



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

SPORES AND BIOMASS OF *BEAUVERIA BASSIANA* IN LIQUID MEDIA SUPPLEMENTED WITH *EURYSACCA MELANOCAMPTA* AND *PERONOSPORA FARINOSA*

OBTENCIÓN DE ESPORAS Y BIOMASA DE *BEAUVERIA BASSIANA* EN MEDIOS LÍQUIDOS SUPLEMENTADOS CON *EURYSACCA MELANOCAMPTA* Y *PERONOSPORA FARINOSA*

Pedro Laynes; Rosalyn Acuña & Ana Gutiérrez

Universidad Nacional Federico Villarreal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM). Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Jr. Rfo Chepen s/n. El Agustino. Lima – Perú
anaisabelflor@gmail.com

The Biologist (Lima), 14(1), jan-jun: 75-87.

ABSTRACT

The aim of this investigation was to study the growth of *Beauveria bassiana*, grown in liquid media supplemented with minimum media with more artificial substrate (glucose, laminarin o colloidal chitin) and with minimum media with more natural substrate from *E. melanocampta* or *Peronospora farinosa*, for which we evaluated the number of spores and biomass. For this was used the CCB-LE 262 strain of *B. bassiana*, which was inoculated in different culture media and for which growth was evaluated after 24 h, 96 h and 216 h. Our results indicate that the highest number of spores was obtained in the artificial culture medium supplemented with laminarin (ML), with spores $67.80 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, whereas the best natural media was that supplemented with powder of *E. melanocampta* (M_{Em}), with $18.53 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ spores. The highest biomass was obtained at 96 h in the artificial medium of colloidal chitin (MM+QC), with $5.085 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; biomass at 216 hours for the natural medium M_{Em} , was $8.59 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. We conclude that the *in vitro* culture of *B. bassiana*, supplemented with laminarin, colloidal chitin and *E melanocampta* substrates, induce spore formation and high biomass.

Keywords: *Beauveria bassiana* – *Eurysacca melanocampta* – quitin colloidal – laminarin

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue estudiar el crecimiento de *Beauveria bassiana*, cultivado en medios líquidos suplementados con medio mínimo más sustratos artificiales (glucosa, laminarina o quitina coloidal) y con medio mínimo más sustratos naturales provenientes de *Eurysacca melanocampta* o *Peronospora farinosa*, para lo cual se evaluó el número de esporas y la cantidad de biomasa. Para ello se utilizó la cepa de *B. bassiana* CCB-LE 262, la cual fue inoculada en diferentes medios líquidos y donde se evaluó su crecimiento durante las 24 h, 96 h y 216 h. Nuestros resultados indican que a las 216 h la mayor cantidad de esporas se obtuvo en el medio artificial suplementado con laminarina (ML), con $67,80 \text{ esporas} \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, mientras que el mejor medio natural fue el suplementado con polvo de *E. melanocampta* (M_{Em}) con $18,53 \text{ esporas} \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$. La mejor biomasa se encontró a las 96 h, en el medio artificial de quitina coloidal (MQ) con $5.085 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y a las 216 h para el medio natural M_{Em} fue de $8,59 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Se concluye que el cultivo *in vitro* de *B. bassiana*, suplementados con sustratos de laminarina, quitina coloidal y *E. melanocampta* inducen la formación de esporas y de biomasa.

Palabras clave: *Beauveria bassiana* – *Eurysacca melanocampta* – quitina coloidal – laminarina

INTRODUCCIÓN

La polilla de la quinua, *Eurysacca melanocampta*, Meyrick, 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae), también llamada “kcona kcona”, es la plaga más importante del cultivo de quinua y se caracteriza porque en su estado larval destruye los granos de quinua maduros y en formación, observándose que cuando las infestaciones son altas (hasta 250 larvas/planta), llegan a destruir por completo la producción del cultivo (Aroni *et al.* 2009, Costa *et al.* 2009).

Por otra parte el Oomicete *Peronospora farinosa* f. sp. *chenopodii* FR. 1849 (llamada también *Peronospora variabilis* Gäum o *Peronospora variabilis* f. sp. *Chenopodii* Byford) ocasiona la enfermedad del “mildiu” en la quinua, afectando al follaje de la planta durante su crecimiento, formando áreas cloróticas grandes e irregulares que inicialmente se observan como clorosis en la cara superior y finalmente produciendo necrosis, lo cual tiene un efecto sobre su desarrollo y crecimiento (Danielsen & Ames 2010).

Los hongos entomopatógenos Hyphomycetes son componentes importantes y están presentes en la mayoría de los ecosistemas terrestres (Mishra *et al.* 2013, Husnain *et al.* 2014). Pueden ser usados como elementos importantes del manejo integrado de plagas (MIP) (Prasad & Pal 2014, Khan *et al.* 2013) y así enfrentar el aumento de la resistencia a insecticidas y mitigar las consecuencias ambientales por el uso de plaguicidas (Pham *et al.* 2009, Senthamizhlselvan *et al.* 2010, Nahayo & Bayisenge 2012, Husnain *et al.* 2014). Una ventaja clave de estos agentes de control microbiano es su fácil producción en masa y almacenamiento, manteniéndose eficaces en un amplio rango de temperaturas y niveles de humedad, además de persistir en el medio ambiente, ofreciendo supresión continua de las poblaciones de plagas de insectos (Subramanian & Punamalai 2013, Prasad & Pal 2014).

Beauveria bassiana (Ascomycota: Hypocreales), pertenece a esta clase de hongos y crece formando conidios y/o esporas; cuyo mecanismo de acción se da cuando las esporas entra en contacto con el cuerpo de un insecto huésped, germinan y penetran en la cutícula

creciendo dentro del insecto y matándolo en cuestión de días. De allí que sea considerado un hongo eficiente como agente de control biológico, que además, no requiere ser ingerido (Pedrini *et al.* 2007, Dhar & Kaur 2010, Mishra *et al.* 2013).

Las formas miceliales de *B. bassiana* se caracterizan por llevar esporas asexuales llamadas conidios que sirven como propágulos infectivos y son dispersadas por el viento (Mustafa & Kaur 2009, Subramanian & Punamalai 2013). En sustratos sólidos, estos hongos producen abundantes conidios aéreas que son susceptibles de almacenamiento como preparaciones secas; a diferencia de esto, en cultivo sumergido crecen con alta producción y concentraciones de propágulos vegetativos levaduriformes y otros llamados blastosporas que son típicamente más grandes que las conidios aéreas (Vega *et al.* 2003, Lohse *et al.* 2014). Thomas *et al.* (1987) y Jenkins *et al.* (1993), mencionan que las células hifales, también llamadas cuerpos hifales o blastosporas, suelen ser el único tipo de propágulos producidos en los esquemas de fermentación líquidos. Sin embargo, la patogenicidad de las blastosporas y esporas aéreas es la misma (Subramanian & Punamalai 2013).

El objetivo de este trabajo fue obtener esporas y biomasa en medios líquidos suplementados con *E. melanocampta* y *P. farinosa*; para lo cual se evaluó el número de esporas y cantidad de biomasa expresada en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa del hongo

La cepa de *B. bassiana* fue obtenida del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) con código CCB-LE 262, cultivada y almacenada en arroz. Se hicieron diluciones hasta obtener un cultivo

monospórico con el medio sólido agar-papa-glucosa (APG), de donde fue seleccionada una sola cepa, y cultivada por cuatro días, en el medio líquido enriquecido glucosa-peptona-extracto de levadura (GPE). La nueva cepa fue denominada BbQcR1, y con ella se realizaron todos los experimentos posteriores.

Medio de enriquecimiento líquido

Este medio, se formuló con la finalidad de obtener una cepa con crecimiento uniforme y en óptimas condiciones nutricionales para poder ser utilizada en los distintos medios a evaluar. Para ello se preparó 100 ml del medio GPE: (Glucosa 4% p/v, Peptona 1% p/v y Extracto de levadura 1% p/v) a pH a 5,6. Al medio se le añadió el inóculo de *B. bassiana* y fue mantenido a temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$), en un agitador orbital (Orbital Genie 2013) a 130 rpm por cuatro días. Posteriormente el contenido fue centrifugado 3000 rpm y lavado con suero fisiológico para recuperar las esporas.

Medios de cultivo suplementados

Se prepararon seis diferentes medios de cultivo. El medio mínimo (MM), a base de 0,6 g de NaNO_3 ; 0,052 g de KCl; 0,202 g de $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ y 0,102 g de MgSO_4 (SIGMA), y 40 μL de elementos traza, acorde al método propuesto por Fernandes *et al.* (2012), este medio fue la base para preparar los otros medios. Se prepararon tres medios de cultivo líquido de 20 mL cada uno a pH 5,6, los cuales contenían el medio mínimo más uno de los siguientes sustratos: glucosa 0,1 % p/v + MM (MG), laminarina 0,1 % p/v + MM (ML) y quitina coloidal 2 % p/v + MM (MQ), a los cuales se les denominó "Artificiales". Además, se prepararon dos medios de cultivo conteniendo el medio mínimo más uno de los siguientes sustratos: *E. melanocampta* 0,1 % p/v + MM (ME_m) o *P. farinosa* 0,1 % p/v + MM (MP_f), a los cuales se les denominó "Naturales". Los medios naturales fueron hechos a partir de larvas de *E. melanocampta* secadas al horno y trituradas, de igual forma se

extrajeron hojas de quinua infestadas con *P. farinosa*, que fueron secadas al horno y trituradas hasta hacerlas polvo antes de su uso como sustratos. La preparación de quitina coloidal se realizó de acorde al método propuesto por Castro *et al.* (2010). Posteriormente, los seis medios se esterilizaron a 121°C por 15 min y a cada uno de ellos se les añadió un inóculo de *B. bassiana* a una concentración de 1×10^6 esporas·mL⁻¹. La temperatura de incubación fue de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ en cabina con movimiento rotatorio de 130 rpm.

Evaluación de medios de cultivo

Se hicieron tres repeticiones para cada medio de cultivo y se fijaron tres tiempos de evaluación 24 h, 96 h y 216 h. Luego de cada tiempo de cultivo se retiró del matraz 1,0 mL del extracto crudo para realizar el conteo de esporas·mL⁻¹ y se midió el volumen restante del matraz, el cual fue centrifugado en microtubos previamente pesados para separar la biomasa del sobrenadante. El precipitado de cada tubo fue secado al horno a 30°C por 48 h y pesado para su posterior evaluación de producción de biomasa en mg·mL⁻¹.

Diseño experimental y Análisis de datos

En este trabajo se manejaron los datos

obtenidos en un diseño factorial de dos vías (seis tratamientos x tres tiempos). Siendo: $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$. Dónde: y_{ijk} = Es la variable dependiente a analizar en el *i*-ésimo tratamiento (*i*=(1) MM, (2) ML 0,1%; (3) MG 0,1 %; (4) MQ 2 %, (5) MEm 0,1% y (6) MPf 0,1%) del *j*-ésimo tiempo (*j*=(1) 24 h, (2) 96 h y (3) 216 h), en la repetición *k* (*k*=1 al 3). Las variables dependientes fueron: (1) Número de esporas y (2) Cantidad de Biomasa. Los datos se acumularon en una hoja de Excel y se analizaron en forma individual. Se realizó el ANOVA de los tratamientos para cada tiempo así como la comparación de medias empleando el estadístico de Tukey ($\alpha=0,05$) (Microsoft excell 2007).

RESULTADOS

El crecimiento de las esporas de *B. bassiana* en los diferentes medios de cultivo presentó características morfológicas distintas. Algunos medios mostraron sólo esporogénesis, mientras que, en otros, abundaron las ramificaciones de hifas. En el MM, *B. bassiana* creció formando pequeñas esporas sumergidas y sin presencia de hifas. En los

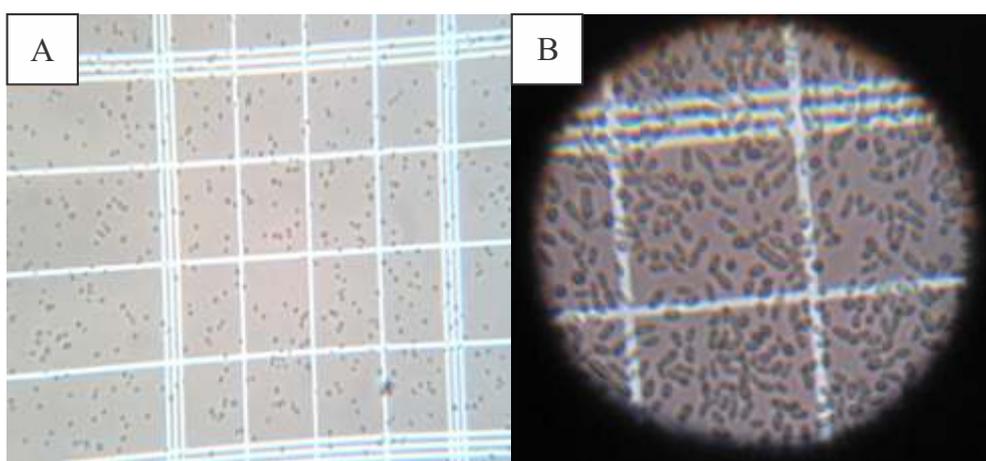


Figura 1. Esporas de *Beauveria bassiana*, en MM+Laminarina donde predominan los conidios sumergidos en gran cantidad, sin presencia de hifa. Aumento en microscopio óptico: A) 40 X y B) 100 X.

medios denominados artificiales *B. bassiana* creció de la siguiente forma: para ML se observó predominancia de gran cantidad de esporas sumergidos, sin presencia de hifas (figura 1), para el MG, se observó formación de esporas, ramificaciones de hifas y conidiosporos y en el MQ, se obtuvo un crecimiento de hifas y ramificaciones a partir de las 96 h y en mayor cantidad a las 216 h. En los medios denominados naturales, en *MEM* se observó mayor presencia de masa hifal ramificada a partir de las 24 h y poca presencia de esporas y para MPf se observó producción de conidios sumergidos.

El ANOVA determinó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los medios de prueba para cada uno de los tiempos evaluados. Al realizar las comparaciones múltiples con el estadístico de Tuckey ($\alpha = 0,05$), se observaron diferencias significativas para conidios (Figura 2) y biomasa (Figura 3).

En la figura 2, se observa que el medio artificial con laminarina (ML) obtuvo el mayor número de esporas, ($2,2 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$; $59,68 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ y $67,80 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, a las 24 h, 96 h y 216 h, respectivamente), mientras que entre los medios naturales, el suplementado con polvo de *E. melanocampta* (*MEM*) obtuvo el mayor número de esporas a través del tiempo: $1,61 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ (24 h), $10,23 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ (96 h) y $18,53 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ (216 h).

En la figura 3 se muestra la cantidad de biomasa ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) producida en cada medio suplementado, observándose el máximo valor en el medio natural *MEM* a las 216 h, con $8,59 \pm 1,729 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de biomasa. Mientras que entre los cultivos artificiales los mayores valores se ubican a las 96 h ($p < 0,05$) en el medio MQ con $5,085 \pm 0,848 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de biomasa.

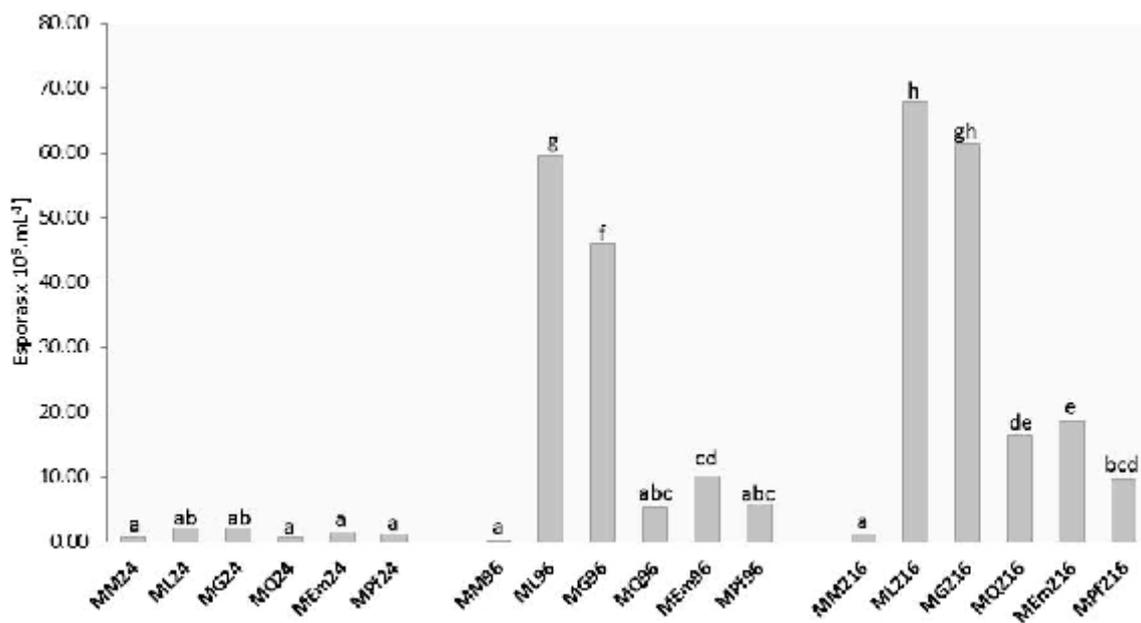


Figura 2. Número de esporas $\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$, producidos por *Beauveria bassiana* a las 24 h, 96 h y 216 h en los diferentes medios de prueba. MM= Medio mínimo; MG=Medio mínimo+Glucosa; ML= Medio mínimo+Laminarina; MQ=Medio mínimo+ Quitina Coloidal; *MEM*=Medio mínimo+polvo de *Eurysacca melanocampta*; MPf=Medio mínimo+polvo de *Peronospora farinosa*. Tukey ($\alpha = 0,05$).

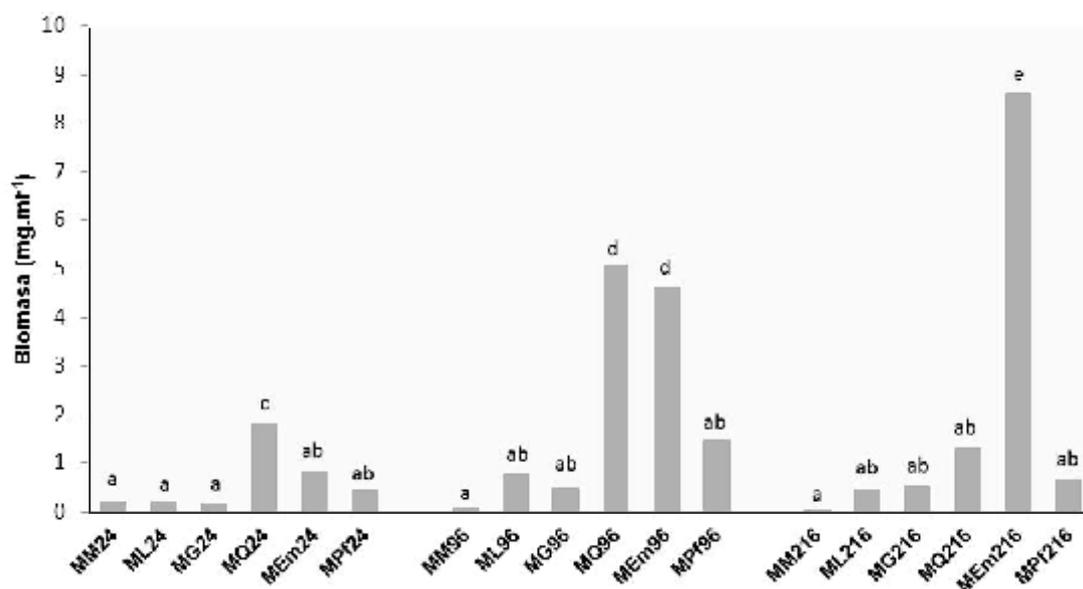


Figura 3. Cantidad de biomasa ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) producidos por *Beauveria bassiana* a las 24 h, 96 h y 216 h en los diferentes medios de prueba. MM= Medio mínimo; MG=Medio mínimo+Glucosa; ML= Medio mínimo+Laminarina; MQ=Medio mínimo+QuitinaColoidal; MEm=Medio mínimo+polvo de *Eurysacca melanocampta*; MPf=Medio mínimo+polvo de *Peronospora farinosa*. Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabla 1. Cantidad de Biomasa ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) *Beauveria bassiana* en los diferentes medios de cultivo, a las 24 h, 96 h y 216 h.

Tiempo (h)	MEDIO	Promedio Biomasa ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DS
24	MM	0,19635	0,073
	MG	0,28189	0,171
	ML	0,21185	0,059
	MQ	1,82986	0,151
	MEm	0,84557	0,121
	MPf	0,44498	0,011
96	MM	0,07473	0,032
	MG	0,49962	0,107
	ML	0,76387	0,247
	MQ	5,08515	0,848
	MEm	4,64198	0,184
	MPf	1,47400	1,367
216	MM	0,05926	0,011
	MG	0,51667	0,034
	ML	0,46500	0,032
	MQ	1,78058	0,842
	MEm	8,59275	1,729
	MPf	0,67087	0,044

MM= Medio mínimo; MM+G=Medio mínimo+Glucosa; MM+L= Medio mínimo+Laminarina; MM+QC=Medio mínimo+QuitinaColoidal; MM+Em=Medio mínimo+polvo de *Eurysacca melanocampta*; MM+Pf=Medio mínimo+polvo de *Peronospora farinosa*.

En la tabla 1 observamos que en el MM la biomasa decrece con el tiempo. Dentro de los medios artificiales encontramos que en el MG la biomasa aumenta hasta las 96 h y se mantiene casi sin variar hasta las 216 h; mientras que en ML y MQ alcanzan la mayor cantidad de biomasa a las 96 h. En los medios naturales encontramos que el medio MEm incrementa la cantidad de biomasa a partir de las 24 h ($0,845 \pm 0,121 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) hasta las 216 h ($8,593 \pm 1,73 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); mientras que MPf alcanza su mayor cantidad de biomasa a las 96 h ($1,474 \pm 1,37 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

DISCUSIÓN

Esporas

En nuestra investigación encontramos que *B. bassiana* en el medio (MM) desarrollo escaso números de esporas, a diferencia de los medios artificiales y naturales donde el número de esporas se incrementó desde las 24 h hasta las 216 h, esto debido a que en estos medios además de sales poseían otros nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo.

Beauveria bassiana en los medios de cultivo artificiales como laminarina (ML) y glucosa (MG) mostró un buen crecimiento de esporas sumergidas durante los tres tiempos de evaluación, teniendo esporas más abundantes en laminarina a las 216 h ($67,796 \times 10^6$ esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$). Nosotros suponemos que en el caso de glucosa, esta es una fuente de carbono que pudo ser utilizada fácilmente por *B. bassiana* en la formación de esporas, en cambio laminarina es un polímero ramificado, con moléculas de glucosas unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow3)$ en su cadena lineal y con moléculas de glucosas unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow6)$ en las ramificaciones, por lo cual, para que este sustrato pueda ser utilizado como fuente de carbono por *B. bassiana*, esta debe activar sus enzimas exo y endo $\beta(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow6)$

glucanasas para liberar las moléculas de glucosa. Al activarse estas glucanasas en los hongos, ellas cumplen varias funciones entre las cuales está la diferenciación y división celular, el crecimiento del hongo y la movilización de los β -glucanos (El-Katatny *et al.* 2001, Viterbo *et al.* 2002, Ting & Chai 2014), lo cual explicaría porque en el ML este sustrato favoreció en este estudio, el alto número de esporas encontrados y la baja producción de biomasa (Smith & Grula 1981, Santa *et al.* 2005, Pereira *et al.* 2007).

Sin embargo, en el medio de cultivo MPf (natural), aunque se ve un aumento en la formación de esporas de *B. bassiana*, esta no supera al medio MEm, ni a los medios artificiales, ello se debe a que *P. farinosa* como oomiceto presenta paredes celulósicas. La celulosa es un polímero de glucosas, las cuales se mantienen unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos, permitiendo formar cadenas largas y lineales, unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno intramolecular, formando una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Chou *et al.* 1981, Fan *et al.* 1982). Para hidrolizar a este polímero es necesaria la acción secuencial y sinérgica de exo y endo- β -1,4-glucanasas y de la β -1,4-glucosidasa, que actúan en diferentes sitios para la hidrólisis (Lee 1997) y que dan como productos oligosacáridos, glucosa y celobiosa, siendo esta última un inhibidor de las exo y endo- β -1,4-glucanasas (Hahn-Hagerdal & Palmqvist 2000), lo cual trae como consecuencia la disminución de la eficiencia de la hidrólisis y por tanto una disminución de la fuente de carbono (Sahab & Sabbour 2011).

El número de esporas obtenido en el medio artificial MQ, al compararlo con los medios MG y ML sólo alcanzó el 33,18% a las 24 h, el 8,71% a las 96 h y el 24,4% a las 216 h, observándose además hifas muy ramificadas desde las 24 h de cultivo. La fuente de carbono y nitrógeno de este medio, para *B. bassiana*,

fue la quitina obtenida de la caparazón de crustáceos, la cual es un polisacárido lineal compuesto de unidades repetitivas de quitobiosas (N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), unidas por enlace glicosídicos del tipo β -(1 \rightarrow 4)) (Merzendorfer & Zimoch 2003). *B. bassiana* frente a este sustrato debe inducir la actividad de sus enzimas quinasas, las cuales presentan homología en cuanto a la función que desempeñan en nutrición, pero también presentan cierta actividad en el desarrollo de los procesos de morfogénesis. Sin embargo, el efecto inhibitorio sobre la conidiogénesis de *B. bassiana*, puede deberse a que en el medio de cultivo aumento la concentración de los productos de la hidrólisis, entre ellos GlcNAc, el cual es un inhibidor de las quitinasas (St Leger *et al.* 1986, Merzendorfer & Zimoch 2003, Campos *et al.* 2005).

El número de esporas en el medio natural MEm fue mayor a través del tiempo, en 124% a las 24 h, 96,7% a las 96 h y 12,03% a las 216 h, al compararlo con el medio artificial MQ. El alza del número de esporas a las 24 h y 96 h puede deberse a que *B. bassiana* tenía como sustrato a *E. melanocampta*, y sabemos que los insectos tiene como constituye principal de su cutícula a la quitina (St. Leger *et al.* 1986, Merzendorfer & Zimoch 2003, Mohanty & Prakash 2004, Fang *et al.* 2005). El hecho de que a las 216 h se vea disminuido el porcentaje de producción de esporas puede deberse a la presencia de altas concentraciones de GlcNAc, pero también a la presencia de otros azúcares y/o metabolitos que se puedan generar por el sustrato y servir como inhibidores de las quitinasas y otras hidrolasas. Gerding-González *et al.* (2007) menciona a Kubicek *et al.* (2001) y Manjula *et al.* (2004) quienes han demostrado que las quitinasas tienen un efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas de varios hongos patógenos e hipotéticamente en varios hongos que contienen quitina en su pared celular.

Biomasa

Para cualquier organismo, una eficiente producción de biomasa y de los metabolitos de interés depende en gran medida de las fuentes de nutrientes, su composición y un adecuado balance entre estas fuentes. La relación carbono-nitrógeno (C/N) es un factor importante que afecta la formación del micelio y del cuerpo fructífero de los hongos, aunque se ha encontrado poco efecto sobre la producción de intra y exo-polisacáridos (Kim *et al.* 2002, Lee *et al.* 2007, Pham *et al.* 2009). Además, la velocidad de crecimiento de *B. bassiana* es típica de un hongo mesófilo y se ve afectada por la temperatura, por lo que presenta un crecimiento vegetativo óptimo entre 25 y 30°C (Sinia 2013, Romano 2013), rango de temperatura en que se cultivó a *B. bassiana*.

En el MM se obtuvo la menor cantidad de biomasa de *B. bassiana* en todos los tiempos, ello se debe a que este medio carecía de fuentes de carbono, nitrógeno y otros factores requeridos en la producción de biomasa, demostrándose que un medio sólo con sales no favorece la biomasa e inclusive diferentes concentraciones o clases de sales no tienen un efecto positivo sobre la producción de biomasa (Hsieh *et al.* 2006).

En el MG se observó que la producción de biomasa de *B. bassiana* fue 43,9% más que en el MM a las 24 h, y de 77% a las 96 h, permaneciendo casi invariable a las 216 h, esto se debe a que el medio carecía de fuente de nitrógeno, lo cual conduce a una menor producción de biomasa como lo han demostrado las investigaciones de Kim *et al.* (2002) para el hongo *Pleurotus tuber-regium* (Rumph. ex Fr.) Singer, Wu *et al.* (2004) para el hongo *Isaria cicadae* (= *Paecilomyces sinclairii*) Miq., Lee *et al.* (2007) para el hongo *Ganoderma lucidum* (= *G. applanatum*) (Curtis) P.Karst y Torres *et al.* (2011) para el hongo *G. lucidum*.

En el ML, la biomasa de *B. bassiana* se incrementó 8,03% a las 24 h con respecto al MM, y tuvo su mayor producción (0,764 mg·mL⁻¹) a las 96 h, disminuyendo a las 216 h, lo cual se puede explicar por la falta de fuente de carbono disponible, relación C/N adecuada, presencia de celobiosa (producto hidrolisis) como inhibidor de las exo y endo- β -1,4-glucanas (Lee 1997, Hahn-Hagerdal & Palmqvist 2000), o por falta de otros nutrientes relacionados a la producción de la biomasa, la cual en algunas estudios demuestran que hay una correlación negativa entre producción de esporas y de biomasa (Gessner 1997).

Como se observa en la Tabla 1, en el MQ (artificial) la producción de biomasa de *B. bassiana* se incrementó (5,085 \pm 0,85 mg·mL⁻¹, hasta las 96 h), con respecto al MM y medios artificiales (MG, ML) y ello se debe a la estructura del sustrato (quitina coloidal), cuyas unidades estructurales están compuestas de N-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc), las cuales por molécula tiene una relación carbono/nitrógeno de 8/1. Según Wallander *et al.* (2003) dicen que la relación C/N de la biomasa fúngica debe ser alrededor de 20/1, sin embargo se ha encontrado que el valor óptimo de esta relación en los medios de cultivo usados para el crecimiento de los hongos es específico para cada especie. Así por ejemplo, se han encontrado como relaciones óptimas para la producción de biomasa micelial de hongos, relaciones C/N de 20/1 para *Isaria cicadae*, 24/1 para *P. tuber-regium*, de 40/1 para *Antrodia cinnamomea* Chang & Chou e incluso de 129/1 para *G. lucidum* (Lin & Chen 2007, Lee *et al.* 2007, Kim *et al.* 2002, Wu *et al.*, 2004). La disminución de la biomasa a las 216 h se explica porque las enzimas que hidrolizan este sustrato (quitinasas) son inhibidas por altas concentraciones de GlcNAc, que se deben estar liberando al medio. Además que otras investigaciones han demostrado que estas enzimas inhibe el alargamiento del tubo germinativo (Manjula *et al.* 2004) y produce lisis en los extremos de las

hifas (Ordentlich *et al.* 1988).

El crecimiento de *B. bassiana* en el MPf (natural) produjo más biomasa que el MM, pero frente a los medios artificiales MG y ML, su comportamiento fue de baja producción de biomasa, ello se explica porque *P. farinosa* en sus paredes contiene celulosa, que es resistente a la hidrólisis (Ljungdahl & Eriksson 1985) y que uno de sus productos de hidrólisis, la celobiosa es un inhibidor de las exo y endo glucanasas que ayudan a degradar a este polímero (Lee 1997).

En el medio suplementado con *E. melanocampta* (ME_m) la producción de biomasa para *B. bassiana* fue significativamente mayor (p>0,05) a las 216 h (8,593 mg·mL⁻¹ biomasa), al compararla con los otros medios de esta investigación. La diferencia con el MQ es que este medio contenía como sustrato quitina de crustáceos la cual es ligeramente diferente, ya que mientras los grupos acetilo de la quitina de crustáceos se distribuye uniformemente a lo largo de la cadena polimérica, la quitina aislada de la cutícula de insectos (Merzendorfer & Zimoch 2003) y de las paredes celulares de los hongos contienen los residuos de acetilos concentrados en ciertos puntos del polímero. Hernández *et al.* (2008) observaron que su contenido de nitrógeno puede variar de 5 % a 8 % en función del grado de desacetilación. La degradación enzimática de la quitina produce una mezcla de quito-oligosacáridos de diferente tamaño y características (Struszczyk & Struszczyk 2007). Por lo tanto, nosotros suponemos que en el ME_m los productos de hidrólisis favorecieron la producción de biomasa, debido a que alcanzo una adecuada relación de C/N y los nutrientes necesarios para su crecimiento.

El cultivo de *B. bassiana in vitro* suplementado con sustratos como laminarina, quitina coloidal y *E. melanocampta* inducen un incremento del número de esporas y de biomasa.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (PNICP) y La Universidad Nacional Federico Villareal. Contrato N°189-FINCYT-IB-2013.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aroni, J.C.; Cayoja, M. & Laime, M. A. 2009. *Situación actual al 2008 de la Quinua Real en el altiplano sur de Bolivia. Oruro-Potosi*. Primera edición. Versión libre online.
- Campos, R.A.; Arruda, W.; Boldo, J.T.; Silva, M.V.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L.; Schrank, A. & Vainstein, M.H. 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*, 50: 257-261.
- Costa, J.; Jábar, E. & Gianol, E. 2009. Parasitismo sobre *Eurysacca melanocampta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) en dos Localidades de Cusco, Perú. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62: 4807-4813.
- Chou, T.Y.C.; Chang, M.M. & Tsao, G.T. 1981. Structure pre-treatment and hydrolysis of cellulose. *Advances in Biochemical Engineering*, 20:16-42.
- Danielsen, S. & Ames, T. 2010. *El mildiu de la quinua en la zona andina. Manual práctico para el estudio de la enfermedad y el patógeno*. CIP. Manual versión libre online. <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/10/AN60198.pdf>.
- Dhar, P. & Kaur, G. 2010. Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Biotechnology*, 9:8092-8099.
- El-Katatny, M.H.; Gudelj, M.; Robra, K.H.; Elnaghy, M.A. & Gübitz, G.M. 2001. Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *T. harzianum* Rifai T-24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 137-143.
- Fan L.T., Lee Y.H. & Gharpuray M.M. 1982. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering*, 23:158-187.
- Fang, W.; Leng, B.; Xiao, Y.; Jin, K.; Ma, J.; Fan, Y.; Feng, J.; Yang, X.; Zhang, Y. & Pei, Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 363-370.
- Fernandes, E. G.; Valério, H. M.; Feltrin, T.; & Van Der Sand, S. T. 2012. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43: 827-833.
- Gerding-González, M.; France, A.; Sepulveda, M.E. & Campos, J. 2007. Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formulation. *Biocontrol Science and Technology*, 17:105-110.
- Gessner, M. O. 1997. *Fungal biomass, production and sporulation associated with particulate organic matter in streams*. *Limnetica*, 13:33-44.
- Hahn-Hägerdal, B. & Palmqvist, E. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74: 25-33.
- Hernández, N.C.M.; Varo, A.W.E.; Leyva, R.N.; Ramirez, B.N.A. & Andrade, O.J. 2008. *Utilización de residuos de cáscara de camarón para la obtención de quitina*

- blanqueada: propuesta de una metodología en base de tratamientos alcalino-base y ozono.* Avances de la Investigación Científica en CUBCA, Universidad de Guadalajara. pp. 659-666.
- Hsieh, C.; Tseng, M.H. & Liu, C.J. 2006. Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041): under limitations of nutrients. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 109-117.
- Husnain, H.; Ali, A.S.; Irfan, M.U.H.; Ali, A. & Muhammed, U. 2014. Efficacy of Entomopathogenic Fungi as Biological Control agent against insect pests of *Gossypium hirsutum*. *Journal of Natural Sciences Research*, 4: 68-72.
- Jenkins, N.E. & Prior, C. 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycological Research*, 97: 1489-1494.
- Khan, N.; Tyagi, P. J. & Mishra, M. 2013. Isolation of *Beauveria Bassiana* from white Grubs and Comparing their growth on natural and artificial medium. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4: 415-420.
- Kim, S.; Hwang, H.; Xu, C.; Na, Y.; Song, S. & Yun, J. 2002. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*, 34: 389-393.
- Kubicek, C.P.; Mach, R.L.; Peterbauer, C.K. & Lorito, M. 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 83: 11-23.
- Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56: 1-24.
- Lee, W. Y.; Park, Y.; Ahn, J.K.; Ka, K.H. & Park, S. Y. 2007. Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharides from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 249-254.
- Lin, E. & Chen, Y. 2007. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. *Bioresource Technology*, 98: 2511-2517.
- Ljungdahl L.G. & Eriksson K.E. 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbial Ecology*, 8: 237-299.
- Lohse, R.; Jakobs-Schönwandt, D. & Patel, A. V. 2014. Screening of liquid media and fermentation of an endophytic *Beauveria bassiana* strain in a bioreactor. *AMB Express*, a Springer Open Journal, 4: 47.
- Manjula, K.; Kishore, G. & Podile, A. 2004. Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved more effective than cell free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 737-744.
- Mishra, S.; Kumar, P. & Malik, A. 2013. Effect of process parameters on the enzyme activity of a novel. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2: 49-56.
- Merzendorfer, H. & Zimoch, L. 2003. Review Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 4393-4412.
- Mohanty, S.S & Prakash, S. 2004. Extracellular metabolites of *Trichophyton ajelloi* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *Current Science*, 86: 323-325.
- Mustafa, U. & Kaur, G. 2009. Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Agricultural Research*, 3: 922-930.

- Nahayo, A. & Bayisenge, J. 2012. Biological control of coffee antestia bugs (*Antestiopsis lineaticolis*) by using *Beauveria bassiana*. New York Science Journal, 5: 106-113.
- Ordentlich, A.; Elad, Y. & Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology, 78:84-88.
- Pedrini, N.; Crespo, R. & Juárez, M.P. 2007. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 146:124-137.
- Pereira, J.L.; Noronha, E.F.; Miller, R.N.G. & Franco, O.L. 2007. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. Letters in Applied Microbiology, 44: 573-581.
- Pham, T. A.; Kim, J. J.; Kim, S. G. & Kim, K. 2009. Production of blastospore of entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a submerged batch culture. Mycobiology, 37:218-224.
- Prasad, C.S. & Pal, R. 2014. Mass Production and Economics of Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Verticillium lecanii* on agricultural and industrial waste. Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences, 1:28-32.
- Romano, 2013. *Producción y extracción de esporas del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin por fermentación en medio sólido*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad autónoma metropolitana-México.
- Sahab A.F. & Sabbour M.M. 2011. Virulence of four entomopathogenic fungi on some cotton pests with especial reference to impact of some pesticides, nutritional and environmental factors on fungal growth. Egyptian journal of biological pest control, 21: 61-67.
- Santa, H.S.D.; Santa, O.R.D.; Brand, D.; Vandenberghe, L.P.S. & Soccol, C.R. 2005. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues, Brazilian Archives of Biology and Technology, 48: 51-60.
- Senthamizhselvan, P.; Sujetha, J. A.R.P. & Jeyalakshmi, C. 2010. Growth, sporulation and biomass production of native entomopathogenic fungal isolates on a suitable medium. Journal of Biopesticides, 3: 466-469.
- Sinia, A. 2013. *Evaluation of the Fungi Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, and Clonostachys rosea as Bio-control Agents against the Honey Bee Parasitic Mite, Varroa destructor*. Tesis de doctorado. The University of Guelph-Canada.
- Smith R.J. & Grula, E.A. 1981. Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 3: 222-230.
- St. Leger, R.J.; Cooper, R.M.; Charnley, A.K. 1986. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. Journal of General Microbiology, 132: 1509-1517.
- Struszczyk, M.H. & Struszczyk, K.J., 2007. *Medical applications of chitin and its derivatives*. Polish Chitin Society, Monograph XII.
- Subramanian, C. & Punamalai, G. 2013. Optimization process for blastospore production of *Beauveria bassiana* isolates in poly ethylene glycol (peg) supplemented medium. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2: 114-122.
- Ting, A.S.Y. & Chai, J.Y. 2014. Chitinase and β -1,3-glucanase activities of *Trichoderma harzianum* response towards pathogenic and non-pathogenic isolates.
- Thomas, K.C.; Khachatourians, G.G. & Ingledew, W.M. 1987. Production and

- properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. Canadian Journal of Microbiology, 33:12-20.
- Torres L.A.M., Quintero D.J.C & Atehortua G.L. 2011. Efecto de nutrientes sobre la producción de biomasa del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. Revista Colombiana de Biotecnología, 13:103-109.
- Vega, F.E.; Jackson, M. A.; Mercadier, G. & Poprawski, T.J. 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 19: 363-368.
- Viterbo, A.; Ramot, O.; Chernin, L. & Chet, I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Anton van Leeuwenhoek, 81: 549-556.
- Wallander, H.; Nilsson, L. O.; Hagerberg, D. & Rosengren, U. 2003. Direct estimates of C:N ratios of ectomycorrhizal mycelia collected from Norway spruce forest soils. Soil Biology & Biochemistry, 35: 997-999.
- Wu, J.; Cheung, P.; Wong, K. & Huang, N. 2004. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. Food Chemistry, 85: 101-105.

Received November 7, 2015.
Accepted February 26, 2016.