

PERFILES DIFERENCIALES DE *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. EN REPUESTA AL CO₂: PRODUCCIÓN DE CONIDIOS Y AMILASAS

DIFFERENTIAL PROFILES OF *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. AS A RESPONSE TO CO₂: PRODUCTION OF CONIDIA AND AMYLASES

Paul M. Garza-López¹, Mina Konigsberg², Gerardo Saucedo-Castañeda¹, Octavio Loera^{1*}

¹Departamento de Biotecnología, ²Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 09340. San Rafael Atlixco 186. Colonia Vicentina, Iztapalapa, México, D. F. (loera@xanum.uam.mx).

RESUMEN

La producción de conidios del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. se realiza en cultivo en medio sólido (CMS) utilizando productos agrícolas y sus residuos, como arroz (*Oryza sativa*) y bagazo de caña (*Saccharum officinarum*), donde el CO₂ puede acumularse como producto del metabolismo. En este estudio se usó arroz (*Oryza sativa* var. japonica) como sustrato usando dos composiciones atmosféricas: aire normal y otra enriquecida con CO₂ (5 %), a través de recambios cada 12 o 24 h. Se determinó el efecto de estos tratamientos en la producción de conidios y de enzimas amilasas por *B. bassiana*, mediante un diseño completamente al azar y análisis de varianza usando la prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$). La producción máxima de conidios por g de sustrato seco inicial (gssi) se obtuvo con la atmósfera normal (1.14×10^9 conidios gssi⁻¹), mientras que con 5 % de CO₂ la producción de conidios disminuyó hasta 85 % (1.8×10^8 conidios gssi⁻¹). Sin embargo, en este último tratamiento la actividad de amilasas se incrementó tres veces (16.58 UI gssi⁻¹) respecto a la atmósfera normal (5.41 UI gssi⁻¹). Estos resultados son importantes para la producción de conidios y de enzimas por hongos en CMS, con la recomendación de modificar la concentración de CO₂, según se requiera favorecer el tipo de producto.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, *Oryza sativa*, dióxido de carbono, cultivo en medio sólido, rendimiento de conidios, actividad enzimática.

ABSTRACT

Conidia production of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. is performed in a solid state culture (SSC) using agricultural products and their residues, such as rice (*Oryza sativa*) and sugarcane (*Saccharum officinarum*) bagasse, where CO₂ can be accumulated as a product of metabolism. In this study rice (*Oryza sativa* var. japonica) was used as substrate using two atmospheric compositions: normal air and other enriched with CO₂ (5 %), through exchanges every 12 or 24 h. The effect of these treatments was determined on the conidial production and amylase enzymes by *B. bassiana*, using a completely randomized design and analysis of variance using Tukey-Kramer test ($p \leq 0.05$). Maximum conidia production per g of initial dry substrate (gssi) was obtained with the normal atmosphere (1.14×10^9 conidia gssi⁻¹), while with 5 % of CO₂ the conidia production decreased up to 85 % (1.8×10^8 conidia gssi⁻¹). However, in this latter treatment amylase activity increased three times (16.58 UI gssi⁻¹) with respect to the normal atmosphere (5.41 UI gssi⁻¹). These results are important for the conidia and enzymes production by fungi in SSC, with the recommendation to modify the concentration of CO₂, as it is required to favor the type of product.

Key words: *Beauveria bassiana*, *Oryza sativa*, carbon dioxide, solid medium culture, yield of conidia, enzymatic activity.

INTRODUCTION

In México the use of bio-insecticides increased because many species of insects have developed resistance to conventional insecticides; in addition, people have become more aware to preserve the environment and human health (Batra, 1982; Glare, 2004). Therefore, bio-insecticides are an

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2011. Aprobado: septiembre, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 45: 761-770. 2011.

INTRODUCCIÓN

En México aumenta el uso de bioinsecticidas debido a que muchas especies de insectos han desarrollado resistencia a insecticidas convencionales; además, el público ha adquirido más consciencia de preservar el ambiente y la salud humana (Batra, 1982; Glare, 2004). Por ello, los bioinsecticidas son una alternativa en la agricultura sostenible y manejo integral de plagas (Lacey y Goettel, 1995).

Existen alrededor de 2000 especies de microorganismos entomopatógenos, de los cuales 750 son especies de hongos (Candas y Bulla, 2002). La mayoría de estos microorganismos infectan únicamente a insectos y no son nocivos para otros organismos como aves, mamíferos o plantas (Alatorre-Rosas, 2007). Dentro de las especies de hongos usadas para formular bioinsecticidas se encuentra *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., la cual infecta a varias especies de insectos plaga como picudo del algodón (*Anthonomus grandis*), palomilla de la manzana (*Cydia pomonella*), barrenador del tallo de maíz (*Diatraea saccharalis*), gusano de la harina (*Tenebrio molitor*), broca del café (*Hypothenemus hampei*) y mosquitas blancas (*Bemisia* spp.) (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999; Alves *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2002; Montesinos-Matías *et al.*, 2011).

La producción de conidios de *B. bassiana* se realiza en cultivo en medio sólido (CMS) y en cultivo líquido (CL). Para el CMS se usan soportes naturales como bagazo de caña (*Saccharum officinarum*), residuos de papa (*Solanum tuberosum*), salvado de trigo (*Triticum aestivum*) y arroz (*Oryza sativa*) (Neves y Alves, 2000; Dalla-Santa *et al.*, 2004, 2005; Núñez-Gaona *et al.*, 2010). Ye *et al.* (2006) desarrollaron una cámara de cultivo para producir conidios de *B. bassiana* a nivel de planta piloto, utilizando arroz como sustrato. Además de este sistema, hay procesos de producción de conidios de *B. bassiana* basados en paja de arroz y salvado de trigo (Kang *et al.*, 2005). En otros estudios donde se usó arroz como sustrato para la producción de *Metarhizium anisopliae* y *B. bassiana* (Liu y Tzeng, 1999; Neves y Alves, 2000; Arzumanov *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha considerado medir la actividad de amilasas, que son las enzimas más importantes para hidrolizar el almidón, el cual es la fuente de carbono más importante en el arroz. Por tanto, hay varios productos agrícolas y

option for sustainable agriculture and integral pest management (Lacey and Goettel, 1995).

There are about 2000 species of entomopathogenic microorganisms, of which 750 are species of fungi (Candas and Bulla, 2002). Most of these microorganisms infect only insects and are innocuous for other organisms as birds, mammals or plants (Alatorre-Rosas, 2007). Among the species of fungi used to formulate bio-insecticides are *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., which infects several species of pest insects, such as boll weevil (*Anthonomus grandis*), codling moth (*Cydia pomonella*), corn stalk borer (*Diatraea saccharalis*), mealworm (*Tenebrio molitor*), coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and whiteflies (*Bemisia* spp.) (Hernández-Velázquez and Berlanga-Padilla, 1999; Alves *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2002; Montesinos-Matías *et al.*, 2011).

The production of conidia of *B. bassiana* is usually achieved in solid culture (SSC) and in liquid culture (LC). For the SSC natural supports are used such as sugar cane (*Saccharum officinarum*) bagasse, potato (*Solanum tuberosum*) residues, wheat (*Triticum aestivum*) bran and rice (*Oryza sativa*) (Neves and Alves, 2000; Dalla-Santa *et al.*, 2004, 2005; Núñez-Gaona *et al.*, 2010). Ye *et al.* (2006) developed a culture chamber to produce conidia of *B. bassiana* at pilot plant level, using rice as substrate. In addition to this system, there are processes of production of conidia of *B. bassiana* based on rice straw and wheat bran (Kang *et al.*, 2005). In other studies was used as a substrate for the production of *Metarhizium anisopliae* and *B. bassiana* (Liu and Tzeng, 1999; Neves and Alves, 2000; Arzumanov *et al.*, 2005). However, it has not been considered to measure the amylases activity, which are the most important enzymes to hydrolyze starch, that is the most important carbon source in rice. Therefore, there are several agricultural products and agro-industrial residues used in the world to produce conidia of this entomopathogenic fungus, which are the most important infective units for field application.

Some factors have an important influence on the production of conidia such as heat transfer, size and type of substrate particles, water activity, pH, temperature and gas exchange (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1990; Alatorre-Rosas, 2007; Núñez-Gaona *et al.*, 2010). In the processes of conidia production, CO₂ can be accumulated in the reactors, as a product

residuos agroindustriales usados en el mundo para producir conidios de este hongo entomopatógeno, los cuales son las unidades infectivas más importantes para la aplicación en campo.

Algunos factores tienen una influencia importante en la producción de conidios: transferencia de calor, tamaño y tipo de partícula del sustrato, actividad de agua, pH, temperatura e intercambio gaseoso (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1990; Alatorre-Rosas, 2007; Núñez-Gaona *et al.*, 2010). En los procesos de producción de conidios se puede acumular el CO₂ en los reactores, como producto del metabolismo del propio hongo. El efecto de la concentración de CO₂ se ha descrito para varias especies de hongos filamentosos en CMS y en CL (Desgranges y Durand, 1990; McIntyre y McNeil, 1998). Lord (2009) realizó un estudio con una atmósfera con baja concentración de O₂ y elevada cantidad de CO₂, pero sólo durante los bioensayos con insectos infectados con *B. bassiana*.

El objetivo de este estudio fue comparar el efecto de dos composiciones atmosféricas, una normal (aire) y otra con 5 % de CO₂, durante el crecimiento, producción de conidios y amilasas de *B. bassiana* utilizando un soporte natural fácilmente manipulable como el arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa de *B. bassiana* Bb 882.5 perteneciente a la colección de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (México, D. F.), propagada por picadura en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de agar Sabouraud-Maltosa al 2 % modificado (SMA) (agar 15 g L⁻¹, maltosa 20 g L⁻¹, peptona de caseína 2.5 g L⁻¹, extracto de levadura 0.5 g L⁻¹ y avena molida 15 g L⁻¹), esterilizados 15 min en autoclave a 15 PSI. Una vez inoculados, se incubaron 8 d a 28±1 °C con un fotoperiodo 12:12 h.

Cultivo en medio sólido

Como unidades experimentales se usaron botellas serológicas de 75 mL conteniendo 5 g de arroz pre-cocido, esterilizadas 15 min en autoclave a 15 PSI. Se preparó una suspensión de conidios adicionando 20 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.05 % a los matraces Erlenmeyer usados en la propagación. Luego se contaron conidios en cámara de Neubauer, realizando las diluciones necesarias, con Tween 80 al 0.05 %, para obtener una concentración de 5×10⁶ conidios por mL (con mL⁻¹).

of metabolism of the fungus itself. The effect of CO₂ concentration has been described for several species of filamentous fungi in SSC and in LC (Desgranges and Durand, 1990; McIntyre and McNeil, 1998). Lord (2009) conducted a study under an atmosphere with a low concentration of O₂ and a high amount of CO₂, but only during bioassays with insects infected with *B. bassiana*.

The aim of this study was to compare the effect of two atmospheric conditions, normal (air) and other with (5 %) of CO₂, during growth, conidia and amylases production of *B. bassiana* using an easily manipulated natural support such as rice.

MATERIALS AND METHODS

The strain of *B. bassiana* Bb 882.5 which belongs to the culture collection of the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (Mexico City) was used, propagated by point inoculation in Erlenmeyer flasks of 250 mL containing 50 mL of Sabouraud-Maltose agar at 2 % modified (SMA) (agar 15 g L⁻¹, maltose 20 g L⁻¹, casein peptone 2.5 g L⁻¹, yeast extract 0.5 g L⁻¹, and ground oats 15g L⁻¹), sterilized 15 min in an autoclave at 15 PSI. Once inoculated, were incubated 8 d at 28±1 °C with a 12:12 h photoperiod.

Culture in solid medium

Serological bottles of 75 mL were used as experimental units, containing 5 g of pre-cooked rice, sterilized 15 min in an autoclave at 15 PSI. A suspension of conidia was prepared adding 20 mL of a sterile Tween® 80 solution at 0.05 % to the Erlenmeyer flasks used in the propagation. Conidia were then counted in the Neubauer chamber, making the necessary dilutions with Tween 80 at 0.05 %, to obtain a concentration of 5×10⁶ conidia per mL (con mL⁻¹). Finally 1 mL was added of this suspension of conidia to obtain a final concentration of 1×10⁶ conidia per g of initial solid substrate (con gss⁻¹), with the necessary amount of a sterile solution of yeast extract (0.5 g L⁻¹) to obtain 40 % of initial moisture content.

Modification of the atmosphere

Two gas mixtures were utilized; normal atmosphere (21 % O₂) and one enriched with CO₂ (21 % O₂ and 5% CO₂). The enriched mixture was purchased from the company Praxair-Mexico S. A. All experiments began with a pre-stationary phase, where for each experimental unit a cotton plug was placed. On the third day of the culture rubber seals were placed to the

Finalmente se adicionó 1 mL de esta suspensión de conidios para obtener una concentración final de 1×10^6 conidios por g de sustrato sólido inicial (con gss^{-1}), con la cantidad necesaria de una solución estéril de extracto de levadura (0.5 g L^{-1}) para obtener humedad inicial de 40 %.

Modificación de la atmósfera

Se utilizaron dos mezclas gaseosas: atmósfera normal (21 % O_2) y una enriquecida con CO_2 (21 % O_2 y 5 % CO_2). La mezcla enriquecida se adquirió de la compañía Praxair-México S. A. Todos los experimentos comenzaron con una fase pre-estacionaria, donde a cada unidad experimental se colocó un tapón de algodón. Al tercer día del cultivo se colocaron tapones de goma a las botellas destinadas al tratamiento enriquecido con CO_2 y se colocaron dos agujas, una para facilitar la salida de los gases y la segunda conectada al tanque que contenía la mezcla enriquecida con flujo de $20 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ por 1 min (Tlecuil-Beristain *et al.*, 2010). Los recambios gaseosos se realizaron a intervalos de 12 o de 24 h para determinar si existía un efecto por la frecuencia del recambio. El cultivo se incubó 8 d a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ con un fotoperiodo 12:12 h, con tres repeticiones en cada tiempo de muestreo. La atmósfera normal se nombró AN, mientras que la mezcla enriquecida con CO_2 se denominó 21-5.

Producción de conidios y medición de pH

Los conteos de conidios se hicieron tomando muestras de las botellas serológicas. Para ello, se adicionaron 20 mL de Tween 80 al 0.05 %, se agitaron 10 min y se contaron conidios en cámara de Neubauer. La suspensión de biomasa (conidios y micelio) restante se vertió en tubos Falcon de 50 mL para determinar los valores de pH con un potenciómetro Conductronic™ pH 120. La producción de conidios se reporta por g de sustrato seco inicial (gss).

Determinación de proteína extracelular

Se utilizó el método de Bradford (1976) con una curva estándar de seroalbúmina bovina y se leyó la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (Beckman™ DU-640). Para la determinación de proteína de las muestras se obtuvo un extracto adicionando 1 mL de la suspensión de biomasa a tubos Eppendorf y se centrifugó 1 min a $8000 \times g$. Se colocaron 800 μL del sobrenadante en tubos de ensayo de 10 mL y se adicionaron 200 μL de reactivo de Bradford (Sigma™). Los tubos se agitaron en un vórtex y transcurridos 5 min se leyó la absorbancia a 595 nm.

bottles for the treatment enriched with CO_2 and two needles were placed, one to facilitate the exit of the gases and the second connected to the tank containing the mixture enriched with flow of $20 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ for 1 min (Tlecuil-Beristain *et al.*, 2010). Gas exchanges were made at intervals of either 12 or 24 h to determine if there was an effect by the exchange frequency. The culture was incubated 8 d at $28 \pm 1^\circ \text{C}$ with a 12:12 h photoperiod, with three replicates at each sampling time. The normal atmosphere was named NA, while the mixture enriched with CO_2 was called 21-5.

Conidia production and pH measurement

Conidia counts were performed by taking samples from the serological bottles. To do this, 20 mL of Tween 80 at 0.05 % were added and stirred 10 min and conidia were counted in a Neubauer chamber. The suspension of remaining biomass (conidia and mycelium) was placed into 50 mL Falcon tubes to determine the pH values with a potentiometer Conductronic™ pH 120. Conidia production is reported per g of initial dry substrate (gss).

Determination of extracell protein

Bradford's (1976) method was used with a standard curve of bovine serum albumin and absorbance was read at 595 nm in spectrophotometer (Beckman™ DU-640). For the determination of protein from samples an extract was obtained by adding 1 mL of the biomass suspension to Eppendorf tubes and centrifuged during 1 min at $8000 \times g$. In 10 mL assay tubes 800 μL of the residues were placed and 200 μL of Bradford reagent (Sigma™) were added. Tubes were shaken in a vortex and after 5 min absorbance was read at 595 nm.

Determination of amylases activity

Because the main component of rice is starch, the total amount of amylases was determined by quantification of reducing sugars by the method of the dinitrosalicylic acid or DNS (Miller *et al.*, 1960). A standard curve of glucose was done that was subsequently treated as described for the samples.

To quantify the activity of amylases in the samples a soluble starch solution at 1 % (w/v) was used as substrate dissolved in phosphate buffer (0.1M, pH=6.1). The enzyme extracts were obtained as previously described. In 10 mL tubes a general blank (GB) was prepared with 0.9 mL of substrate and 0.1 mL of buffer as well as tubes for sample blanks (SB) and samples analysis (SA) adding 0.9 mL of substrate. Then all tubes were placed in a water bath at 40°C and after 1 min 0.1 mL of extract were added to

Determinación de actividad de amilasas

Debido a que el componente principal del arroz es el almidón, se determinó la cantidad de amilasas totales mediante la cuantificación de los azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico o DNS (Miller *et al.*, 1960). Se hizo una curva estándar de glucosa que se trató como se describe posteriormente para las muestras.

Para cuantificar la actividad de amilasas en las muestras se utilizó una solución de almidón soluble al 1 % (p/v) como sustrato, disuelto en amortiguador de fosfatos (0.1M, pH=6.1). Los extractos enzimáticos se obtuvieron como se describe previamente. En tubos de 10 mL se preparó un blanco general (BG) con 0.9 mL de sustrato y 0.1 mL de amortiguador, así como tubos para blancos de muestra (BM) y análisis de muestras (AM) adicionando 0.9 mL de sustrato. Luego se pusieron todos los tubos en baño de agua a 40 °C y después de 1 min se agregó 0.1 mL de extracto a los tubos (AM), mientras que en los tubos (BG) y (BM) se adicionaron 1.5 mL de reactivo DNS. Los tubos se incubaron 30 min antes de agregar 1.5 mL de reactivo DNS (sólo a los tubos AM) para detener la reacción. En los tubos del BM se agregó 0.1 mL de extracto crudo enzimático y todos los tubos se pusieron a ebullición 5 min, luego se colocaron en agua con hielo por 5 min, y se retiraron hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro (Beckman™ DU-640). Una unidad internacional de amilasas se definió como la cantidad de enzima que libera un μmol de glucosa por min bajo las condiciones del ensayo.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y la determinación de las variables se realizó cada 24 h. Con los datos se realizó un análisis de varianza utilizando la prueba de Tukey-Kramer ($p \leq 0.05$), para lo cual se usó el programa estadístico SPSS 13 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSION

Perfiles de producción de conidios y de pH

En la Figura 1 se observa que al aumentar la concentración de CO₂ la producción de conidios disminuyó 70 % al final del cultivo. La cantidad máxima de conidios (1.14×10^9 con gssi⁻¹) se obtuvo con el tratamiento AN, mientras que con el tratamiento 21-5 y recambio cada 24 h fue de 1.80×10^8 con gssi⁻¹, siendo significativamente distintos ($p \leq 0.05$).

the tubes (SA), while in the tubes (GB) and (SB) 1.5 mL of DNS reagent was added. The tubes were incubated 30 min before adding 1.5 mL DNS reagent (only tubes SA) to stop the reaction. In tubes SB 0.1 mL of crude enzyme extract was added and all tubes were boiled for 5 min, after which they were placed in ice water for 5 min, and were removed from the bath until reaching room temperature. Finally absorbance was read at 640 nm in a spectrophotometer (Beckman™ DU-640). An international unit of amylases was defined as the amount of enzymes that releases a μmol of glucose per min under the assay conditions.

Statistical analysis

The experimental design was completely randomized and the determination of variables was done every 24 h. With the data a variance analysis was carried out using the Tukey-Kramer test ($p \leq 0.05$), for which the statistical program SPSS 13 for Windows was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Conidia production and pH profiles

Figure 1 shows that by increasing CO₂ concentration production of conidia decreased 70 % at the end of the culture. Maximum conidia production (1.14×10^9 con gssi⁻¹) was reached with NA treatment, whereas with treatment 21-5 and exchange every 24 h was 1.80×10^8 con gssi⁻¹, being significantly different ($p \leq 0.05$). The effect of CO₂ was observed from the first 24 h following the initiation of atmospheric exchanges. Moreover, the time of maximum production of conidia to the atmosphere NA was at day 7, whereas for the treatments with CO₂ was 24 h later (Figure 1).

The yields of conidia were similar to those reported by Ye *et al.* (2006), who used rice as a substrate and a two-phase system for culture of *B. bassiana*, obtaining a yield of 2×10^9 con gssi⁻¹. However, due to the fact that the active mycelium obtained from LC was used as inoculum, the time of peak production was on day 6 of culture. In the study by Neves and Alves (2000), when the same substrate was used to select different strains of *B. bassiana*, the maximum yield was 2.7×10^9 con gssi⁻¹.

Dalla-Santa *et al.* (2005) used sugarcane bagasse and potato residues to produce conidia of *B. bassiana*; however, the initial inoculum (10^7 con gssi⁻¹) was an order of magnitude higher than that

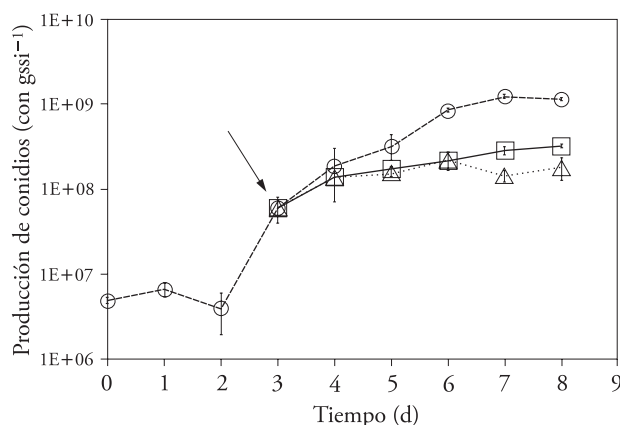


Figura 1. Cinéticas de producción de conidios de la cepa Bb 882.5 en cultivos con diferentes composiciones atmosféricas (○ AN: atmósfera normal; □ 21-5, 12 h: atmósfera con 21 % O₂ y 5 % CO₂ con recambio cada 12 h; △ 21-5, 24 h: atmósfera con 21 % O₂ y 5 % CO₂ con recambio cada 24 h). La flecha indica el día de inicio del recambio atmosférico.

Figure 1. Kinetics of conidia production of strain Bb 882.5 in cultures with different atmospheric compositions (○ NA: normal atmosphere; □ 21-5, 12 h: atmosphere with 21 % O₂ and 5 % CO₂ with exchange every 12 h; △ 21-5, 24 h: atmosphere with 21 % O₂ and 5 % CO₂ with exchange every 24 h). The arrow indicates the first day of the atmospheric exchange.

El efecto del CO₂ se observó desde las primeras 24 h posteriores al inicio del recambio. Además, el tiempo de máxima producción de conidios para la atmósfera AN fue al día 7, mientras que para los tratamientos con CO₂ fue 24 h después (Figura 1).

Los rendimientos de conidios fueron similares a los reportados por Ye *et al.* (2006), quienes usaron arroz como sustrato y un sistema bifásico para cultivo de *B. bassiana*, obteniendo un rendimiento de 2×10^9 con gssi⁻¹. Sin embargo, debido a que se usó como inóculo al micelio activo obtenido de CL, el tiempo de producción máxima fue en el día 6 de cultivo. En el estudio de Neves y Alves (2000), cuando se usó el mismo sustrato para seleccionar diferentes cepas de *B. bassiana*, el rendimiento máximo fue 2.7×10^9 con gssi⁻¹.

Dalla-Santa *et al.* (2005) usaron bagazo de caña y residuos de papa para producir conidios de *B. bassiana*; sin embargo, el inóculo inicial (10^7 con gssi⁻¹) fue un orden de magnitud superior al del presente estudio, y después de 10 d de cultivo estos autores reportan una producción máxima de 1.1×10^{10} con gssi⁻¹. El efecto que tiene el nivel de inóculo sobre el rendimiento y productividad de conidios fue descrito por Nuñez-Gaona *et al.* (2010).

Desgranges y Durand (1990) estudiaron el efecto del incremento de CO₂ sobre dos especies de *Aspergillus* y una de *Trichoderma* en CMS y encontraron que con un incremento de 4 % la producción de conidios de *Aspergillus* disminuyó al menos 50 %; en contraste, no hubo efecto sobre la cepa de *Trichoderma*. Esto indica que la sensibilidad al CO₂ es muy distinta entre especies de hongos filamentosos. Asimismo, a una concentración de CO₂ de 20 %, se observó inhibición en la conidiación en las tres especies de hongos utilizadas.

of this study, and after 10 d of culture these authors report a maximum yield of 1.1×10^{10} con gssi⁻¹. The effect that the level of inoculum has on the yield and productivity of conidia was described by Nuñez-Gaona *et al.* (2010).

Desgranges and Durand (1990) studied the effect of the CO₂ increase on two species of *Aspergillus* and one of *Trichoderma* in SMC and found that with a 4 % increase the production of *Aspergillus conidia* decreased at least 50 %; in contrast, there was no effect on the *Trichoderma* strain. This indicates that sensitivity to CO₂ is very different between species of filamentous fungi. Also, at a CO₂ concentration of 20 %, inhibition was observed in the conidiation in the three fungi species used.

With regard to the profiles of pH, variations were observed in the three treatments during culture, although on day 8 the values (pH=5.7) were not significantly different ($p > 0.05$) (Figure 2). In general, to obtain conidia from *B. bassiana* the initial values of pH between 6 and 7 have been standardized (Dalla-Santa *et al.*, 2005; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009). In addition, pH values might decrease due to a higher production of Krebs's cycle intermediates, by direct regulation of CO₂ on some enzymes of this metabolic pathway (Cordon and Schwartz, 1962; McIntyre and McNeil, 1998).

Amylase activity profiles

The specific activity profiles of amylases show that production of these enzymes was increased when the amount of CO₂ raised, regardless the frequency of exchange (Figure 3). Activity peaks were observed on day 6 of culture for all treatments; although there was an effect due to the periodicity of exchanges,

Respecto a los perfiles de pH, se observaron variaciones en los tres tratamientos durante el cultivo, aunque en el día 8 los valores (pH=5.7) no fueron significativamente distintos ($p>0.05$) (Figura 2). En general, para obtener conidios de *B. bassiana* se han estandarizado los valores iniciales de pH entre 6 y 7 (Dalla-Santa *et al.*, 2005; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009). Además, los valores de pH podrían disminuir debido a la producción elevada de intermediarios del ciclo de Krebs, por la regulación directa del CO₂ sobre algunas enzimas de esta ruta metabólica (Cordon y Schwartz, 1962; McIntyre y McNeil, 1998).

Perfiles de actividad de amilasas

Los perfiles de actividad específica de amilasas muestran que la producción de estas enzimas se incrementó al aumentar la cantidad de CO₂, sin importar la frecuencia del recambio (Figura 3). Se observaron picos de actividad al día 6 del cultivo para

and that performing it every 12 h a higher specific activity was achieved (6.54 UI mg⁻¹ protein), which represents an increase 100 % ($p\leq 0.05$) compared to the value obtained with treatment NA (3.21 UI mg⁻¹ protein).

Amylases yields increased steadily until the end of culture, on large extent since the atmospheric exchange initiated with CO₂ (Figure 4). The highest yield (16.58 UI gssi⁻¹) was obtained with treatment 21-5 and exchanges every 12 h, being three times higher than the value obtained with atmosphere NA (5.41 UI gssi⁻¹). These results contrast with those reported for fungi of the genus *Aspergillus* in which it was observed that the amylase production was not modified by increasing up to 20 % the CO₂ concentration (Desgranges and Durand, 1990).

The effect of CO₂ on growth, production of secondary metabolites and production of enzymes has been studied with different filamentous fungi in both LC and SSC. In this sense, the presence of CO₂ can alter the synthesis of enzymes and the

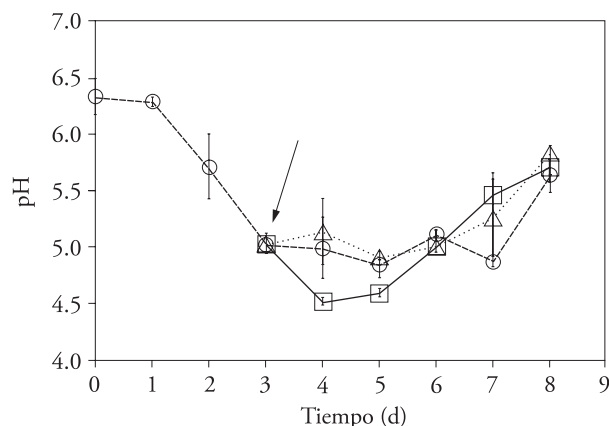


Figura 2. Cambios de pH en el medio durante el cultivo de la cepa Bb 882.5 en diferentes composiciones atmosféricas (○ AN: atmósfera normal; □ 21-5, 12 h: atmósfera con 21 % O₂ y 5 % CO₂ con recambio cada 12 h; △ 21-5, 24 h: atmósfera con 21 % O₂ y 5 % CO₂ con recambio cada 24 h). La flecha indica el día de inicio del recambio atmosférico.

Figure 2. Changes of pH in the medium during the cultivation of strain Bb 882.5 in different atmospheric compositions (○ NA: normal atmosphere; □ 21-5, 12 h: atmosphere with 21 % O₂ and 5 % CO₂ with exchange every 12 h; △ 21-5, 24 h: atmosphere with 21 % O₂ and 5 % CO₂ with exchange every 24 h). The arrow indicates the initial day of the atmospheric exchange.

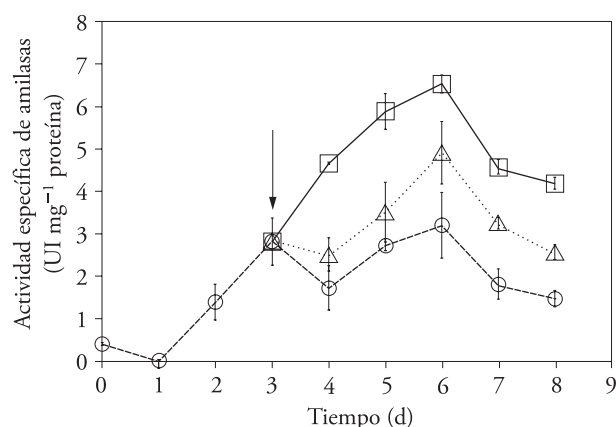


Figura 3. Cinéticas de actividad específica de amilasas de la cepa Bb 882.5 en cultivos con diferentes composiciones atmosféricas (○ AN: atmósfera normal; □ 21-5, 12 h: atmósfera con 21 % O₂ y 5 % CO₂ con recambio cada 12 h; △ 21-5, 24 h: atmósfera con 21 % O₂ y 5 % CO₂ con recambio cada 24 h). La flecha indica el día de inicio del recambio atmosférico.

Figure 3. Kinetics of amylases specific activity of the strain Bb 882.5 in cultures with different atmospheric compositions (○ Na: normal atmosphere; □ 21-5, 12 h: atmosphere with 21 % O₂ and 5 % CO₂ with exchange every 12 h; △ 21-5, 24 h: atmosphere with 21 % O₂ and 5 % CO₂ with exchange every 24 h). The arrow indicates the initial day of the atmospheric exchange.

todos los tratamientos; aunque sí hubo un efecto debido a la periodicidad de los recambios, ya que al realizarlo cada 12 h se logró la mayor actividad específica ($6.54 \text{ UI mg}^{-1} \text{ proteína}$), lo cual representa un incremento del 100 % ($p \leq 0.05$) respecto al valor obtenido con el tratamiento AN ($3.21 \text{ UI mg}^{-1} \text{ proteína}$).

Los rendimientos de amilasas aumentaron constantemente hasta el final del cultivo, en mayor medida desde que inició el recambio atmosférico con CO_2 (Figura 4). El mayor rendimiento ($16.58 \text{ UI gssi}^{-1}$) se obtuvo con el tratamiento 21-5 y recambio cada 12 h, siendo tres veces mayor al valor obtenido con la atmósfera AN ($5.41 \text{ UI gssi}^{-1}$). Estos resultados contrastan con lo reportado para hongos del género *Aspergillus* donde se observó que la producción de amilasas no se modificó al aumentar hasta 20 % la concentración de CO_2 (Desgranges y Durand, 1990).

El efecto del CO_2 sobre el crecimiento, producción de metabolitos secundarios y producción de enzimas se ha estudiado con distintos hongos filamentosos en CL y CMS. En este sentido, la presencia de CO_2 puede alterar la síntesis de enzimas y la actividad de las mismas (Desgranges y Durand, 1990; McIntyre y McNeil, 1998). Respecto a amilasas, la actividad de α -amilasa disminuye al reducir la concentración de O_2 (Rahardjo *et al.*, 2005). Además, la medición de la actividad de dichas enzimas se realiza con extractos libres de micelio obtenidos por filtración, lo cual sugiere que la actividad medida corresponde a enzima extracelular (Goto *et al.*, 1998; Mitidieri *et al.*, 2006; Salas-Hernández *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha determinado la presencia

activity of themselves (Desgranges and Durand, 1990; McIntyre and McNeil, 1998). With respect to amylases, the activity of α -amylase decreases when concentration of O_2 is reduced (Rahardjo *et al.*, 2005). In addition, the measurement of the activity of these enzymes was performed with free extracts of mycelium obtained by filtration, suggesting that the activity measured corresponds to extracellular enzyme (Goto *et al.*, 1998; Mitidieri *et al.*, 2006; Salas-Hernández *et al.*, 2006). However, the presence of intracellular amylases has been determined in species of the genera *Aspergillus*, *Cryptococcus* and *Saccharomycopsis* (van der Kaaij *et al.*, 2007). For entomopathogenic fungi, the effect of CO_2 , either accumulated by the metabolism or added exogenously, on the enzymes required for degrading substrates such as rice in our study is not known. Regarding to entomopathogenic fungi, Lord (2009) changed the atmosphere (16 % O_2 and 40 % CO_2) and this change was only applied during bioassays with *Tribolium castaneum* (Herbst); as a result the presence of CO_2 increased the mortality of insects infected with *B. bassiana*.

CONCLUSIONS

The strain of *Beauveria bassiana* 882.5 was sensitive to the increase in the CO_2 concentration (5 %), regardless of the interval of atmospheric exchange, as the production of conidia decreased up to 85 %. This suggests that accumulation of CO_2 , by metabolic activity during SSC should be avoided, ensuring an adequate system of ventilation to improve the production of conidia.

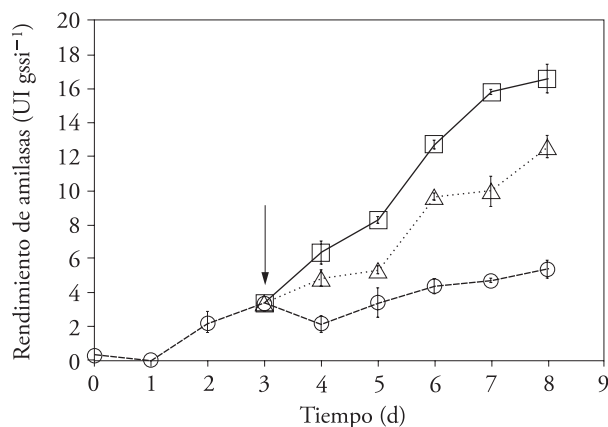


Figura 4. Cinéticas de rendimiento de actividad de amilasas totales de la cepa Bb 882.5 en cultivos con diferentes composiciones atmosféricas (○ AN: atmósfera normal; □ 21-5, 12 h: atmósfera con 21 % O_2 y 5 % CO_2 con recambio cada 12 h; △ 21-5, 24 h: atmósfera con 21 % O_2 y 5 % CO_2 con recambio cada 24 h). La flecha indica el día de inicio del recambio atmosférico.

Figure 4. Kinetics of total amylase activity of the strain 882.5 Bb strain in cultures with different atmospheric compositions (○ NA: normal atmosphere; □ 21-5, 12 h: atmosphere with 21 % O_2 and 5 % CO_2 with exchange every 12 h, △ 21-5, 24 h: atmosphere with 21 % O_2 and 5 % CO_2 with exchange every 24 h). The arrow indicates the initial day of the atmospheric exchange.

de amilasas intracelulares en especies de los géneros *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Saccharomycopsis* (van der Kaaij *et al.*, 2007). Para hongos entomopatógenos, no se conoce el efecto del CO₂, acumulado por el metabolismo o añadido de manera exógena, sobre las enzimas requeridas para degradar los sustratos, como arroz en este estudio. Respecto a hongos entomopatógenos, Lord (2009) modificó la atmósfera (16 % O₂ y 40 % de CO₂), y esta modificación sólo se aplicó durante bioensayos con *Tribolium castaneum* (Herbst); el resultado fue que la presencia de CO₂ aumentó la mortalidad de los insectos infectados con *B. bassiana*.

CONCLUSIONES

La cepa de *Beauveria bassiana* 882.5 fue sensible al incremento en la concentración de CO₂ (5 %), sin importar el intervalo de recambio, ya que disminuyó hasta 85 % la producción de conidios. Esto sugiere que debe evitarse la acumulación del CO₂ por actividad metabólica durante los CMS, asegurando un sistema adecuado de ventilación para mejorar la producción de conidios.

El incremento de CO₂ debe considerarse en la producción de enzimas debido al efecto positivo en la actividad específica y en el rendimiento de las amilasas totales, con énfasis en los recambios más frecuentes.

Una contribución del presente estudio fue mostrar la respuesta diferencial de *Beauveria bassiana* a la acumulación de CO₂ en el rendimiento de conidios y de amilasas, lo cual no se ha descrito hasta el momento.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada a P. M. Garza-López y por el proyecto de Ciencia Básica 152420-Z, a la UAM-Iztapalapa y a la Red Promep por el financiamiento conjunto para esta investigación.

LITERATURA CITADA

- Alatorre-Rosas, R. 2007. Hongos entomopatógenos. In: Rodríguez B., L. A., y H. C. Arredondo B. (eds). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México. pp: 127-143.
- Alves, S. B., L. S. Rossi, R. B. Lopes, M. A. Tamai, and R. M. Pereira. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). J. Invertebr. Path. 81: 70-77.

The increase in CO₂ should be considered in the production of enzymes due to the positive effect on specific activity and yield of total amylases, with emphasis on more frequent exchanges.

A contribution of this study was to demonstrate the differential response of *Beauveria bassiana* to the accumulation of CO₂ in the yield of conidia and amylases, which has not been described so far.

—End of the English version—



- Arzumanov, T., N. Jenkins, and S. Roussos. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Process Biochem. 40: 1037-1042.
- Batra, S. W. T. 1982. Biological control in agroecosystems. Science 215: 134-139.
- Bradford, M. 1976. A quick and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Candas, M., and L. A. Bulla. 2002. Insecticides, Microbial. Encyclopedia of Environmental Microbiology. John Wiley and Sons, NY. pp: 1709-1717.
- Cordon, T. C., and J. H. Schwartz. 1962. The fungus *Beauveria tenella*. Science 138: 1265-1266.
- Dalla-Santa, H. S., N. J. Sousa, D. Brand, O. R. Dalla-Santa, A. Pandey, M. Sobotka, J. Pada, and C. R. Soccol. 2004. Conidia production of *Beauveria* sp. by solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* Caterpillars. Folia Microbiol. 49: 418-422.
- Dalla-Santa, H. S., O. R. Dalla-Santa, D. Brand, L. Porto de Souza-Vandenberghe, and C. R. Soccol. 2005. Spore production of *Beauveria bassiana* from agroindustrial residues. Braz. Arch. Biol. Techn. 48: 51-60.
- De la Rosa, W., C. L. López, and P. Liedo. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the mexican fruit fly (Diptera:Tephritidae) under laboratory conditions. J. Econ. Entomol. 95: 36-43.
- Desgranges, C., and A. Durand. 1990. Effect of pCO₂ on growth, conidiation and enzyme production in solid-state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS. Enzyme Microb. Technol. 12: 546-551.
- Glare, T. R. 2004. Biotechnological potential of entomopathogenic fungi. In: Arora, D. K. (ed). Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Environmental Applications. Marcel Dekker Inc, New York. pp: 79-90.
- Goto, C. E., E. P. Barbosa, L. C. L. Kistner, F. G. Moreira, V. Lenartovicz, and R. M. Peralta. 1998. Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing α-methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate. FEMS Microbiol. Lett. 167: 139-143.
- Hernández-Velázquez, V. M., y A. M. Berlanga-Padilla. 1999. Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbiano. Ficha técnica CB-03. SAGARPA.

- Kang, S. W., S. H. Lee, C. S. Yoon, and S. W. Kim. 2005. Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnol. Lett.* 27: 135-139.
- Lacey, L. A., and M. S. Goettel. 1995. Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga* 40: 3-27.
- Liu, B. L., and Y. M. Tzeng. 1999. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnol. Lett.* 21: 657-661.
- Lord, J. C. 2009. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of *Tribolium castaneum* with reduced oxygen and increased carbon dioxide. *J. Appl. Entomol.* 133: 101-107.
- McIntyre, M., and B. McNeil. 1998. Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 291-298.
- Miller, G. L., B. Blum, W. E. Glennon, and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* 2: 127-132.
- Mitidieri, S., A. H. Souza-Martinelli, A. Schrank, and M. Henning Vainstein. 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technol.* 97: 1217-1224.
- Montesinos-Matías, R., G. Viniegra-González, R. Alatorre-Rosas, and O. Loera. 2011. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 2095-2102.
- Neves, P. J., and S. B. Alves. 2000. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). *Braz. Arch. Biol. Techn.* 43: 373-378.
- Núñez-Gaona O., G. Saucedo-Castañeda, R. Alatorre-Rosas, and O. Loera. 2010. Effect of moisture content and inoculum on growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 53: 771-777.
- Rahardjo, Y. S. P., S. Sie, F. J. Weber, J. Tramper, and A. Rinzema. 2005. Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomol. Eng.* 21: 163-172.
- Rodríguez-Gómez, D., O. Loera, G. Saucedo-Castañeda, and G. Viniegra-González. 2009. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World J. Microb. Biot.* 25: 513-518.
- Salas-Hernández, M., M. Rodríguez-Rodríguez, N. Pérez-Guerra, and R. Pérez-Rosés. 2006. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *J. Food Eng.* 73: 93-100.
- Saucedo-Castañeda, G., M. Gutiérrez-Rojas, G. Bacquet, M. Raimbault, and G. Viniegra-González. 1990. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 802-808.
- Tlecuitl-Beristain, S., G. Viniegra-González, G. Díaz-Godínez, and O. Loera. 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia* 169(5): 387-394.
- van der Kaaij, R. M., S. Janacek, M. J. E. C. van der Maarel, and L. Dijkhuizen. 2007. Phylogenetic and biochemical characterization of a novel cluster of intracellular fungal α -amylase enzymes. *Microbiology* 153: 4003-4015.
- Ye, S. D., S. H. Ying, C. Chen, and M. G. Feng. 2006. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnol. Lett.* 28: 799-804.