



Qualitative analysis of the production of enzymes of *Beauveria bassiana* in solid fermentation using an inductor

Análisis cualitativo de la producción de enzimas de *Beauveria bassiana* en fermentación sólida utilizando un inductor

Daniel López-Sosa, María de Jesús García-Gómez, Oscar Núñez-Gaona*

Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, Oaxaca.
Circuito Central 200, Col. Parque Industrial, Tuxtepec, Oax., C. P. 68301, México.

*Corresponding author.

E-mail address: oscarnzg@hotmail.com (O. Núñez-Gaona).

Article history:

Received: 15 December 2017 / Received in revised form: 18 April 2018 / Accepted: 4 May 2018 / Published online: 1 July 2018.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.3.26>

ABSTRACT

The production of entomopathogenic fungi is a study area of great importance because represent an alternative to the use of chemical insecticides. During the mechanism of infection, the entomopathogenic fungi release lipases, proteases and chitinases responsible for the penetration of the cuticle of insects. It has been shown that in liquid fermentation these enzymes are inducible, but the products obtained by this bioprocess do not have high effectiveness for its use at the agricultural level; on the other hand, those obtained by solid fermentation present an advantage with respect to their viability, due to the formation of aerial conidia. The aim of this work was to analyze the enzymes production by *Beauveria bassiana* in solid fermentation using mixtures of rice and *T. molitor* cuticles (100: 0, 95: 5, 90:10, 85: 15%). In the semi-qualitative tests carried out, it was observed that the use of inducers in solid fermentation has no effect with respect to the total repression of the enzymes produced. The best treatment to produce conidia with greater virulence in the bioassays was obtained with a substrate: inductor ratio of 90:10.

Keywords: *Beauveria bassiana*, conidia, inductor, solid state fermentation, virulence.

RESUMEN

La producción de hongos entomopatógenos es un área de estudio de gran importancia representando una alternativa ante el uso de insecticidas de origen químico. Durante el mecanismo de infección los hongos entomopatógenos liberan lipasas, proteasas y quitinasas responsables de la penetración de la cutícula de los insectos. Se ha demostrado que en fermentación líquida estas enzimas son inducibles, pero los productos obtenidos por este bioproceso no tienen alta efectividad para su uso a nivel agrícola; en cambio, los obtenidos por fermentación sólida presentan una ventaja con respecto a su viabilidad, debido a la formación de conidios aéreos. El objetivo de este trabajo fue analizar cualitativamente la producción de enzimas de *Beauveria bassiana* en fermentación sólida utilizando mezclas de arroz y cutículas de *T. molitor* (100:0, 95:5, 90:10, 85:15 %). En las pruebas semicualitativas realizadas se observó que el uso de inductores en fermentación sólida no tuvo efecto con respecto a la represión total de las enzimas producidas. En cuanto a la virulencia de los conidios, el mejor tratamiento se obtuvo con una relación sustrato: inductor 90:10 para producir conidios con mayor virulencia en los bioensayos.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, conidios, inductor, fermentación sólida, virulencia.

1. INTRODUCCIÓN

A partir de la revolución verde comenzó el desarrollo y uso de nuevas prácticas (empleo excesivo de insecticidas, herbicidas y fertilizantes) para favorecer los rendimientos de producción a través de la prevención y cuidado de los cultivos; originando el incremento del uso de agentes químicos; fertilizantes, herbicidas, plaguicidas, fungicidas entre otros, a su vez se comenzaron a utilizar grandes extensiones de tierra para el monocultivo (Brechtel, 2004). Pero el uso excesivo de compuestos químicos ha ocasionado contaminación de la tierra y los mantos freáticos provocando daños colaterales a organismos no blanco (Soto, 2013) incluyendo a los humanos.

Debido a esta problemática se han establecido programas para el manejo integrado de plagas (MIP) que son métodos económicos, ecológicos y toxicológicamente aceptados (Zavaleta-Mejía, 1999) que buscan disminuir el uso de compuestos de origen químico durante la prevención de plagas y el cuidado de los cultivos. El control biológico, un método esencial en el MIP, utiliza organismos entomopatógenos como bacterias, nematodos y hongos para el control de plagas (Padilla *et al.*, 2005). Específicamente, los hongos entomopatógenos tienen ventajas con respecto a otros organismos que afectan a los insectos, porque invaden al huésped por contacto (Ortiz-Meza *et al.*, 2005) y esta capacidad reduce la posibilidad de que los organismos huésped adquieran resistencia (Montesinos-Matías 2008); entre los más destacados se encuentra *Beauveria bassiana* que tiene la capacidad de infectar a diversas especies de insectos de distintos órdenes (coleópteros, dípteros, heterópteros, homópteros, lepidópteros, tisanópteros) además de ser la especie fúngica más ampliamente distribuida en la naturaleza (Zimmermann, 2007). El mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos inicia con su penetración hacia la cutícula de los insectos mediante la liberación de enzimas hidrolíticas como lipasas, proteasas y quitinasas (Montesinos-Matías, 2012).

Los bioinsecticidas con aplicación en el campo deben de tener la concentración suficiente de estos microorganismos, 10^{10} conidios/gramo de sustrato (Villaba, 2009; Gandarilla-Pacheco, 2013); así como conidios con alta tasa de efectividad y calidad. Por tal motivo, para la producción de conidios se ha evaluado el efecto del tipo de cultivo, la naturaleza de los sustratos y el uso de inductores. Durante la producción de conidios en fermentación líquida (FL) se ha demostrado que las enzimas hidrolíticas pueden ser inducibles (Jiménez-Alejandro, 2016; Motesinos-Matías, 2012; Safavi *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2004) pero en dicho proceso los productos no tienen una alta efectividad para su uso a nivel agrícola; en cambio, los productos derivados de la fermentación sólida (FS) presentan una ventaja con respecto a su viabilidad, debido a la formación de conidios aéreos (López-Sosa, 2017; Mascarín *et al.*, 2010; Lomer *et al.*, 2001). En cuanto a los sustratos que se han utilizado predomina el uso de cereales como arroz y trigo por su amplia disponibilidad y composición química (Villaba, 2009; Méndez, 2010; Gandarilla-Pacheco, 2013). Finalmente, se han utilizado insectos modelo como inductores y para evaluar la virulencia de los conidios producidos por FL o FS, tal es el caso de *Tenebrio molitor* conocido también como gusano de la harina, que en su estado larvario puede considerarse una plaga en los almacenes de granos (Goptar *et al.* 2008; Ramos-Elorduy *et al.*, 2002; Nuñez-Gaona, 2009). Considerando lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo analizar cualitativamente la producción de enzimas de *Beauveria bassiana* en FS utilizando mezclas de arroz y cutícula de *T. molitor* (100:0, 95:5, 90:10, 85:15 %).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Se utilizaron agar Sabouraud dextrosa (SD), extracto de levadura (EL) (DIBICO, México, D.F.) y arroz quebrado (forrajeras locales).

2.2 Microorganismo

Se empleó la cepa de *Beauveria bassiana* 885.2 (donada por el Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México), la cual se cultivó, modificando la metodología reportada por López-Lastra *et al.* (2002), en agar SD al 4 % enriquecido con 0.05 % de EL por 7 días a 25 °C, posteriormente los conidios se extrajeron con agua destilada estéril y se conservaron en refrigeración (4 °C), con la finalidad de mantener la homogeneidad genética de la cepa durante el estudio. Para conocer la concentración de conidios en las suspensiones se realizaron conteos en cámara de Neubauer (Nuñez-Gaona, 2009)

2.3 Insecto modelo

Se utilizó *T. molitor* como inductor (Insectario de la Universidad del Papaloapan *campus* Tuxtepec). Los tres estadios se encontraban debidamente separados en cajas de plástico de aproximadamente 45 L (60 x 25 x 30 cm); alimentados con una mezcla de salvado de trigo (250 g) y avena (30 g) estéril.

2.4 Fermentación sólida

Se llevó a cabo en cajas de plástico (L 10 cm x A 10 cm x H 4 cm) en las que se agregaron 25 g de arroz y 32.5 mL de agua destilada (75 % de humedad). Estas cajas fueron esterilizadas e inoculadas, bajo condiciones estériles, con 32.5 mL de una suspensión de esporas con una concentración de 3.5×10^9 conidios/mL. Finalmente se incubaron a 25°C/7 días durante este periodo se tomaron muestras cada 24 h para cuantificar los conidios producidos. Lo anterior se realizó bajo condiciones estériles, mezclando 1 g de cada sustrato fermentado con 20mL de agua destilada estéril, la mezcla se homogeneizó en un vórtex durante 2 min, se tomó una alícuota de 1 mL para realizar diluciones 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 para facilitar el conteo por cámara de Neubauer mediante microscopio óptico a 40x (Núñez-Gaona, 2009).

2.5 Pruebas cualitativas API® ZYM

Las determinaciones enzimáticas se realizaron con el sistema API® ZYM de acuerdo con las instrucciones del proveedor (BioMerieux). Cada pozo se inoculó con 100 µL de extracto enzimático proveniente de cada fermentado. Posteriormente, se incubó por 4 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se adicionó una gota de los reactivos ZYM A y ZYM B por pozo, la reacción positiva o negativa se reportó con base en su coloración.

2.6 Bioensayos

Se realizaron empleando la metodología propuesta por Montesinos-Matías (2008). Se seleccionaron larvas de *T. molitor* sanas, activas, del mismo tamaño y estadio, las cuales fueron sumergidas en una suspensión de conidios ajustada a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Un total de 12 larvas fueron sumergidas por tratamiento durante 15 segundos, cada unidad experimental (12 larvas) se colocó en cajas de plástico transparente (L 12cm x A 12cm x H 6cm) con sustrato estéril (avena), las cuales fueron incubadas a 25 °C con un foto periodo 12/12 (luz/oscuridad), monitoreando cada 24 h para retirar las larvas muertas y colocándolas en una cámara húmeda para facilitar la emergencia del micelio de *B. bassiana*.

3. RESULTADOS

3.1 Efecto de *Tenebrio molitor* sobre el crecimiento de *Beauveria bassiana* en fermentación sólida

En la Figura 1 se muestra la cinética de crecimiento de *B. bassiana* en sustrato de arroz con diferentes niveles de inducción. La fase de crecimiento exponencial se observó, para los 4 tratamientos, del día 3 al 5 del bioproceso. La máxima producción de conidios aéreos se alcanzó a los 5 días en todas las mezclas con inductor. Los títulos obtenidos fueron de $7.20 \times 10^9 \pm 4.2 \times 10^8$ conidios/g de sustrato sin inductor; $7.25 \times 10^9 \pm 4.25 \times 10^8$ conidios/g de sustrato, $7.70 \times 10^9 \pm 4.50 \times 10^8$ conidios/g de sustrato y $7.43 \times 10^9 \pm 8.63 \times 10^8$ conidios/g de sustrato con 5%, 10% y 15% de inductor respectivamente; siendo el mayor título de

conidios aéreos por gramo de sustrato con la mezcla de arroz con 10 % de inductor. Sin embargo, no hubo diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) en la producción de conidios utilizando arroz con diferentes niveles de inductor.

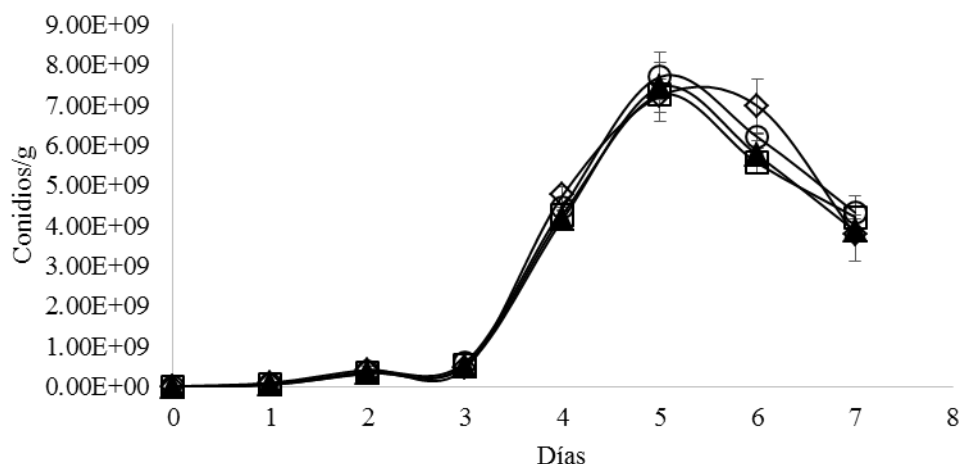


Fig. 1. Cinética de crecimiento de *B. bassiana* en sustrato de arroz con diferentes niveles de inductor: 100:0 % (◇), 95: 5% (□), 90: 10% (○), 85: 15% (▲) arroz:inductor.

3.2 Pruebas cualitativas API® ZYM

La Figura 2 muestra, de forma colorimétrica, la producción de enzimas hidrolíticas implicadas en el mecanismo de infección de los insectos: (a) fosfatasas, (b) esterases, (c) lipasas, (d) tripsina, (e) β -quimotripsina, (f) galactosidasa, (g) N-acetil-glucosaminidasa entre otras. Se observó que el nivel de inducción no tuvo efecto con respecto a la expresión total de las enzimas, sin embargo, por intensidad de color es posible deducir que la cantidad de enzimas producidas se vio favorecida con respecto al nivel de inducción; siendo las mezclas con 10 y 15 % de inductor con las que se observó una mayor intensidad para las enzimas lipolíticas (a, b y c) y proteolíticas (d y e). En cuanto a las enzimas quitinolíticas, la galactosidasa (f) no varió de intensidad en todos los tratamientos, pero la N-acetil-glucosaminidasa (g) tuvo un color más intenso en los medios con 0 y 5 % de inductor (Fig. 2).



Fig. 2. Prueba API® ZYM de extractos obtenidos del medio de crecimiento de *B. bassiana* en sustrato de arroz con diferentes niveles de inductor: 100:0% (1), 95: 5% (2), 90: 10% (3), 85: 15% (4) arroz: inductor. Posibles enzimas implicadas en la infección de insectos: (a) fosfatasas, (b) esterases, (c) lipasas, (d) tripsina, (e) β -quimotripsina, (f) galactosidasa, (g) N-acetil-glucosaminidasa.

3.3 Bioensayos

La figura 3 muestra el tiempo de muerte de las larvas de *T. molitor* durante el bioensayo realizado, en ésta se puede observar que la muerte de la primera larva ocurrió en el cuarto día cuando se utilizaron conidios provenientes del medio sin inductor; en cambio con las esporas del tratamiento con 5% de inductor la primera larva muerta se reportó al tercer día; en contraste, en los bioensayos con conidios de las mezclas de arroz con 10% y 15% de inductor la muerte de 2 y 1 larvas, respectivamente, se produjo en el segundo día del bioensayo. La totalidad de la muerte de las larvas sometidas al bioensayo se alcanzó en periodos diferentes; la mayor eficacia se obtuvo con las esporas del tratamiento con 10% de inductor alcanzándose a los 14 ± 5.89 días; seguidas en orden descendente por las de los tratamientos con 15%, 5 % y 0 % de inductor que fueron de 16 ± 4.02 , 17 ± 5.89 y 20 ± 7.25 días, respectivamente.

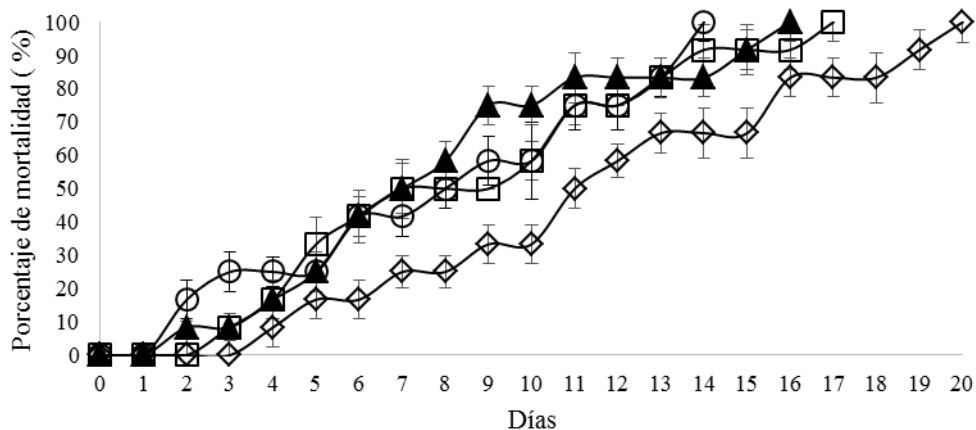


Fig. 3. Cinética de muerte de larvas de *T. molitor* con esporas de *B. bassiana* producidas por FS en sustrato de arroz con diferentes niveles de inductor: 100:0% (◇), 95: 5% (□), 90: 10% (○), 85: 15% (▲) arroz: inductor.

4. DISCUSIONES

En investigaciones realizadas para producir conidios aéreos de *B. bassiana*, el sustrato que se usa con mayor frecuencia es el arroz (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013; Villalba *et al.*, 2009). Para la mayoría de las especies de hongos entomopatógenos, crecidos sobre arroz, se han reportado rendimientos de hasta 10^{10} conidios/g de sustrato, aunque comúnmente la mayoría de las especies alcanza valores de 10^9 conidios/g de sustrato, con tiempos de incubación mayores a los 10 días (Méndez *et al.*, 2010). En este trabajo se alcanzaron títulos de producción de conidios, con todos los tratamientos, comparables a los reportados en un periodo de tiempo menor (5 días).

Para la identificación bioquímica de distintos organismos como bacterias y hongos entomopatógenos se han realizado numerosos estudios. El-Sayed *et al.*, (1993) realizaron pruebas API[®] ZYM para la identificación cualitativa de diferentes tipos de enzimas que producían *Nomuraea atypicola*, *Nomuraea anemonoides*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, utilizando agar maltosa Sabouraud (AMS) como sustrato, concluyendo que los hongos entomopatógenos analizados produjeron enzimas hidrolíticas (lipasas, tripsinas, proteasas, aminopeptidasas, esterases y quitinasas) similares entre ellos aunque en diferente concentración. En este trabajo se analizó el efecto de un inductor sobre la inducción o represión de las enzimas ligadas al mecanismo de infección que inicia con la penetración del hongo hacia la cutícula del insecto mediante la liberación de lipasas, proteasas y quitinasas (Montesinos-Matías, 2012).

Por otro lado, el estudio del efecto del uso de inductores en el medio de cultivo para promover la virulencia de hongos entomopatógenos es limitado y poco usual. Montesinos-Matías (2008) utilizó distintas cepas de *B. bassiana* crecidas en agar maltosa Sabouraud al 2% con avena (3%) y EL (0.05%) para determinar el porcentaje de mortalidad de larvas de *T. molitor*; con la cepa 885.2 (misma que se empleó en esta investigación) éste fue de 97% después de 15 días de bioensayo; mientras que en este trabajo el 100 % de mortalidad se

alcanzó a los 14 días utilizando esporas obtenidas por FS usando arroz como sustrato y 10% de inductor, es probable que la virulencia de estas esporas esté relacionada con una mayor producción de enzimas lipolíticas y proteolíticas (Fig. 2 3a, b, c, d y f) (Montesinos-Matías, 2012).

5. CONCLUSIONES

El análisis cualitativo de la producción de enzimas hidrolíticas de *Beauveria bassiana* en FS utilizando mezclas de arroz y cutícula de *T. molitor* (100:0, 95:5, 90:10, 85:15 %) permitió obtener títulos de producción de conidios (10^9 conidios/g de sustrato) comparables a los reportados en la bibliografía en menor tiempo (5 días). Por otro lado, el nivel del inductor en el medio de cultivo tuvo un efecto sobre la producción de enzimas lipolíticas y proteolíticas que se reflejó en la virulencia de las esporas, ya que se alcanzaron porcentajes de mortalidad elevados, de hasta 100 %, en tiempos más cortos con respecto a estudios anteriores.

Las pruebas cualitativas para la determinación de enzimas, como la utilizada en este trabajo, dan información sobre las enzimas que se inducen o reprimen según los sustratos empleados.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Bioprocesos y al Cuerpo Académico Biotecnología Sustentable de la Universidad del Papaloapan *campus* Tuxtepec, por las facilidades prestadas para el desarrollo de este trabajo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses al desarrollo y publicación de este trabajo.

REFERENCIAS

Brechelt A. (2004). El manejo ecológico de plagas y enfermedades. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAPAL).

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.

El-Sayed G. N., Ignoffo C. M, Leathers T. D. & Gupta S. C. 1992. Use of a colorimetric system to detect enzymes expressed by germinating conidia of entomopathogenic fungi. Mycopathologia 118:29-36

Gandarilla-Pacheco F. L.; Galán-Wong L. J.; Arévalo-Niño K.; Elías-Santos M. & Quintero-Zapata, I. 2013. Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. hypocreales: cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia* 47:255-266.

Goptar I. A, Koulemzina I. A, Filippova I Yu, Lysogorskaya E. N, Oksenoit E. S, Zhuzhikov D. P, Dunaevsky Y. E, Belozersky M. A, & Elpidina E. N. 2008 Properties of post-proline cleaving enzymes from *Tenebrio molitor*. *Russian Journal Bioorganic Chemistry*. 34(3): 280–285.

Jiménez-Alejandro S. E. 2016. Producción de quitinasas en cultivo líquido con hongos entomo y fitopatógenos, utilizando tres fuentes de quitina como inductor. Tesis de maestría. Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec. México.

Lomer C. J.; Bateman R. P.; Johnson D. L. & Lagewald T. M. 2001. Biological Control of *locusts* and *grasshoppers*. *Annual Review of Entomology*. 46:667-702.

López-Lastra C.C.; Hajek A.E. & Humber R. A. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*. 80:1126-1130.

López-Sosa D., García-Gómez M. J., Núñez-Gaona O. 2017. Fermentación bifásica para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* con diferentes sustratos sólidos. *Coloquio de Investigación Multidisciplinaria*. 5:1284-1289

Mascarin G. M., Alves S. B., Lopes R. B., 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53(4): 753-761

Matsumoto, Y., Saucedo-Castañeda, G., Revah, S., & Shirai, K. 2004. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry* 39(6):665-671

Montesinos-Matías R. 2008. Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México.

Montesinos-Matías R. 2012. Relación de la inducción/represión de enzimas hidrolíticas con la infectividad en cepas de *Beauveria bassiana* resistentes a 2-desoxi-D-glucosa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México.

Méndez A.; del Pozo E.; García I. & González A. 2010. Evaluación de sustratos para la producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Revista de Protección Vegetal*. 25:108-112.

Núñez-Gaona O. 2009. Efecto de la actividad de agua y la modificación de la atmósfera gaseosa sobre la producción y calidad de conidios de *Beauveria bassiana*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México.

Ortiz Meza J. A.; González Hernández A.; Salazar Solís E. & Torres Guzmán C. 2005. Aislamiento de cDNAs de expresión diferencial durante el crecimiento *Metarhizium anisopliae* en cutícula de *Phyllophaga ravidata* mediante la técnica de RDA. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, México.

Padilla Guerrero I. E. González Hernández A.; Salazar Solís E. & Torres Guzmán J. C. 2005. Estudios para evaluar la participación de gene de expresión diferencial en el proceso de invasión de *Metarhizium anisopliae* a su hospedero. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, México.

Ramos-Elorduy J, Avila-González E, Rocha-Hernández A & Pino J. M 2002. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. Journal Economic Entomology 95(1):214–220

Safavi S. A, Shah F. A, Pakdel A. K, Rasoulilian G. R, Bandani A. R & Butt T. M 2007. Effect of nutrition on growth and virulence off the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Letters 270, 116-123.

Soto G. 2003. Memorias del Taller Agricultura Orgánica: una herramienta para el desarrollo rural sostenible y la reducción de la pobreza. Turrialba, Costa Rica. <http://www.fao.org/3/a-at738s.pdf> (consultado Octubre 12, 2017)

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

Whipps J. M. & Lumsden R. D. 2001. Commercial Use of Fungi as Plant as Plant Disease Biological Control Agents: Status and Prospects. CABI International. Fungi as Biocontrol Agents. Edts T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan 1: 9-22

Zavaleta-Mejía E. 1999. Management Alternatives for Plant Diseases. *Terra* 17:201-207.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology. 17:554-596.