

**Comparación de dos métodos de producción de *Beauveria bassiana* y su uso en campo como insecticida microbiano: Revisión de Literatura**

**Daniel Homero Moreno Chuquin**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Honduras**  
Junio 2021

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

# **Comparación de dos métodos de producción de *Beauveria bassiana* y su uso en campo como insecticida microbiano: Revisión de Literatura**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Daniel Homero Moreno Chuquin**

**Zamorano, Honduras**

Junio 2021

# **Comparación de dos métodos de producción de *Beauveria bassiana* y su uso en campo como insecticida microbiano: Revisión de Literatura**

Presentado por:

Daniel Homero Moreno Chuquin

Aprobado:

---

Rogelio Trabanino, M.Sc.  
Asesor Principal

---

Rogel Castillo, Mtr.  
Director  
Departamento de Ciencia y  
Producción Agropecuaria

---

Alejandra Sierra, M.Sc.  
Asesora

---

Ana Margarita Maier, Ph.D.  
Vicepresidenta y Decana Académica *a.i*

---

Sayda Guzman, Microbióloga  
Asesora

## Comparación de dos métodos de producción de *Beauveria bassiana* y su uso en campo como insecticida microbiano: Revisión de Literatura

Daniel Homero Moreno Chuquin

**Resumen.** *Beauveria bassiana* es un organismo eucariótico heterótrofo que posee células quitinizadas y parasita otros insectos, gracias a sus mecanismos físicos y químicos de infección, debido a eso *B. bassiana* ha sido muy usado como bioinsecticida microbiano por su amplio rango de hospederos y distribución geográfica, por ello la producción de bioinsecticidas a base de *B. bassiana* ha crecido exponencialmente. El objetivo de esta revisión de literatura fue recopilar información acerca de los diferentes métodos producción masiva del hongo entomopatógeno *B. bassiana* en medio sólido y líquido, control de calidad, almacenamiento y su uso como controlador de plagas. Para el aislamiento del hongo se usan insectos adultos muertos e infectados por *B. bassiana*, para obtener matrices de cepa pura que son utilizadas en diferentes métodos de producción. Actualmente el sistema de producción por fermentación en sustrato sólido es el más usado, sin embargo, la producción por fermentación líquida es más eficiente y su uso va en crecimiento. La producción en sustrato sólido promueve la obtención de conidios haciendo uso de sustratos como cereales, el arroz es el más usado, en cambio el método por fermentación líquida se obtienen estructuras conocidas como blastosporas, el medio más común para su producción es basado en fuentes de carbono y nitrógeno. El control de calidad se basa en pruebas de pureza, viabilidad, concentración de conidios o blastosporas por gramo o mililitro.

**Palabras Clave:** Bioplaguicidas, beauvericina, blastosporas, control de plagas, hongos entomopatógenos.

**Abstract.** *Beauveria bassiana* is a heterotrophic eukaryotic organism that has chitinized cells and parasitizes other insects, thanks to its physical and chemical mechanisms of infection, due to this *B. bassiana* has been widely used as a microbial bioinsecticide due to its wide range of hosts and geographic distribution the production of bioinsecticides based on *B. bassiana* has grown exponentially. The objective of this literature review was to collect information about the different methods of mass production of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* in a solid and liquid medium, quality control, storage, and its use as a pest control. For the isolation of the fungus, mature insects that are dead and infected by *B. bassiana* are used to obtain matrices of pure strain that are used to inoculate different production methods. Currently the production system by fermentation in solid substrate is the most used, however, production by liquid fermentation is more efficient and its use is growing. The production in solid substrate promotes the obtaining of conidia making use of substrates such as cereals, rice is the most used, on the other hand the liquid fermentation method produces structures known as blastospores, the most common means for its production is based on a carbon source and nitrogen. Quality control is based on tests of purity, viability, concentration of conidia or blastospores per gram or milliliter.

**Key words:** Biopesticides, beauvericin, blastospores, pest control, entomopathogenic fungi

## ÍNDICE GENERAL

Portada.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Índice general.....	iv
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. METODOLOGÍA .....</b>	<b>2</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>17</b>
<b>5. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>18</b>
<b>6. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>19</b>

## ÍNDICE DE CUADRO Y FIGURAS

Cuadro	Página
1. Medio de cultivo líquido para <i>B. bassiana</i> .....	12

Figuras	Página
1. Estructuras morfológicas principales del hongo <i>B. bassiana</i> .....	3
2. Morfología colonial de <i>B. bassiana</i> en medio PDA.....	4
3. Mecanismo de infección de <i>B. bassiana</i> en la cutícula del insecto.....	6
4. Artrópodos afectados con <i>B. bassiana</i> .....	6
5. Cultivos monospóricos de <i>B. bassiana</i> en medio sólido PDA.....	8
6. Matriz de <i>B. bassiana</i> cepa Zamorano.....	8
7. Etapas de producción de <i>B. bassiana</i> en sustrato sólido.....	9
8. Etapas de producción de <i>B. bassiana</i> por fermentación líquida.....	11

# 1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de pesticidas químicos provoca serios problemas tales como la pérdida de controladores biológicos en el ambiente, resistencia por parte de las plagas al ingrediente activo mayormente usado y además las personas corren el riesgo de tener intoxicaciones agudas al momento de aplicarlos en campo. Debido a esto las regulaciones internacionales de la salud promueven la reducción de pesticidas químicos en el mercado, por ello las empresas comerciales agrícolas fabricantes de productos fitosanitarios buscan y trabajan en formulaciones de bioinsecticidas, a base de extractos naturales y hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* con el fin de cumplir las regulaciones y seguir la nueva tendencia de producción limpia (Cuervo *et al.* 2018).

*B. bassiana* es un organismo eucariótico heterótrofo que posee células quitinizadas, tiene como característica principal su modo de vida: saprófito, debido a que se puede encontrar y desarrollar en el suelo, en la materia orgánica, y parasítico de muchos insectos plagas como coleópteros, lepidópteros, hemípteros entre otros (Jaronski 2007). Este hongo parasita otros insectos, gracias a sus mecanismos físicos y químicos de infección. Debido a eso *B. bassiana* ha sido muy usado como bioinsecticida microbiano por su amplio rango de hospederos y distribución geográfica. La producción masiva de *B. bassiana* se ha dado en todas las escalas, tanto de manera artesanal como para el sector industrial.

A nivel comercial, la producción masiva de *B. bassiana* se basa en técnicas de fermentación en medios sólidos y líquidos. La producción por fermentación en sustratos sólido es un proceso que tiene lugar utilizando sustratos naturales como fuente de carbono y energía, representa un proceso relativamente de bajo costo para la obtención de conidios aéreos en un lapso de 35 días. Los sustratos que comúnmente se usan para la inoculación de los conidios son cereales esterilizados y humedecidos (Jaronski 2007). La producción por fermentación líquida se basa en un crecimiento de blastosporas en un sistema totalmente líquido a base de nitrógeno y carbono haciendo uso de un biorreactor, esta última es caracterizada por ser más eficiente por su corto tiempo de producción en un lapso de siete días. Por consiguiente, la producción de *B. bassiana* como bioinsecticida microbiano representa una alternativa muy tentativa a los insecticidas químicos. El presente documento pretende explicar dos de los procesos de producción masiva de *B. bassiana* más importantes y su uso agronómico como insecticida microbiano.

Los objetivos de esta revisión de literatura fueron:

- Recopilar información acerca de los métodos de producción masiva del hongo entomopatógeno *B. bassiana*.
- Investigar y describir dos procesos de producción masiva de *B. bassiana* en sustrato sólido y medio líquido usando biorreactor.
- Investigar y describir un proceso de control de calidad y una formulación que proporcione una vida de anaquel prolongada al bioinsecticida de *B. bassiana*.

## 2. METODOLOGÍA

La revisión bibliográfica tuvo lugar en los meses de julio a octubre del 2020, usando herramientas de búsqueda digitales como Google Scholar, Research Gate, Scielo, Word Wide Science, Microsoft Academic, entre otros. Para realizar la búsqueda se usaron palabras como bioinsecticidas, blastosporas, cultivos líquidos y sólidos de *B. bassiana*, biorreactor. Para realizar la búsqueda de documentos en inglés se usaron palabras como “bioinsecticides”, “liquid and solid cultures of *B. bassiana*”, “bioreactor”.

Se incluyeron artículos reportados en la literatura científica en los últimos 39 años (1981 a 2020), exceptuando ciertos estudios previos a estos años que eran claves y debían ser incluidos debido a su relevancia al tema. Los artículos usados fueron escritos en el idioma inglés y español. Se incluyeron artículos que describieron el aislamiento de *B. bassiana*, bioinsecticidas microbianos, control de calidad, almacenamientos del conidias y blastosporas, formas de producción artesanal e industrial y uso de sustratos para el crecimiento por fermentación líquida y sólida.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Descripción de *Beauveria bassiana*

*B. bassiana* es un hongo entomopatógeno del Phylum ascomiceto de la clase Hyphomycete, división Deuteromicetes. Es un organismo eucariótico heterótrofo que posee células quitinizadas. Se caracteriza por formar una capa de polvo blanco en la superficie del hospedero, debido a eso en 1835 el entomólogo Agostino Bassi nombró esta característica como la enfermedad muscardina, porque afectó varios cuerpos de algunos gusanos de seda (*Bombyx mori*) (Kouassi 2001). Desde entonces este hongo ha sido estudiado, por su amplio rango de hospederos. Actualmente tiene un 37.7% de participación en las publicaciones, y existen 6451 artículos científicos, reseñas y patentes desde 1945 a 2015 usando Web of Science, lo que confirma su gran importancia como un biocontrol, farmacéutico e industrial agente microbiano (Vázquez 2018).

#### Morfología

En sustratos sólidos o ya sea de manera natural (saprófitica o parasítica) se producen gran cantidad de conidias aéreas, conformada por hifas septadas de 2,5 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, se forman conidióforos simples raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más ancho en el centro que en los extremos), los cuales sostienen los conidios, originados de forma simpodial o acrópeta, dando una apariencia en zigzag al raquis. Los conidios son hialinos, lisos, de forma globosa a elipsoidal con un tamaño de 2.2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1) (Echeverría 2006). *B. bassiana* en los cultivos líquidos crece de manera similar a las levaduras, produciendo altas concentraciones de propágulos vegetativos denominados blastosporas, las mismas que se producen en la hemolinfa de los insectos. Estas son estructuras unicelulares de naturaleza hidrofílica, pueden tener forma ovalada elíptica (Figura 1) tienen la característica de adoptar diferente forma y tamaño, aun siendo de la misma especie (Echeverría 2006).

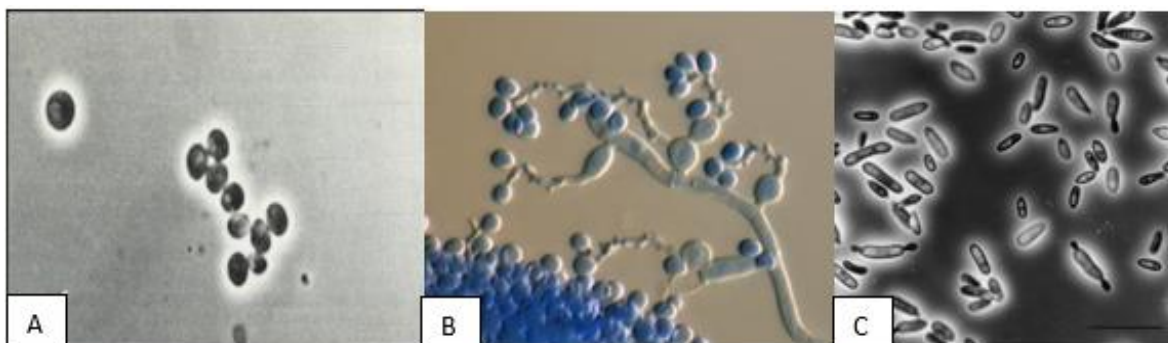


Figura 1. Estructuras morfológicas principales del hongo *B. bassiana*; A. Conidios aéreos; B. Hifas septadas, conidióforo simple; proliferación simpodial del conidióforo; C. Blastosporas en medio líquido.

Fuente: Echeverría 2006.

En PDA (Agar papa dextrosa), las colonias se caracterizan por tener lento crecimiento, llegando a alcanzar hasta 2 cm de diámetro en 10 días. La colonia es de color blanco, textura blanda y superficie plana. En los primeros días de crecimiento, es de aspecto lanoso y a medida que transcurren los días, se torna de aspecto polvoso, debido al desarrollo de abundantes conidios (Figura 2) (Góngora *et al.* 2009).



Figura 2. Morfología colonial de *B. bassiana* en medio PDA.

Fuente: Echeverría 2006.

### **Mecanismo de acción**

Existen dos estructuras infectivas las cuales son los conidios y blastosporas. Estos se dispersan naturalmente por varios factores como ser el viento, salpicaduras de lluvia por artrópodos lo transportan en su cuerpo. También pueden ser dispersadas por aplicaciones intencionales al aplicarlas en los cultivos. Ambas estructuras tienen distintos modos de acción, pero la misma capacidad de infección (Mascarin y Jaronski 2016).

*B. bassiana* actúa por contacto y es capaz de penetrar el insecto e invadirlo provocando su muerte por micosis produciendo sustancias líticas y tóxicas que ayudan a la penetración y a inhibir los mecanismos de defensa del insecto. El ataque de este hongo sobre el insecto huésped, se realiza en diferentes etapas divididas en: adherencia, germinación, diferenciación y proliferación. La primera etapa se produce cuando el conidio se adhiere a la cutícula. Para ello es necesario el reconocimiento y compatibilidad entre el conidio y las células del tegumento del insecto mediante enzimas y glicoproteínas, influida por dos acciones: una pasiva en la cual se ejercen fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, y otra activa, en la cual se secretan mucílagos, que interactúan químicamente con las lecitinas de la membrana y generan un ambiente favorable para la secreción de enzimas (Echeverría 2006). Una vez adherido inicia la segunda etapa que es la germinación, esta depende mucho de las condiciones que le pueda brindar el insecto y el ambiente para poder germinar (Meyling y

Eilenberg 2007). La germinación del hongo inicia con la formación de un tubo germinativo, similar a un apresorio, el cual ayuda a la penetración de la cutícula por actividad enzimática extracelular (quitinasas, lipasas, esterases, y proteasas) y presión mecánica. Este mismo facilita la invasión de la epidermis e hipodermis. Finalmente, las hifas invaden y se proliferan en el tracto digestivo hasta llegar a la hemolinfa donde el hongo experimenta una diferenciación morfológica, pasando del crecimiento filamentoso de cuerpos hifales a blastosporas monocelulares, provocando una colonización de los tejidos internos, evadiendo el sistema inmunológico del insecto (Mascarin y Jaronski 2016). Es en esta etapa donde ocurre la muerte del insecto, ocasionado por el daño mecánico, desnutrición y toxicidad, cuando las hifas secretan un antibiótico (oosporina), que ataca las bacterias del intestino (Wan 2003), suprimen las barreras inmunes del insecto, donde el hongo invade el tracto digestivo, se alimenta de su interior, colonizando todo el cuerpo del insecto. La colonización puede variar entre 76-120 horas, dependiendo del patógeno, insecto y las condiciones ambientales.

La adhesión del conidio a la cutícula del huésped no es específica en muchos casos. Sin embargo, al parecer, la agresividad se encuentra relacionada con la actividad enzimática sobre los lípidos, ácidos grasos y la secreción de mucílago, que cumple la función de adhesión y de favorecer la actividad de las enzimas extracelulares (Barquero 2008). Durante la etapa de diferenciación el hongo secreta metabolitos tóxicos como la beauvericina (BEA), la cual tiene propiedades antimicrobianas e insecticidas (Arboleda 2003). Debido a eso hay una relación directa entre la cantidad de toxina y la patogenicidad producida por el hongo, la cual causa una degeneración progresiva de los tejidos del hospedero (Jackson 1997). La BEA también genera cambios estructurales en las membranas provocando su deshidratación. A nivel eléctrico se generan cambios en los nervios debido al aumento de consumo de oxígeno (Doberski 1981). Adicionalmente la BEA ocasiona una vacuolización generalizada, esto se refiere a un efecto tóxico generado en las mitocondrias el cual es el principal síntoma de intoxicación, debido a que las mitocondrias se hinchan tomando una forma esférica similar a vacuolas esféricas (Auld 2001).

Las blastosporas germinan e infectan al huésped más rápido que los conidios debido su actividad metabólica, reduciendo la exposición factores adversos del ambiente, al adherirse en la epicutícula del insecto las blastosporas desarrollan su propio tubo germinativo, que penetrará la epicutícula del insecto llegando a la hemolinfa, donde producirá los metabolitos tóxicos como BEA provocando la muerte del insecto (Figura 3) (Jackson 1997). Después de la muerte del insecto se producirán conidióforos que posteriormente van a emerger del cuerpo del huésped y en un lapso aproximado de 24 a 48 horas, se producen nuevos conidios infecciosos mediante el mecanismo de esporulación (Arias *et al.* 2014).

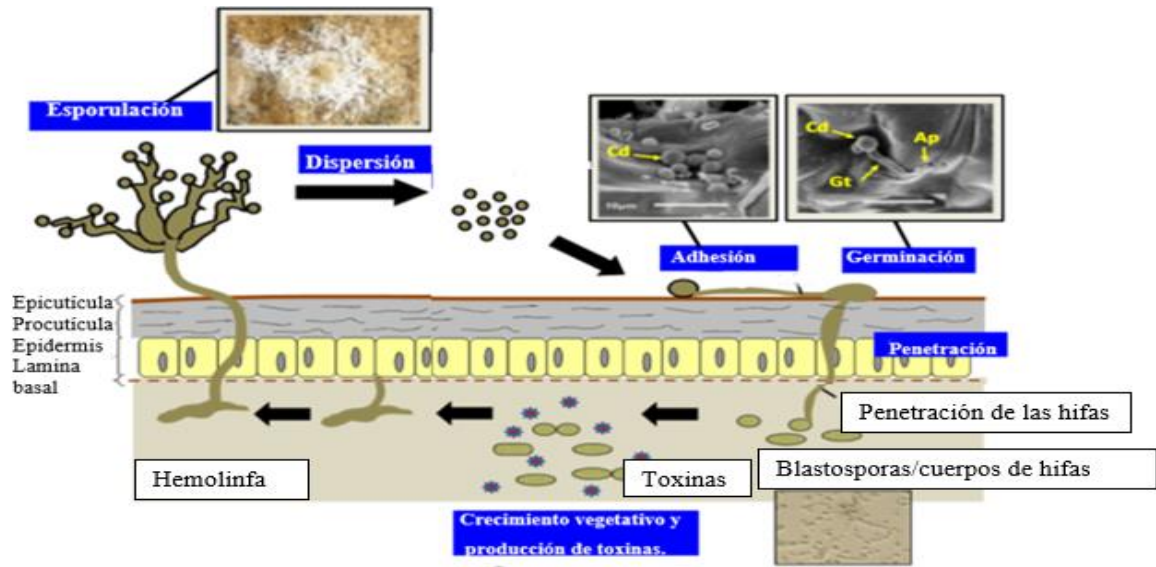


Figura 3. Mecanismo de infección de *B. bassiana* en la cutícula del insecto.

AP: Apresorio, CD: Conidias, GT: Tubo Germinal.

Fuente: Jackson *et al.* 2010.

**Alcance de infección.** Se caracteriza por infectar una gran diversidad de artrópodos, generando un alto índice de mortalidad, son susceptibles artrópodos del orden coleóptera, himenóptera, lepidóptera y trombidiformes (Jackson *et al.* 2010) (Figura 4).

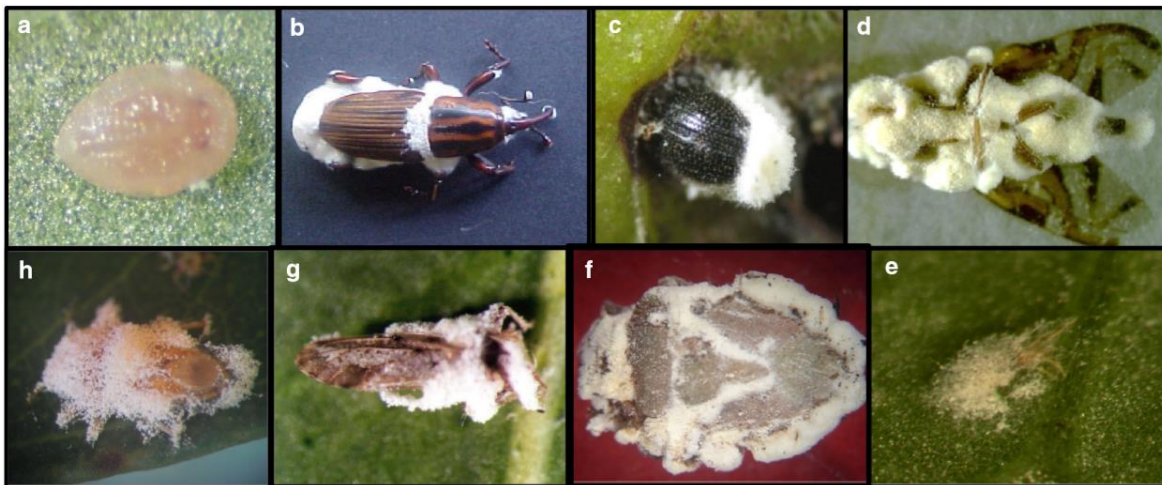


Figura 4. Artrópodos afectados con *B. bassiana*. a. Ninfa de mosca blanca (*Bemisia tabaci*); b. picudo del banano (*Metamasius hemipterus*); c. barrenador de los frutos del café (*Hyphotenemus hampei*); d. mosca de la fruta (*Anastrepha fraterculus*); e. araña roja (*Tetranychus urticae*); f. chinche hedionda de soja (*Nezara viridula*); g. psílido de los cítricos (*Diaphorina citri*); h. chinche de bronce de eucalipto (*Thaumastocoris peregrinus*)

Fuente: Jackson *et al.* 2010.

### **Métodos de producción de *B. bassiana* a gran escala**

La producción a gran escala de *B. bassiana*, involucra procesos rentables donde se produce una gran cantidad de propágulos viables e infecciosos, además de mantener su entomopatogenicidad (Jaronski 2007).

El método estándar para la producción es el proceso de fermentación. Aunque existen varios tipos de fermentación, los principales son la fermentación sumergida y la fermentación semi sólida (Jackson 1997). La fermentación semi sólida, es un método artesanal de países no industrializados, esta se realiza en sustratos sólidos, y se producen gran cantidad de conidias aéreas hidrofóbicas (Figura 1.A). En cambio, la fermentación sumergida es un método biotecnológico industrializado. El cultivo líquido se realiza en biorreactores a escala industrial obteniendo altas concentraciones de propágulos vegetativos hidrofílicos denominados blastosporas (Echeverría 2006) (Figura 1.C). Comparadas con las conidias aéreas, las preparaciones de blastosporas obtenidas en sustrato líquido muestran una mayor velocidad de germinación, lo que hace de las últimas una gran promesa como propágulos bioinsecticidas. En cualquier método de producción se debe mantener la asepsia en todo el flujo de proceso, para garantizarla calidad en el producto final.

### **Cultivo monospórico**

Debido a la necesidad de contar con material puro, donde la variabilidad genética y características bioquímicas y fisiológicas sean homogéneas, se debe de aislar una cepa con capacidad infectiva a partir de un insecto muerto por *B. bassiana*, y purificar la cepa realizando cultivos monospóricos (García *et al.* 2011). Para ello los cadáveres de insectos adultos se sumergen en hipoclorito de sodio al 0.5% durante 2 minutos, posteriormente se lavan cuatro veces con agua destilada estéril, se toma parte del tejido del insecto con micelio y se transfiere a cajas de Petri con medio de cultivo PDA suplementado con antibióticos. Los platos Petri se incuban a 25 °C durante 10 días en condiciones de oscuridad (Poma y Lopez 2017).

Posteriormente se busca esporas germinadas características de *B. bassiana* directamente en el cultivo PDA, una vez localizadas se encierran en un círculo, luego en la cámara de flujo laminar con la ayuda de un bisturí estéril se corta el área señalada (cuadros aproximadamente de 16 mm<sup>2</sup>), y se coloca en una placa Petri con PDA suplementado con antibiótico, recién preparadas y gelificada, se coloca un cuadrado por placa, se dejan en incubación en las mismas condiciones anteriores. Pasado el tiempo se seleccionan los cultivos con mayor crecimiento y apariencia uniforme y se cultivan en placas con PDA (sin bacteriostático), para obtener mayor cantidad de material (Echeverría 2006). Cuando los micelios maduren su color pasará a ser beige, los conidióforos presentarán conidios hialinos, globosos ovales de dos a tres micrómetros de diámetro. Siendo esta la cepa madre que se usará para conservar y utilizar en los diferentes métodos de producción masiva (Figura 5) (Poma y Lopez 2017).





Figura 5. Cultivos monospóricos de *B. bassiana* en medio sólido PDA.  
Fuente: Echeverría 2006.

**Conservación.** La cepa madre se debe cultivar en PDA, durante 10 a 15 días con una temperatura de 25 °C hasta la esporulación, los cultivos esporulados, se cortan en cuadros de agar de 1 mm<sup>2</sup> y conservan en glicerol al 10% en viales en ultracongelación a -80 °C. Estos cultivos madre son usados para la preparación de matrices de producción (Echeverría 2006).

**Preparación de matrices.** A partir de la cepa madre en congelación se realizan las matrices de producción. Para ello se realiza una descongelación rápida a 37 °C/1 minuto, se toma una alícuota de 0.1 mL de la cepa madre y se deposita en una placa Petri con PDA. La siembra se realiza en forma de zigzag, con ayuda de un asa de Drigalski, se espera la esporulación del hongo en placas Petri aproximadamente de 15 días, esta actividad se realiza en la cámara de flujo laminar. Pasados 15 días se debe observar la esporulación del hongo en el medio de cultivo (Figura 6) (Crespo *et al.* 2018).

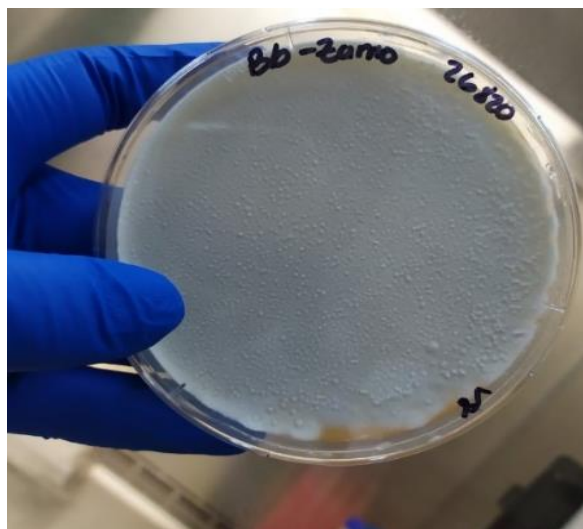


Figura 6. Matriz de *B. bassiana* cepa Zamorano.

Fuente: Guzman 2020.

### Producción en sustrato sólido

En este tipo de fermentación, utilizada básicamente para hongos, el microorganismo se desarrolla en la superficie húmeda de un sustrato sólido, el cual generalmente es un grano de cereal procesado. Esto permite al hongo crecer en condiciones similares a las encontradas en la naturaleza. La producción de los conidios aéreos generalmente se da en granos de arroz, debido a que este posee condiciones físicas con una adecuada superficie efectiva que favorece el crecimiento micelial por su consistencia suave, suelta, sin aglomerarse, su contenido alto en carbohidratos, para que permita un crecimiento homogéneo del hongo en este sustrato (Jackson 1999). Sin embargo, se puede usar otro tipo de sustratos como por ejemplo bagazo de caña (*Saccharum officinarum*), residuos de papa (*Solanum tuberosum*), salvado de trigo (*Triticum aestivum*) (Nava *et al.* 2012).

Aunque las fermentaciones semi sólidas son relativamente fáciles de desarrollar en pequeña escala, el escalado de las mismas a las proporciones necesarias para productos comerciales es bastante difícil por problemas asociados con la esterilización del sustrato, intercambio gaseoso, control de la temperatura, mantenimiento de cultivos puros y recuperación del producto a partir del sustrato (Jackson 1997). Por otra parte, el tiempo de fermentación necesario para la esporulación en sustratos sólidos (35 días), la cantidad de personal y la infraestructura (grandes espacios físicos), son factores que aumentan los costos de gran manera en este tipo de metodologías (Deshpande 1999; Jackson 1997; Jackson *et al.* 2004). La metodología es básicamente la misma alrededor del mundo, se trata de un proceso de varias etapas, que en general se organizan en seis pasos, que va desde la preparación del sustrato hasta la formulación y almacenamiento (Figura 7).



Figura 7. Etapas de producción de *B. bassiana* en sustrato sólido.

Fuente: Mascarin y Jaronski 2016.

**Preparación, esterilización y embolsado del sustrato.** En la preparación del sustrato se debe eliminar la mayor cantidad de partículas ajenas. Para ello, se lava el sustrato en este caso el arroz usando agua limpia, se debe dejar escurrir durante 10 minutos en un colador y

se procede con el embolsado (Motta y Murcia 2011). El embolsado se realiza colocando 100 g de arroz en una bolsa plástica de polipropileno resistente a la temperatura, estas deben ser enrolladas y posteriormente engrapadas, para luego esterilizar durante treinta minutos, a una temperatura de 121 °C y presión de 1.549841 kg/cm<sup>2</sup> (Jackson *et al.* 2010). Posteriormente se llevan las bolsas a la cámara de flujo laminar para su enfriamiento. Es necesario someter a rayos ultravioletas por un lapso de 15 minutos y aplicar en el exterior de la bolsa alcohol al 70% para evitar una contaminación cruzada (Mascarin *et al.* 2016).

**Inoculación y maduración.** A partir de las matrices en placa Petri con PDA, crecidos durante 10 a 15 días a 25 °C y de buena esporulación, en la cámara de flujo laminar se toman trocitos de agar y se colocan en 20 mL de una solución acuosa estéril de Tween 80 al 0.04 %, se agita vigorosamente con el fin de desprender la mayor cantidad de conidios (Jaronski 2007). Posteriormente es necesario realizar una pequeña abertura en las bolsas con arroz, se abren las grapas y se agrega de 10 a 15 mL de la solución de esporas a la bolsa con el sustrato estéril, con una concentración de  $5.5 \times 10^6$  conidios/mL, posteriormente se debe cerrar la abertura con grapas y mezclar el arroz haciendo movimientos rotativos. Las bolsas inoculadas son colocadas en un cuarto de incubación durante 25 días a una temperatura de 22 a 24 °C. Es necesario agitar las bolsas inoculadas cada tres días para diseminar los conidios, de esta manera se logra mejorar el contacto y germinación (Poma y Lopez 2017).

**Secado.** Pasados los 25 días de maduración, el sustrato esporulado se lleva a un cuarto de secado donde se dispersa en bandejas plásticas forradas con papel absorbente con el fin de absorber la humedad. El sustrato se deja en un cuarto cerrado a una humedad relativa de 30 a 35% durante 10 días hasta alcanzar una actividad de agua (*A<sub>w</sub>*) de 0.5 en los conidios (Jackson *et al.* 2010).

**Tamizado.** Pasado los 10 días de secado se coloca el arroz esporulado en tamizadoras industriales con el fin de separar las conidias del sustrato para posteriormente realizar el control de calidad y proceder con el empaqueo (Mascarin y Jaronski 2016).

**Formulación y almacenamiento.** Los conidios se mezclan con material inerte, para mantener una presentación de 200 a 300 gramos por empaque de producto. La formulación oscila en una concentración de conidias de  $1.0 \times 10^8$  conidios a  $4.1 \times 10^8$  por gramo. El almacenamiento del producto formulado se mantiene en cuartos fríos a una temperatura máxima de 4 °C, a su vez debe mantener una actividad de agua (*A<sub>w</sub>*) no mayor de 0.5 (Mascarin y Jaronski 2016).

### **Producción de por fermentación líquida**

La fermentación sumergida se perfila como el método más económico, se trata como su nombre lo indica, del crecimiento del hongo en sistemas totalmente líquidos (Jackson 1997). Existen gran cantidad de ventajas que hacen de esta metodología más efectiva, entre las que se destaca la necesidad de menos mano de obra para operar el fermentador y manejo del producto. Se cuenta además con la posibilidad de controlar de manera más sencilla factores ambientales como la temperatura, aireación y pH, manteniendo más estable el medio de crecimiento, cuya homogeneidad favorece las etapas de procesamiento posteriores (Jackson 1997).



Se ha observado que el hongo en cultivos líquidos es de rápido crecimiento, y que se adapta a gran cantidad de sustratos, siempre y cuando posean una adecuada aireación, fuentes de carbono, nitrógeno y elementos minerales (Iskandarov *et al.* 2006). La producción por fermentación líquida se puede detallar en cinco etapas las cuales tienen un lapso de 7 días (Figura 8).

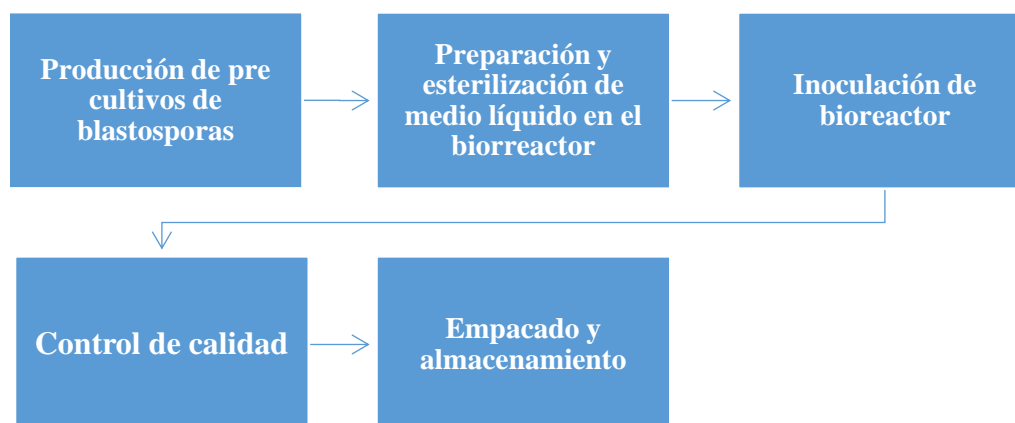


Figura 8. Etapas de producción de *B. bassiana* por fermentación líquida.  
Fuente: Mascarin y Jaronski 2016.

**Producción de pre cultivos de blastosporas.** Se prepara 100 mL de un medio líquido sintético semidefinido, en un matraz bafleado de 250 mL este se esteriliza durante 30 minutos a 121 °C y 1.0546 kg/cm<sup>2</sup>. Posteriormente en la cámara de flujo laminar se cortan cuadros de 1 cm<sup>2</sup> de los cultivos madres, crecidos durante 10-15 días a 25 °C y de buena esporulación, se agregan los trozos al caldo estéril, se incuban a 25 °C en agitación a 300 revoluciones por minuto (rpm) durante 72 horas. Pasado el tiempo de incubación se mide la concentración de blastosporas en el precultivo usando un hematocitómetro o cámara de Neubauer la cual debe ser  $5.0 \times 10^8$  blastosporas/mL (Jaronski 1997).

**Preparación y esterilización del medio líquido en el biorreactor.** Es recomendable primero esterilizar el biorreactor, a una temperatura de 121 °C 1.0546 kg/cm<sup>2</sup>, durante 30 minutos. Posteriormente se adiciona al biorreactor estéril, todos los ingredientes del medio de cultivo (Cuadro 1) y se disuelven en agua destilada (Mascarin y Jaronski 2016). Luego se esteriliza bajo las mismas condiciones anteriores, se deja enfriar hasta llegar a los 25 °C, para posteriormente inocular el biorreactor con el preinoculo (Jackson *et al.* 2010).

Cuadro 1. Medio de cultivo para *Beauveria bassiana* para fermentación líquida.

Componentes	g/L
Glucosa	80.0000
Caseína hidrolizada	25.0000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.3000
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.4000
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.0370
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.0500
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.0160
Tiamina	0.0005
Riboflavina	0.0005
Pantotenato	0.0005
Niacina	0.0005
Piridoxina	0.0005
Ácido fólico	0.0005
Biotina	0.0005
Vitamina B12	0.0005
Antiespumante	0.0005

Fuente: Jackson *et al.* 1997

**Inoculación del medio en el biorreactor.** Pasada las 72 horas de incubación del precultivo, se inocula el biorreactor usando una bomba peristáltica, con la cantidad de inóculo necesario para alcanzar una concentración inicial en el biorreactor de  $5.0 \times 10^6$  blastosporas/mL de medio (Jackson 1999).

**Monitoreo.** Después de la inoculación, se debe monitorear constantemente durante las 72 horas de producción. Los parámetros que deben ser monitoreados son la temperatura, no menor de 25 °C ni mayor de 30 °C, el oxígeno disuelto > 20, el pH (inicial debe ser de 5.3) y mantener en un rango de 5.0-5.5 durante el proceso de fermentación. Cada 24 horas, se realiza un muestreo donde se realizan pruebas de pureza y concentración de blastosporas/mL para evaluar la calidad del fermentado en producción (Solís *et al.* 2006).

**Drenaje y envasado.** Pasada las 72 horas del proceso de fermentación se procede a contar las blastosporas en la cámara de Neubauer. La formulación oscila en una concentración de  $1.0 \times 10^8$  a  $4.1 \times 10^8$  blastosporas/mL. Posteriormente se envasa en recipientes limpios y desinfectados con presión de vapor durante 30 segundos. El envasado para una dosis por hectárea consta de un volumen aproximado de 1000 mL. Estos se almacenan en refrigeración a 4 °C (Jackson *et al.* 2010).

#### Formulación en sustrato sólido y líquido

La formulación tiene como fin promover un microambiente óptimo a las conidias y blastosporas para mantenerlas viables, manteniendo así su vida anaquel durante su

almacenamiento. Para las formulaciones se utilizan polímeros biodegradables, estos son macromoléculas que muestran una apreciable descomposición en un medio biológicamente activo, los principales tipos de polímeros biodegradables usados en las formulaciones son: almidón, amilosa, derivados de celulosa, quitina, carragenanos, proteínas como caseína, albumina, queratina, gelatina, colágeno, ligninas, materiales inertes como arcilla blanca, arcilla verde, harina de trigo y sulfato de calcio (Rosas 1999).

**Formulación de conidias.** Las conidias han sido mayormente mezcladas con arcillas, entre las más usadas están las arcillas blanca y verde, debido a que podido mantener su viabilidad a 4 °C en un periodo mayor a cuatro meses, también se puede utilizar aceites vegetales como aceite de soya o maní, sin embargo, pueden bajar la viabilidad de las conidias debido a que estos aceites dañan la pared celular de las conidias volviéndolas poco viables, solo se añade el material inerte de manera simple, se mezcla junto con las conidias antes del empaque, el porcentaje de material inerte va de acuerdo a la cantidad total en gramos, generalmente representa el 90% de material inerte y el 10% de conidios, para mantener una presentación de 200 a 300 gramos por empaque de producto con una concentración de  $1.0 \times 10^8$  a  $4.1 \times 10^8$  conidias/g (Hernandez y Jiménez 2018).

**Formulación de blastosporas.** Las blastosporas pueden microencapsularse mediante un proceso de coacervación, este método es usado ampliamente para la formulación de líquidos y emulsiones concentradas. La microencapsulación se basa en que la blastospora es rodeada por una pared de revestimiento para formar pequeñas cápsulas, protegiendo y manteniendo su viabilidad en un periodo de almacenamiento de cinco a ocho meses (Rosas 1999). Los agentes encapsulantes más comunes en la industria son proteínas (gelatina) y polisacáridos (goma acacia) debido a ser productos naturales y relativamente baratos, generalmente los polisacáridos son comúnmente usados junto con las proteínas para formar los coacervados, debido a que tiene varios grupos carboxilo cargados negativamente que pueden interactuar con los grupos catiónicos presentes en las proteínas provocando estabilidad en su formulación. La formulación líquida presenta una concentración de  $1.0 \times 10^8$  a  $4.1 \times 10^8$  blastosporas por mL, a esta solución se somete a un proceso de tamizado usando separador de cribado vibratorio Sweco con el fin de separar las blastosporas del micelio, posteriormente para el proceso de coacervación se usa generalmente como proteína la gelatina y como polisacárido la goma acacia, el recipiente donde va a ir el preparado debe ser un recipiente con cierre inviolable, este tiene un dispositivos especial que revela si está cerrado o abierto, en este recipiente se procede a preparar dos disoluciones acuosas a una concentración menor del 3% en peso de cada una, a una de ellas se le adiciona las blastosporas que sería nuestro material activo y sobre esta se le adiciona la otra disolución. La temperatura debe ser mayor que el punto de gelificación de la gelatina mayor a 35 °C, se debe ajustar el pH a 3.8-4.3 y se mantiene una agitación continua de 300 rpm en todo el proceso. El sistema debe enfriarse a 5 °C, la cápsula coacervada gelifica y se endurece añadiendo glutaraldehído, con un tamaño a rededor de 80  $\mu$ m, después las microcápsulas se secan y recogen para su posterior empaque en diferentes presentaciones de acuerdo con la casa comercial (Hernandez y Jiménez 2018).

### **Control de calidad para conidias producidas en fermentación en sustrato sólido**

Es importante implementar no solo un sistema de control de calidad eficiente para evaluar el producto final, sino que también, un sistema de control de calidad para el proceso, buscando

principalmente la obtención de productos con la máxima eficacia en el campo, los controles de calidad de las conidias son: prueba de pureza, prueba de viabilidad y lectura de concentración de conidias (Castro 2013).

**Prueba de pureza.** El porcentaje de pureza aceptable es de 100%, para ello se realiza una suspensión de conidios. Se pesa 1 g de conidios tamizados y se coloca en 100 mL de agua destilada estéril, partiendo de esta se realizan diluciones consecutivas 1:10, posteriormente se inoculan 0.1 mL de la última dilución en placas Petri con PDA usando el método de extensión en superficie. Se incuba durante 5 días con una temperatura de 25 °C en condiciones de oscuridad. Para la lectura, se cuentan el número de UFC (Unidades formadoras de colonia) con morfología característica de *B. bassiana* y UFC con morfología no característica, además se calcula el porcentaje de pureza, dividiendo las UFC características entre el total de UFC, y multiplicándolo por 100% tal como está detallado en la ecuación 1 (Chiriboga *et al.* 2015).

$$\text{Pureza(\%)} = \frac{\text{Número de UFC características de } B.bassiana}{\text{Número de UFC totales}} \times 100 \quad [1]$$

**Prueba de viabilidad.** El porcentaje de viabilidad aceptable es mayor a 90%, la evaluación de viabilidad de conidias se realiza en agar-agua al 2%, se depositan 5 alícuotas de dilución  $1.0 \times 10^5$  de la suspensión del hongo, en 5 puntos al azar de cada plato Petri. La lectura se realiza 24 horas después de haber depositado las alícuotas en el medio, se usa el microscopio con un objetivo de 40x, contabilizando conidios germinados y no germinados, contando por lo menos 200 conidias en cada montaje, el porcentaje de viabilidad se determina dividiendo las germinadas entre el total del conidias observadas. Para realizar el cálculo se aplica la siguiente ecuación 2 (Chacin *et al.* 2013).

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{\text{Número de conidias germinadas}}{\text{Número de conidias totales}} \times 100 \quad [2]$$

**Lectura de concentración de conidias.** La concentración de conidios por gramo es determinada después del proceso de tamizado, se toma 1 g de conidios tamizados y se agrega en un tubo de ensayo que contenga solución estéril Tween 80 al 0.1% (v/v), se realiza el conteo usando la metodología de Antía *et al.* (1992). Para obtener la cantidad de conidias por gramo del producto se realiza un conteo usando un microscopio y una cámara de Neubauer. se multiplica el promedio del número de conidias por mililitro obtenido en el recuento y posteriormente esta cantidad se divide por el peso de la muestra utilizada, desde  $1.0 \times 10^8$  a  $4.1 \times 10^8$  conidios/g ya es la concentración permitida para formular el producto (Gómez *et al.* 2014).

### **Control de calidad para blastosporas producidas por fermentación líquida**

El control de calidad se realiza durante el proceso de la producción de blastosporas, debido a que es muy estricto su control, por ello este se basa en un monitoreo constante de los factores que se controlan en el biorreactor como es el pH, nivel de agitación, oxígeno disuelto, temperatura, además de realizar pruebas de pureza para verificar que no hay contaminación en el medio y llevar el control de la concentración de las blastosporas para su posterior formulación (Castro 2013).

**Monitoreo de producción.** Después de inocular las blastosporas en el biorreactor se realiza un constante monitoreo durante 72 horas de los parámetros del proceso de fermentación; temperatura (24 a 25 °C), oxígeno disuelto (> 20), pH (5.5 a 5.8).

**Muestreo cada 24 horas.** Se realiza muestreo del fermentado en el biorreactor para realizar pruebas microbiológicas de calidad en la producción de las blastosporas para lo cual se hacen pruebas de pureza y lectura de concentración de blastosporas, de esta manera se determina con anterioridad la calidad y pureza de la producción (Solís *et al.* 2006).

**Prueba de pureza.** Se toma una azada del fermentado en producción y se siembra en un tubo con caldo TSB (caldo soja tripticaseína), y se incuba durante 16 horas a 25 °C, si hay turbidez en el tubo indica la presencia de bacterias, lo que indica disminución de calidad y concentración de blastosporas por mililitro.

**Lectura de concentración de blastosporas.** La concentración de blastosporas por mililitro es determinada cada 24 horas durante el proceso maduración en el biorreactor, se toma 1 mL de la solución, se agrega en un tubo de ensayo que contenga solución estéril de agua, se realiza el conteo usando la metodología de Antía *et al.* (1992). Para obtener la cantidad de blastosporas por mL del producto se realiza un conteo usando un microscopio y una cámara de Neubauer. si la concentración es de  $5.5 \times 10^8$  blastosporas/mL ya se procede a la formulación la más común es la microencapsulación mediante un proceso de coacervación (Gómez *et al.* 2014).

### **Recomendaciones Agronómicas**

La aplicación del producto ya sea conidias o blastosporas se realiza de forma preventiva para el control de plagas, por lo que es recomendable mantener un monitoreo constante del cultivo y aplicar en los primeros indicios de presencia de plagas. Se debe aplicar en horas frescas ya que los rayos ultravioleta afectan la germinación de las esporas.

Es necesario tomar en cuenta que el modo de acción del producto es de contacto directo de otra manera no tendrá con efectividad en el control de plagas, la aplicación no debe coincidir con aplicaciones de fungicidas o azufrados, se debe usar equipos totalmente limpios y libres de residuos químicos debido a que estos podrían inhibir la viabilidad del hongo (Gómez *et al.* 2014).

El modo de aplicación dependerá del lugar donde esté presente la plaga, si es en el follaje sería usando bombas de fumigación, sin embargo, si es en el suelo podrá utilizar el sistema de riego para llegar a las raíces de la planta de una manera más efectiva (Motta y Murcia 2011).

**Aplicación en campo de *B. bassiana*.** La dosis por hectárea de *B. bassiana* es 1 L/ha en el caso de blastosporas y 1 paquete de 240 g/ha en el caso de conidias (Chiriboga *et al.* 2015). Se debe colocar en un recipiente de 20 L con agua hasta la mitad del envase, para hacer la premezcla respectiva de las conidias o blastosporas con el adherente y el agua, en el caso de las blastosporas no requieren el uso obligatorio del adherente debido a su naturaleza hidrofílica que le permite mezclarse con el agua fácilmente. Posteriormente se debe aplicar un corrector de pH y dureza de agua (si lo requiere), como por ejemplo el corrector Biosol

26 SL, debido a que es recomendable que el agua a utilizar tenga un pH ligeramente ácido entre 5.5 a 6.5, con una dureza entre 120 a 150 mg/L compuestos minerales en el agua. (Motta y Murcia 2011). Al tener la solución lista se procede a mezclar en el volumen total que se va a usar para la aplicación en campo. Es importante mantener la solución en constante movimiento para evitar la sedimentación de las conidias en el agua, la aplicación puede ser con mochila, o una fumigadora adicionada a un tractor (Gómez *et al.* 2014).

## 4. CONCLUSIONES

- La producción de *B. bassiana* puede ser de manera artesanal o baja escala y gran escala. La producción a gran escala tiene dos métodos por fermentación usando medio sólidos, el cual ha sido el más usado debido a la facilidad de manejo y la producción en medio líquido, el cual es más complejo por el uso de biorreactores.
- La producción en sustrato sólido promueve la obtención de conidios haciendo uso de sustratos como cereales esterilizados y humedecidos, el arroz es el más usado por su adecuada superficie efectiva en un lapso de 35 días, en cambio el método por fermentación líquida usando biorreactores produce blastosporas haciendo uso de un medio cultivo a base de una fuente de carbono y nitrógeno en un lapso de 7 días.
- El control de calidad de producción de conidias y blastosporas se basa en pruebas de pureza, determinación de viabilidad y concentración de conidias o blastosporas/ gramo o mililitro, en la formulación de conidias se usan arcillas y harinas y en la formulación de blastosporas se aplica microencapsulación usando polisacáridos y proteínas formando coacervados.

## 5. RECOMENDACIONES

- Investigar e implementar técnicas de formulación para fermentados líquidos con el fin de aumentar la viabilidad de las blastosporas de *B. bassiana*.
- Examinar otros medios de cultivo más económicos para la producción líquida en biorreactores, con el fin incrementar el rendimiento de producción de blastosporas de *B. bassiana*.
- Buscar y probar otros sustratos utilizados en la producción en medio sólido para aumentar los rendimientos de crecimiento de *B. bassiana*.



## 6. LITERATURA CITADA

- Antía OP, Posada FJ, Bustillo AE, Gonzáles MT. 1992. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. [sin lugar]: [sin editorial]. 12 p. (vol. 182). [https://www.researchgate.net/publication/233957052\\_Produccion\\_en\\_finca\\_del\\_hongo\\_Beauveria\\_bassiana\\_para\\_el\\_control\\_de\\_la\\_broca\\_del\\_cafe](https://www.researchgate.net/publication/233957052_Produccion_en_finca_del_hongo_Beauveria_bassiana_para_el_control_de_la_broca_del_cafe).
- Arboleda J, Delgado F, Valencia A. 2003. Efecto de la toxina beauvericina sobre *Hypothenemus hampei*. Costa Rica: [sin editorial]. 71 p. 68 vol. [https://www.researchgate.net/publication/228761687\\_Efecto\\_de\\_la\\_toxina\\_bauvericina\\_sobre\\_Hypothenemus\\_hampeii](https://www.researchgate.net/publication/228761687_Efecto_de_la_toxina_bauvericina_sobre_Hypothenemus_hampeii).
- Arias López P, Banda Banda B, Bejarano de las Cruz, Renzo, Benites Salcedo D, Arellano Barragán J. 2014. Efecto de *Beauveria bassiana* sobre la mosca *Anastrepha sp.* y larvas del cogollero *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio. REBIOLEST; [consultado el 9 de sep. de 2020]. 2(1). <https://core.ac.uk/download/pdf/267888774.pdf>.
- Auld B. 2002. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. Plant Pathology. 51(4):518. en. <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3059.2002.07351.x>. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.07351.x.
- Barquero Miranda M. 2008. Producción de *Beauveria bassiana* mediante fermentación líquida. Revista Informativa; [consultado el 6 de sep. de 2020]. II:1/1. [http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/revista\\_informativa/Revista-II-Sem-08.pdf?fbclid=IwAR1ptD76Uxy9h5aMzjQQAKFIF-0HPktwlsBTgGLKuHiDn\\_IpIXbIW2-Vh\\_c](http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/revista_informativa/Revista-II-Sem-08.pdf?fbclid=IwAR1ptD76Uxy9h5aMzjQQAKFIF-0HPktwlsBTgGLKuHiDn_IpIXbIW2-Vh_c).
- Castro Alfaro LM. 2013. Control de calidad en los procesos de producción de hongos entomopatógenos y del parasitoide *Cotesia flavipes* en Costa Rica. Costa Rica: [sin editorial]; [Consultado el 6 octubre del 2020]. 24p. <http://servicios.laica.co.cr/laica-cv-biblioteca/index.php/Library/download/ngDmebakOvIsGtvTUHMKPIukrNFTber>
- Chacin Zambrano C, Duarte FL, Reyes LC. 2013. Evaluación del efecto de *Beauveria bassiana* en el control biológico de *Varroa destructor*, parasito de la abeja melífera (*Apis mellifera*) en la finca Felisa en el municipio de los patios, Norte de Santander. Innovaciencia facultad cienc. exactas fis. naturales. 1(1):18. doi:10.15649/2346075X.211.
- Chiriboga H, Gómez G, Garcés KE. 2015. Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (ysaú). Paraguay: IICA. ISBN: 978-92-9248-592-4. es. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/2646>.
- Crespo Martín E, Gallego Sánchez LM, Gámez Arcas S, Mozo Mulero M, Nevado Berzosa MP, Pérez Camacho I, Soriano Bermúdez JJ, Téllez Pueblas EA, Molina-Heredia FP, Roncel M, et al. 2018. Hongos entomopatógenos: de la agricultura a la conservación del patrimonio histórico. Revista PH; [consultado el 15 de ago. de 2020]. (94):352–367. doi:10.33349/2018.0.4204.

- Cuervo Mulet RA, López Villalobos ID, Trujillo Perdomo JF, Fernández Daza FF, Vélez-Correa SL. 2018. Riesgos en salud laboral asociados al uso de un bioinsecticida con esporas de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma lignorum*. *entramado*. 14(2):244–255. doi:10.18041/1900-3803/entramado.2.4762.
- Deshpande MV. 1999. Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*. 25(3):229–243. eng. doi:10.1080/10408419991299220.
- Doberski JW. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus* to larvae and adults of *S. scolytus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 37(2):188–194. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022201181900744>. doi:10.1016/0022-2011(81)90074-4.
- Echeverría Beirute F. 2006. Caracterización Biológica Molecular *Beauveria bassiana*. Costa Rica: CIB. [https://www.researchgate.net/publication/333293462\\_Trabajo\\_Final\\_de\\_Graduacion-Characterizacion\\_Biologica\\_Molecular\\_Beauveria\\_bassiana](https://www.researchgate.net/publication/333293462_Trabajo_Final_de_Graduacion-Characterizacion_Biologica_Molecular_Beauveria_bassiana).
- García M, García S, Leshner J, Molina R. 2011. Vista de Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*; [consultado el 15 de ago. de 2020]. 10(2):1–8. <https://revistas.ujat.mx/index.php/horizonte/article/view/229/170>.
- Gómez H, Zapata A, Torres E, Tenorio M. 2014. Producción de hongos entomopatógenos. SCB; [consultado el 3 de ago. de 2020]. I:1–37. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Produccion-y-Uso-de-Hongos-Entomopatogenos.pdf>.
- Góngora Botero CE, Marín Marín P, Benavides Machado P. 2009. Claves para el éxito del hongo *beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. Colombia: Cenicafé. [https://www.researchgate.net/publication/329754601\\_CLAVES\\_PARA\\_EL\\_EXITO\\_DEL\\_HONGO\\_Beauveria\\_bassiana\\_COMO\\_CONTROLADOR\\_BIOLOGICO\\_DE\\_LA\\_BROCA\\_DEL\\_CAFE](https://www.researchgate.net/publication/329754601_CLAVES_PARA_EL_EXITO_DEL_HONGO_Beauveria_bassiana_COMO_CONTROLADOR_BIOLOGICO_DE_LA_BROCA_DEL_CAFE).
- Guzman S. 2020. Matriz de *B. bassiana* cepa Laboratorio de Control Biológico, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Hernandez R, Jiménez T. 2018. Coacervación compleja: una alternativa como un método de microencapsulación - TSIA. Puebla-México: TSIA; [actualizado el 10 de may. de 2018]. <https://tsia.udlap.mx/coacervacion-compleja-una-alternativa-como-un-metodo-de-microencapsulacion/>.
- Iskandarov US, Guzalova AG, Davranov KD. 2006. Effects of nutrient medium composition and temperature X.on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Appl Biochem Microbiol*. 42(1):72–76. doi:10.1134/S000368380601011
- Jackson MA. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19(3):180–187. doi:10.1038/sj.jim.2900426.
- Jackson MA. 1999. Method for producing desiccation tolerant *paecilomyces fumosoroseus* spores. United States Patent; [consultado el 3 de nov. de 2020]. 5(III):1–14.

- <https://patentimages.storage.googleapis.com/7b/a8/4e/a1bb41cf765659/US5968808.pdf>
- Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*. 55(1):129–145. doi:10.1007/s10526-009-9240-y.
- Jackson MA, Payne AR, Odelson DA. 2004. Liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 31(4):149–154. eng. doi:10.1007/s10295-004-0127-8.
- Jaronski S. 1997. New Paradigms in Formulating Mycoinsecticides. *Pesticide Formulations and Application Systems: 17th Volume, ASTM STP 1328*. G.R. Goss, M.J. Hopkinson and H. M. Collins, eds. Philadelphia: ASTM, pp. 99-114. ASTM STP. 17:99–114.  
[https://www.researchgate.net/publication/224852553\\_Jaronski\\_ST\\_1997\\_New\\_Paradigms\\_in\\_Formulating\\_Mycoinsecticides\\_Pesticide\\_Formulations\\_and\\_Application\\_Systems\\_17th\\_Volume\\_ASTM\\_STP\\_1328\\_GR\\_Goss\\_MJ\\_Hopkinson\\_and\\_H\\_M\\_Collins\\_eds\\_Philadelphia\\_ASTM\\_pp\\_99](https://www.researchgate.net/publication/224852553_Jaronski_ST_1997_New_Paradigms_in_Formulating_Mycoinsecticides_Pesticide_Formulations_and_Application_Systems_17th_Volume_ASTM_STP_1328_GR_Goss_MJ_Hopkinson_and_H_M_Collins_eds_Philadelphia_ASTM_pp_99).
- Jaronski ST. 2007. Soil ecology of the entomopathogenic Ascomycetes: a critical examination of what we (think) we know. Sidney: Research Signpost. 91 p. ISBN: 978-81-308-0192-6.  
[https://www.researchgate.net/publication/313704833\\_Soil\\_ecology\\_of\\_the\\_entomopathogenic\\_Ascomycetes\\_a\\_critical\\_examination\\_of\\_what\\_we\\_think\\_we\\_know](https://www.researchgate.net/publication/313704833_Soil_ecology_of_the_entomopathogenic_Ascomycetes_a_critical_examination_of_what_we_think_we_know).
- Kouassi M. 2001. Les possibilités de la lutte microbiologique. *Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement*. (Volume 2 Numéro 2). fr. <https://journals.openedition.org/vertigo/4091>. doi:10.4000/vertigo.4091.
- Mascarin GM, Jackson MA, Behle RW, Kobori NN, Júnior ID. 2016. Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana* blastospores using convective drying and active packaging processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100(19):8359–8370. eng. doi:10.1007/s00253-016-7597-2.
- Mascarin GM, Jaronski ST. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J Microbiol Biotechnol*. 32(11):177. eng. doi:10.1007/s11274-016-2131-3.
- Meyling NV, Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*. 43(2):145–155. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964407001806>. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.07.007.
- Motta Delgado PA, Murcia Ordoñez B. 2011. Redalyc.Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua*; [consultado el 3 de ago. de 2020]. 6(2):77–90. <https://www.redalyc.org/pdf/928/92819767006.pdf>.
- Nava Pérez E, García Gutiérrez C, Camacho Báez JR, Vázquez Montoya EL. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*; [consultado el 3 de ago. de 2020]. 8(3):17–29. <https://www.redalyc.org/pdf/461/46125177003.pdf>.
- Poma Laura H, López Blanco C. 2017. Esporulación de conidias de *Beauveria bassiana* en sustratos de arroz. *APTHAPI*. 3(II):500.

[http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-03042017000200003&lng=es&nrm=iso](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-03042017000200003&lng=es&nrm=iso).

- Rosas García N. 1999. Desarrollo de formulados asperjables de *Beauveria bassiana* (Bálsamo Vuillemin) utilizando diversos polímeros. México: Universidad Autónoma de Nuevo León; [actualizado el 3 de ago. de 2020; consultado el 3 de ago. de 200]. <https://1library.co/document/oz1j12dz-desarrollo-formulados-asperjables-beauveria-bassiana-balsamovuillemin-utilizando-polimeros.html>.
- Solis Soto A, García Gutierrez C, González Maldonado MB, Medrano Roldán H, Galán Wong LJ. 2006. Redalyc. Toxicidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* (VUILL) contra palomilla del manzano *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Folia Entomológica Mexicana*; [consultado el 3 de ago. de 2020]. 45(2):195–200. <https://www.redalyc.org/pdf/424/42445210.pdf>.
- Vázquez Chacón JY. 16 de nov. de 2018. *Beauveria bassiana*: características, morfología, ciclo de vida. lifeder; [consultado el 3 de ago. de 2020]. <https://www.lifeder.com/beauveria-bassiana/>.
- Wan H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: insect-cuticle degrading enzymes and development of a new selection marker for fungal transformation. China: Heidelberg University Library.