobre la producción de esporas de *B. bassiana* en cultivo sumergido. Rombach *et al.* (1988) observaron que al aumentar la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo por encima de 0.75 g/ l disminuyó la producción de conidias. Por otra parte Hegedus *et al.* (1990) encontraron resultados variables en la producción de conidias de *B. bassiana*, al utilizar diferentes fuentes de nitrógeno naturales en medios complejos. Estos resultados no aportan un criterio definido sobre la influencia de la concentración de nitrógeno sobre la esporulación de *B. Bassiana*, por lo que el objetivo del estudio siguiente fue establecer que influencia tenían las variaciones en las concentraciones de glucosa y sulfato de amonio sobre la producción de esporas de *B. bassiana* por FMS. Para este fin se desarrolló un DCC 2<sup>2</sup>. El análisis de los resultados se realizó utilizando la MSR y empleando el paquete de programas STATGRAPHICS<sup>MR</sup>, como se describió en la sección 6.1.

Las condiciones iniciales de la FMS fueron iguales a las descritas en la parte inicial de este capítulo. Como medio basal se utilizó el descrito en la sección 4.2.2. El tiempo de fermentación fue de 7 días.

En la **Tabla 6.5** se presenta la matriz del diseño factorial central compuesto (DCC) 2<sup>2</sup> con las variables codificadas. Las partes del diseño, según Myers *et al.* (1989), fueron: (i) 2<sup>2</sup> vértices de un cuadrado, (ii) 2\*2 vértices en la porción axial con  $\alpha= 1.41$ , que define la distancia de los puntos colocados en la estrella al origen de coordenadas y (iii) seis repeticiones en el punto central. Se realizaron 14 experimentos divididos en dos bloques(Montgomery, 1991).

**Tabla 6.5** Matriz de diseño del DCC 2<sup>2</sup> con las variables codificadas.

# Experimento	# Bloque	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>
1	1	-1	-1
2	1	-1	1
3	1	1	-1
4	1	1	1
5	1	0	0
6	1	0	0
7	1	0	0
8	2	1.41	0
9	2	-1.41	0
10	2	0	1.41
11	2	0	-1.41
12	2	0	0
13	2	0	0
14	2	0	0

En la **Tabla 6.6** se muestran los niveles de concentraciones reales de glucosa y sulfato de amonio probados en el DCC 2<sup>2</sup>.

**Tabla 6.6** Niveles iniciales de las variables en el DCC 2<sup>2</sup>.

Variable	Niveles				
	-1.41	-1	0	1	1.41
x <sub>1</sub> : Glucosa (g/l)	23.2	32.5	55.0	77.5	86.8
x <sub>2</sub> : (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	0.89	2.84	7.57	12.3	14.25

El nivel central de glucosa se fijó a la misma concentración que en el diseño de la sección 5.1 (55 g/l) con el objetivo de probar concentraciones menores de 50 g/l, y que no se sobrepasara una concentración de 100 g/l en el punto axial máximo (1.41). Además era de interés comprobar el comportamiento de la producción de esporas con la concentración de glucosa en

la región de experimentación probada en los estudios anteriores, pero ahora con variaciones en la concentración de sulfato de amonio.

Para el nivel central de concentración de sulfato de amonio se utilizó el valor que se definió inicialmente en la formulación del medio semisintético (7.57 g/ l). Tomando como punto central este valor la concentración de sulfato de amonio varió entre 0.89 y 14.25 g/ l, que representó un intervalo amplio para evaluar la influencia de esta variable en la esporulación. Roussos (1985), probó concentraciones de sulfato de amonio entre 0.5 y 8 g/ l para la esporulación de *T. harzianum* y encontró que se producía una disminución de la producción de esporas con la disminución de la concentración.

En la **Tabla 6.7** se muestran los resultados del ajuste del modelo de regresión general de la *Ec. 6.1*. El modelo completo tenía seis términos y todos fueron incluidos en el ajuste final, pero solo fueron significativos cuatro términos que satisfacían la condición  $p < 0.05$  para rechazar la hipótesis nula (Montgomery, 1991).

**Tabla 6.7** Resultados obtenidos en el ajuste del modelo de regresión de la *Ec. 6.1*.

<b>Término</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Probabilidad <sup>a</sup></b>
<b>Constante</b>	$2.34 \times 10^8$	$2.59 \times 10^7$	0.0001 **
<b>x<sub>1</sub></b>	$-4.15 \times 10^7$	$2.24 \times 10^7$	0.0775
<b>x<sub>2</sub></b>	$-1.21 \times 10^8$	$2.24 \times 10^7$	0.0001 **
<b>x<sub>1</sub><sup>2</sup></b>	$-1.51 \times 10^7$	$2.33 \times 10^7$	0.5257
<b>x<sub>2</sub><sup>2</sup></b>	$5.93 \times 10^7$	$2.33 \times 10^7$	0.0187 **
<b>x<sub>1</sub> * x<sub>2</sub></b>	$8.81 \times 10^7$	$3.17 \times 10^7$	0.0110 **

a: Mínimo valor de probabilidad para rechazar la hipótesis nula (Montgomery, 1991).

\*\* : Parámetros significativos en el modelo de regresión ajustado ( $p < 0.05$ ).

La forma final del modelo ajustado fue:

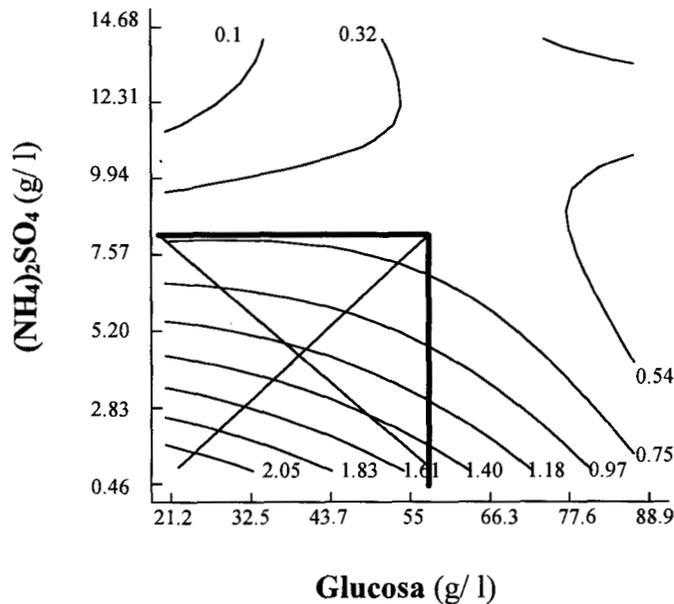
$$\begin{aligned} \text{esporas/ g} = & 2.34 \times 10^8 - 1.21 \times 10^8 ((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) + 5.93 \times 10^7 ((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)^2 + \\ & 8.81 \times 10^7 (\text{glucosa}) * ((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4) \end{aligned} \quad (6.5)$$

Donde: esporas/ g: variable dependiente (esporas/ gramo de soporte húmedo)  
glucosa: término correspondiente a la concentración inicial de glucosa  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: término correspondiente a la concentración inicial de sulfato de amonio

En los resultados del ajuste del modelo de regresión se observó que el coeficiente del término correspondiente a la concentración de sulfato de amonio tenía el valor más alto y negativo (-1.21 x 10<sup>8</sup>). El coeficiente del término correspondiente a la concentración con exponente 2 tenía signo positivo pero su valor fue menor (5.93 x 10<sup>7</sup>). La concentración de glucosa no fue significativa para la respuesta, solo en el término correspondiente a su interacción con la concentración de sulfato. Este análisis mostró que el aumento de la concentración de sulfato de amonio influyó negativamente en la producción de esporas. Vézina y Singh (1975) reportaron que la esporulación de *A. niger* ocurría en presencia de bajas concentraciones de nitrógeno en cultivo sumergido.

Las curvas de nivel constante de producción de esporas que se muestran en la **Figura 6.5** tenían forma de hipérbolas por lo que el comportamiento de la superficie presentó forma de “silla de montar” (Himmelblau, 1969). De acuerdo con este comportamiento, el punto central correspondiente al óptimo fue un “punto silla”. Se llama así por tener forma parecida a las sillas de montar utilizadas en deportes ecuestres. El análisis vectorial, como el presentado en la sección 6.1, para este tipo de comportamiento no resultó válido debido a la inestabilidad de la respuesta en la región de experimentación.

En la **Figura 6.5** se puede apreciar también que las mayores producciones de esporas fueron de 2.05 x 10<sup>9</sup> esporas/ g de soporte húmedo. Nivel que superior a los alcanzados en los estudios anteriores.



**Figura 6.5** Niveles constantes de producción de esporas (esporas/ g x 10<sup>9</sup>) para las concentraciones iniciales de glucosa y sulfato de amonio (SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>).

A partir de estos resultados se estimaron las concentraciones de glucosa y sulfato de amonio que se utilizaron en la formulación del medio de cultivo en los estudios posteriores. La determinación de estas concentraciones se hizo a partir del comportamiento de las curvas de nivel constante, tomando en cuenta los criterios siguientes:

Las producciones más altas de esporas se obtuvieron cuando disminuyeron las concentraciones de glucosa y sulfato de amonio en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos en la sección 6.2 mostraron que las mayores producciones de esporas se obtuvieron para concentraciones de glucosa menores de 50 g/l.

Utilizar concentraciones de sulfato de amonio por debajo de 7.57 g/l para evitar que se produjeran inhibiciones en la producción de esporas por exceso de nitrógeno en el medio de cultivo.

La aplicación de estos criterios permitió definir la zona señalada en la **Figura 6.5** con el recuadro (parte inferior izquierda de la región ). Las coordenadas del punto central de este recuadro fueron tomadas para definir las concentraciones de glucosa y sulfato de amonio . Las concentraciones definidas fueron: glucosa 40 g/ l y sulfato de amonio 4.0 g/ l. Estas concentraciones se utilizaron en la formulación del medio de cultivo empleado en experimentos de producción de esporas de *B. bassiana* a diferentes escalas de FMS

#### **6.4.- ESTUDIO DE LA EXTRACCION DE ESPORAS OBTENIDAS POR FMS**

La extracción de esporas producidas en medio sólido presenta características diferentes a la extracción producidas en cultivo superficial. En cultivo superficial las esporas solo se producen en la masa de micelio que crece sobre la superficie del disco de agar por lo que la extracción se facilita. En medio sólido el hongo crece tanto en la superficie de las partículas como en la matriz del soporte. Por esta razón parte de las esporas se producen en la matriz del soporte y no se recuperan fácilmente.

Para analizar la influencia de las condiciones de extracción se realizó un experimento factorial  $2^4$  en el que se evaluaron la influencia de dos niveles de cuatro variables sobre la variables de respuesta. En la **Tabla 6.8** se presenta el diseño del experimento con las variables codificadas. Para los cálculos estadísticos se empleó la metodología descrita en la sección **6.1**.

**Tabla 6.8** Diseño del experimento factorial  $2^4$  con las variables codificadas.

# Experimento	X1	X2	X3	X4
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1

**Tabla 6.8** Diseño del experimento factorial  $2^4$  con las variables codificadas (continuación).

# Experimento	X1	X2	X3	X4
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1

Los experimentos se realizaron con muestras de medio sólido fermentado, obtenidas en el experimento de la sección 6.3. Para cada muestra se pesó 1.0 g de medio sólido.

En la **Tabla 6.9** se muestran los niveles reales de las variables empleados en el experimento. Aunque estas variables fueron estudiadas en los experimentos de extracción a partir de cultivo superficial se decidió analizar su efecto sobre la extracción de esporas de *B. Bassiana* a partir de cultivos en FMS.

**Tabla 6.9** Niveles reales de las variables en el experimento  $2^4$ .

Variable	Niveles	
	-1	1
<b>X1: Volumen (ml)</b>	10	20
<b>X2: Concentración (%)</b>	0.01	0.06
<b>X3: Elemento de extracción</b>	B	B+P
<b>X4: Tiempo (min)</b>	10	20

B: Barra magnética.

B+P: Barra magnética más + 1.7 g de perlas de vidrio.

El volumen de la solución de Tween 80 empleado se aumentó de 10 ml a 20 ml para tratar de mejorar la extracción. El tiempo de extracción se redujo de 20 min (que era el utilizado en las extracciones a partir de muestras de FMS) a 10 min con el fin de hacer más rápida la operación de extracción pues el procesamiento de un número alto de muestras toma mucho tiempo, por ejemplo en el procesamiento de 32 muestras correspondientes al bloque tres del diseño factorial 3<sup>2</sup> de la sección 6.1.

En la **Tabla 6.10** se muestran los resultados de los análisis estadísticos realizados. Como se observa en los resultados obtenidos el aumento del volumen de la solución de Tween 80 disminuyó significativamente la cantidad de esporas extraídas ( $p < 0.05$ ) de las muestras de FMS. El aumento de la concentración de la solución de Tween 80 no produjo un aumento significativo en el número de esporas extraídas ( $p < 0.05$ ). Mismo resultado obtenido cuando se adicionaron 1.7 g de perlas de vidrio en la extracción. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la extracción a partir de cultivo superficial. La disminución del tiempo de extracción a 10 min produjo una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en la cantidad de esporas extraídas provocada por la disminución del tiempo de contacto entre el elemento de extracción y las partículas del sólido.

**Tabla 6.10** Comportamiento de la extracción de esporas de *B. bassiana* a partir de muestras de medio sólido fermentado.

Variables	Esporas/ g x 10 <sup>8</sup>			
	-1		1	
<b>X1: Volumen (ml)</b>	2.61 ± 0.22	a	1.80 ± 0.25	b
<b>X2: Concentración (%)</b>	2.20 ± 0.22	c	2.22 ± 0.33	c
<b>X3: Elemento de extracción</b>	2.38 ± 0.27	d	2.04 ± 0.28	d
<b>X4: Tiempo (min)</b>	1.78 ± 0.14	e	2.64 ± 0.29	f

Letras iguales en las filas indican que no existen diferencias significativas entre las medias ( $p < 0.05$ ).

De acuerdo a los resultados, se determinó utilizar las condiciones siguientes para realizar las extracciones de esporas, a partir de muestras de medio sólido:

- solución de Tween 80: volumen 20 ml, concentración 0.01 %
- elemento de extracción: barra magnética
- tiempo de extracción: 20 min.

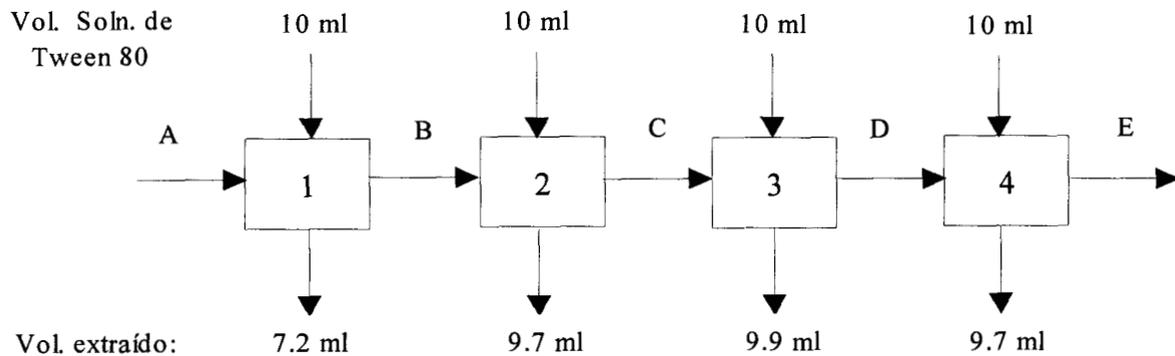
Cuando se realizaron dos extracciones sucesivas con estas condiciones se encontró que en la primera extracción se recuperó el 60 % del total de esporas obtenidas. Este valor fue 10 % menor al obtenido en las extracciones a partir de cultivo superficial. Lo cual evidenció que con una sola extracción no se podía estimar el total de esporas producidas por FMS. Además implica que las condiciones de extracción válidas para cultivo superficial no son aplicables del todo en extracciones de esporas de FMS.

#### **6.5. - ESTIMACION DEL NUMERO MAXIMO DE ESPORAS OBTENIDAS POR FMS**

Para estimar el número total de esporas que se producían en el medio sólido se realizaron extracciones sucesivas a las muestras de medio fermentado, utilizando las condiciones determinadas en la sección 5.4 En la **Figura 6.6** se presenta de forma esquemática la metodología seguida para realizar las extracciones sucesivas. Se efectuaron 4 extracciones sucesivas a una misma muestra, representadas con los números 1, 2, 3 y 4. En cada extracción se añadieron 10 ml de solución de Tween 80 (0.01 %) como se muestra en la parte superior de la **Figura 6.6**.

Una vez efectuado cada paso de extracción las muestras fueron filtradas a través de lana de vidrio. Los sólidos retenidos se utilizaron para el siguiente paso de extracción. Se midieron los volúmenes extraídos en cada paso (parte inferior del diagrama) y se realizaron los conteos de

esporas. En los puntos representados por letras (A, B, C, D y E) se retiraron dos muestras de sólidos después de filtrar y se determinó su humedad.



**Figura 6.6** Representación esquemática de la metodología seguida para realizar las extracciones sucesivas.

En la **Tabla 6.11** se presentan los resultados de las determinaciones realizadas a los sólidos en los puntos de medición A, B, C, D, E. Al término del primer paso de extracción se observó que el peso y la composición de los sólidos permanecieron prácticamente constantes. El número de esporas contenida en los sólidos húmedos permaneció constante también.

Los resultados mostrados en la **Tabla 6.11** permitieron calcular el número real de esporas recuperadas en cada paso de extracción y la fracción de esporas extraídas en los pasos 2, 3 y 4, respecto a las esporas extraídas en el paso anterior, como se muestra en la **Tabla 6.12**. En los pasos 3 y 4 se obtuvo una fracción de esporas extraídas de 0.74.

Asumiendo que el valor de 0.74 se mantenía constante para una serie de extracciones sucesivas a partir de la segunda extracción, se realizó una simulación del proceso de extracción completo hasta que en los sólidos quedaran retenidas solamente 10 esporas, este criterio se estableció para garantizar una alta extracción de esporas, la ecuación aplicada en la simulación fue la siguiente:

$$E_i = E_{i-1} * F \quad (6.6)$$

Donde:  $E_i$ : esporas extraídas en cada paso a partir del paso 3

$E_{i-1}$ : esporas extraídas en el paso anterior

F: fracción de esporas extraídas (0.74) según se estableció en la **Tabla 6.12**

**Tabla 6.11** Resultados de los análisis de los sólidos en los puntos de medición durante las extracciones sucesivas.

Composición de los sólidos	Valores en los puntos de medición			
	A	B	C	D
Peso húmedo (g) <sup>a</sup>	1.05	2.45	2.84	2.58
Humedad (%) <sup>b</sup>	75.42	93.70	93.37	92.78
Volumen de suspensión (ml) <sup>c</sup>	0.79	2.30	2.66	2.40
Esporas en suspensión x 10 <sup>7</sup> <sup>d</sup>	-	2.30	2.82	2.09

a: Peso húmedo de la muestra de sólidos al término de la filtración a través de lana de vidrio

b: Humedad de la muestra de sólidos.

c: Volumen de la suspensión de esporas contenida en los sólidos.

d: Número de esporas en la suspensión contenida en los sólidos.

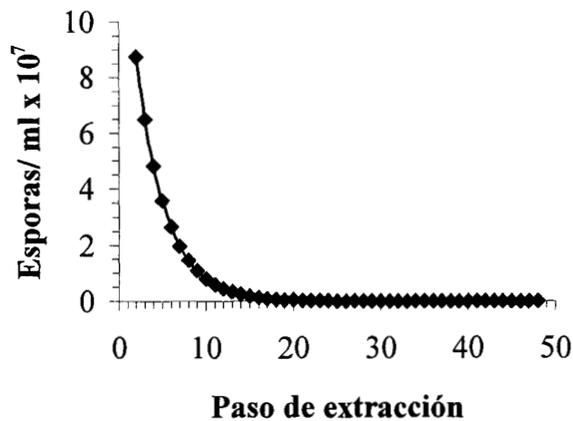
**Tabla 6.12** Recuperación total de esporas en los pasos sucesivos de extracción.

Paso de extracción	Esporas extraídas <sup>a</sup>	Fracción de esporas extraídas <sup>b</sup>
1	1.62 x 10 <sup>8</sup>	-
2	8.73 x 10 <sup>7</sup>	1.63
3	6.49 x 10 <sup>7</sup>	0.74
4	4.82 x 10 <sup>7</sup>	0.74

a: Total de esporas extraídas en cada paso (esporas en la suspensión filtrada + esporas en la suspensión incluida en los sólidos)

b: Por ejemplo para el paso 3 el cálculo fue el siguiente  $6.49 \times 10^7 / 8.73 \times 10^7 = 0.74$

Con los resultados de la ecuación 6.6 se construyó un gráfico de la simulación de la disminución del número de esporas extraídas, a partir de la segunda extracción. El comportamiento obtenido se presenta en la **Figura 6.7**. Se tomó como criterio de terminación de la simulación que en los sólidos quedarán solamente 10 esporas/ g. Mediante la simulación se estimó que eran necesarias 48 extracciones sucesivas para dejar 10 esporas retenidas en los sólidos.



**Figura 6.7** Simulación del comportamiento de la recuperación total de esporas a partir del segundo paso de extracción.

El total de esporas extraídas en todo el proceso incluyendo la primera extracción se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$E_t = E_1 + \sum E_i \quad (6.7)$$

Donde:  $E_t$ : número total de esporas extraídas en el proceso

$E_1$ : esporas extraídas en el paso 1

$E_i$ : esporas extraídas a partir del paso 2 de extracción, calculadas según la ecuación 6.6

El número total de esporas extraídas se estimó en  $5.02 \times 10^8$  esporas/ g de soporte húmedo, con este valor se determinó un factor de corrección para estimar el total de esporas producidas,

tomando como referencia el resultado de la primera extracción. El factor se calculó mediante la relación siguiente:

$$\text{Factor de corrección} = \frac{5.02 \times 10^8}{1.62 \times 10^8} = 3.1$$

Este factor de 3.1 se aplicó para corregir las determinaciones del número de esporas realizadas en el presente trabajo para los estudios de FMS. La corrección aplicada fue la siguiente:

$\text{Esporas obtenidas/ g} = \text{esporas/ g (determinadas en la primera extracción)} * 3.1$
---

## **6.6. - CONCLUSIONES**

De los resultados obtenidos en los estudios de FMS se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. - Las condiciones de fermentación establecidas permitieron el crecimiento y la esporulación de la cepa de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin CDBB H- 987 utilizada en este trabajo.
2. - La producción de esporas fue superior a los 7 días de fermentación. Para este tiempo la densidad de empaque inicial no influyó en la producción de esporas.
3. - La concentración de fosfato de potasio no afectó la producción de esporas en el intervalo estudiado (0.18 - 0.68 g/ l).
4. - Concentraciones de glucosa en el medio de cultivo superiores a 50 g/ l inhibieron la esporulación. Para concentraciones por encima de 100 g/ l se produjo una inhibición muy fuerte de la esporulación.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

5. - El aumento en la concentración de sulfato de amonio provocó una disminución en la producción de esporas.
6. - El aumento del volumen de solución de Tween 80 hasta 20 ml no mejoró la cantidad de esporas extraídas del medio sólido.
7. - El aumento de la concentración de la solución de Tween 80 hasta 0.06 % y la adición de perlas de vidrio para la extracción no influyeron en la recuperación de esporas a partir de medio sólido.
8. - La disminución del tiempo de extracción hasta 10 min redujo la cantidad de esporas extraídas del medio sólido

**ESCALAMIENTO**

## **7. - ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE ESPORAS DE *B. bassiana* POR FMS A DIFERENTES ESCALAS**

### **7.1. - USO DEL NUMERO DE REYNOLDS COMO CRITERIO DE ESCALAMIENTO**

En esta sección se analizan los resultados obtenidos en los experimentos realizados a diferentes escalas de fermentación para la producción de esporas de *B. bassiana* por FMS. Se conoce que el cambio de escala afecta un gran número de parámetros fisicoquímicos y biológicos que influyen sobre la productividad de los procesos de fermentación. El término escala se refiere tanto al volumen como a las dimensiones lineales del fermentador (Trilli, 1986).

Lonsane *et al.* (1992) analizaron varios aspectos de los procesos de FMS que se afectan cuando se aumenta la escala de fermentación. Los aspectos considerados fueron: las variaciones en la cantidad de biomasa formada, la necesidad de producir inóculos en gran escala, la esterilización del medio de cultivo, el suministro de aire, la agitación, la remoción de calor, el contenido de humedad de los sólidos, el control de pH y de la contaminación, la heterogeneidad del sistema de FMS, la purificación de los productos obtenidos, la disposición de los residuos y el manejo de los sólidos.

Entre los aspectos señalados anteriormente se consideró el suministro de aire debido a que es una variable de proceso importante en la FMS ya que cumple varias funciones como el suministro de oxígeno (O<sub>2</sub>), la remoción del bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y otros metabolitos volátiles. Además se utiliza para mantener la temperatura y la humedad en el medio sólido (Lonsane *et al.*, 1992; Mudgett, 1986; Prior *et al.*, 1992; Ramana-Murthy *et al.*, 1992). Las condiciones para la transferencia de gases en la FMS también favorecen regímenes variados de transferencia, dependiendo del método de aireación empleado. Esto puede producir limitación

de O<sub>2</sub> o aumentar la concentración de CO<sub>2</sub> hasta niveles inhibitorios en el gas que circula por los espacios vacíos del lecho de sólidos (Mudgett, 1986).

Rathbun y Shuler (1983) encontraron gradientes de concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en la dirección axial del lecho de sólidos, utilizando reactores empacados controlados por difusión de gases. Auria *et al.* (1992) determinaron que los coeficientes efectivos de difusión para ambos gases disminuyeron con el aumento de la concentración de biomasa. Desgranges y Durand (1990) encontraron que un aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire, durante el crecimiento superficial de *T. viride* y *A. niger*, aumentaba la velocidad de crecimiento radial y disminuía la producción de conidias por unidad de área de colonia. Aunque la información bibliográfica reportada por estos autores mostró que los resultados pueden ser variables para la producción de esporas y otros metabolitos secundarios como enzimas.

La información analizada permitió establecer como hipótesis de trabajo que la variación en la velocidad superficial del aire por la sección transversal del lecho de sólidos influía en la producción de esporas de *B. bassiana* a diferentes escalas de FMS, como consecuencia de la transferencia de O<sub>2</sub> y remoción de CO<sub>2</sub>.

Para comprobar esta hipótesis se realizó un experimento utilizando reactores de geometría cilíndrica de tres tamaños: pequeños, medianos y grandes (ver en la sección 4.3.2.-4 las dimensiones de los reactores). Las condiciones iniciales de FMS para las fermentaciones fueron similares a las utilizadas en el **Capítulo 6**. Se empleó el medio de cultivo basal con las concentraciones de glucosa, fosfato de potasio y sulfato de amonio determinadas en el **Capítulo 6**. Los reactores fueron colocados en una cámara con temperatura controlada de 29 °C durante 7 días.

Para cada tamaño de reactor se varió la relación de la longitud del lecho de sólidos al diámetro interno del reactor (relación L/D). Se utilizaron tres relaciones L/D: 4.8 (definida para la densidad de empaque de 0.25 g/ ml utilizada en los experimentos anteriores de FMS con reactores pequeños en este trabajo), 2.4 y 1.2. De esta forma utilizando el mismo flujo de aire

(0.75 vkgm) se varió su velocidad inicial por la sección transversal del lecho de sólidos para cada escala de fermentación, ya que la cantidad de medio sólido fue diferente en cada condición.

En la **Tabla 7.1** se presentan los volúmenes efectivos y los pesos de medio sólido empleados en cada condición para las diferentes escalas de FMS estudiadas. Como se aprecia el cambio de escala estudiado fue de aproximadamente 120 veces en volumen y en peso de sustrato entre los reactores pequeños y grandes.

**Tabla 7.1** Escalas de fermentación empleadas para la producción de esporas de *B. bassiana*.

Escala	Relación L/D			
		4.8	2.4	1.2
Reactores grandes	Ve:	4764	2382	1191
	PS:	1191	596	298
Reactores medianos	Ve:	162	81	40
	PS:	40	20	10
Reactores pequeños	Ve:	40	20	10
	PS:	10	5	2.5

Ve: Volumen efectivo del reactor (cm<sup>3</sup>).

PS: Peso de medio sólido húmedo al inicio de la fermentación (g).

Los resultados para las diferentes escalas se analizaron utilizando el número de Reynolds (Re). La fórmula de este número adimensional para un gas que circula a través de un lecho empacado es la siguiente (Levenspiel, 1993):

$$R e = \frac{d_p \rho_g V_g}{\mu_g \epsilon_0} \quad (7.1)$$

Donde:  $d_p$ : diámetro promedio de las partículas del sólido (m)  
 $\rho_g$ : densidad del aire ( $\text{kg/ m}^3$ )  
 $V_g$ : velocidad del aire por la sección transversal del reactor (m/ seg)  
 $\mu_g$ : viscosidad del aire ( $\text{kg/ m seg}$ )  
 $\epsilon_0$ : fracción de espacios vacíos en el lecho de sólidos (adimensional)

El Re puede ser utilizado como criterio de escalamiento para establecer las condiciones de operación a diferentes escalas de FMS pues depende de las características del aire (densidad y viscosidad), del tamaño de las partículas (diámetro promedio), de la fracción de espacios vacíos en el medio sólido y de la velocidad del aire por la sección transversal. En la **Tabla 7.2** se presentan los valores de las variables empleados en los cálculos del Re.

**Tabla 7.2** Valores de las variables utilizadas para los cálculos del Re.

<b>Variable</b>	<b>Valor</b>
$d_p$ (m)	$2.198 \times 10^{-3}$ <sup>a</sup>
$\rho_g$ ( $\text{kg/ m}^3$ )	$0.897$ <sup>b</sup>
$\mu_g$ ( $\text{kg/ m seg}$ )	$1.8 \times 10^{-5}$ <sup>b</sup>
$\epsilon_0$ (adimensional)	$0.52$ <sup>a</sup>

Fuentes: a: Levenspiel, 1993  
b: Perry, 1984

En las tres escalas empleadas se cumplió con el criterio establecido para lechos sólidos empacados al azar en columnas:

$$d_T \geq 8 \cdot d_p$$

Donde:  $d_T$  es el diámetro interno de la columna.

Manteniendo este criterio se evita que queden espacios vacíos en la paredes de las columnas y por tanto la formación de canales preferenciales en la circulación del aire (Perry, 1984).

En la **Tabla 7.3** se relacionan las condiciones empleadas para las fermentaciones en cada escala. Se presentan las velocidades del aire por la sección transversal de los reactores empleados y los valores iniciales de Re. Como puede observarse los valores de Re en todos los casos se encontraron en la zona de régimen laminar de flujo  $Re < 1$ , (Perry, 1984). Además se colocó un reactor mediano sin suministro de aire alguno  $Re = 0$ , como referencia.

**Tabla 7.3** Condiciones de aireación empleadas en los experimentos de producción de esporas de *B. bassiana* a diferentes escalas.

Escala	Relación L/D			
		4.8	2.4	1.2
Reactores grandes	$V_g$ :	1.62	0.81	0.40
	Re:	0.347	0.173	0.086
Reactores medianos	$V_g$ :	0.52	0.26	0.13
	Re	0.112	0.056	0.028
Reactores pequeños	$V_g$ :	0.33	0.16	0.08
	Re	0.07	0.035	0.0175

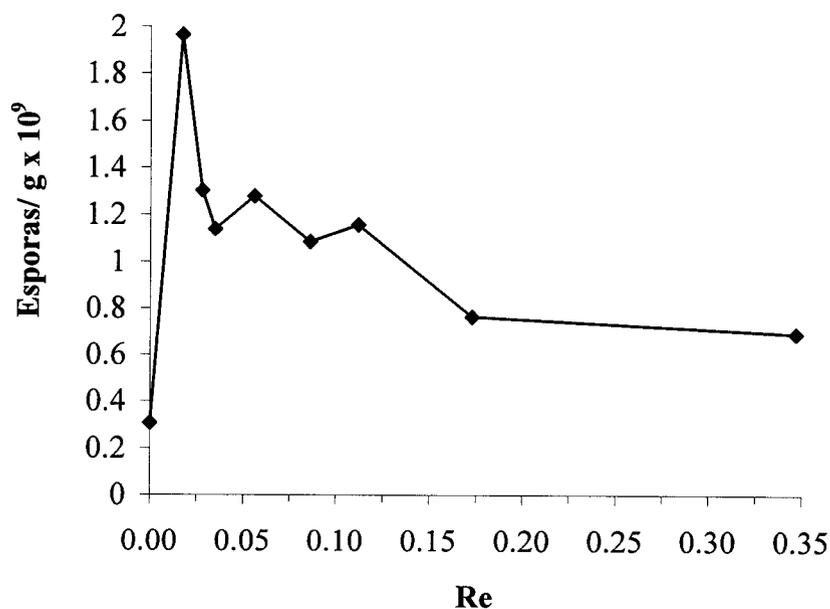
$V_g$ : velocidad del aire por la sección transversal del reactor (m/ seg) x  $10^{-3}$ .

Re: número de Reynolds al inicio de la fermentación.

En la **Figura 7.1** se presentan los resultados de producción de esporas para los diferentes Re estudiados. Como puede observarse cuando el Re es cero se obtuvo la menor producción de esporas. El máximo de producción se alcanzó con un Re de 0.0174. A partir de este valor se observó una disminución de la esporulación con el aumento de Re.

Los resultados obtenidos mostraron que el Re influyó sobre la producción de esporas de *B. bassiana* en el intervalo estudiado. Esta influencia posiblemente estuvo relacionada con la mayor o menor remoción de CO<sub>2</sub> de los espacios entre partículas del lecho de sólidos.

La disminución en la velocidad del aire por la sección transversal del lecho de sólidos pudo determinar que la remoción del CO<sub>2</sub> de los espacios interparticulares del sólido fuera más lenta. Lo que pudo provocar que las concentraciones del gas en los espacios entre las partículas así como los gradientes de concentración en la dirección axial de flujo fueran mayores para cada tiempo de fermentación. Lo cual pudo favorecer la esporulación de *B. bassiana* en las últimas etapas del cultivo.



**Figura 7.1** Comportamiento de la producción de esporas de *B. bassiana* para los diferentes números de Reynolds empleados en diferentes escalas.

En la **Figura 7.1** se aprecia además que para el intervalo de  $Re$  entre 0.028 y 0.112 la producción de esporas fue menor que para  $Re= 0.0174$ , pero en este intervalo la producción fue más estable por lo que podría ser utilizado para la selección de criterios de operación en aplicaciones prácticas. También se observa que el aumento en el  $Re$  por encima de 0.173 y hasta 0.347 no provocó un aumento en la producción de esporas de *B. bassiana* por lo que no es razonable aplicar  $Re$  superiores.

Los resultados obtenidos sugieren que se puede cambiar hasta 120 veces la escala de fermentación exitosamente siempre que el  $Re$  se mantenga entre 0.0174 y 0.112. Además que en los cultivos donde no se suministra aire la producción de esporas puede disminuir. Este puede ser el caso de los sistemas que emplean bolsas cerradas de polietileno para la producción de esporas de *B. bassiana*.

## **7.2. - INFLUENCIA DEL CAMBIO DE ESCALA SOBRE LA ACTIVIDAD RESPIRATORIA DE *B. bassiana***

El método de análisis de gases de salida en la FMS ha sido ampliamente utilizado para determinar el comportamiento de los cultivos. Una de las razones de la extensión del uso de esta técnica es debida a la dificultad que se presenta en la determinación de la biomasa producida en FMS. Esto se debe a que los microorganismos pueden crecer tanto en la superficie como en el interior de las partículas del sólido por lo que resulta difícil separar la biomasa del sólido (Saucedo-Castañeda, 1991). Además el análisis de los gases a la salida permite determinar la evolución del cultivo en tiempo real, durante todo el período de incubación y sin perturbarlo (Raimbault, 1980; Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994).

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en los análisis de la actividad respiratoria de *B. bassiana* durante los experimentos realizados a diferentes escalas de fermentación, descritos en la sección 7.1. Para el análisis de los resultados se empleó la metodología descrita por Saucedo-Castañeda *et al.* (1994).

Para analizar el comportamiento del cultivo de *B. bassiana* en las diferentes escalas de fermentación se determinó la proporción de CO<sub>2</sub> en los gases de salida durante las fermentaciones utilizando cromatografía de gases y por absorción infrarroja, como se describió en la sección 4.4.7..

La velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> se expresó en (mg/ h g MSI) utilizando la ecuación siguiente:

$$r_{CO_2} = \frac{(\%CO_2) (F) (PM) (fc)}{(MSI) 100} \quad (7.2)$$

Donde:  $r_{CO_2}$ : velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> (mg/ h g MSI)

% CO<sub>2</sub>: % v/v determinado por análisis de los gases de salida.

F: flujo de aire al reactor (ml/ h).

PM: peso molecular del CO<sub>2</sub> (44 mg/ mmol)

fc: factor de corrección (0.031 mmol/ ml).

MSI: contenido de materia seca del medio sólido al inicio de la fermentación (g).

Para estimar la acumulación total de CO<sub>2</sub> producido, en las diferentes condiciones estudiadas, se calcularon las integrales de las curvas de velocidad de producción de CO<sub>2</sub> utilizando la regla de los trapecios según las ecuaciones siguientes:

$$C_{CO_2} = r_i * \Delta t + (( r_{i+1} - r_i) * \Delta t / 2) \quad (7.3)$$

$$CO_{2\ TOTAL} = \Sigma C_{CO_2} \quad (7.4)$$

Donde:  $C_{CO_2}$ : CO<sub>2</sub> producido (mg/ g MSI).

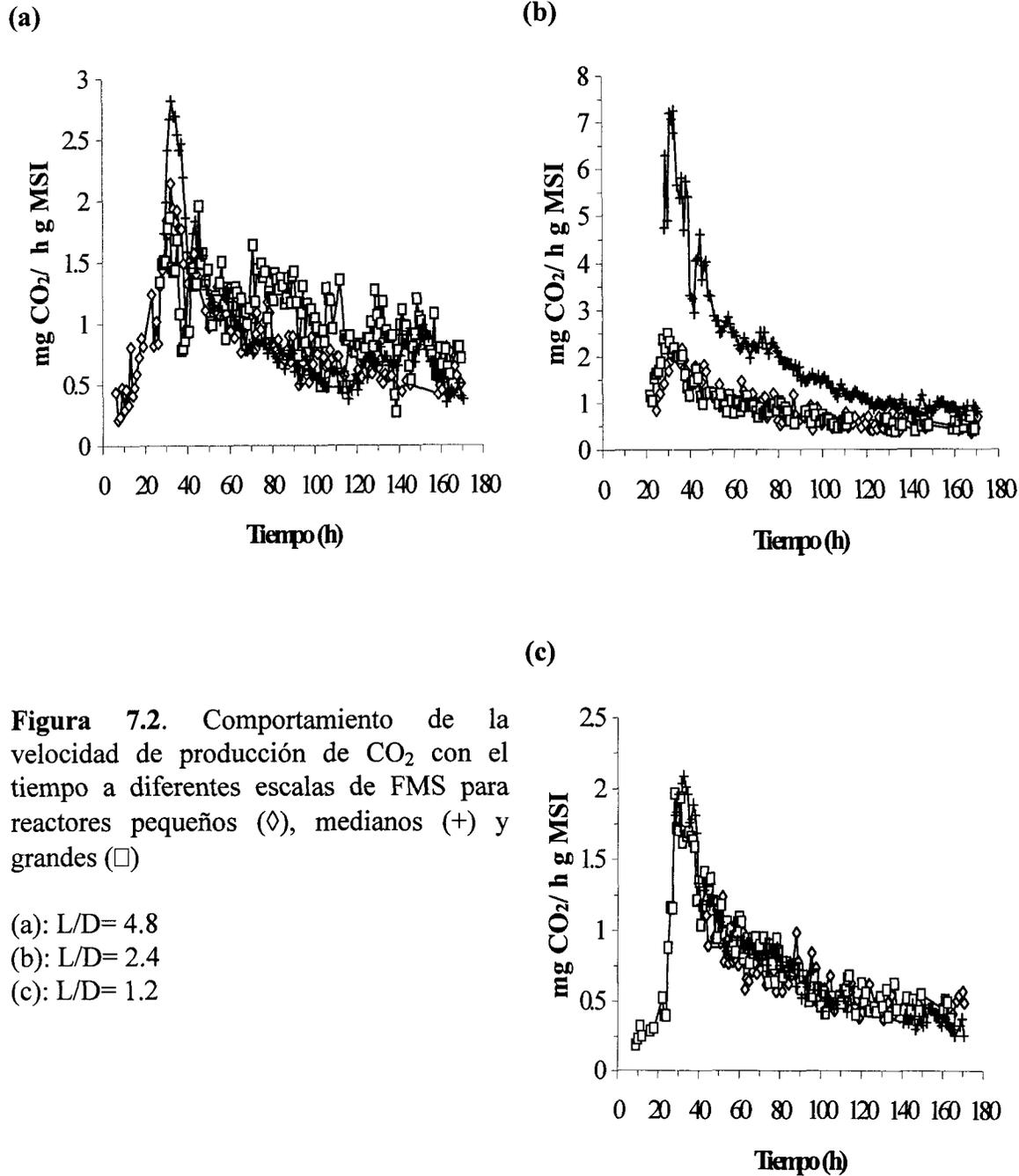
$\Delta t$ : intervalo de tiempo entre dos análisis (h).

$r_i$ : velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> al inicio del intervalo de tiempo.

$r_{i+1}$ : velocidad específica de producción de CO<sub>2</sub> al término del intervalo de tiempo.

$CO_{2\ TOTAL}$ : acumulación de CO<sub>2</sub> producido (mg/ g MSI)

Los resultados de velocidad de producción de CO<sub>2</sub>, calculados utilizando la ecuación 7.2, para las relaciones L/D estudiadas en cada escala de fermentación se presentan en la **Figura 7.2**. En todos los casos se observó un aumento rápido, en la velocidad de producción de CO<sub>2</sub>, en las primeras 30 h de cultivo. Entre 30 y 40 h se alcanzaron los máximos de velocidad en el intervalo de 2.0 a 2.5 mg/ h g MSI para todas las condiciones.



**Figura 7.2.** Comportamiento de la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> con el tiempo a diferentes escalas de FMS para reactores pequeños (◇), medianos (+) y grandes (□)

- (a): L/D= 4.8
- (b): L/D= 2.4
- (c): L/D= 1.2

## RESULTADOS Y DISCUSION

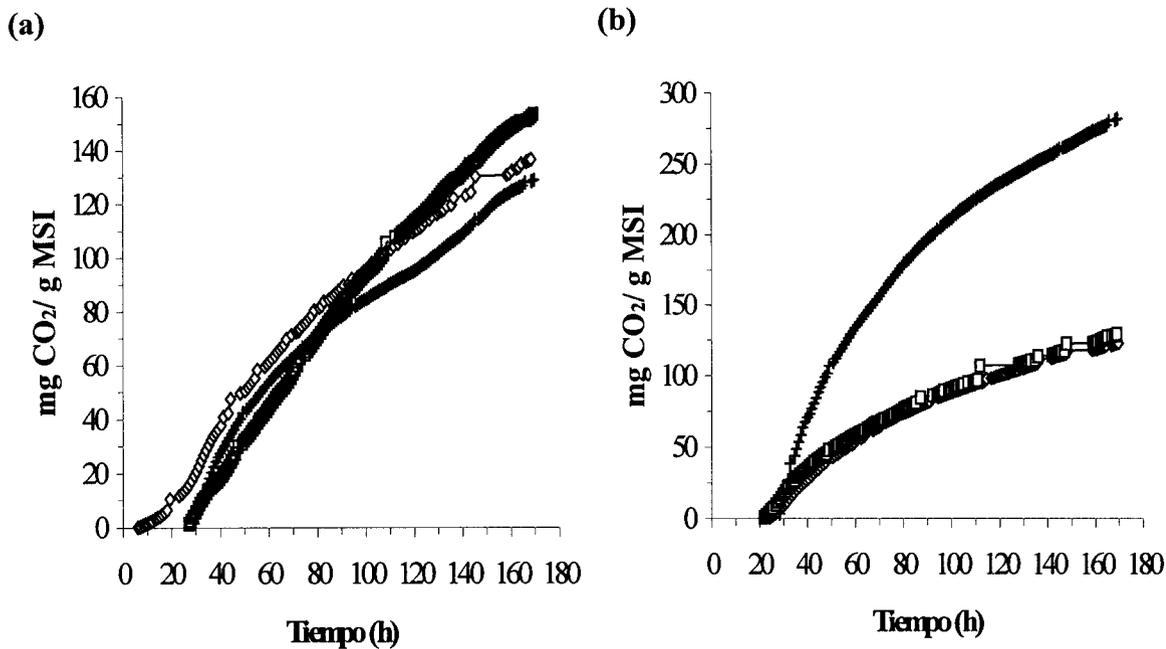
Las diferencias encontradas en las mediciones del reactor grande con  $L/D= 2.4$  fueron causadas por un error en la calibración del equipo de medición resultados de esta determinación se presentan solo para mostrar que el comportamiento general de la producción de  $CO_2$  para esta condición fue similar a los restantes.

El comportamiento observado en las primeras horas de cultivo correspondió con la fase de crecimiento vegetativo del hongo. Este período se caracteriza por una multiplicación activa de micelio, crecimiento exponencial, por lo que la velocidad de producción de  $CO_2$  aumentó proporcionalmente al aumento de la biomasa del hongo. Comportamientos similares se han obtenido para otros sistemas de FMS: Rimbault (1980) para el cultivo de *Aspergillus hennebergii* sobre harina de yuca; Saucedo-Castañeda (1991) para el cultivo de *Schwanniomyces castellii* sobre bagazo de caña; Soccol (1992) para el cultivo de *Rhizopus oryzae* sobre harina de yuca.

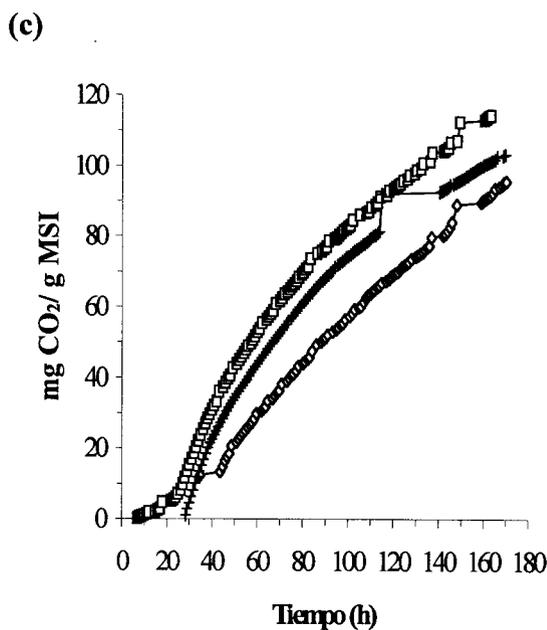
Una vez que se alcanzaron los máximos de producción de  $CO_2$ , la velocidad descendió hasta llegar a los valores mínimos a las 40 h de cultivo. A partir de aquí la velocidad aumentó ligeramente entre 40 y 50 h debido probablemente a la formación de esporas. Esta esporulación fue de menor importancia y no se consideró asociada al crecimiento, posiblemente ocurrió debido a la maduración del micelio primario (Larroche *et al.*, 1988).

A partir de 50 h de cultivo la velocidad de producción de  $CO_2$  comenzó a disminuir hasta alcanzar un nivel de aproximadamente  $0.5 \text{ mg/ h g MSI}$  en el que se mantuvo mas o menos constante hasta las 168 h de cultivo (7 días). Este periodo correspondió con la etapa de esporulación de *B. bassiana*.

Los resultados de los cálculos de la acumulación de  $CO_2$  producido, utilizando la ecuación 7.3 se muestran en la **Figura 7.3** El comportamiento de la acumulación de  $CO_2$  fue muy similar para las tres escalas en cada relación  $L/D$  evaluada. Los valores de producción total de  $CO_2$  al término de las fermentaciones se encontraron en el intervalo entre 100 y 150  $\text{mg/ g MSI}$ .

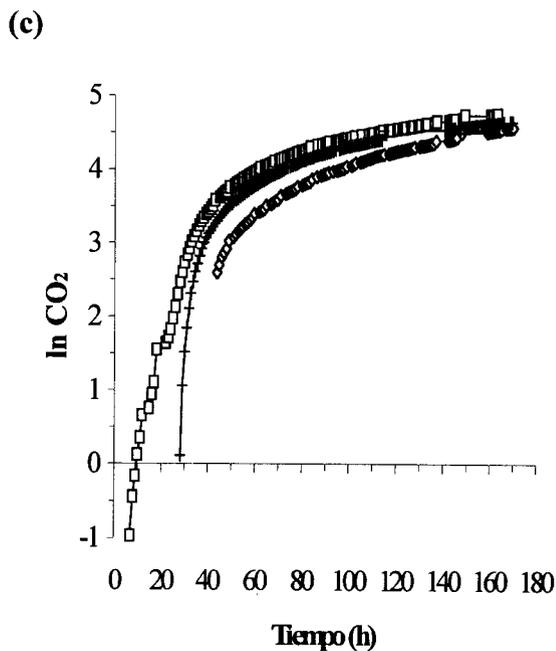
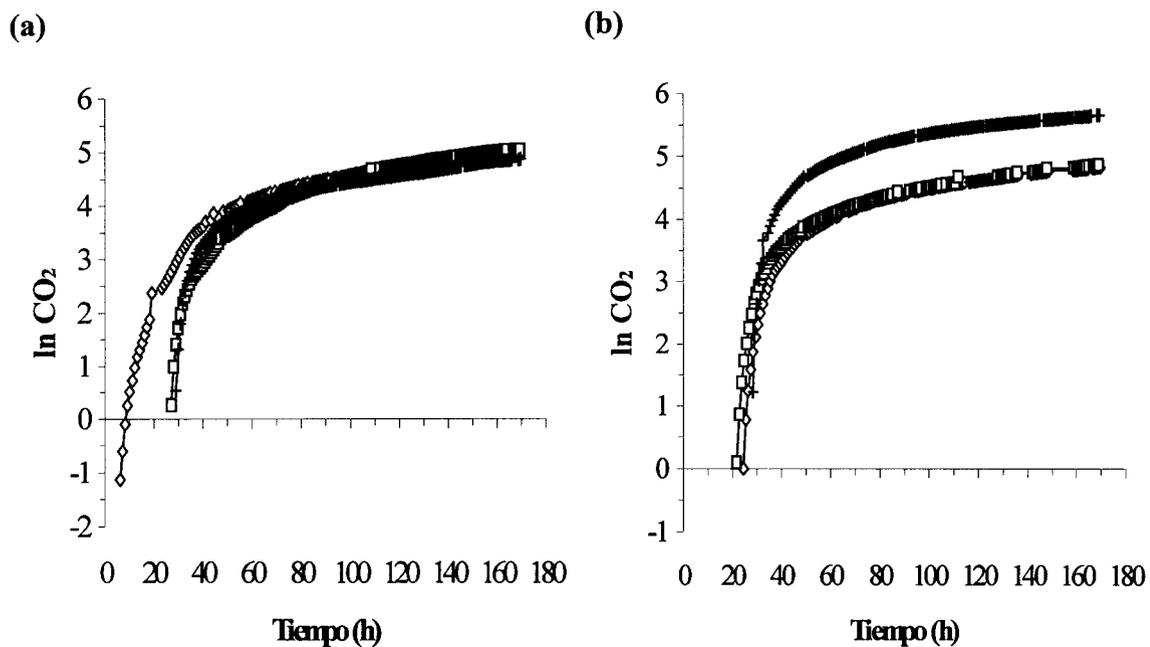


**Figura 7.3** Comportamiento de la producción total de  $\text{CO}_2$  a diferentes escalas de FMS. Los símbolos y la nomenclatura son similares a los utilizados en la **Figura 7.2**.



En la **Figura 7.4** se muestran los resultados de los cálculos de los logaritmos naturales de la producción de  $\text{CO}_2$  ( $\ln \text{CO}_2$ ) para las relaciones L/D estudiadas en cada escala de FMS. El comportamiento del  $\ln \text{CO}_2$  en todos los casos mostró que la fase exponencial de crecimiento

se desarrolló entre las 20 y las 31 h de cultivo. Entre las 31 y las 40 h se produjo una disminución en la velocidad y a partir de 40 h los cultivos se desarrollaron en estado estacionario.



**Figura 7.4** Comportamiento del  $\ln CO_2$  a diferentes escalas de FMS. Los símbolos y la nomenclatura son similares a los utilizados en la **Figura 7.2**.

En la **Tabla 7.4** se resumen los resultados de los análisis de actividad respiratoria y producción de esporas de *B. bassiana* para las diferentes escalas de fermentación y relaciones L/D estudiadas. Se observó que el tiempo en que se alcanzó la velocidad máxima de producción de CO<sub>2</sub> fue de 31 ± 2 h. Mientras que la producción total de CO<sub>2</sub> fue de 124 ± 17 mg/ g MSI.

La producción de esporas alcanzó un nivel promedio de 1.12 ± 0.39 x 10<sup>9</sup> esporas/ g por lo que a todas las escalas probadas se mantuvo la producción alcanzada en los experimentos realizados a escala de laboratorio (sección 6.3).

**Tabla 7.4** Efecto del cambio de escala en la actividad respiratoria y la producción de esporas de *B. bassiana* en FMS.

Escala	L/D	t (h) <sup>a</sup>	CO <sub>2</sub> total (mg/ g MSI) <sup>b</sup>	Esporas/ g x 10 <sup>9</sup> <sup>c</sup>
Reactores grandes	4.8	32	128	0.69
	2.4	-	-	0.76
	1.2	32	103	1.08
Reactores medianos	4.8	32	150	1.15
	2.4	30	134	1.28
	1.2	28	114	1.30
Reactores pequeños	4.8	32	136	0.77
	2.4	33	123	1.14
	1.2	34	100	1.96

a: Tiempo en que se alcanza la velocidad máxima de producción de CO<sub>2</sub>.

b: Cantidad de CO<sub>2</sub> total producido en 7 días de fermentación.

c: Producción de esporas.

### **7.3. - CONCLUSIONES**

Los resultados de producción de esporas de *B. bassiana* a diferentes escalas de FMS permitieron arribar a las conclusiones siguientes:

1. - Se escaló la FMS de *B. bassiana* desde 2.5 g hasta aproximadamente 1200 g, que corresponde a un factor de escala de 480 en peso, de medio sólido húmedo en reactores de lecho empacado estático sin afectar los niveles de producción de esporas.
2. - El número de Reynolds es un criterio relevante para realizar el escalado del proceso de producción de esporas de *B. bassiana* por FMS.
3. - No se debe eliminar completamente el suministro de aire ( $Re = 0$ ) ni aumentar el Re por encima de 0.112 pues disminuye la producción de esporas de *B. Bassiana*.
4. - El intervalo de Re entre 0.017 y 0.112 puede emplearse para definir criterios de operación en aplicaciones prácticas de la producción de esporas de *B. bassiana*.
5. - El cambio de escala no produjo variaciones en la actividad respiratoria de *B. bassiana*.
6. - Los perfiles de velocidad de producción de bióxido de carbono fueron similares en las escalas de FMS estudiadas. La máxima velocidad de producción de CO<sub>2</sub> se alcanzó a las 31 h de cultivo.
7. - La producción total de CO<sub>2</sub> estuvo en un intervalo pequeño, de 100 a 150 mg/ g MSI, lo que indica que el consumo de la fuente de carbono (glucosa) fue prácticamente similar en las escalas de FMS.
8. - La duración de las fases de crecimiento del hongo durante el cultivo en FMS fueron: retardo 20 h, exponencial 20 a 31 h, desaceleración 31 a 40 h, estacionaria 40 h en adelante.

## **CONCLUSIONES**

## 8. - CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se estudió la producción de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en fermentación en medio sólido FMS. Los estudios realizados se dividieron en tres partes: primero se determinaron las características del crecimiento y la esporulación en cultivo superficial, posteriormente se hicieron estudios de la influencia de la composición del medio de cultivo sobre la producción de esporas, en FMS a escala de laboratorio y la extracción de esporas, por último se estudió la influencia del cambio de escala en la producción de esporas. Los resultados obtenidos permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

### - Cultivo superficial

El aumento de la temperatura hasta 29 °C y la utilización del medio semisintético incrementaron la velocidad de crecimiento y la esporulación de *B. bassiana* en cultivo superficial. Además se determinó que temperaturas por encima de 30 °C impidieron la germinación y el crecimiento del hongo. El tiempo de cultivo para lograr la esporulación adecuada del hongo fue de 7 días, en este tiempo se obtuvieron concentraciones de esporas de  $3.5 \times 10^7$  esporas/ ml de suspensión de Tween 80. La viabilidad de las esporas a los 7 días de cultivo fue de 55%. La hidrofobicidad de las esporas obtenidas fue superior a 95 % hasta 10 días de cultivo lo que indicó que tienen un alto potencial como bioinsecticidas.

El aumento del volumen, de 30 a 40 ml por matraz Erlenmeyer, y la concentración de la solución de Tween 80 de 0.01 a 0.06 %, así como la adición de 1.7 g de perlas de vidrio y el aumento en el tiempo de extracción de 10 a 20 min, no aumentaron significativamente la extracción de esporas.

### - FMS a escala de laboratorio

Se determinaron las concentraciones del medio de cultivo utilizado en FMS para obtener  $10^9$  esporas/ g de medio sólido húmedo. Las concentraciones de los componentes en el medio de cultivo para obtener esta esporulación del hongo en FMS fueron: fosfato de potasio, 0.18 - 0.68 g/l, glucosa inferiores a 100 g/l y sulfato de amonio menores de 7.57 g/l.

## CONCLUSIONES GENERALES

La utilización de 20 ml de solución de Tween 80 por gramo de medio sólido húmedo y la adición de 1.7 g de perlas de vidrio no mejoró la extracción de esporas a partir de medio sólido. El número de extracciones sucesivas necesario para recuperar el 99 % de las esporas producidas en FMS fue estimado en 48 extracciones. A partir de este valor se calculó el número total de esporas producidas que fue de un factor de corrección de 3.1 para corregir el número de esporas obtenidas en un solo paso de extracción.

### **- Cambio de escala**

El cambio de escala con un factor de 480 en peso no afectó la producción de esporas ni la actividad respiratoria de *B. bassiana*. El número de Reynolds definido para lechos empacados fue un criterio relevante para realizar el escalamiento del proceso de producción de esporas de *B. bassiana* por FMS debido a que se encontró un intervalo de Reynolds entre 0.028 y 0.112 en que la producción de esporas se mantuvo estable entre  $1.0$  y  $1.3 \times 10^9$  esporas/ g de soporte húmedo.

El comportamiento de la velocidad de producción de bióxido de carbono, producción total de  $\text{CO}_2$  y el  $\ln \text{CO}_2$  fue similar en las escalas de FMS estudiadas. El tiempo en que se alcanzó la mayor velocidad de producción de  $\text{CO}_2$  fue de 31 h, mientras que la producción total de  $\text{CO}_2$  fue de 124 mg/ g MSI. La producción de esporas fue de  $1.12 \times 10^9$  esporas/ g de soporte húmedo este valor coincidió con el obtenido a escala de laboratorio.

## **BIBLIOGRAFIA**

**9. - BIBLIOGRAFIA**

**AULD, B. A.** (1991). Mass production, formulation and application of fungi as biocontrol agents. En: Biological Control of Locust and Grasshoppers (Proceedings of a Workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, 29April - 1May 1991), Lomer C. J. y Prior C. (Eds.), C A B International, Section IV: 219 - 229.

**AURIA, R.; J. PALACIOS y S. REVAH** (1992). Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 39: 898 - 902.

**BARRIOS- GONZALEZ, J.; C. MARTINEZ; A. AGUILERA y M. RAIMBAULT** (1989). Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.*, 11: 551 - 554.

**BARRIOS- GONZALEZ, J.; H. GONZALEZ y A. MEJIA** (1993). Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. *Biotechnol. Adv.*, 11: 539 - 547.

**BIDOCHKA, M. J. y G. G. KHACHATOURIANS** (1987). Purification and properties of an extracellular protease produce by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Envirom. Microbiol.*, 53: 1679 - 1684.

**BIDOCHKA, M. J. y G. G. KHACHATOURIANS** (1988). *N*-acetyl-D-glucosamine mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Envirom. Microbiol.*, 54: 2699 - 2704.

**BIDOCHKA, M. J.; N. H. LOW y G. G. KHACHATOURIANS** (1990). Carbohydrate storage in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Envirom. Microbiol.*, 56: 3186-3190.

**BIDOCHKA, M. J. y G. G. KHACHATOURIANS** (1991). The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invert. Pathol.*, 58: 106 - 117.

**BIDOCHKA, M. J. y G. G. KHACHATOURIANS** (1992). Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the cuticular components from migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invert. Pathol.*, 59: 165 - 173.

**BIDOCHKA, M. J. y G. G. KHACHATOURIANS** (1993a). Regulation of extracellular *N*-acetyl-D-glucosaminidase production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.*, 39: 6 - 12

**BIDOCHKA, M. J. y G. G. KHACHATOURIANS** (1993b). Oxalic acid hyperproduction in *Beauveria bassiana* mutants is related to a utilizable carbon source but not to virulence. *J. Invert. Pathol.*, 62: 53 - 57.

**BIDOCHKA, M. J.; K. I. YONG y G. G. KHACHATOURIANS** (1993). Partial purification and characterization of two extracellular *N*-acetyl-D-glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.*, 39: 40 - 45.

**BING, L. A. y L. C. LEWIS** (1993). Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Agric. Ecosys. Envirom.*, 45: 147 - 156.

**BOTTON, B.; A. BRETON; M. FEVRE; Ph. GUY; J. P. LARPENT y P. VEAU** (1985). Moissisures Utiles et Nuisibles. Importance Industrielle. En: Collection Biotechnologies, Masson, Paris: pp 122.

**BOUCIAS, D.; J. C. PENDLAND y J. P. LATGE** (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Appl. and Envirom. Microbiol.*, 54: 1795 - 1805.

**CHARNLEY, A. K.** (1991). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. En: Biological Control of Locust and Grasshoppers (Proceedings of a Workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, 29April - 1May 1991), Lomer C. J. y Prior C. (Eds.), C A B International, Section II: 181 - 190.

**CORDOVA, J. A.** (1994). Efecto de la concentración de glucosa en el crecimiento y la producción de ácido cítrico en *Aspergillus niger* por fermentación en estado sólido. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, 96 p.

**DEBACH, P. y D. ROSEN** (1991). Biological control by natural enemies. Cambridge University Press, Great Britain, Cap. 2: 35 - 84.

**DEFARGES, C.; C. LARROCHE y B. G. GROS** (1987). Spore production of *Penicillium roqueforti* by solid state fermentation: stoichiometry, growth and sporulation behavior. *Biotechnol. Bioeng.*, 24: 1050 - 1058.

**DESGRANGES; C. y A. DURAND** (1990). Effect of pCO<sub>2</sub> on growth, conidiation, and enzyme production in solid-state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS. *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 546 - 551.

**FASSATIOVÁ, O.** (1986). Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. En: Progress in Industrial Microbiology, Elsevier, Vol. 22: 64 - 85.

**GERVAIS, P.; P. MOLIN; W. GRAJEK y M. BENSOUSSAN** (1988). Influence of water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnol. Bioeng.*, 31: 457 - 463.

**GOETTEL, M. S.** (1991). Fungal agents for biocontrol. En: Biological Control of Locust and Grasshoppers (Proceedings of a Workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, 29April - 1May 1991), Lomer C. J. y Prior C. (Eds.), C A B International, Section II: 123 - 132.

**GOETTEL, M. S. y D.W. ROBERTS** (1991). Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. En: Biological Control of Locust and Grasshoppers (Proceedings of a Workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, 29April - 1May 1991), Lomer C. J. y Prior C. (Eds.), C A B International, Section IV: 230 - 238.

**GRIFFITHS, D. A.; D. E. BROWN y S. G. JEZEQUEL** (1992). Biotransformation of warfarin by the fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 169 - 175.

**GUTIERREZ- ROJAS, M.; J. CORDOVA; R. AURIA; S. REVAH Y E. FAVELATORRES** (1995). Citric acid production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnol. Lett.*, 17: 219 - 224.

**GUTIERREZ- ROJAS, M.** (1995b). Contribución al estudio del modelado matemático de la fermentación sólida de hongos filamentosos en soportes inertes. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana, México, 196 p.

**HEGEDUS, D. D. y G. G. KHACHATOURIANS** (1988). Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol. Letters*, 10: 637 - 642

**HEGEDUS, D. D.; M. J. BIDOCHKA y G. G. KHACHATOURIANS** (1990). *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 641 - 647.

**HEGEDUS, D. D.; M. J. BIDOCHKA; G. S. MIRANPURI y G. G. KHACHATOURIANS** (1992). A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 785- 789.

**HEGEDUS, D. D. y G. G. KHACHATOURIANS** (1994). Isolation and characterization of conidial lethal mutants of *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.*, 40: 766 - 776.

**HESELTINE, C. W.** (1972). Solid state fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 14: 517 - 532.

**HIMMELBLAU, D. M.** (1969). Process analysis by statistical methods. John Wiley, New York, 463 p.

**HOCKING, A. D.** (1993). Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. En: Stress Tolerance of Fungi. Jennings D. H. (Ed.), Marcel Dekker, New York, Cap. 10: 233 - 256.

**IBARRA, J.** (1994). Los bioinsecticidas como alternativa ecológica. *Biotecnología*, 4: 3 - 10.

**JENNINGS, D. H.** (1976). Transport and translocation in filamentous fungi. En: The Filamentous Fungi. Vol. 2: Biosynthesis and Metabolism. Smith J. E. y Berry D. R. (Eds.), Edward Arnold, Londres, Cap. 2: 32 - 64.

**JOHNS, M. R.** (1992). Production of secondary metabolites. En: Solid Substrate Cultivation, Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. (Eds.), Elsevier Sci. Pub., England, Cap. 17: 341 - 352.

**LANE, B. S.; A. P. J. TRINCI y A. T. GILLESPIE** (1991). Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon- and nitrogen- limited batch cultures. *Mycol. Res.*, 95: 821 - 828.

**LARROCHE, C.; C. DESFARGES y J. B. GROS** (1988). Optimization of the spore production of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation on buckwheat seeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 85 - 92.

**LAUKEVICS, J. J.; A. F. APSITE; U. S. VIESTURS y R. P. TENDERDY** (1985). Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of wheat straw. *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 149 - 158.

**LEVENSPIEL, O.** (1993). Flujo de fluidos e intercambio de calor. Reverté, México, Cap. 6: 119 - 134.

**LONSANE, B. K.; G. SAUCEDO-CASTAÑEDA; M. RAIMBAULT; S. ROUSSOS; G. VINIEGRA-GONZALES; N. P. GHILDYAL; M. RAMAKRISHNA y M. M. KRISHNAIAH** (1992). Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process Biochem.*, 27: 259 - 273.

**MENDOÇA, A. F.** (1991). Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata*, in Brazil. En: Biological Control of Locust and Grasshoppers (Proceedings of a Workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, 29April - 1May 1991), Lomer C. J. y Prior C. (Eds.), C A B International, Section IV: 239 - 244.

**MITCHELL, D. A. y B. K. LONSANE** (1992). Definition, characteristics and potential. En: Solid Substrate Cultivation, Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. (Eds.), Elsevier Sci. Pub. England, Cap. 1: 1 - 16.

## **BIBLIOGRAFIA**

- MITCHELL, D. A; Z. TARGONSKI; J. ROGALSKI y A. LEONOWICZ** (1992). Substrates for processes. En: Solid Substrate Cultivation, Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. (Eds.), Elsevier Sci. Pub. England, Cap. 3: 29 - 52.
- MONTGOMERY, D. C.** (1991). Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica, México, 589 p.
- MUDGETT, R. E.** (1986). Solid-state fermentations. En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Demain A. L. y Solomon N. A. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, Cap. 7: 66 - 83.
- MYERS, R. H.; A. I. KHURI y W. H. CARTER** (1989). Response surface methodology: 1966- 1988. *Technometrics*, 31: 137 - 157.
- NEVILLE, A. C.** (1975). Biology of the arthropod cuticule. Springer Verlag K. G., Berlin: 71 - 123.
- PELCZAR, J. M.; R. D. REID y E. C. S. CHAN** (1982). Hongos: Los mohos. En: Microbiología, Segunda Edición, MacGraw-Hill, México, Cap. 15: 247 - 270.
- PERRY, R. H. y D. GREEN** (1984). Perry's chemical engineer's handbook. Sixth Edition. McGraw-Hill, New York.
- PIRT, S. J.** (1985). Principles of microbe and cell cultivation., Blackwell Scientific Publications Great Britain, Cap. 23: 234 - 242.
- PRIOR, B. A.; J. C. Du PREEZ y P. W. REIN** (1992). Environmental parameters. En: Solid Substrate Cultivation, Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. (Eds.), Elsevier Sci. Pub. England, Cap. 5: 65 - 85.
- RAIMBAULT, M.** (1980). Fermentation en milieu solide: croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Tesis de Doctorado en Ciencias. Travaux et Documents de L'ORSTOM. Francia, 291 p.
- RAMANA-MURTHY, M. V.; N. G. KARANTH y K. S. M. S. RAGHAVA RAO** (1992). Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.*, 38: 99 - 147.
- RATHBUN, B. L. y M. L. SHULER** (1983). Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations: Design of fermentation chambers. *Biotechnol. Bioeng.*, 25: 929 - 938.
- ROBERTS, D. W. y A. R. HUMBER** (1981). Entomogenous fungi. En: Biology of Conidial Fungi, Garry T. C. y Kendrick B. (Eds.), Ac. Press, Vol. 2, Cap. 21: 201 - 236.

**ROMBACH, M. C.; R. M. AGUDA y D. W. ROBERTS** (1988). Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in different liquid media and subsequent conidiation of dry mycelium. *Entomophaga*, 33: 315 - 324.

**ROUSSOS, S.** (1985). Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: physiologie, sporulation et production de cellulases. These Doctorat. Université de Provence. Francia, 163 p.

**SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.** (1991). Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castelii* cultivé sur support solide. These Doctorat. Université Montpellier II Sciences Techniques du Languedoc. Francia, 212 p.

**SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; M. R. TREJO-HERNÁNDEZ; B. K. LONSANE; J. M. NAVARRO; S. ROUSSOS y M. RAIMBAULT** (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations.

**SMITH, J. E.** (1975). The structure and development of filamentous fungi. En: The Filamentous Fungi. Vol. 1: Industrial Mycology. Smith J. E. y Berry D. R. (Eds.), Edward Arnold, Londres, Cap. 1: 1 - 15.

**SOCOL, C. R.** (1992). Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+) lactique. These Doctorat. Université de Technologie de Compiègne. Francia, 218 p.

**STUDDERT, P. S.; H. K. KAYA y J. M. DUNIWAY** (1990). Effect of water potential, temperature, and clay-coating on survival of *Beauveria bassiana* conidia in a loam and peat soil. *J. Invert. Pathol.*, 55: 417 - 427.

**STUDDERT, P. S. y H. K. KAYA** (1990a). Water potential, temperature, and clay-coating of *Beauveria bassiana* conidia: effect on *Spodoptera exigua* pupal mortality in two soil types. *J. Invert. Pathol.*, 56: 327 - 336.

**STUDDERT, P. S. y H. K. KAYA** (1990b). Water potential, temperature, and soil type on the formation of *Beauveria bassiana* soil colonies. *J. Invert. Pathol.*, 56: 380 - 386.

**THOMAS, K. C.; G. G. KHACHATOURIANS y W. M. INGLEDEW** (1987). Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. J. Microbiol.*, 33: 12 - 20.

**TRILLI, A.** (1986). Scale-up of fermentation. En: Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain A. L. y Solomon N. A. (Eds.), American Society of Microbiology, Washington, Cap. 22: 277 - 307.

**TRINCI, A. P. J.** (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.*, 57: 11 - 24.

## **BIBLIOGRAFIA**

**TRINCI, A. P . J.** (1971). Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *J. Gen. Microbiol.*, 67: 325 - 344.

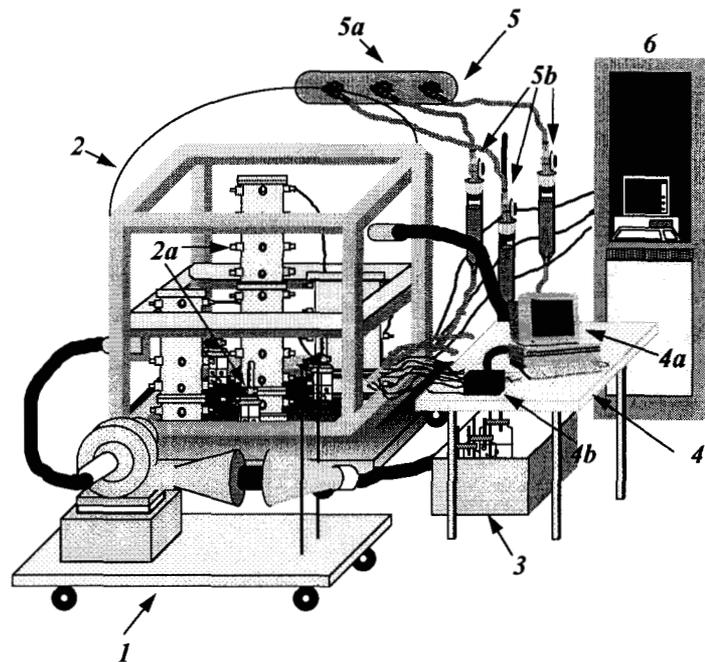
**VÉZINA, C. y K. SINGH** (1975). Transformation of organic compounds by fungal spores. En: *The Filamentous Fungi. Vol. 1: Industrial Mycology.* Smith J. E. y Berry D. R. (Eds.), Edward Arnold, Londres, Cap. : 158 - 192.

**ANEXOS**

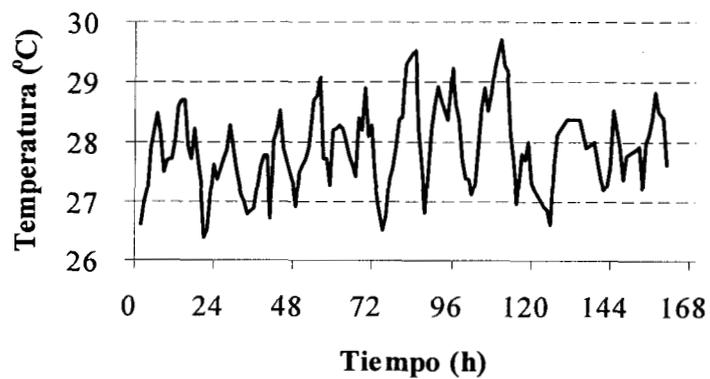
## ANEXO I

Sistema de fermentación y captura de datos utilizado en los experimentos de escalamiento.

- 1)- Sistema de calentamiento de la cámara
- 2)- Cámara de temperatura controlada
- 2a)- Reactores modulares y humidificadores internos
- 3)- Baño de temperatura y humidificadores externos
- 4)- Sistema para la medición de temperatura
- 4a)- Computadora con el programa para la captura y calibración de datos
- 4b)- Tarjeta o interfase del sistema de medición de temperatura
- 5)- Sistema de alimentación de aire
- 5a)- Distribuidor
- 5b)- Filtros
- 6)- Sistema para la medición de gases



**PERFIL DE TEMPERATURA DEL AIRE EN LA CAMARA DE TEMPERATURA CONTROLADA**

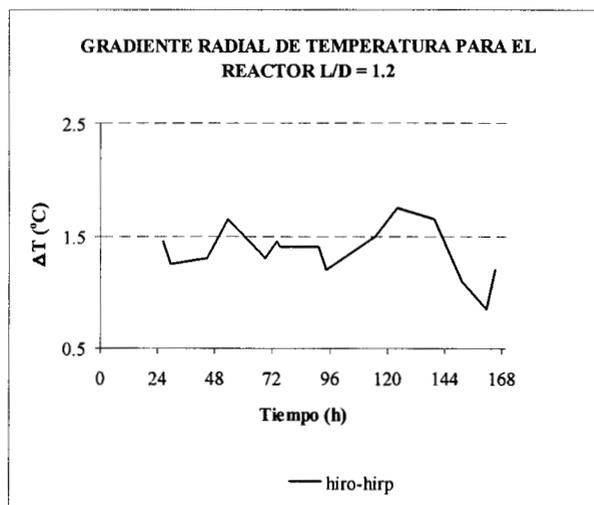
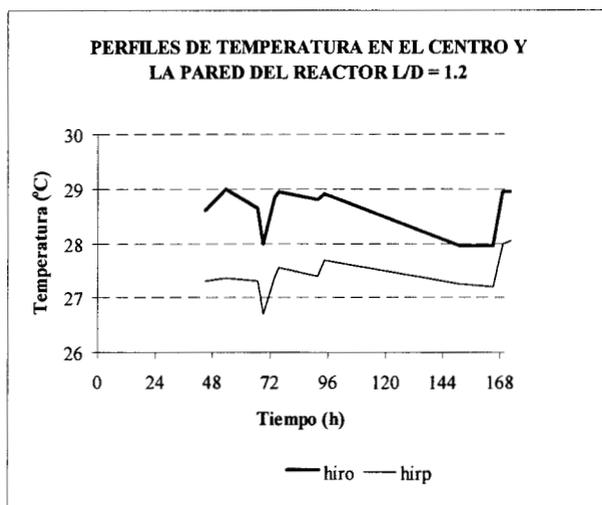


## ANEXO II

Colocación de los termopares para el registro de temperatura en los Reactores Grandes.

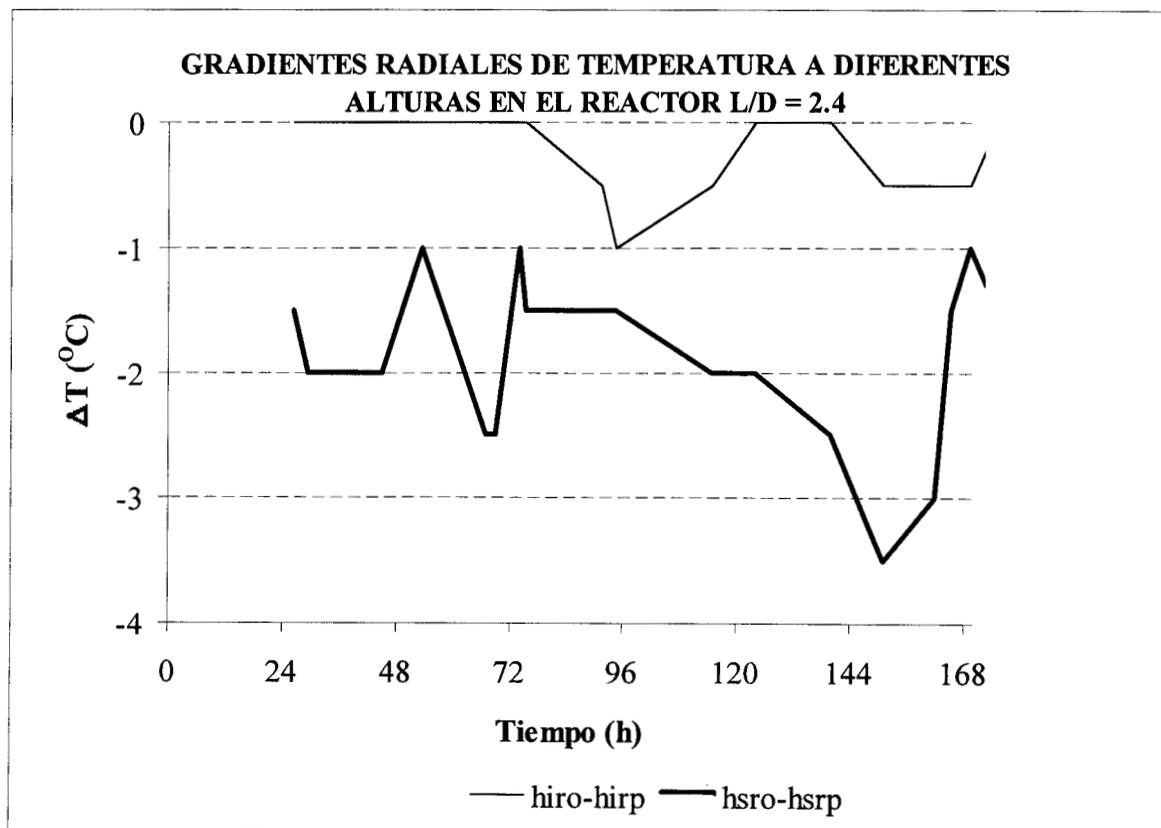
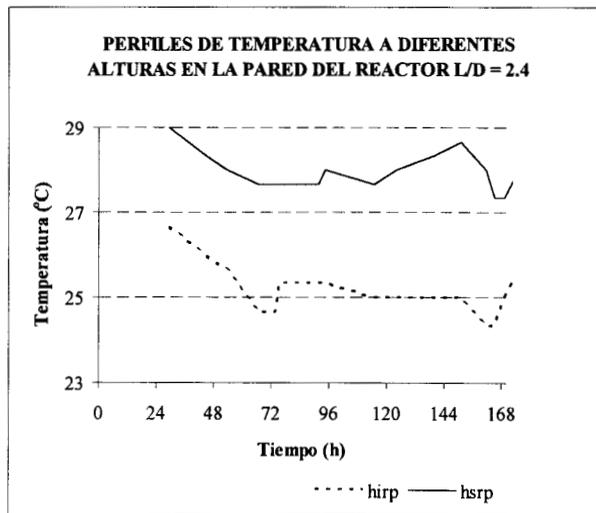
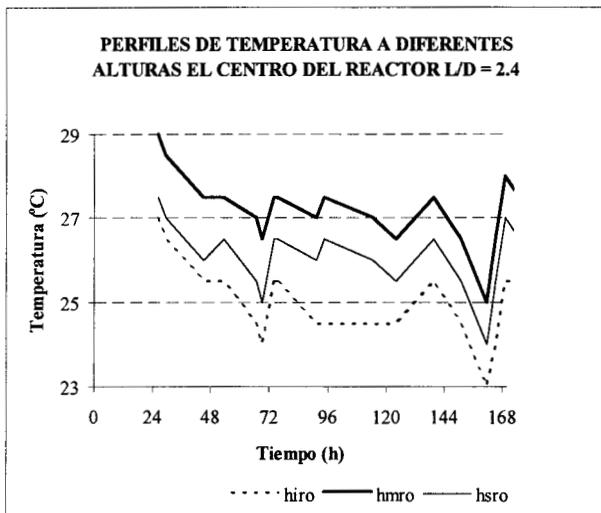
Relación L/D	Posiciones de los termopares (cm)			Altura total del lecho (cm)
	hi	hm	hs	
1.2	3.0	-	-	13.0
2.4	3.0	11.0	19.0	26.0
4.8	11.0	27.0	43.0	52.0

Comportamiento de la temperatura en el Reactor Grande (L/D = 1.2)



### ANEXO III

#### Comportamiento de la temperatura en el Reactor Grande (L/D = 2.4)



## ANEXO IV

## Comportamiento de la temperatura en el Reactor Grande (L/D = 4.8)

