

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**Aislamiento y Caracterización Microbiológica del *Metarhizium anisopliae*
Utilizado como una Alternativa Ecológica para el Control de Plagas
Agrícolas**

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

**IMER JOSIAS CACERES NAVARRO
KEVIN RODOLFO URBINA RODRIGUEZ**

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

OCTUBRE, 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

TRIBUNAL CALIFICADOR

COORDINADORA DE AREA QUIMICA AGRICOLA

MAE. María Elisa Vivar de Figueroa

COORDINADORA DE AREA DE MICROBIOLOGIA

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

DOCENTE ASESOR

MSc. Coralia González de Díaz

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la organización no gubernamental CORDES por su aporte en el trabajo de investigación y por ser una institución líder en el desarrollo rural sostenible en El Salvador, que considera como centro del desarrollo al ser humano en equidad y en armonía con el medio ambiente, que integra los procesos económicos y sociales de carácter local y nacional e incide en las transformaciones estructurales del país.

De la misma manera se agradece al Ing. David Baños (CORDES) y a los Laboratoristas de microbiología Wilber Guzmán y Oscar Coreas de la facultad de Química y Farmacia (UES) por su tiempo y colaboración en esta investigación.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por su amor incondicional, por su bondad, por su gracia y por su protección hacia mi vida. Eben-Ezer.

A mis Padres José Guadalupe Caceres y Consuelo Navarro Cruz que con gran amor han derramado sus vidas dándome lo que he necesitado. Sus palabras de ánimos y consejos son de mucha bendición.

A mis hermanos Erika Caceres, Heber Caceres y Nevin Caceres por su increíble apoyo.

A mis amigos en general que siempre me dieron ánimos para seguir adelante.

Imer Caceres

DEDICATORIA

A Dios por su fidelidad y nunca dejarme solo, por cumplir mis metas, sueños y haberme guiado a lo largo de mi carrera con sabiduría y por darme una vida llena de felicidad.

A mi esposa Elizabeth de Urbina por darme tu apoyo, comprensión y por ser mi ayuda idónea; este logro es de los dos.

A mi hija Sarah Urbina por ser mi inspiración cada mañana para sacrificarme y para darte lo mejor que pueda.

A mi madre Roselia Rodríguez por siempre estar conmigo y darme en todo momento su apoyo incondicional y siempre esforzarse por darme lo mejor y por haberme inculcado valores.

A mis hermanos Henry Urbina y Katya Urbina por ser los mejores hermanos y por demostrarme siempre su apoyo en todo momento durante toda mi vida.

A mis amigos por estar siempre ahí cuando los necesito y apoyarme

A los Maestros y compañeros que de alguna manera formaron parte en esta etapa de mi vida.

Kevin Urbina

INDICE

	Pág.
RESUMEN	
CAPÍTULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	xvii
CAPÍTULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPÍTULO III	21
3.0 MARCO TEÓRICO	
3.1 Plaguicidas	22
3.2 Factor limitante a la productividad	23
3.3 Limitación al uso de plaguicidas	24
3.4 Eliminación del abuso y uso innecesario de plaguicidas	24
3.5 Manejo integrado de plagas y vectores	24
3.6 Toxicidad de los plaguicidas	25 26
3.7 Plaguicidas, causantes de enfermedades	
3.8 Alternativas al uso de plaguicidas para el manejo de plagas	27 27

3.9 Bioplaguicidas	
3.10 <i>Metarhizium anisopliae</i>	28
3.11 Ciclo de vida del <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
3.12 Mecanismo de acción	31
3.13 Resistencia a <i>Metarhizium anisopliae</i>	31
3.14 Producción	32
3.14.1 Recolección de muestras en el campo	32
3.14.2 Aislamiento	32
3.14.3 Producción del inóculo en cajas de petri	33
3.14.4 Preparación de matrices	33
3.15 Almacenamiento	33
3.16 Seguridad de uso	34
3.17 Efecto adverso	34
3.18 Aplicaciones	34
3.19 Medición con el pHmetro	35
3.20 Recuento en placa	36
3.21 Recuento en cámara de Newbauer	37
3.22 Crecimiento microbiano	38
3.22.1 Progresión de crecimiento microbiano	39
3.23 Aspectos para el cálculo del crecimiento microbiano	39
3.23.1 Número de generación	39
3.23.2 Velocidad de crecimiento	39

3.23.3 Tiempo de generación	39
3.24 Fases de crecimiento bacteriano	40
3.24.1 Fase lag o fase de latencia	40
3.24.2 Fase logarítmica o crecimiento exponencial	40
3.24.3 Fase estacionaria	41
3.24.4 Fase de muerte o declive logarítmico	41
CAPÍTULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	43
4.1 Tipo de estudio	43
4.2 Investigación bibliográfica	43
4.3 Investigación de campo	43
4.4 Parte experimental	44
4.4.1 Aislamiento del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> a partir de la mosca pinta	44
4.4.2 Procedimiento para la obtención del inóculo del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i>	45
4.4.3 Evaluación de parámetros cinéticos de cada medio líquido de cultivo	46
CAPÍTULO V	
5.0 RESULTADOS	53
CAPÍTULO IV	

6.0 CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO VII	
7.0 Recomendaciones	77
Bibliografía	79
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Anexos N°

1. Esquema de trabajo para el aislamiento del hongo *Metarhizium anisopliae* a partir de la mosca pinta.
2. Esquema de trabajo para la obtención del inóculo del hongo *Metarhizium anisopliae*.
3. Materiales utilizados en la metodología.
4. Esquema de toma de muestras para pruebas de evaluación cinética.
5. Esquema de pruebas microbiológicas para evaluación cinética.

6. Muestra de la mosca pinta infectada con el *Metarhizium anisopliae*.
7. Procedimiento del aislamiento del hongo *Metarhizium anisopliae*.
8. Resiembra para la producción de *Metarhizium anisopliae*.
9. Crecimiento del *Metarhizium anisopliae* luego de una semana de incubación a temperatura ambiente.
10. Vista microscópicamente del hongo *Metarhizium anisopliae*.
11. Estandarización del hongo *Metarhizium anisopliae*.
12. Cámara de Newbauer.
13. Introducción de la muestra en la cámara de Newbauer.
14. Conteo de un cuadro grande en la cámara de Newbauer.
15. Recuento de 5 cuadros grandes en la cámara de Newbauer.
16. Recuento con alta concentración celular.
17. Medio 1 (Papa, Azúcar y Agua) , Medio 2 (Levadura, Azúcar y Agua).

18. Crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* después de una semana de su aislamiento.
19. Crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* después de dos semanas de su aislamiento.
20. Crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* luego de una semana de su resiembra.
21. Elaboración de los medios de cultivo e Inoculación del *Metarhizium anisopliae* a los medios de cultivo propuestos.
22. Medios líquidos de cultivo durante el tiempo de incubación.
23. Toma de muestras a tiempos determinados para ambos medios líquidos de cultivo.

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°

1. Tabla de los resultados de la estandarización del hongo *Metarhizium anisopliae*.
2. Resultados del recuento de cámara de Newbauer para el Medio 1 del Experimento 1.
3. Resultados del recuento de cámara de Newbauer para el Medio 1 del Experimento 2.
4. Resultados del recuento de cámara de Newbauer para el Medio 2 del Experimento 1.
5. Resultados del recuento de cámara de Newbauer para el Medio 2 del Experimento 2.
6. Resultados de la toma de pH de los tiempos de muestreo en el Medio 1 del Experimento 1.
7. Resultados de la toma de pH de los tiempos de muestreo en el Medio 2 del Experimento 1.
8. Resultados de la toma de pH de los tiempos de muestreo en el Medio 1 del Experimento 2.
9. Resultados de la toma de pH de los tiempos de muestreo en el Medio 2 del Experimento 2.

RESUMEN

En la actualidad se realizan investigaciones que aporten ayuda a la disminución de la contaminación del medio ambiente. Entre estas investigaciones se encuentran las alternativas que promueven el uso de bioplaguicidas en cultivos agrícolas. El uso de ellos genera un equilibrio con el medio ambiente y ser humano, por lo tanto en este trabajo se investigó el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* utilizado como una alternativa ecológica para el control de plagas agrícolas.

El *Metarhizium anisopliae* se aisló partiendo de un insecto infectado (Mosca pinta, (*Aeneolamia contigua* Walker). Para el aislamiento, el insecto se maceró con gotas de agua estéril en un mortero. La solución del macerado se estrió sobre 4 placas con agar papa dextrosa y 4 tubos con agar papa dextrosa inclinado y posteriormente se incubó a una temperatura ambiente. Luego del aislamiento sobre las placas, el hongo se sembró dentro de 6 erlenmeyers que contenían 25 mL de agar papa dextrosa con el fin de obtener la mayor cantidad de inóculo utilizando las mismas condiciones ambientales para el aislamiento. Cuando el crecimiento del hongo había crecido en su totalidad, se extrajeron las esporas con agua estéril más tween 80 al 0.05% para la obtención del inóculo puro del microorganismo. Este se estandarizó utilizando La cámara de Neubauer y el espectrofotómetro spectronic 20 a una tramitancia de 14.6% y Longitud de Onda de 595 nm. Se obtuvo una concentración de 2.41×10^6 Cel/mL en la cámara de Neubauer. Partiendo de esta concentración se inoculó en dos medios líquidos de cultivos propuestos para determinar la cinética de crecimiento del hongo entomopatógeno durante la toma de 5 muestras para cada medio. En cada muestra tomada se analizo inmediatamente el pH y la concentración en [Cel/mL] presente en cada medio y de esta manera se creó la curva de crecimiento del *Metarhizium anisopliae* utilizando como parámetros el tiempo de muestra y la concentración

correspondiente de cada tiempo de muestra. Se evaluó la cinética de crecimiento del hongo entomopatógeno en ambos medios líquidos de cultivo mediante la determinación de la velocidad específica de crecimiento y la volumétrica de producción, tiempo de generación y número de generación. El que tiene una mejor cinética de crecimiento es el medio 2 (medio de levadura) ya que presenta una mayor producción y concentración en los tiempos analizados. Para la realización del estudio se trabajó en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador en los meses agosto a octubre del año 2014.

Comentario [C1]: QUE RECOMIENDAN DEL TRABAJO

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN⁽³⁾

En los últimos años el tema de los plaguicidas ha tenido mucha importancia debido al riesgo que presenta la exposición durante su aplicación a los cultivos agrícolas y a los accidentes originados por el mal almacenamiento, provocando intoxicaciones a la población. La falta de conocimiento sobre el uso y su almacenamiento incrementa el riesgo de intoxicaciones con las personas que entran en contacto directo y las que viven alrededor de las áreas donde estos son aplicados y almacenados.

El uso de plaguicidas en los últimos años ha tenido un incremento bajo el concepto de considerarse como complemento necesario de las actividades agrícolas en el país, sin embargo existe preocupación con relación a su uso, debido a la toxicidad de sus componentes que pueden tener efectos en la salud y el ambiente, lo que significa que representan riesgos para el trabajador agrícola, sus familias y las comunidades adyacentes a las áreas de siembra, aspectos que involucran tanto al Ministerio de Salud y al de medio ambiente, como a la población en general la cual cada vez está más interesada en saber sobre sus efectos y repercusiones.

Considerando esta problemática se aísla, caracteriza y se analiza la cinética de crecimiento del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* que es usado como alternativa al uso de plaguicida como bioplaguicida y que estudios demuestra que disminuye riesgos tóxicos para el ser humano y que aumenta la productividad agrícola; utilizando parámetros cinéticos como pH y su concentración por medio del conteo celular en la cámara de Newbauer, inoculándolo en medios líquidos y económicos para la producción.

Para la realización del estudio se trabajó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador entre los meses Agosto a Octubre del año 2014. Se analizó la cinética de crecimiento del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* sobre dos medios de cultivos líquidos propuestos usando parámetros como pH y Determinación de la Biomasa mediante Recuento en Placa de Diluciones Seriadas y Recuento Celular con cámara de Newbauer.

Comentario [C2]: ARREGLAR

La ONG CORDES proporcionó la mosca pinta infectada en la cual el hongo entomopatógeno fue aislado con una maceración y estriando en placas de petri con agar papa dextrosa. También proporcionó el hongo en su fase esporulada (control positivo) en tubos con agar inclinado de papa dextrosa. Este fue utilizado para comparar las características microscópica y macroscópica de este.

CAPÍTULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar microbiológicamente el *Metarhizium anisopliae* utilizado como alternativa ecológica para el control de plagas agrícolas.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1** Aislar *Metarhizium anisopliae* a partir de la mosca pinta (*Aeneolamia contigua Walker*) infectada.
- 2.2.2** Cultivar *Metarhizium anisopliae* utilizando medios de cultivo óptimos para su crecimiento.
- 2.2.3** Analizar la cinética de crecimiento de *Metarhizium anisopliae* sobre dos medios de cultivo propuestos mediante parámetros cinéticos.
- 2.2.4** Evaluar el aprovechamiento de ambos medios de cultivo utilizados en la producción de biomasa.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Plaguicidas. ⁽⁷⁾

Según la OMS, un pesticida o plaguicida es cualquier sustancia o mezclas de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización y producción de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, también aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos.

El término plaguicida incluye también los siguientes tipos de sustancias: reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta, agentes para evitar la caída prematura de la fruta y sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha, para proteger el producto contra el deterioro, durante el almacenamiento y transporte.

La detección temprana de las plagas y la aplicación de medidas de control racionales y efectivas son tareas priorizadas para quienes tienen la responsabilidad de la protección fitosanitaria. La intensificación de la agricultura, motivada por la necesidad de proveer productos agrícolas a una población cada día creciente, trae como consecuencia la proliferación de plagas y enfermedades.

La alta presión de los diferentes problemas fitosanitarios y su manejo inadecuado, conducen a que éstos ejerzan un impacto negativo no sólo en las cosechas, sino en el suelo, el agua y en la calidad del agroecosistema.

Por ello, día a día, es fundamental que los productores realicen un manejo integrado de plagas, partiendo del diagnóstico adecuado e incorporando prácticas como el uso de estrategias de control biológico, botánico y prácticas de manejo cultural, entre otras.

El desarrollo de bioplaguicidas estimula la modernización de la agricultura y sin duda, va a reemplazar gradualmente a una cantidad de plaguicidas químicos.

En la producción agrícola; en ambientes libre de contaminación, los bioplaguicidas son sustitutos ideales para sus homólogos químicos tradicionales, que por su naturaleza, estos pueden usarse con seguridad en una agricultura sustentable, además son menos costosos, biodegradables y seguros para el ser humano y el medio ambiente, aunque tienen poca residualidad. Además han demostrado que al ser utilizados en forma adecuada en el control biológico de plagas favorecen la práctica de una agricultura sustentable con menor dependencia de plaguicidas químicos.

Los bioplaguicidas son eficaces en el control de plagas agrícolas, sin causar daños graves al ambiente o empeorar la contaminación del medio ambiente. La investigación y el desarrollo de su aplicación práctica en el campo se enfocan a mitigar la contaminación ambiental causada por residuos de plaguicidas químicos, aunque por su naturaleza biológica también promueven el desarrollo sustentable de la agricultura.

3.2 Factor limitante a la productividad. ⁽⁷⁾

Las plagas son factores limitantes en la productividad de sistemas agroforestales y pecuarios siendo responsables de hasta un 50% en pérdidas reportadas en la agricultura mundial. Se han desarrolla nuevas tecnologías y programas de control con el propósito de contrarrestar o

eliminar las plagas que se desarrollan acorde al crecimiento de la producción agraria y el surgimiento de las tecnologías que sustentan las producciones intensivas, generalmente influenciadas por factores económicos y sociales.

3.3 Limitación al uso de plaguicidas. ⁽⁸⁾

El uso de plaguicidas debe ser responsable y debería ser limitado al mínimo necesario porque son químicos tóxicos y pueden acarrear serios efectos negativos para la salud y el ambiente, así como sobre ecosistemas agrícolas. Los efectos negativos pueden ocurrir en todo el ciclo de vida del plaguicida, por ejemplo, producción, transporte, almacenamiento, aplicación y hasta en su disposición final.

3.4 Eliminación del abuso y uso innecesario de plaguicidas. ⁽⁸⁾

A causa de los efectos potenciales negativos que acarrearán, los plaguicidas deben ser utilizados sólo como un último recurso, como parte de un manejo integrado de plagas o dentro de un manejo integrado de vectores.

3.5 Manejo integrado de plagas y vectores. ⁽⁸⁾

El manejo integrado de plagas (MIP) y el manejo integrado de vectores (MIV) son estrategias que implican una o varias combinaciones de técnicas de control para optimizar el manejo de plagas o vectores según las condiciones locales. Tales estrategias requieren la evaluación cautelosa de todas las técnicas de manejo de las plagas disponibles y la subsecuente integración de las medidas apropiadas que desalientan el desarrollo de poblaciones de plagas y vectores manteniendo el uso de plaguicidas u otras intervenciones en los niveles más bajos para reducir y minimizar los riesgos sobre la salud humana y el ambiente.

3.6 Toxicidad de los plaguicidas. ⁽⁸⁾

La toxicidad de un químico es la capacidad de causar la muerte, lesiones graves o daño en organismos vivos. Los efectos tóxicos pueden variar mucho entre las especies. Para que un plaguicida sea efectivo debe ser tóxico para las especies objetivo. La toxicidad de una formulación comercial generalmente depende de la concentración del ingrediente activo en la formulación, pero puede variar con los componentes "no plaguicidas" o si las impurezas asociadas con el ingrediente activo exceden el promedio, por ejemplo después de un largo periodo de almacenamiento.

En una intoxicación aguda los efectos adversos se presentan a corto plazo luego de la aplicación de una sola dosis de plaguicida, o inmediatamente después de una exposición corta, o de una exposición continua, o de múltiples dosis en las últimas 24 horas o menos.

La intoxicación aguda es cuantificada por el valor de LD50 (Dosis Letal 50), que es una estimación estadística de la cantidad necesaria de un químico (miligramos por kilo de peso) requerida para causar la muerte del 50 % de los animales de prueba cuando ingresa al cuerpo en una sola dosis.

Cuantificaciones similares pueden usarse para un número diferente de muertes por porcentaje, por ejemplo: LD10 o LD100; o para otras vías de administración del químico, por ejemplo: LC50 (concentración letal 50) pensada para una administración por inhalación. En el reporte de la prueba para cada valor debe indicarse la especie, el sexo de los animales y la ruta de administración del químico.

Para evaluar la probable toxicidad de un químico en seres humanos, por lo general, se utilizan ratas como especie de prueba. Debido al número de

animales involucrados, la prueba de LD50 clásica está siendo substituida por otras pruebas en las cuales se requieren menos animales, por ejemplo, el método de dosis fija. La información sobre la intoxicación oral aguda es utilizado para satisfacer la clasificación de peligrosidad y las exigencias de etiquetado/rotulado, para la evaluación de riesgo para la salud humana y el ambiente, y cuando se estima la toxicidad de mezclas.

La toxicidad crónica de una sustancia es la capacidad de provocar efectos adversos retardados que ocurren como resultado de la exposición a dosis repetidas de un plaguicida o la exposición al plaguicida por un largo período de tiempo de la vida del individuo (por lo general más del 50%).

3.7 Plaguicidas, causantes de enfermedades. ⁽⁷⁾

En muchos países en desarrollo, el empleo de plaguicidas sigue representando un grave riesgo, que cada año los efectos a largo plazo de la exposición habitual a ellos provocan a menudo enfermedades crónicas como el cáncer, trastornos neurológicos y del aparato reproductor; casi todos los casos se presentan en zonas rurales donde ocurre el 99% de las muertes por intoxicación con esas sustancias.

En una investigación realizada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) para estimar los casos de envenenamiento no reportados en la región, comparando el número de los notificados con la población censada se encontró que el 98% de los envenenamientos con plaguicidas no se informan, el 76 % de los afectados son trabajadores del sector agrícola y el 5% de las personas expuestas experimentaron síntomas.

3.8 Alternativas al uso de plaguicidas para el manejo de plagas. ⁽⁶⁾

Debido a la tendencia de la demanda mundial por productos obtenidos sin o con muy bajos niveles de uso de agroquímicos es prioritario buscar nuevos métodos de control de plagas ecológicamente adecuados. Se considera que la clave para obtener éxito en el manejo de las poblaciones de insectos es utilizar un conjunto de medidas que permitan mantener el equilibrio en el agroecosistema. Dentro del contexto del manejo integrado de plagas (MIP), una de las alternativas es usar insecticidas de naturaleza biológica como lo son los hongos entomopatógenos.

La investigación sobre control biológico con hongos entomopatógenos está generando constantemente ideas sobre su uso en campo. Esto permite optimizar las prácticas de aplicación para aumentar la probabilidad del cumplimiento de su ciclo infectivo, teniendo en cuenta factores como las condiciones ambientales más favorables al momento de la aplicación. También se han generado avances en la producción y almacenamiento, aspectos que se tornaban hace tiempo en desventajas en el uso de estos microorganismos.

3.9 Bioplaguicidas. ⁽⁹⁾

En el ámbito de la agricultura se denomina plaguicida a cualquier sustancia de origen natural elaborada con el fin de prevenir, controlar o combatir cualquier plaga, enfermedad o maleza que pueda interferir con el desarrollo o conservación adecuados a los cultivos o productos agrícolas. Su origen puede ser vegetal, animal o mineral, pero a través de procesos de síntesis química. Si bien las plantas bien nutridas constituyen la mejor defensa contra las plagas y enfermedades, el uso de bioplaguicidas tiene varias ventajas como bajo costo, fácil acceso, promueven la independencia del agricultor, no requiere equipo ni entrenamiento especializado,

biodegradable, generan productos sanos, baja propensión a resistencia y mínimo impacto ecológico.

Metarhizium anisopliae, plaguicida amigable al medio ambiente

Clasificación Taxonómica

Metarhizium anisopliae

Reino	<i>Fungi</i>
Subreino	<i>Dikarya</i>
Phylum	<i>Ascomyceto</i>
Clase	<i>Sordariomyceto</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Clavicipitaceae</i>
Género	<i>Metarhizium</i>
Especie	<i>Anisopliae</i>

3.10 *Metarhizium anisopliae*.⁽¹¹⁾

Metarhizium anisopliae, anteriormente conocido como *Entomophthora anisopliae*, es un hongo que habita en el suelo. El primer uso de *M. anisopliae* como un agente microbiano contra los insectos fue en 1879, cuando Elie Metchnikoff utilizó para controlar el escarabajo de grano de trigo, *Anisoplia austriaca* y luego para controlar el gorgojo de azúcar de remolacha, *Cleonus punctiventris*. Un miembro de la clase Hyphomycetes de hongos, *Metarhizium anisopliae* se clasifica como un hongo muscardino verde debido al color verde de las colonias esporuladas. Se ha informado de infectar a aproximadamente 200 especies de insectos y otros artrópodos.

3.11 Ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae*.⁽⁴⁾

En general los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases sobre su hospedante: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. El proceso se inicia cuando la espora o conidio se adhiere a la cutícula del insecto, luego desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo ohaustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas post-inoculación. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, ocurre 4 o 5 días después de la inoculación.

Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de la relación patógeno-hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad para seres humanos, pero de mucha

actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos. Las destruxinas afectan varios organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino, túbulos de Malpighi, hemocitos y tejido muscular. La esporulación ocurre en 2 a 3 días, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente.

La infección por el entomopatógeno puede ser afectada principalmente por la baja humedad relativa y por la falta de habilidad para utilizar los nutrientes disponibles sobre la superficie de la cutícula o por la falta de factores necesarios para el reconocimiento de un hospedero susceptible o sitio de infección penetrable. El reconocimiento de un hospedero susceptible involucra signos químicos y topográficos. También puede fracasar la invasión del hongo por la presencia de compuestos inhibitorios tales como fenoles, quinonas y lípidos en la superficie de la cutícula.

Los síntomas que causan los entomopatógenos son variables: las ninfas disminuyen sus movimientos, disminuyen la producción de espuma y pueden abandonar los lugares de ataque. Los adultos infectados presentan movimientos lentos, no se alimentan, reducen su radio de vuelo y las hembras no ovipositan. Pueden morir en lugares distantes de donde fueron contaminados. El ciclo total de la enfermedad es de 8 a 10 días. Después de la muerte, los individuos presentan un crecimiento micelial blanco seguido por la típica esporulación verde. En algunas ocasiones no se presenta la esporulación sobre el tegumento, solamente se ve la presencia de micelio y se debe a condiciones inadecuadas de humedad durante el proceso de esporulación.

3.12 Mecanismo de acción. ⁽¹⁾

La enfermedad causada por el hongo a veces se llama enfermedad muscardina verde por el color verde de sus esporas.

Metarhizium anisopliae generalmente entra en los insectos a través de espiráculos y poros en los órganos de los sentidos. Una vez dentro del insecto, el hongo produce una extensión lateral de las hifas, que eventualmente se prolifera y consume los contenidos internos del insecto. Crecimiento de las hifas continúa hasta que el insecto está lleno de micelios. Cuando se han consumido los contenidos internos, el hongo se rompe a través de la cutícula y esporulados. El *M. anisopliae* puede liberar esporas (conidios) bajo condiciones de baja humedad. Además, el *M. anisopliae* puede obtener la nutrición de los lípidos en la cutícula. El hongo también puede producir metabolitos secundarios, tales como destruxinas, que tienen propiedades insecticidas en la polilla y larvas de mosca.

El hongo se desarrolla en el interior del cuerpo finalmente para matar el insecto después de unos pocos días; este efecto letal es muy probable que con la ayuda de la población de péptidos cíclicos insecticidas.

Si la humedad del ambiente es lo suficientemente alta, un moho blanco a continuación, crece en el cadáver que pronto se vuelve verde como se producen espore.

3.13 Resistencia a *Metarhizium anisopliae*. ⁽¹¹⁾

Algunos insectos han desarrollado mecanismos fisiológicos para reducir la infección por hongos entomopatógenos tales como *M. anisopliae*. La langosta del desierto produce toxinas antimicóticas, que inhiben la

germinación de las esporas. Algunos insectos previenen la infección por el desarrollo de un tegumento antes que el hongo penetre en la cutícula.

3.14 Producción. ⁽⁵⁾

3.14.1 Recolección de muestras en el campo. ⁽⁵⁾

Para la obtención de cepas del entomopatógenos se hacen recolecciones en el campo de insectos muertos que presenten síntomas o signos del patógeno que se desea aislar (micelio o esporulación). Estos insectos se colocan individualmente en frascos de vidrio, cajitas o fundas plásticas, limpias o esterilizadas, y se trasladan al laboratorio. Aquí se hace una desinfección de los especímenes, sumergiendo en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0.5%, durante 2 minutos, y se enjuagan tres veces en agua destilada estéril (ADE). Posteriormente se colocan sobre papel filtro estéril para extraer el exceso de humedad. Una vez desinfectados los especímenes, se colocan en cajas petri acondicionadas como cámara húmeda estériles, con papel filtro, una bolita de algodón humedecido y dos portaobjetos colocados en cruz, sobre los especímenes desinfectados.

3.14.2 Aislamiento. ⁽⁵⁾

Se toman los insectos de la cámara húmeda que presenten una esporulación uniforme y estén libres de contaminantes. Este aislamiento se puede efectuar de dos maneras: en el primer caso se prepara una suspensión retirando las conidios del cuerpo del insecto y colocándolas en un frasco con 9 mL de agua destilada estéril más una gota de Tween 20. Se hacen siembras en el medio de cultivo. En otro caso las conidias se retiran con el aza de platino y se siembran directamente en el medio de cultivo por estrías. Posterior al aislamiento se realiza una reactivación para mantener la patogenicidad y virulencia.

3.14.3 Producción del inoculo en cajas de petri. ⁽⁵⁾

Cuando sea obtenido una colonia pura del patógeno se prepara una suspensión de conidias y se siembra en el medio de cultivo agar papa dextrosa con la ayuda de rastrillo de vidrio. Las placas se sellan con papel parafilm y se incuban a 27°C con luz continua por 15 días, tiempo en el cual el hongo completa su desarrollo y alcanza completamente la esporulación. Luego de transcurrido los 15 días es retirado el papel parafilm para que pierda humedad y mejore el intercambio gaseoso. Posteriormente se incuban entre 4-8°C en donde pueden conservarse hasta 6 meses.

3.14.4 Preparación de matrices. ⁽⁵⁾

Para formar las matrices se utilizan Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 mL de agar papa dextrosa más extracto de levadura y dos gotas de ácido láctico. En estas matrices se siembra el inóculo proveniente de las cajas de petri llenas. Para ello se prepara una suspensión con una concentración de alrededor de 1×10^8 conidias/mL, de la cual se toman 2 ml para inocular cada matriz. Estas se colocan en la incubadora o en un ambiente a 27 °C, con luz permanente o fotoperiodo normal. Al cabo de 15 días el hongo estará completamente esporulado y podrá ser utilizado en la producción masiva del mismo.

3.15 Almacenamiento. ⁽¹⁾

El *M. anisopliae* es sensible a temperaturas extremas y la viabilidad de las esporas disminuye a medida que aumentan las temperaturas de almacenamiento.

3.16 Seguridad de uso. ⁽¹¹⁾

Aunque *M. anisopliae* no es infeccioso o tóxico para los mamíferos, la inhalación de esporas podría causar reacciones alérgicas en individuos sensibles.

3.17 Efecto adverso. ⁽¹⁴⁾

Microorganismos entomopatógenos sorprenden a los insectos con nuevas toxinas y maneras de atacar y matarlos mientras que los insectos adquieren resistencias o demuestran cambios en el comportamiento para evadir la acción letal. El resultado de esta carrera evolutiva es una gran variedad de cepas de hongos y bacterias con propiedades de control muy específicas

3.18 Aplicaciones. ⁽⁴⁾

- Según muchos estudios, el hongo ha controlado muchas otras plagas de insectos incluyendo escarabajo japonés, vid picudo negro, y los mosquitos.
- Las formulaciones pulverizables controlan el prado salivazo en la caña de azúcar y el minador del café.
- El *M. anisopliae* es altamente patógeno para muchas especies de garrapatas.
- Espectro de hospedadores hallado en *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (*Ascomycota: Hypocreales*) en Argentina.
- El espectro de hospedadores de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* fue investigado en Argentina en el 2003-2004. Las muestras de insectos con infecciones fúngicas fueron recolectadas a partir de campos de maíz y las áreas no cultivadas

circundantes a los mismos, en diferentes localidades de las provincias de Buenos Aires, Tucumán y Corrientes.

- Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados
- En agosto de 2007, los científicos del Instituto Indio de Tecnología Química descubrió una manera más eficiente de producir biodiesel que utiliza lipasa, una enzima producida por *Metarhizium anisopliae*. El hongo es ahora un candidato para la producción en masa de la enzima.

3.19 Medición con el pHmetro. ⁽¹⁰⁾

El pH-metro realiza la medida del pH por un método potenciométrico. Este método se basa en el hecho de que entre dos disoluciones con distinta $[H^+]$ se establece una diferencia de potencial. Esta diferencia de potencial determina que cuando las dos disoluciones se ponen en contacto se produzca un flujo de H^+ , o en otras palabras, una corriente eléctrica. En la práctica, la medida del pH es relativa, ya que no se determina directamente la concentración de H^+ , sino que se compara el pH de una muestra con el de una disolución patrón de pH conocido.

Para ello se utiliza un electrodo de pH. Cuando el electrodo entra en contacto con la disolución se establece un potencial a través de la membrana de vidrio que recubre el electrodo. Este potencial varía según el pH. Para determinar el valor del pH se necesita un electrodo de referencia, cuyo potencial no varía. El electrodo de referencia puede ser externo o puede estar integrado en el electrodo de pH

3.20 Recuento en placa.⁽¹⁶⁾

Es un método de recuento de células viales (célula viable es aquella que es capaz de dividirse y originar descendencia). Se cuentan las células de una muestra que son capaces de formar colonias cuando se inoculan en un medio de cultivo sólido adecuado.

Hay dos modalidades de siembra:

1. En superficie (siembra de extensión): Un volumen de la muestra (0.1 mL) se coloca sobre la superficie de la placa que contiene el medio y se extiende con ayuda de un asa de extensión.
2. En profundidad (siembra de vertido en placa): La muestra se mezcla con el medio de cultivo y se vierte en placa estéril. Permite inocular volúmenes mayores de muestra.

En la mayoría de los casos antes de realizar la siembra las muestras tienen que diluirse.

Una vez inoculadas, las placas se incuban a la temperatura adecuada y cuando aparecen, se cuentan las colonias.

Normalmente, una célula origina una colonia, pero con el fin de evitar errores a la hora de dar el resultado se suele hablar de unidades formadoras de colonia (ufc), en lugar de células y el resultado se expresa como ufc / mL.

3.21 Recuento en Cámara de Newbauer.⁽²⁾

Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor.

En una cámara simple, la porción central, que es donde se realiza el conteo, está dividida en 3 partes. En la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular.

En el caso de cámaras dobles, que son las más comunes, existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara.

La cámara de NewBauer es un instrumento utilizado en microbiología para realizar el recuento de células en un medio líquido, que puede ser un cultivo celular, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, etc.

Esta cámara de contaje está adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas y que en el fondo de las cuales se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas. Se cubre la cámara con un cubrecámaras que se adhiere por simple tensión superficial.

Luego se introduce el líquido a contar, al que generalmente se ha sometido a una dilución previa con un diluyente, por capilaridad entre la cámara y el cubrecámara; puesto que tiene dos zonas esto permite hacer dos recuentos simultáneamente. Para contar las células se observa el retículo al microscopio con el aumento adecuado y se cuentan las células. Con base en la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo del retículo, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la muestra líquida inicial.

3.22 Crecimiento Microbiano. ⁽¹⁷⁾

El crecimiento microbiano hace referencia al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo y no al aumento de tamaño de un

microorganismo. El aumento del número de microorganismos permite la formación de colonias o de poblaciones. Es por eso que en microbiología el crecimiento se estudia por poblaciones y no en microorganismos individuales. Las bacterias u hongos se reproducen generalmente por fisión binaria. El resultado de la fisión binaria son dos células hijas por cada célula madre, así, una célula se divide en dos, dos en cuatro y cuatro en ocho y así sucesivamente.

El intervalo de tiempo que transcurre para la formación de dos células a partir de la célula madre se llama tiempo de generación o tiempo generacional y al igual que la tasa de crecimiento o cambio en el número de células por unidad de tiempo, varía en dependencia de las condiciones genéticas de las bacterias y de los factores nutricionales. Si partimos de una célula al cabo de una generación habrá duplicado su número y así sucesivamente en cada generación. Como se puede observar el crecimiento se produce en progresión geométrica y no aritmética.

3.22.1 Progresión de Crecimiento Microbiano

Número de Generación	Número de Células
1 Generación	2 Células = 2^1
2 Generación	4 Células = 2^2
3 Generación	8 Células = 2^3
4 Generación	16 Células = 2^4
5 Generación	32 Células = 2^5
6 Generación	64 Células = 2^6

En algunos microorganismos en condiciones óptimas la duplicación celular se realiza cada 20 minutos, es así como en 10 horas se habrán producido 30 generaciones, es decir mil millones de células bacterianas. A partir de una célula se obtiene al cabo de 10 horas o sea 600 minutos, $600/20=30$ generaciones. El número de células entonces sería 230.

3.23 Aspectos para el cálculo del crecimiento microbiano

3.23.1 Número de generación (n)

Es el número de divisiones celulares que ocurren en un determinado tiempo en un cultivo microbiano.

3.23.2 Velocidad de crecimiento: $CV = (\Delta n / \Delta t)$

VC: es el cambio en el número de generaciones por unidad de tiempo.

3.23.3 Tiempo de Generación (tiempo de duplicación)

Es el tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos, sea el cambio requerido para duplicar el número de células de una población; o se llamara también al tiempo en que tarda en dividirse la población bajo condiciones dadas de crecimiento, (medio, temperatura, pH, etc.).

3.24 Fases del crecimiento bacteriano.⁽¹⁷⁾

El incremento en el número de las células en una población se denomina como crecimiento exponencial o logarítmico. Si se inocula microorganismos en un medio de cultivo fresco y se cuantifica la población en intervalos de tiempo se puede obtener una curva que represente el crecimiento bacteriano.

La curva puede estar determinada por la comparación del número total de los microorganismos vivos presentes en la población en un período de tiempo.

La curva de crecimiento de la población tiene cuatro fases:

3.24.1 Fase lag o fase de latencia.

Es el periodo de adaptación de los microorganismos a un nuevo ambiente, en este periodo el número de células no se incrementa, sino que se mantiene constante por un largo período que puede durar desde 1 hora hasta varios días. En esta fase las células presentan gran actividad metabólica. Al final de la fase la mayoría de las células aumentan su tamaño.

3.24.2 Fase logarítmica o de crecimiento exponencial.

Durante este periodo las células se empiezan a dividir en forma constante, la actividad metabólica: respiración celular, la síntesis de proteínas es máxima. El número de células vivas en reproducción es mucho mayor que las células vivas de la población que comienzan a morir. El tiempo generacional es mínimo y constante. Las células muestran su morfología: color agrupación forma entre otras. En el momento final de esta fase y como resultado de la alta tasa de reproducción, comienzan a escasear los nutrientes y el ambiente se torna tóxico por el exceso de productos de desecho. Es el momento en el cual las células son más sensibles a los antimicrobianos o a las radiaciones que pueden intervenir negativamente en su crecimiento. Esta fase se representa por una línea recta ascendente.

3.24.3 Fase estacionaria.

En este periodo se genera un factor limitante del crecimiento, razón por la cual se detiene el crecimiento de los microorganismos, generando una tasa reproductiva igual a la tasa de mortalidad. Si la población no se reproduce ni muere, el número de células permanece constante y la longitud de la fase varía y depende del balance que logren las células con el medio ambiente. Es un periodo de equilibrio.

3.24.4 Fase de muerte, o de declive logarítmico.

En esta fase las células no se reproducen, solo mueren y son destruidas por lisis en forma exponencial a causa del incremento en las cantidades de ácido y otros desechos dañinos en el ambiente.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Experimental: durante la realización de este trabajo se realizaron ensayos con dos medios de cultivos propuestos para obtener el mejor medio para el crecimiento óptimo del hongo *Metarhizium anisopliae*.

Prospectivo: se realizaron ensayos los cuales se determinaron parámetros cinéticos y aprovechamiento de los medios de cultivo líquidos propuestos para el crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae*; lo que es de aplicación para futuras investigaciones (posteriormente se tendrán que realizar investigaciones para verificar su virulencia y potencia).

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realizaron consultas en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador (UES).
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador (UES).
- Biblioteca de la Facultad de Agronomía de la Universidad de El Salvador (UES)
- Internet

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

UNIVERSO

Hongos entomopatógenos.

MUESTRA

Metarhizium anisopliae

Se visitó la organización no gubernamental CORDES (Biotech) en donde se proporcionó la mosca pinta infectada que ellos usan para aislar el hongo *Metarhizium anisopliae* y usarlo como bioplaguicida únicamente en medio sólido utilizando cultivo de arroz. La investigación se efectuó en las instalaciones de Laboratorios de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1 Aislamiento del hongo *Metarhizium Anisopliae* a partir de la mosca pinta. ⁽²⁾

Procedimiento:

1. Colocar el insecto infectado en el mortero
2. Agregar unas gotas de agua estéril.
3. Macerar.
4. Humedecer un hisopo con el macerado obtenido.
5. Sembrar en la superficie de cuatro placas de petri conteniendo agar papa dextrosa y 4 tubos con agar inclinado del mismo agar, sin regresar a mojar el hisopo cada vez que se estrié (El estriado debe ser por extensión, debe cubrir toda la placa y tubo).
6. Incubar las placas, dos a temperatura de 28°C (para hongos), y las otras dos a 37°C (para bacterias).
7. Observar y anotar el crecimiento cada 24 horas durante 4 días.

4.4.2 Procedimiento para obtención del inóculo del hongo *Metarhizium anisopliae*.^(3, 7)

Procedimiento:

1. Agregar 5.0 mL de agua destilada con tween 80 0.05% estéril (1 gota) a los tubos de agar papa dextrosa inclinado con el hongo sembrado de *Metarhizium anisopliae*.
2. Incorporar 3 perlas de ebullición estériles.
3. Raspar tratando de arrastrar toda la parte del hongo en la superficie del agar inclinado.
4. Verter la solución a un tubo con rosca estéril.
5. De este tubo incorporar 1.0 mL a un Erlenmeyer fondo plano.
6. Verter aproximadamente 25.0 mL de agar papa dextrosa.
7. Realizar movimientos en ocho de tal manera que el agar y solución agregada se disperse en todo el agar (Realizarlo por sextuplicado).
8. Incubar de 7 a 14 días aproximadamente a temperatura ambiente (Los días pueden variar dependiendo la capacidad del hongo en esporular). Crecimiento del hongo después de 7 días.
9. Después de incubar a cada erlenmeyer incorporar 3.0 mL de agua destilada con tween 80 0.05% (1 gota).
10. Agregar 3 perlas de ebullición.
11. Raspar tratando de arrastrar toda la parte del hongo en la superficie del agar del erlenmeyer.
12. Pasarlo a un tubo con rosca (este es el inóculo puro).
13. Lavar con 3.0 mL de agua destilada con tween 80 0.05% dos veces más.
14. De este tubo inocular 0.1 mL a un tubo con 9.9 mL de caldo Casoy con tween 80 0.05%

15. Leer en espectroscopia UV-VIS (Longitud de onda = 595) de tal manera que la solución posea una concentración de 1.0×10^8 .Conidios/mL.

4.4.3 EVALUACIÓN DE PARAMETROS CÍNETICOS DE CADA MEDIO LÍQUIDO DE CULTIVO. ⁽⁵⁾

Procedimiento:

1. Preparar 490.0 mL de los siguientes medios de cultivo Incorporarlo a un erlenmeyer de 1L.
2. Inocular 10.0 mL del tubo madre del hongo con la concentración de 1.0×10^8 conidios/mL a cada medio propuesto.
3. Tomar muestras a las 0, 24, 48, 72, 96 horas y colocarlo sobre un tubo estéril con rosca.
4. Incubar para detener el crecimiento.
5. Realizar la toma de parámetros cinéticos como pH, Recuento en placa, Recuento en cámara de Newbauer.

TOMA DE pH. ⁽¹⁰⁾

Procedimiento para calibración del pH-metro

1. Calibrar el pH-metro.
2. Colocar en una copita parte del medio de cultivo a determinar el pH.
3. Introducir el electrodo del pH-metro a la copita que contiene el medio de cultivo.
4. Esperar a que se estabilice.
5. Anotar el pH.

Procedimiento:

1. Calibrar el pH-metro.
2. Colocar en un recipiente parte del medio de cultivo.
3. Introducir el electrodo del pH-metro al recipiente que contiene el medio de cultivo.
4. Esperar a que se estabilice.
5. Anotar el pH de la muestra tomada.

CONTEO CELULAR. ⁽¹⁾**Procedimiento:****PASO 1. Preparación de la muestra.**

Dependiendo del tipo de muestra a medir, se habrá de preparar una muestra con una concentración apta para su recuento. Típicamente, el rango de concentraciones que permite contar en cámara de newbauer está entre 250.000 células y 2,5 millones de células por mL.

La concentración óptima para conteo en cámara de Newbauer es de 1 millón de células por mL = 10^6 células/mL. Por encima de 2,5 millones ($2,5 \times 10^6$) la probabilidad de cometer errores de conteo crece demasiado, y también el tiempo y esfuerzo necesario para realizar un recuento con fiabilidad. Por encima de esta concentración es conveniente diluir la muestra para acercar la concentración al rango óptimo.

PASO 2. Introducción de la muestra en la cámara de newbauer. ⁽¹⁾

1. Con la micropipeta tomar 10 μ L de la mezcla preparada en el paso 1.

2. Colocar un cubreobjetos sobre la cámara de Newbauer, y colocarlo en posición horizontal sobre la mesa.
3. Introducir una punta desechable en el extremo de la micropipeta.
4. Ajustar la micropipeta para succionar 10 μL de la muestra. Generalmente este ajuste se realiza girando el botón del émbolo para seleccionar el volumen deseado.
5. Introducir la punta de la micropipeta en la muestra.
6. Pulsar el pistón o embolo superior de la pipeta suavemente hasta que se siente como el pistón llega al final de su recorrido.
7. Retirar la punta de la pipeta de la muestra, y mantenerla en posición vertical y llevarla hasta la cámara de newbauer.
8. Colocar la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de newbauer. Se trata de dejar que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad (ver anexo N°13).
9. Soltar el pistón suavemente mientras se supervisa que el líquido está entrando correctamente y de forma uniforme en la cámara.
10. En caso de que aparezcan burbujas en el cubreobjetos, repetir la operación.
11. La cámara de newbauer está cargada lista para el recuento celular.

PASO 3. Preparación y enfoque del microscopio.

1. Colocar la cámara de newbauer en la bandeja del microscopio. Si el microscopio dispone de pinza de sujeción, fijar la cámara con ella.
2. Encender la luz del microscopio.
3. Enfocar el microscopio hasta que pueden verse nítidas las células mirando por el binocular.
4. Buscar el cuadro donde vaya a realizarse el recuento. En este ejemplo vamos a contar 5 cuadros grandes de una cámara de newbauer de 0,1mm de profundidad (Ver anexo N°15). Recuento de 5 cuadros grandes de cámara de Newbauer.
5. Realizar el recuento de células en el cuadrante central (Ver Anexo. N° 16. Recuento con alta concentración celular.
6. Anotar en una hoja de resultados la cantidad de células contadas.

PASO 4. Cálculo de la concentración^{1,(2)}

La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Newbauer:

Concentración (Cel/mL) = (Numero de células x 10000) / (Número de cuadros)⁽²⁾

En el caso de que hayamos aplicado una dilución, deberemos transformar la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra original.

En este caso tendremos que dividir el resultado por la dilución aplicada.

La fórmula quedará:

$$(\text{Cél/mL}) = (\text{Numero de células} \times 10000) / (\text{Número de cuadros} \times \text{Dilución})$$

Ejemplo:

Para una dilución de 1: 10. Dilución = 0,1

Para una dilución de 1: 100, Dilución = 0,01

Criterios de error ⁽²⁾

Errores de hasta 20% y 30% son comunes con este método de recuento debido al pipeteo, a los errores estadísticos por ser la muestra poco representativa, errores del volumen de muestra realmente introducido en la cámara, etc.

Ejemplo de los resultados del conteo en cámara de newbauer

Se realiza el conteo celular de cinco cuadros grandes identificados de color celeste, (ver anexo 15) de no ser posible el conteo por estar muy concentrado, se pueden realizar diluciones hasta que pueda realizarse el conteo y facilitar el conteo de células al investigador y obtener la mayor precisión posible de los análisis.

SIN DILUCIÓN

Para la muestra del medio 1, tiempo 0 horas; se realizó el conteo en estos cinco cuadros grandes, dando como resultado del conteo 13 células /mL.

Nota: no fue necesario hacer dilución ya que se pudo cuantificar de la muestra pura; se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (Cel/mL)} = (\text{Número de células} \times 10000) / (\text{Número de cuadros})$$

Desarrollándola quedaría de la siguiente manera:

$$\text{Concentración (Cel/mL)} = (13 \times 10000) / (5)$$

$$\text{Concentración (Cel/mL)} = 2.6 \times 10^4 \text{ cel/mL}$$

CON DILUCION

Para la muestra del medio 2 tiempo 48 horas se realizó el conteo en estos cinco cuadros grandes dando como resultado del conteo 157 células /mL.

Nota: fue necesario hacer dilución ya que no se pudo cuantificar de la muestra pura; se determinó que la dilución 10^{-2} facilitaría su conteo.

Por lo que se utiliza la siguiente fórmula:

$$(\text{Cél/mL}) = (\text{Numero de células} \times 10000) / (\text{Número de cuadros} \times \text{Dilución})$$

Desarrollándola quedaría de la siguiente manera:

$$\text{Concentración (Cel/mL)} = (157 \times 10000) / (5)(0.01)$$

$$\text{Concentración (Cel/mL)} = 3.14 \times 10^7$$

Cabe mencionar que el autor de esta ecuación utiliza la dilución en el denominador; pero informa que la utiliza inversamente proporcional dando los siguientes datos antes de utilizarla:

Para una dilución de 1: 10. Dilución = 0,1

Para una dilución de 1: 100, Dilución = 0,01

Los resultados serían exactamente los mismos si colocamos el factor de dilución en el numerador de la siguiente manera:

Para una dilución de 1: 10. Dilución = 10

Para una dilución de 1: 100, Dilución = 100

Tomando el mismo ejemplo anterior:

$(\text{Cél}/\text{mL}) = (\text{Numero de células} \times 10000 \times \text{factor de dilución}) / (\text{Número de cuadros})$

Desarrollándola quedaría de la siguiente manera:

$\text{Concentración (Cel/mL)} = (157 \times 10000 \times 100) / (5)$

$\text{Concentración (Cel/mL)} = 3.14 \times 10^7 \text{ cel/mL}$

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

Se logró el aislamiento del hongo *Metarhizium anisopliae* a partir de la mosca pinta infectada observando características micro y macroscópicas.

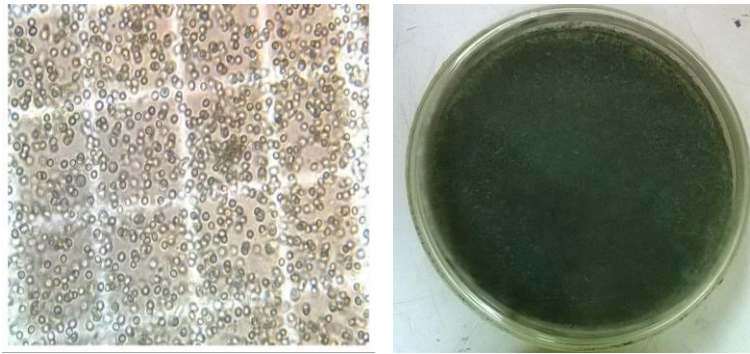


Fig. N°1. Vista microscópicamente y macroscópicamente del *Metarhizium anisopliae*

Sus conidios presentaban una forma circular, unicelular y color verde microscópicamente. El crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* en placa de petri presentó una coloración verde característico de este hongo lo cual indica su presencia.

5.2 MEDIOS DE CULTIVOS PROPUESTOS

Se cultivó el hongo *Metarhizium anisopliae* en dos medios de cultivo líquidos económicos y de materia prima de fácil acceso (costo, disponibilidad, transporte, disposición de desechos, uniformidad de la materia prima, composición química adecuada, satisfacción de los requerimientos de

producción y crecimiento de los microorganismos) con requerimientos nutricionales básicos (como fuente de carbono, de nitrógeno, minerales, factores de crecimiento).



Fig. N°2. Medios de cultivos elaborados

Los medios fueron elaborados con materia prima de fácil acceso.

Para el medio 1 se utilizó: Papa, Azúcar y Agua.

Para el medio 2 se utilizó: Levadura, Azúcar y Agua.

5.3 ESTANDARIZACION DEL INOCULO

Para la estandarización se realizaron 5 pruebas en donde se deseaba llegar a la concentración de 1.0×10^8 Cel/mL a 25% de transmitancia utilizando una longitud de onda de 595nm dando los siguientes resultados.

Cuadro N°1 Resultados de la estandarización del hongo *Metarhizium anisopliae*

TUBO	CANTIDAD ADICIONADA DE INOCULO (mL)	TRAMITANCIA %	CONCENTRACION Cel/mL
1	0.100	48.5	8.92×10^5
	+0.025	40.4**	
	+0.025	32.6*	
	+0.020	28.1	
	Volumen final = 0.170	28.1	
2	0.175	38.6	1.36×10^6
	+0.050	26.6	
	Volumen final = 0.225	26.6	
3	0.240	27.4	1.18×10^6
	+0.020	23.6	
	Volumen final = 0.260	23.6	
4	0.150	*	1.27×10^6
	+0.150	*	
	Volumen final = 0.300	10.4	
5	0.125	**	2.41×10^6
	+0.125	**	
	Volumen final = 0.250	14.6	
*: Tramitancia alcanzada con 0.150 mL			
**: Tramitancia alcanzada con 0.125 mL			

Como se puede observar en la tabla anterior se determinó la concentración del número de células en 5 tubos. Inicialmente se esperaba que a 25% de tramitancia la concentración máxima obtenida fuera de 1.0×10^8 Cel/mL, pero se desconocía la cantidad necesaria de inóculo puro que tendría que ser adicionada para llegar a esta tramitancia y concentración, por lo tanto, fue necesario ir adicionando pequeñas alícuotas en el mismo tubo hasta llegar a una tramitancia de 25%.

En el primer ensayo se obtuvo una tramitancia de 28.1% al adicionar 0.170 mL de la suspensión del inóculo puro alcanzando una concentración de 8.92×10^5 Cel/mL, sin embargo, esta concentración no fue lo suficientemente alta, por lo

que fue necesario un segundo ensayo adicionando 0.225 mL del inóculo puro obteniendo un concentración y tramitancia de 1.36×10^6 Cel/mL y 26.6% respectivamente. En el tercer ensayo se alcanzó una concentración 1.18×10^6 Cel/mL, pero a pesar que la tramitancia fue de 23.6%, la concentración seguía siendo relativamente baja a la deseada, por lo que fue necesario realizar dos ensayos más para determinar la concentración máxima. En el cuarto ensayo se adicionaron 0.300 mL y se obtuvo una tramitancia de 10.4% alcanzando una concentración de 1.27×10^6 Cel/mL, sin embargo, en el quinto ensayo se logró obtener la más alta concentración de 2.41×10^6 Cel/mL con una tramitancia de 14.6% por lo que fue esta la utilizada para la inoculación de los medios de cultivos líquidos.

Ejemplo de Cálculo.

Conteo celular en los cuadrantes de la cámara de newbauer para el ensayo 5 que contiene 0.250 mL presentó una tramitancia de 14.6% y su concentración fue de 2.41×10^6 Cel/mL

Cuadrante	Número de Células
1	248
2	223
3	238
4	258
5	237

Formula.

Concentración de Cel/mL = (Numero de células x 10000)/ (Numero de Cuadros)

Concentración de Cel/mL = $(1204 \times 10000) / (5)$

Concentración de Cel/mL = 2408000 Cel/mL

Concentración de Cel/mL = 2.41×10^6 Cel/mL

5.4 RESULTADOS DE CÁMARA DE NEWBAUER

Graficas de la cinética de producción obtenidas en la metodología.

Cuadro N°2 Resultados del recuento de cámara de Newbauer para el experimento 1 en el medio 1.

Tiempo (h)	Concentración (Cel/mL)
0	3.36×10^9
18	6.55×10^{10}
70	1.50×10^{11}
89	1.27×10^{11}
113	1.27×10^{10}

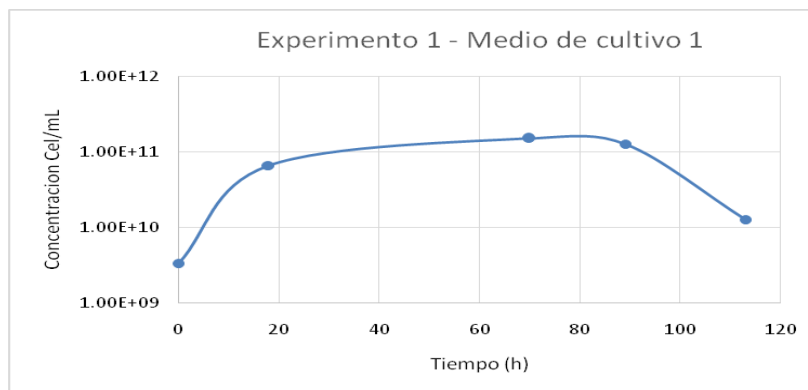


Fig. N° 3 Curva de los resultados del recuento en cámara de Newbauer del experimento 1 en el medio 1.

En la grafica del experimento 1 (Fig. N°3) la cinética de crecimiento no muestra la fase de latencia ya que a partir de la inoculación el hongo comienza su fase de crecimiento (fase exponencial) hasta el tiempo de las 70 horas y a partir de ahí se observa que comienza su fase de muerte como consecuencia de diversos factores como el agotamiento de los nutrientes.

Cuadro N°3 Resultados del recuento de cámara de Newbauer para el experimento 2 en el medio 1.

Tiempo(h)	Concentración (Cel/mL)
0	2.60×10^4
24	2.00×10^4
48	4.00×10^3
120	4.50×10^3
144	2.00×10^3

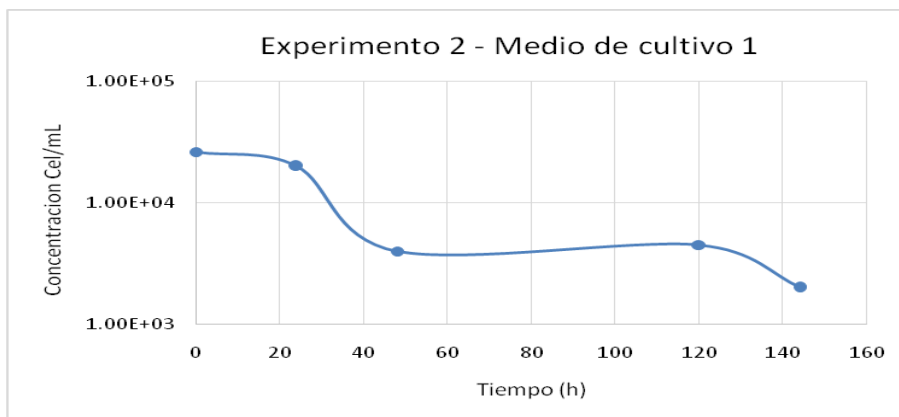


Fig. N° 4 Curva de los resultados del recuento en cámara de Newbauer del experimento 2 en el medio 1.

Para el experimento 2 (Fig. N°4) se observa un descenso considerado de la concentración del hongo *Metarhizium anisopliae* a medida transcurre el tiempo (fase de latencia); al hongo se le dificultó adaptarse al medio de cultivo por eso se observa que la fase de latencia es muy marcada y que a partir de las 48 horas se observa que la concentración incrementa levemente (fase exponencial); a partir del tiempo de 120 horas la concentración comienza a descender (fase de muerte); y como todo microorganismo este hongo necesita nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares y si estos son escasos o se agotan comienza a descender su crecimiento hasta llegar a la fase de muerte.

Cuadro N°4 Resultados del recuento de cámara de Newbauer para el experimento 1 en el medio 2.

Tiempo (h)	Concentración (Cel/mL)
0	1.69×10^{10}
18	2.24×10^{10}
70	7.80×10^8
89	7.44×10^{10}
113	2.65×10^9

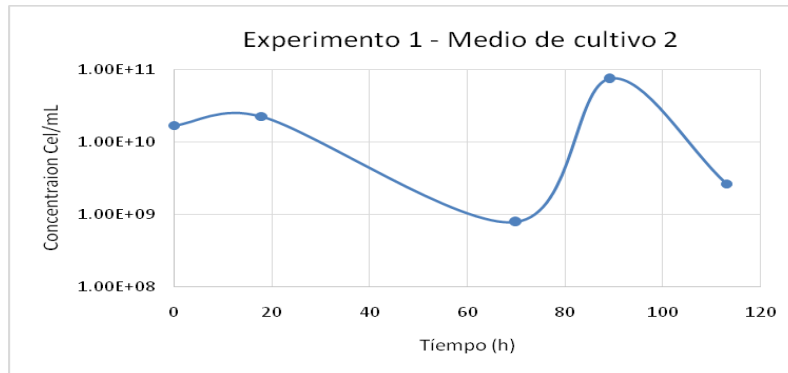


Fig. N°5 Curva de los resultados del recuento en cámara de Newbauer del experimento 1 en el medio 2.

Para el experimento 1 se observa un leve crecimiento a partir de su inoculación y luego del tiempo de 18 a 70 horas comienza a descender (fase de latencia) en donde el hongo comienza a adaptarse a las condiciones y características del medio; el crecimiento usualmente no comienza de inmediato sino después de este lapso y a partir de ahí este se recupera alcanzando una máxima producción hasta el tiempo de 89 horas, luego de esto comienza su fase de muerte en donde los nutrientes o fuentes de energía comienza a agotarse.

Cuadro N°5 Resultados del recuento de cámara de Newbauer para el experimento 2 en el medio 2.

Tiempo(h)	Concentración (Cel/mL)
0	2.80×10^7
24	3.02×10^7
48	3.14×10^7
120	2.14×10^7
144	3.52×10^6

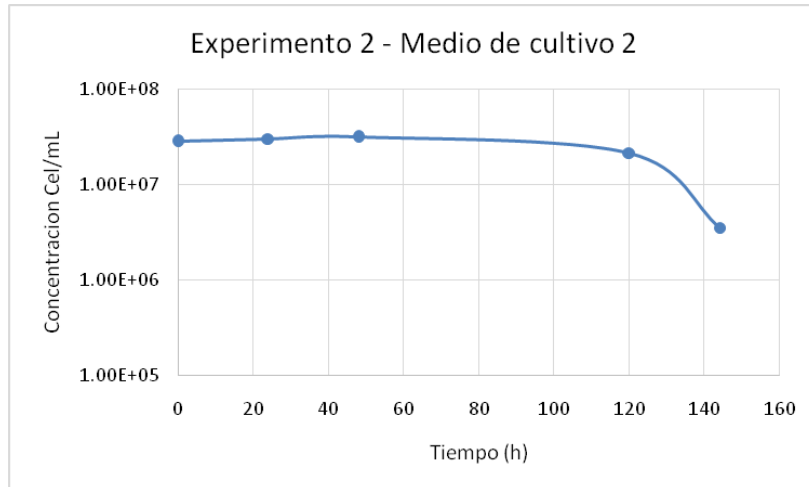


Fig. N°6 Curva de los resultados del recuento en cámara de Neubauer del experimento 2 en el medio 2.

Para el experimento 2 a partir de su inoculación el hongo comienza a crecer levemente (fase exponencial) y en el tiempo de 48 horas se detiene su crecimiento y comienza a descender su concentración rápidamente (fase de muerte).

La diferencia de las cinéticas de crecimiento entre cada medio de cultivo radica en las características y composición de nutrientes de cada uno de ellos, lo que se observa que en el medio 2 (levadura), tiene la ventaja ya que el hongo se adapta mejor obteniendo así su fase exponencial rápidamente a diferencia del medio 1 (papa) que es bien marcada su fase de adaptación (latencia).

Con las gráficas anteriores se establecen los puntos de máxima productividad (para medio 1 y experimento 1 sería el tiempo de 70 horas alcanzando una concentración máxima de 1.50×10^7 cel/mL y para el experimento 2 sería el tiempo de 0 horas obteniendo una concentración de 2.60×10^7 cel/mL y para el

medio 2 experimento 1 sería el tiempo de 89 horas alcanzando una concentración máxima de 7.44×10^{10} cel/mL y para el experimento 2 sería el tiempo de 48 horas obteniendo una concentración de 3.14×10^7 cel/mL), velocidad específica de crecimiento del microorganismo, tiempo de generación durante la fase logarítmica así como el número de generaciones de la población de dicha fase detallados a continuación:

5.5 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO. ⁽¹⁷⁾

Representa el comportamiento que experimenta el consumo de sustrato o la formación de producto para un tiempo específico en el proceso.

$$\mu = \frac{\ln(X_f/X_o)}{T_f - T_o}$$

Donde:

μ : velocidad específica

X_f : gramos de biomasa en tiempo final

X_o : gramos de biomasa en tiempo inicial

T_o : tiempo inicial

T_f : tiempo final

Experimento 1

Medio 1

$$\mu = \frac{\ln(X_f/X_o)}{T_f - T_o}$$

$$\mu = \frac{\ln(1.50 \times 10^{11} / 6.55 \times 10^{10})}{(70\text{h} - 18\text{h})}$$

Medio 2

$$\mu = \frac{\ln(X_f/X_o)}{T_f - T_o}$$

$$\mu = \frac{\ln(7.44 \times 10^{10} / 7.80 \times 10^8)}{(89\text{h} - 70\text{h})}$$

$$\mu = 0.016h^{-1}$$

$$\mu = 0.24h^{-1}$$

Experimento 2

Medio 1

$$\mu = \text{Ln}(X_f/X_o) * (1/ T_f - T_o)$$

$$\mu = \text{Ln}(4.50 \times 10^4 / 4.00 \times 10^4) * (1 / (120h - 48h))$$

$$\mu = 1.64 \times 10^{-3} h^{-1}$$

Medio 2

$$\mu = \text{Ln}(X_f/X_o) * (1/ T_f - T_o)$$

$$\mu = \text{Ln}(3.14 \times 10^7 / 2.80 \times 10^7) * (1 / (48h - 0h))$$

$$\mu = 2.39 \times 10^{-3} h^{-1}$$

La tasa específica de consumo de substrato la podemos considerar la "velocidad" con la que el organismo consume el substrato. Evidentemente, cuanto mayor sea la tasa de consumo mayor será la velocidad de crecimiento (μ). Asimismo, cuanto mayor sea el rendimiento del substrato consumido, también mayor será la tasa de crecimiento.

El valor de la velocidad de crecimiento (μ) se representa en una grafica lineal como una pendiente. Entonces la velocidad específica es mayor cuando más aumenta su pendiente; la velocidad específica es mayor para el medio 2 que para el 1 al ser comparados.

La diferencia entre los tiempos de la velocidad específica de crecimiento del experimento 1 y 2 radica la concentración en el momento en que los medios alcanzan su mayor productividad en la fase exponencial. En el medio 1 la máxima productividad se alcanza entre las 18 horas hasta las 70 horas haciendo una diferencia de 52 horas, mientras que, en el medio 2 la máxima productividad se alcanza a partir de las 70 hasta las 89 horas haciendo una

diferencia de 19 horas. Por lo tanto cuanto menor sea la diferencia de tiempo para alcanzar la máxima productividad en la fase exponencial, mayor será la velocidad específica de crecimiento.

5.6 VELOCIDAD VOLUMÉTRICA DE PRODUCCIÓN. ⁽¹⁷⁾

Representa la tendencia de consumo de sustrato o producción de algún metabolito de interés industrial, expresada en g / L.h presentes en las muestras que son analizadas en los diferentes tiempos del proceso fermentativo.

$$V = (X_f - X_o) / (T_f - T_o)$$

Donde:

V: velocidad volumétrica (g/L.h)

X_f: gramos de biomasa en tiempo final

X_o: gramos de biomasa en tiempo inicial

T_o: tiempo inicial

T_f: tiempo final

Experimento 1

Medio 1

$$V = (X_f - X_o) / (T_f - T_o)$$

$$V = (1.50 \times 10^{11} - 6.55 \times 10^{10}) / (70\text{h} - 18\text{h})$$

$$V = 1.63 \times 10^9 \text{ UFC/mL} \cdot \text{h}$$

Medio2

$$V = (X_f - X_o) / (T_f - T_o)$$

$$V = (7.44 \times 10^{10} - 7.80 \times 10^8) / (89\text{h} - 70\text{h})$$

$$V = 3.87 \times 10^9 \text{ UFC/mL} \cdot \text{h}$$

Experimento 2

Medio 1

$$V = (X_f - X_o) / (T_f - T_o)$$

$$V = (4.50 \times 10^4 - 4.00 \times 10^4) / (120h - 48h)$$

$$V = 0.0156 \text{ cel/mL} \cdot h$$

Medio2

$$V = (X_f - X_o) / (T_f - T_o)$$

$$V = (3.14 \times 10^7 - 2.80 \times 10^7) / (48h - 0h)$$

$$V = 0.0236 \text{ cel/mL} \cdot h$$

El hongo en el medio 2 consume más sustrato tanto para el experimento 1 y como para el 2.

5.7 TIEMPO DE GENERACIÓN DE POBLACIÓN. (17)

Es el tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos, sea el cambio requerido para duplicar el número de células de una población; o se llamará también al tiempo en que tarda en dividirse la población bajo condiciones dadas de crecimiento.

El incremento del logaritmo del número de células aumenta linealmente con el tiempo siendo la constante de proporcionalidad μ . Hay una correlación inversa entre la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de generación.

$$T = \ln 2 / \mu$$

Donde:

μ : Velocidad específica de producción.

Experimento 1

Medio 1

$$t = (\ln 2) / \mu$$

$$t = (\ln 2) / 0.016 \text{ h}^{-1}$$

$$t = 43.32 \text{ h}$$

Medio 2

$$t = (\ln 2) / \mu$$

$$t = (\ln 2) / 0.24 \text{ h}^{-1}$$

$$t = 2.89 \text{ h}$$

Experimento 2**Medio 1**

$$t = (\ln 2) / \mu$$

$$t = (\ln 2) / 0.0016 \text{ h}^{-1}$$

$$t = 433.20 \text{ h}$$

Medio 2

$$t = (\ln 2) / \mu$$

$$t = (\ln 2) / 0.0024 \text{ h}^{-1}$$

$$t = 288.81 \text{ h}$$

El tiempo de generación de población en el medio 1 y el medio 2 fue de 433.2 h y 288.81h respectivamente. Este valor indica el tiempo que el hongo *Metarhizium anisopliae* tarda en duplicar su biomasa en los diferentes de medios de trabajo. Cuanto menor sea este tiempo, más rápido será el aumento de la biomasa del hongo.

5.8 CALCULO DE NÚMEROS DE GENERACIONES. (17)

Es el número de divisiones celulares que ocurren en un determinado tiempo en un cultivo microbiano. Se calcula con la siguiente ecuación:

$$n = (\ln X - \ln X_0) / \ln 2$$

Experimento 1

Medio 1

$$n = (\ln 1.50 \times 10^{11} - \ln 6.55 \times 10^{10}) / \ln 2$$

$$n = 1.20$$

Medio 2

$$n = (\ln 7.44 \times 10^{10} - \ln 7.80 \times 10^8) / \ln 2$$

$$n = 6.58$$

Experimento 2

Medio 1

$$n = (\ln 4.50 \times 10^4 - \ln 4.00 \times 10^4) / \ln 2$$

$$n = 0.17$$

Medio 2

$$n = (\ln 3.14 \times 10^7 - \ln 2.80 \times 10^7) / \ln 2$$

$$n = 0.16$$

5.9pH. (10)

A continuación se presentan las gráficas obtenidas en las lecturas de los pH de cada muestra en cada medio de cultivo del hongo *Metarhizium anisopliae* en donde se observa que a medida transcurre el tiempo y el hongo toma los nutrientes del medio y acidifica los medios de cultivo ya que a cada medio se le tomo su pH inicial y se observa una disminución de este.

Cuadro N°6 Resultados de la toma de pH de los tiempos de muestreo en el experimento 1 del medio 1.

Tiempo (h)	pH
0	4.86
18	4.85
70	4.80
89	4.75
113	4.67

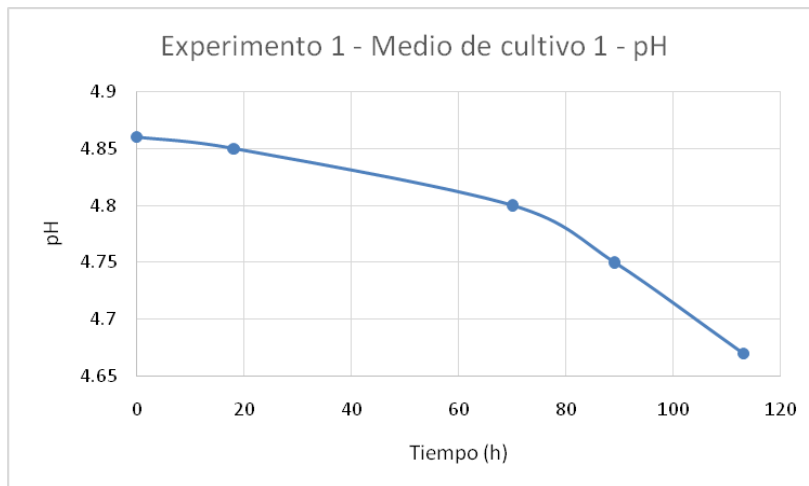


Fig. N°7 Grafica de pH en el Experimento 1 del medio 1.

Cuadro N°7 Resultados de la toma de pH de los tiempos de muestreo en el experimento del medio 2.

Tiempo (h)	pH
0	6.16
18	4.41
70	3.51
89	3.56
113	3.41

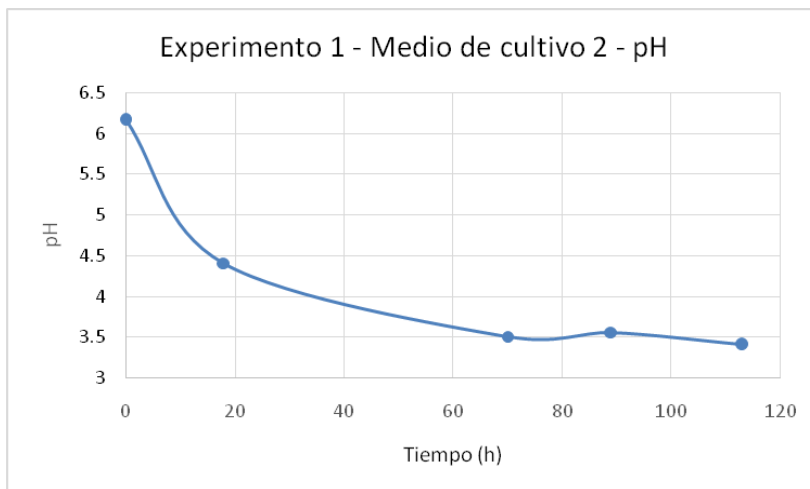


Fig. N°8 Grafica de pH en el experimento 1 del medio 2

Cuadro N°8 Resultados de la toma de pH de los tiempos de muestreo en el experimento 2 del medio 1.

Tiempo (h)	pH
0	6.35
24	5.18
48	4.59
120	4.5
144	4.48

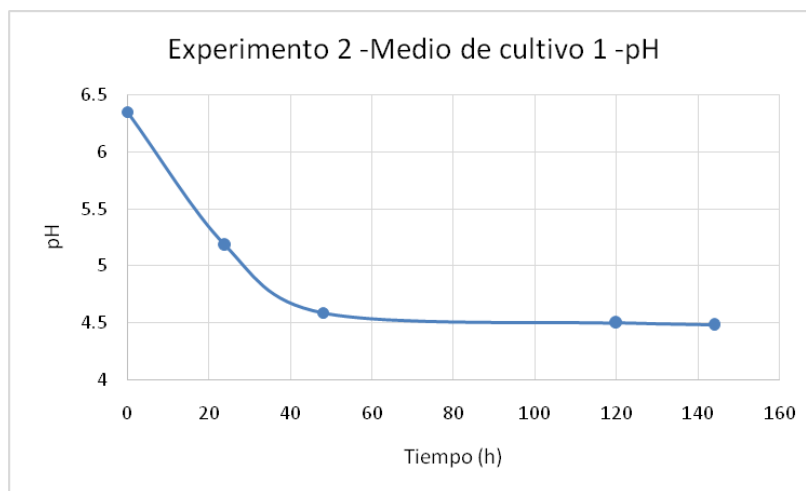


Fig. N°9 Grafica de pH en el Medio 1 del Experimento 2

Cuadro N°9 Resultados de la toma de pH de los tiempos de muestreo en el experimento 2 del medio 2.

Tiempo (h)	pH
0	4.89
24	4.52
48	4.49
120	4.34
144	4.19

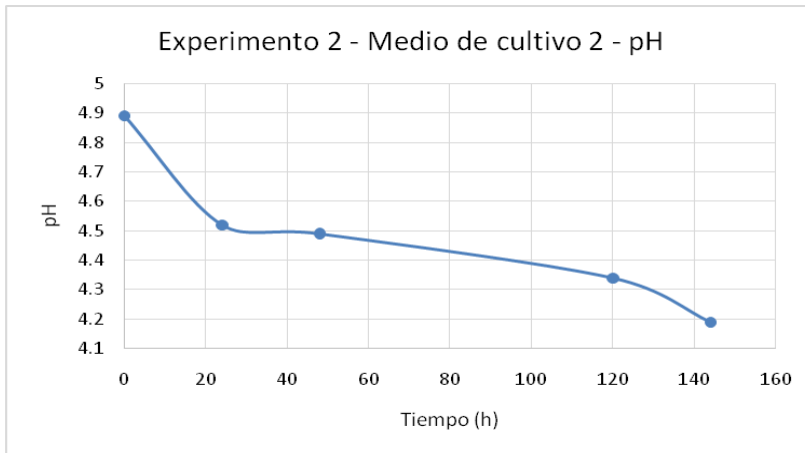


Fig. N°10 Grafica de pH en el experimento 2 del medio 2.

DISCUSIÓN:

El pH es un parámetro crítico en el crecimiento del hongo ya que sólo puede crecer en un rango específico fuera del cual muere rápidamente. Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo, en estas graficas lo que

representa es que el consumo de sustrato es inversamente proporcional ya que a medida transcurre el tiempo el pH desciende, se indica que a mayor consumo de sustrato menor pH.

El descenso de pH indica el rápido consumo de nutrientes que los medios aportan al hongo para su crecimiento. Variaciones intensas en el pH afectan al hongo alterando o inhibiendo su crecimiento.

5.10 RECuento EN PLACA

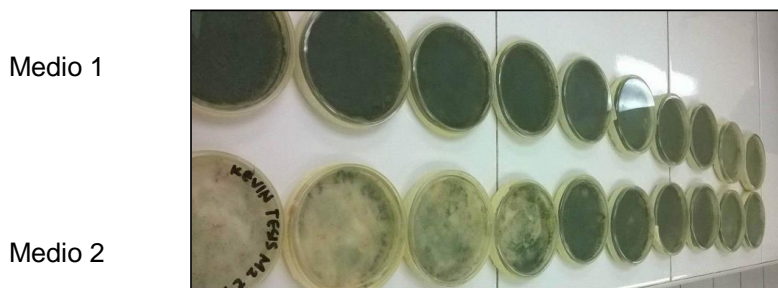


Fig. N°11 Crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* en placas con agar papa dextrosa.

Las células aisladas y cultivadas en los medios de cultivos van utilizando los nutrientes que tienen disponibles con la mayor eficiencia y rapidez que pueden, sintetizar sus propios componentes celulares y dividiéndose en cuanto han podido duplicar su masa y su material genético en este caso el *Metarhizium anisopliae* se observa de color verde. El tiempo que tarda una célula en hacer todo lo anterior es lo que conocemos como tiempo de generación y puede variar desde unos 20 minutos en condiciones óptimas hasta varios meses en

condiciones distintas. Cada vez que transcurre un tiempo de generación, el número de células se duplica, siguiendo, por tanto, un incremento exponencial.

Debido a la forma de crecimiento de este hongo no se pudo cuantificar con la metodología propuesta en UFC pero si se pudo cuantificar en cámara de Newbauer.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Se aisló correctamente el hongo *Metarhizium anisopliae* a partir de la mosca pinta infectada, obteniendo las mismas características tanto micro como macroscópicamente tomando como referencia control positivo.
2. Cuanto mayor sea la tasa de consumo mayor será la velocidad de crecimiento. Asimismo, cuanto mayor sea el rendimiento del sustrato consumido, también mayor será la tasa de crecimiento.
3. Se determinó que tanto en el medio de cultivo de papa, como el de levadura poseen condiciones y características óptimas para que el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* pueda reproducirse y crecer con características cinéticas distintas en cada uno.
4. La velocidad específica y volumétrica en el medio de levadura para ambos experimentos, fue mayor que el medio de papa; esto se demuestra a través de la pendiente que indican sus resultados, observándose que la pendiente del medio de levadura es mayor que el medio de papa; por lo que hay mayor producción en el medio de levadura.
5. De los dos medios utilizados, el que posee mejor producción de biomasa y cinética de crecimiento, es el medio de levadura; debido a que la rápida disminución del pH, representa mayor consumo de sustrato y formación de producto en menor cantidad de tiempo.

Comentario [C3]: PUEDEN PONER EL NOMBRE PARA NO REPETIR TANTOS NUMEROS

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que los sustratos utilizados en la producción de medios de cultivo sean de bajo costo y de alta disponibilidad, además de tener composición químicamente adecuada para el crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae*, porque de esta manera el uso de bioplaguicidas eficaces serían accesibles a la población campesina.
2. Que los medios de cultivo líquidos contengan una fuente de carbono y nitrógeno suficientemente rica y cierto contenido en oligoelementos y sales minerales, básicas para que los microorganismos efectúen sus funciones.
3. Que microorganismos sean capaces de producir esporulación, para facilitar su manejo, inoculación y su conservación.
4. Que las cepas utilizadas posean toxicidad solamente para plagas agrícolas y no para mamíferos de acuerdo a investigación anteriores, porque así se minimizarán los riesgos en caso que alguna célula viva se escape del fermentador al medio ambiente provocando contaminación.
5. Que los tiempos de muestreo deben ser analizados justamente después de haberse tomado la muestra, para conocer el crecimiento correcto en dicho tiempo de muestreo.
6. Que se estudie la cinética de crecimiento de los cultivos microbianos a nivel de laboratorio antes de pasar a un proceso de fermentación a nivel industrial, para conocer cómo será el crecimiento del cultivo, cómo va a ir consumiéndose el sustrato y cómo se va a ir acumulando el producto.

BIBLIOGRAFIA

1. Arahana V., Bastidas Torres A., Diversidad Genética de una colección de hongos entomopatógenos mediante marcadores moleculares AFLP. [Internet], Quito USFQ 2010; [Consulta: 6 de Mayo de 2014], Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/852/1/P-SENESCYT-0016.PDF>
2. Bastidas O.; Conteo Celular en la Cámara de Neubauer; [Consulta: 26 de Julio de 2014]; Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
3. Camacho J, García C, Nava E, Vázquez L, BIOPLAGUICIDAS: UNA OPCIÓN PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS, Ra Ximhai [Internet], 2012 Septiembre Diciembre, [Consulta: 11 de Marzo de 2014] vol.8, Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125177003>
4. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica, 2006, [Consulta: 18 de Enero de 2014], Zeno S, Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia spp.* y *Prosapia spp.*) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala, Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0748E/A0748E.PDF>
5. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador, El Triunfo, Guayas, Ecuador, Octubre de 2004 [Consulta: 11 de Marzo de 2014], Gómez P, Mendoza J, Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*, Disponible en: <http://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Produccion-de-Metarhizium-anisopliae-Publicacion-Tecnica-05.pdf>

6. Cruz Iván, Uso de hongos entomopatógenos en el control de plaga [Internet], UNAN-OEA, [Consulta: 16 de Enero de 2014], Disponible en: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/488624/1/Usohongos-.pdf>
7. Echemendía M, Figueroa J, Ramírez L, Ruiz J, El manejo de plagas y el uso de plaguicidas en la agricultura [Internet], Habana Cuba 2013, [Consulta: 15 de Enero de 2014], Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos98/manejo-plagas-y-uso-plaguicidas-agricultura/manejo-plagas-y-uso-plaguicidas-agricultura.shtml#ixzz2va Bn0Az0>.
8. Organización Panamericana de la Salud [Sede Web], Buenos Aires, Corra Lilian, 2009 [Consulta: 15 de Enero de 2014], Herramienta de capacitación para el manejo responsable de plaguicidas y envases, Disponible en: <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/proyectoPlaguicidas/libro/carpModulo1/modulo1b.html>
9. Plaguicidas de Origen Botánicos, INIFA, Habana, Cuba.
10. Procedimiento QU-003 para la calibración de phmetros digitales; Ministerio de Industria, Turismo y comercio, Centro Español de Metrología, [Consulta: 17 de Septiembre de 2014], Disponible en: http://www.cem.es/sites/default/files/qu-003_digital.pdf
11. Raymond A, Cloyd, The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*; [Internet], Universidad de Illinois, [Consulta: 6 de Mayo de 2014], Disponible en: <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf607.html>

12. Rivera M, Rueda A, Evaluación de plaguicidas Imidacloprid, Binfetrina y *Metarhizium anisopliae*, para el control de gallina ciega (*Phyllophaga spp.*) en caña de azúcar (*Sacharum officinarum*); [Internet] Escuela Agrícola Panamericana 2012; [Consulta: 1 de Marzo de 2014] Disponible en: <http://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/785>
13. Ruvalcaba M; Inefectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapatas *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados, Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, [Internet], México 2005 [Consulta: 7 de Mayo de 2014], Disponible en: <http://ibsaweb.com/~inifap4/index.php/Pecuarias/article/view/1359>
14. Saksamrit J.; La eficiencia del sobrenadante del *Metarhizium anisopliae* para erradicar la termita *Coptotermes curvignathus* [Internet]; Escuela Mahidol Wittayanusorn; 2008 [Consulta: 25 de Julio de 2014]; Disponible en: https://www.google.com/sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCEQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.kmitl.ac.th%2Fscience%2Fsci_journal%2Ffiles%2Fthe_efficiency.doc&ei=bOr7U-OjO7fMsQSWmoGYCQ&usg=AFQjCNHP0MzSHLQqJwg4FVfSWrpyRzjfAg
15. Tecnologías Naturales Internacionales, [Internet], Bioinsecticida, [Consulta: 7 de Mayo de 2014] Disponible en: <http://www.bactiva.com/index.php/es/tecnologias/226-biotec>.
16. Torres C.; Estudio cuantitativo de las bacteria, Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional de Nordeste, [Consulta: 13 de septiembre de 2014], Disponible en: <https://www.google.com/sv/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB4QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.biologia.edu.ar%2Fmicrogenera>

l%2Ftp5.pdf&ei=uzbgVLzuNsXnsATK94CgDA&usg=AFQjCNEb9cqTan6ImE
jzMifrEJvjxdxJfg

17. Universidad Pública de Navarra; Microbiología Industrial, Crecimiento Celular; Pamplona; 2008; [Consulta: 26 de Enero de 2015]; Disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-2.htm>

ANEXOS

Anexo N° 1

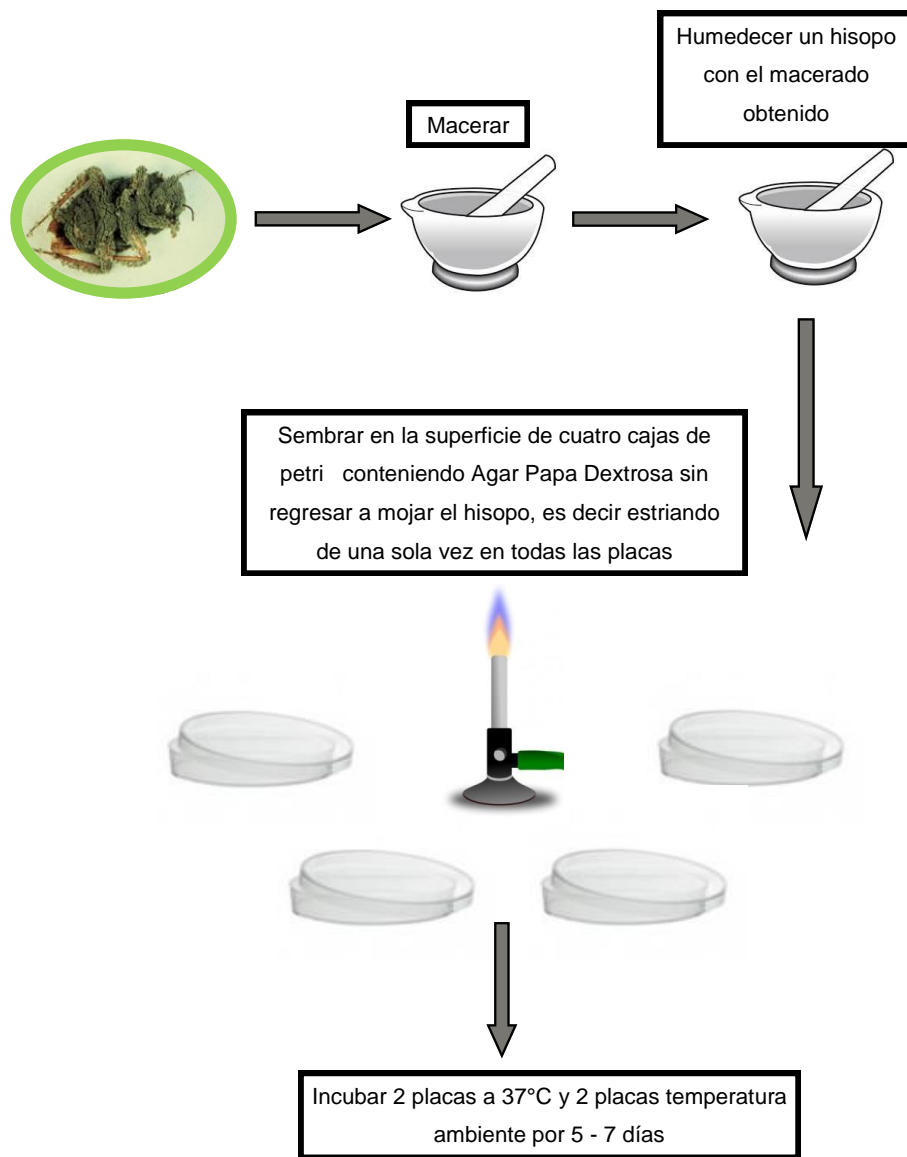


Fig. N° 12 Esquema de trabajo para el aislamiento del hongo *Metarhizium anisopliae* a partir de la mosca pinta.

Anexo N° 2

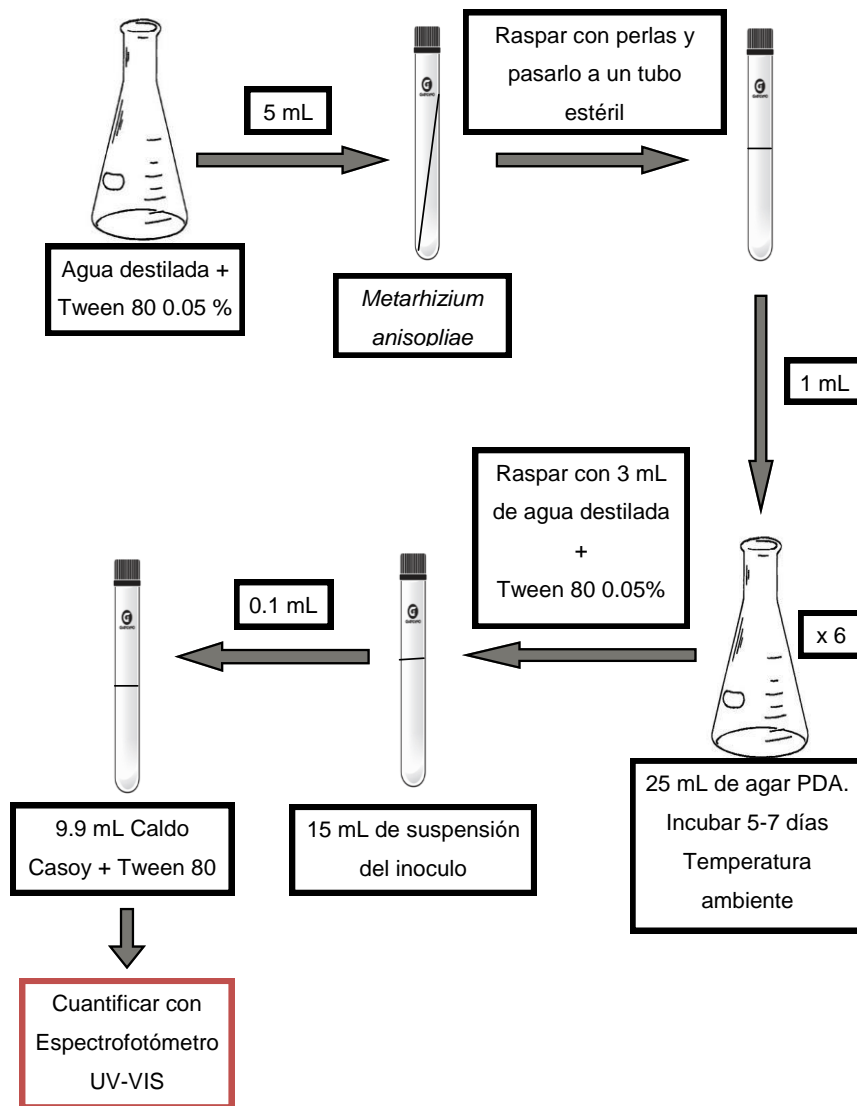


Fig. N° 13 Esquema de trabajo para la obtención del inoculo del hongo *Metarhizium anisopliae*.

Anexo N° 3

Materiales y medios de cultivo para evaluar parámetros cinéticos de cada medio líquido de cultivo.

- Erlenmeyer de 1 litro.
- Pipetas de 10 mL.
- Tubos estériles con rosca.
- Cámara de NewBauer
-
- Frascos para la toma de pH.
- pH metro.
- Agar papa dextrosa
- Cajas de Petri
- Mechero Bunsen.

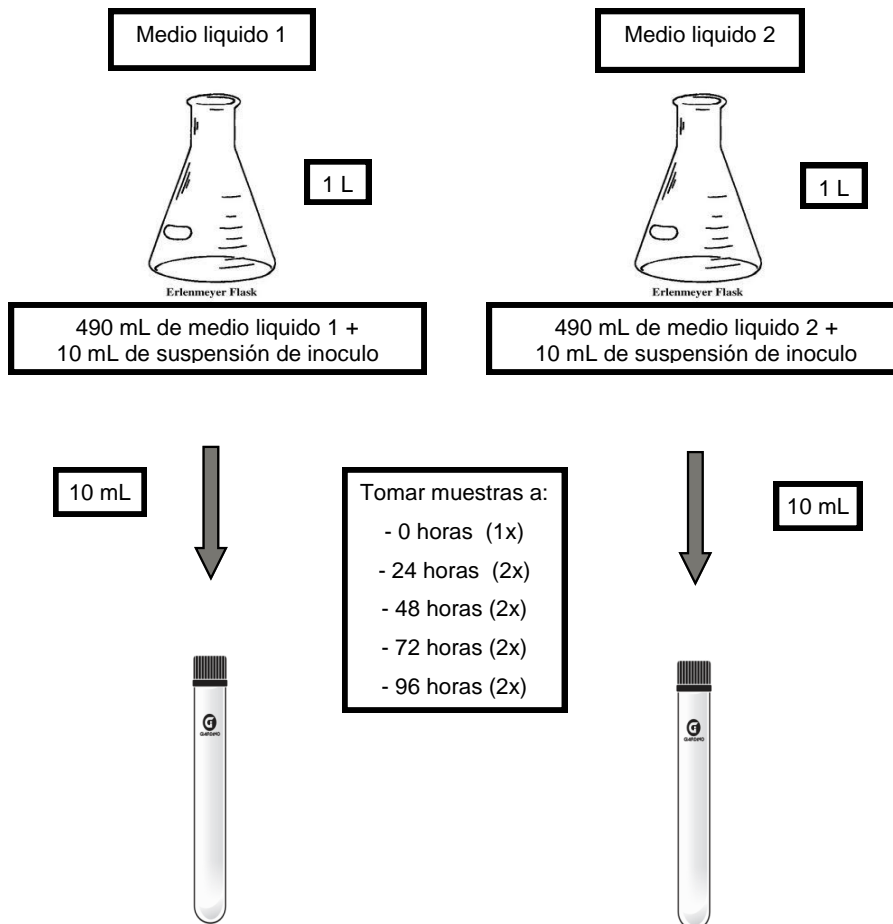
Materiales para el aislamiento del hongo *Metarhizium Anisopliae* a partir de la mosca pinta

- Insecto Infectado (Mosca pinta, *Aeneolamia contigua Walker.*)
- Agua destilada estéril
- Agar Papa Dextrosa
- Mortero + pistilo
- Hisopo
- 4 Cajas de Petri
- Mechero Bunsen

Materiales para la obtención del inóculo del hongo *Metarhizium anisopliae*.

- 150 mL Agar Papa Dextrosa
- Perlas de ebullición
- Tubo con rosca estéril
- 6 Erlenmeyer de 250 mL fondo plano
- 150 mL de agua destilada con tween 80 0.05%
- Mechero Bunsen
- 10 tubos con 9.9 mL de caldo casoy.
- Espectrofotómetro UV-VIS.
- Pipetas de 3.0 mL
- Pipetas de 5.0 mL.

Anexo N° 4



Nota: Se realizara prueba de esterilidad a cada uno de los medios líquidos con 25 mL

Fig. N° 14 Esquema de toma de muestras para pruebas de evaluación cinética.

Comentario [C4]: SI LE PONE EL TITULO ABAJO NO PONERLE ARRIBA

Anexo N° 5

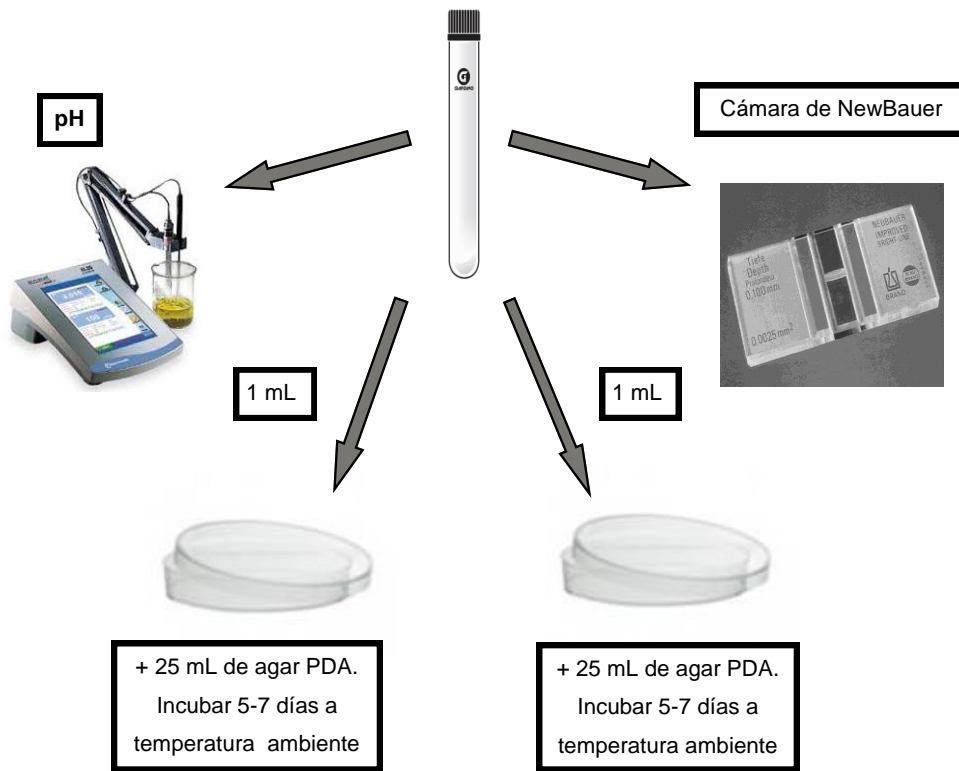


Fig. N° 15 Esquema de pruebas microbiológica para evaluación cinética.

ANEXO N° 6



Fig. N°16 Muestra de la mosca Pinta infectada con el hongo *Metarhizium anisopliae*.

ANEXO N° 7



Fig. N°17. Procedimiento del aislamiento del Hongo *Metarhizium anisopliae*

ANEXO N° 8

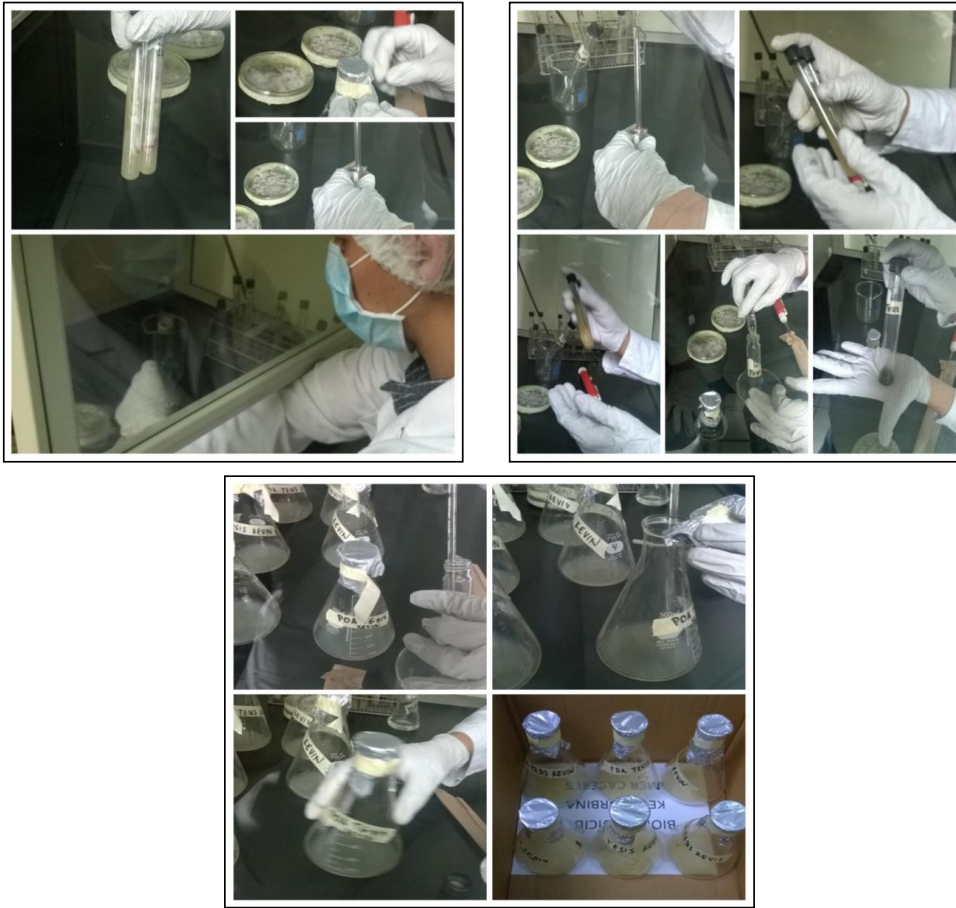


Fig. N°18. Resiembra para la producción de *Metarhizium anisopliae*.

ANEXO N° 9



Fig. N°19. Crecimiento del *Metarhizium anisopliae* luego de una semana de incubación a temperatura ambiente.

ANEXO N°10

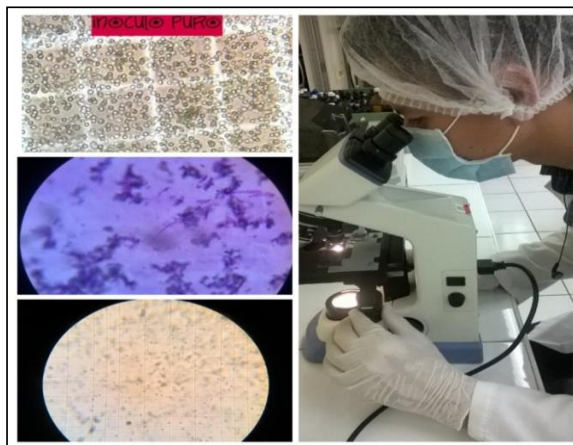


Fig. N°20. Vista microscópicamente del hongo *Metarhizium anisopliae*.

ANEXO N° 11

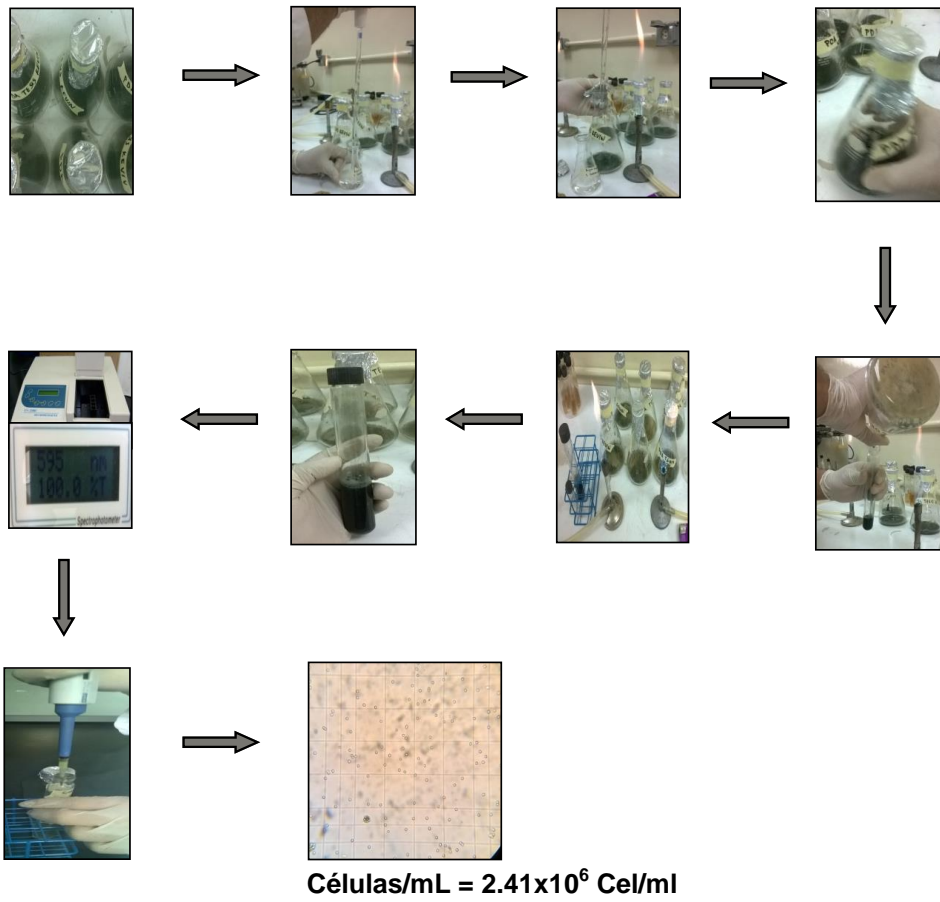


Fig. N° 21. Estandarización del Hongo *Metarhizium anisopliae*.

ANEXO N°12



Fig. N°22. Cámara de Newbauer.

ANEXO N° 13



Fig. N°23. Introducción de la muestra en la cámara de Newbauer.

ANEXO N° 14

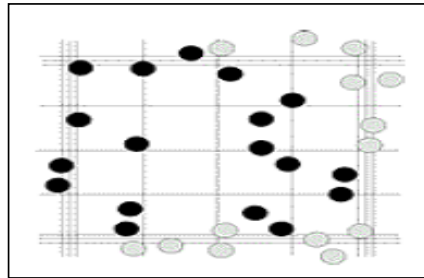


Fig. N°24. Conteo de un cuadro grande de cámara de Newbauer

ANEXO N°15

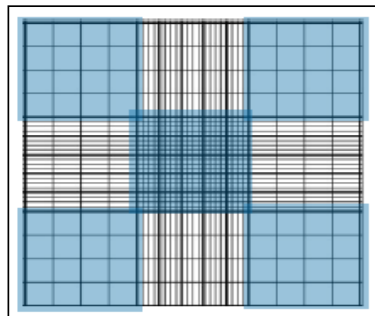


Fig. N°25. Recuento de 5 cuadros grandes de cámara de Newbauer.

ANEXO N°16

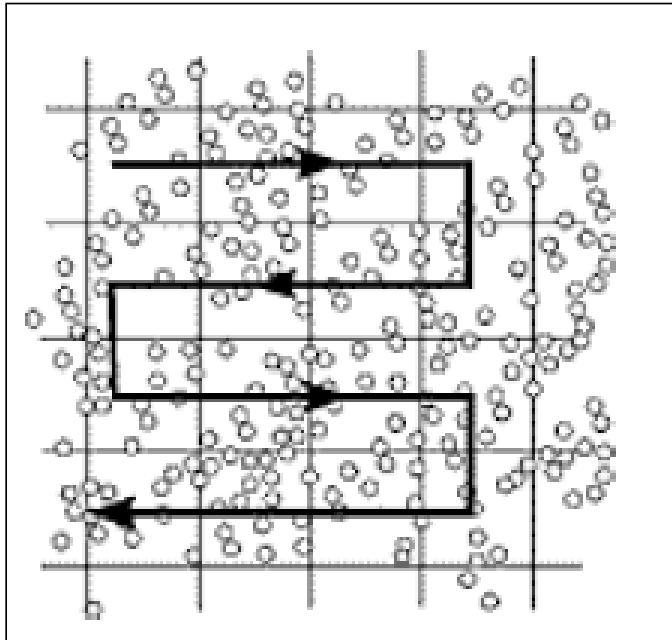


Fig. N°26. Recuento con alta concentración celular. En caso de la concentración celular sea muy alta, y sea fácil perderse en el recuento, se utiliza un orden de conteo en forma de Zig – Za.

Existe una convención por la cual si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho.

ANEXO N° 17

Medio 1

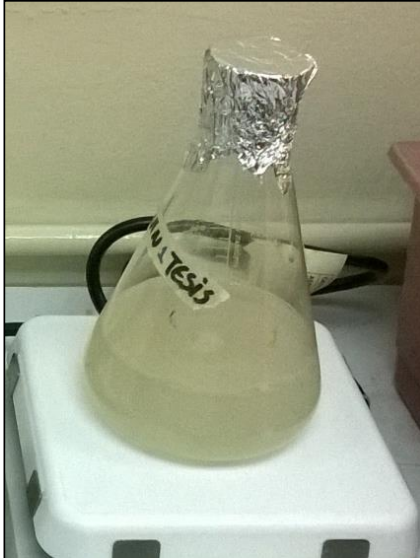


Fig. N°27. Papa, azúcar y agua.

Para medio 1:

Papa.....10 g
Sacarosa.....5 g
Agua.....1000mL

Medio 2



Fig. N°28. Levadura, azúcar y agua.

Para Medio 2:

Levadura.....20 g
Sacarosa.....20 g
Agua.....1000mL

ANEXO N°18



Fig. N°29. Crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* después de una semana de su aislamiento partiendo del insecto infectado.

ANEXO N°19

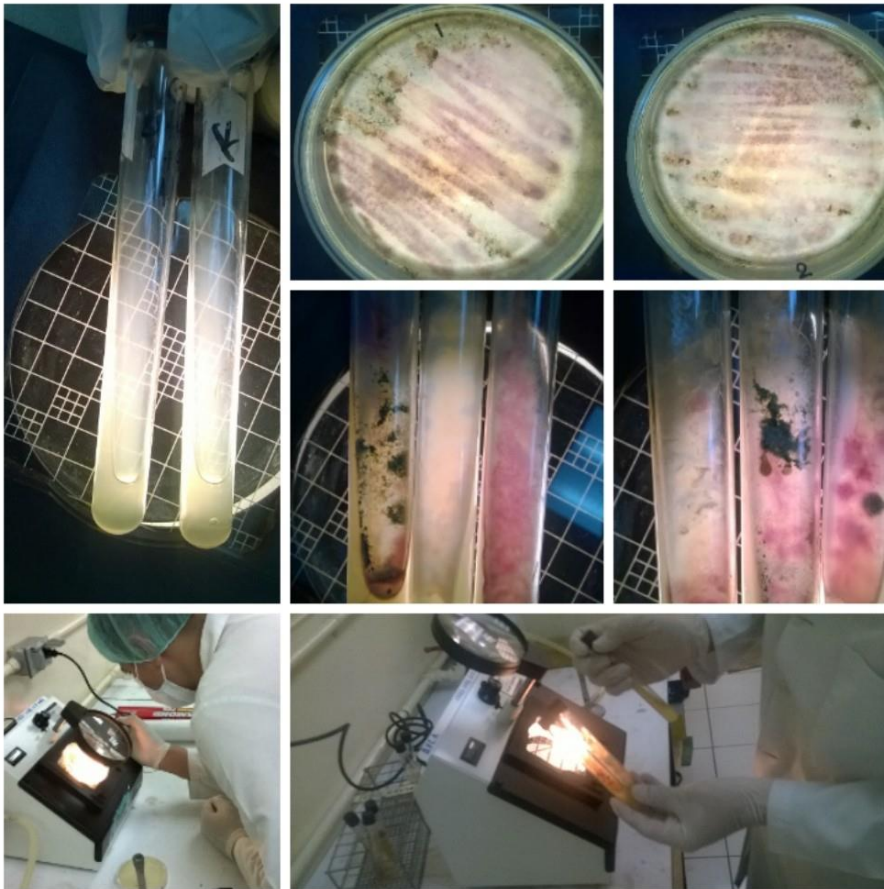


Fig. N°30. Crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae* después de dos semanas de su aislamiento partiendo del insecto infectado.

ANEXO N° 20

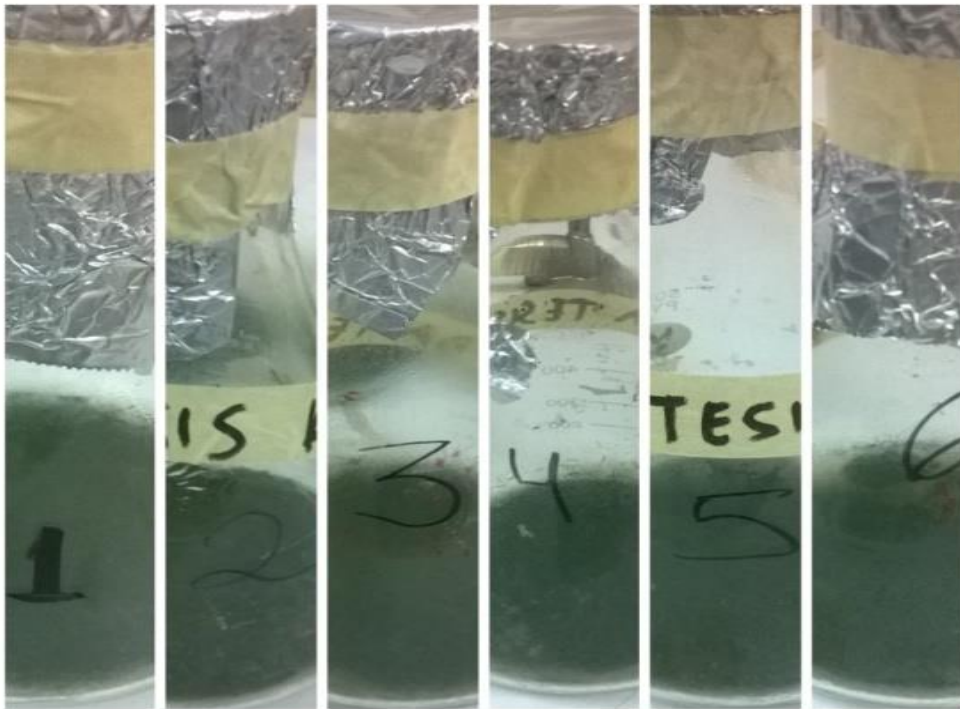


Fig. N°31. Crecimiento del *Metarhizium anisopliae* luego de una semana de su resiembra.

ANEXO N° 21



Fig. N° 33. Elaboración de los medios de cultivo e inoculación del *Metarhizium anisopliae* a los medios de cultivo propuestos.

ANEXO N° 22



Fig. N°34. Medios de cultivo durante el tempo de incubación.

ANEXO N° 23



Fig. N°35. Toma de muestras a tiempos determinados para ambos medios líquidos de cultivo.