

VALIDACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE UN REACTOR DE BIOPELÍCULA UTILIZANDO HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

VALIDATION OF THE OPERATION OF A BIOFILM REACTOR USING ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

Recibido: 17 de octubre de 2022
Aceptado: 09 de diciembre 2022

M.R. Michel Michel¹
P. Aguilar Zárata ^{2*}
L.V. Rodríguez Durán³
M.V. Molina Cantú⁴

RESUMEN

En este trabajo se realizaron tres fermentaciones utilizando la cepa de *Beauveria bassiana* PQ2, hongo entomopatógeno ampliamente utilizado para el control biológico, con el objetivo de producir oosporeina, pigmento activo que produce como metabolito secundario. Se trabajó con un reactor de biopelícula con capacidad de 1.3 L, unido a un sistema de funcionamiento continuo, estableciendo las condiciones fijas de operación: flujo de 2.5 L / min para proporcionar agitación al medio, temperatura 30 °C ± 2, una recirculación de medio de cultivo mediante el uso de una bomba peristáltica y conectado a su vez a un sensor e interfaz para monitoreo de CO₂. El proceso de fermentación se llevó a cabo en un periodo de 168 horas, se manejó un volumen de 600 mL de medio de cultivo, inoculado a una concentración de 1 x 10⁷ esporas / ml, el medio de cultivo se compone por sacarosa, extracto de levadura, KH₂PO₄, MgSO₄, NH₄NO₃ y CaCl₂. El crecimiento de *Beauveria bassiana* se evaluó de acuerdo con la producción de CO₂, su punto de producción más alto de CO₂ se dio durante la fase exponencial, a las 68.5 horas de fermentación con una obtención de 1.35 g de CO₂ / mL. El promedio de producción de oosporeina se produjo una cantidad de 1011.5 mg / L respectivamente, con relación a la producción de esporas en el soporte del reactor se obtuvieron concentraciones de 8.19 x 10⁸, 7.09x 10⁸ y 4.68 x 10⁸ esporas/g de soporte. El reactor de biopelícula es válido para desarrollar el crecimiento de hongos entomopatógenos.

PALABRAS CLAVE: *Beauveria bassiana* PQ2, fermentación, reactor de biopelícula, oosporeina.

ABSTRACT

In this work, three fermentations were carried out using the *Beauveria bassiana* PQ2 strain, an entomopathogenic fungus widely used for biological control, with the aim of producing oosporein, an active pigment that it produces as a secondary metabolite. We worked with a biofilm reactor with a capacity of 1.3 L, linked to a continuous operating system, establishing the fixed operating conditions: flow of 2.5 L / min to provide agitation to the medium, temperature 30 °C ± 2, a recirculation of culture medium by using a peristaltic pump and connected in turn to a sensor and interface for CO₂ monitoring. The fermentation process was carried out in a period of 168 hours, a volume of 600 mL of culture medium was handled, inoculated at a concentration of 1 x 10⁷ spores / ml, the culture medium is composed of sucrose, extract yeast, KH₂PO₄, MgSO₄, NH₄NO₃ and CaCl₂. The growth of *Beauveria bassiana* was evaluated according to the production of CO₂, its highest point of CO₂ production occurred during the exponential phase, at 68.5 hours of fermentation, obtaining 1.35 g of CO₂ / mL. The average production of oosporein was produced in an amount of 1011.5 mg / L respectively, in relation to the production of spores in the reactor support, concentrations of 8.19 x 10⁸, 7.09 x 10⁸, and 4.68 x 10⁸ spores/g of support were obtained. The biofilm reactor is valid for developing the growth of entomopathogenic fungi.

KEY WORDS: *Beauveria bassiana* PQ2, fermentation, biofilm reactor, oosporein.

¹Profesora del Tecnológico Nacional de México Campus Ciudad.

²Profesor del Tecnológico Nacional de México Campus Ciudad Valles. pedro.aguilar@tecvalles.mx (correspondencia)

³Profesor de Universidad Autónoma de Tamaulipas.

⁴Profesora del Tecnológico Nacional de México Campus Ciudad Valles.

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores que limita la producción de los cultivos son las plagas agrícolas. El uso indiscriminado de insecticidas orgánicos sintéticos ha traído como consecuencia la selección de individuos resistentes, la resurgencia de nuevas plagas y la contaminación ambiental y del hombre. El manejo integrado de plagas (MIP), que se basa en principios totalmente ecológicos, considera todo el agroecosistema en su conjunto. Como tal, comprende la aplicación armónica de diferentes métodos de control, uno de ellos es el control biológico de las plagas mediante parasitoides, predadores (entomófagos) y organismos entomopatógenos que pueden ser hongos, bacterias, virus, nematodos y protozoarios (Cañedo & Ames, 2004).

El término hongo entomopatógeno se aplica aquellos microorganismos capaces de atacar insectos, o son un medio de control en la reducción de poblaciones de insectos vectores de enfermedades a humanos o causan daño a cultivos. También se les define como parásitos obligados o facultativos de insectos, con una alta capacidad de esporulación y sobrevivencia; sus mayores ventajas están en la manipulación y adaptación a diferentes ambientes, especificidad y capacidad de penetración directa a través del tegumento (García García et al., 2014).

La utilización de microorganismos como son los hongos entomopatógenos, que son de los principalmente usados en la industria como agentes de control biológico, involucra una serie de procesos para su producción masiva, desde la preparación del materiales y medios de cultivo, así como técnicas de asepsia para evitar contaminantes y lograr obtener los metabolitos secundarios de interés (Mascarin & Jaronski, 2016)..

El aislamiento y estudio de estos metabolitos reviste gran importancia debido a la posibilidad de su utilización como plaguicidas, los mismos poseen baja toxicidad en humanos, elevada acción insecticida y no necesita requerimientos especiales para su empleo. Aunque la producción de metabolitos secundarios es una propiedad genética inherente a los hongos entomopatógenos, la producción de un metabolito en específico puede ser significativamente alterada mediante la optimización de las condiciones del cultivo, como pueden ser los nutrientes, temperatura, pH, etc. (Borges, 2010).

Los biorreactores son equipos donde se desarrollan una serie de reacciones, por la acción de los microorganismos o de enzimas, puesto bajo un ambiente controlado en donde se pretende que haya un crecimiento celular o la producción de metabolitos de interés con una eficiencia óptima. Estos equipos son para el proceso de cultivo, generalmente un tanque de fermentación sólido o líquido. Su diseño debe asegurar la homogeneidad entre los componentes del sistema y las mejores condiciones para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado (Ruíz-Leza et al., 2007). El empleo de estos sistemas incide en la reducción de los costos de producción en el cultivo a escala, ampliamente documentado en gran número de especies de valor comercial. Por otra parte, se controlan varias condiciones de cultivo como lo son pH, agitación, oxígeno disuelto, entre otros parámetros (Rosales-López, 2019)

En el control biológico, el principal problema a atacar es producir de forma rápida, eficiente y económica grandes cantidades de los microorganismos que resulten ser el enemigo natural

de las plagas. El cultivo de microorganismos en reactores es la disciplina biotecnológica que cuenta con la mayor experiencia por lo que, en general, se puede decir que las tecnologías para el control biológico están disponibles. La importancia de realizar este proyecto fue validar el correcto funcionamiento de un reactor de biopelícula utilizando hongos entomopatógenos, evaluando desde la manipulación de las condiciones del cultivo, el crecimiento de los microorganismos en el reactor y la eficiencia en cuanto a la producción de los metabolitos secundarios y esporas, y además el consumo de sustrato.

METODOLOGÍA

Revitalización de los hongos entomopatógenos

Microorganismo

Para la realización del presente trabajo se utilizó la cepa perteneciente al género *Beauveria bassiana* PQ2, la cual se obtuvo del Laboratorio de análisis de alimentos, ubicado en el Instituto Tecnológico de Cd. Valles.

Reactivación

Se realizó una resiembra utilizando como medio agar papa dextrosa para la reactivación, se incubaron durante 7 días a una temperatura de 30 °C en matraces que contuvieran 100 mL de agua destilada, 1000 µL del hongo y 3.9 g de agar PDA.

Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión de esporas de conidios del hongo, inicialmente se adicionaron 40 mL de agua destilada estéril + Tween 80 al 0.01% a cada matraz y con la ayuda de un agitador vibratorio, durante 5 minutos se recuperaron las esporas producidas. Para la inoculación se manejó una concentración de 1×10^7 esporas por mililitro de medio por cada reactor.

Fermentación

Preparación del medio de fermentación

Para el reactor se preparó en un matraz de 1000mL el medio para fermentación con un volumen de 600 mL de agua destilada, realizando inicialmente la dilución de las sales, y por último la sacarosa y extracto de levadura. Ajustar el medio a un pH de 6 (± 0.1 , controlado con hidróxido de sodio 0.5 M), posteriormente se esterilizó a 121 °C, 15 psi durante 15 min. En condiciones asépticas el medio se le agregó 0.06 g de antibiótico, para evitar el crecimiento de bacterias, finalmente se inoculó a una concentración de 1×10^7 esporas/mL. En la tabla 2 se muestra las cantidades de cada reactivo que contendrá el medio de cultivo líquido (Ávila-Hernández et al., 2020).

Tabla 2. Composición del medio.

Componente	Composición (g/L)
Sacarosa (azúcar)	22.5
Extracto de levadura	6
KH ₂ PO ₄	0.48
MgSO ₄	0.72
NH ₄ NO ₃	0.06
CaCl ₂	0.24

Condiciones de operación del reactor

Para llevar a cabo la fermentación se utilizó el reactor de biopelícula, diseñado previamente en el laboratorio por Lara-Juache et al. 2021, con una capacidad de hasta 1.3 L de medio. Como parámetros de operación fijos son: temperatura de 30 ± 2 °C, flujo de aire de 2.5 L/min de aire medido por un flujómetro, que es el que proporciona la agitación y el oxígeno al medio y una recirculación del medio cada 24 horas por medio de una bomba peristáltica, conectado a su vez a un sensor e interfaz para monitoreo de CO₂, esto durante un periodo de 168 horas.

Evaluación de la producción de metabolitos y del consumo de sustrato

Evaluación de producción de metabolitos

Se tomaron muestras desde el tiempo 0 hasta el final de la fermentación, en intervalos de 24 horas, para monitorear la estimación de producción de pigmento rojo. Se realizó una curva de calibración por medio de espectrofotometría, utilizando una solución madre de 10 mg del pigmento diluidos en 10 ml de agua destilada, se realizaron diluciones de 1 mL de solución madre en 1 ml de agua destilada para obtener una dilución de 500 ppm, este se diluirá en un valor de 31.25 ppm usando como valor 0 para el espectrofotómetro solo agua destilada.

Evaluación del crecimiento.

La evaluación del crecimiento del microorganismo se monitoreó midiendo la concentración de CO₂ del gas de escape del reactor por medio de un analizador (sensor) de CO₂ tipo Go Direct®, conectado a una interfaz tipo LabQuest 2. Desde el inicio hasta el final de fermentación se utilizó el análisis de datos descrito por Aguilar-Zárate et al. (2018). La producción de CO₂ de todo el proceso se modela como X (mg CO₂ / g materia seca) a través de la aplicación de Velhursts-Pearl Logistics programada por Aguilar-Zarate et al. (2014) con el fin de evaluar el desarrollo de los hongos.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[1 - \frac{X}{X_{max}} \right]$$

(3)

Donde μ es la tasa máxima de crecimiento específico y X_{max} es el valor de equilibrio para X donde $dX / dt = 0$ la solución para la ecuación (3) se da a continuación:

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 - \left(\frac{X_{max} - X_0}{X_0}\right) e^{(-\mu t)}} \quad (4)$$

X_0 se refiere al valor de X cuando $t = 0$. La ecuación (4) se usa generalmente para datos experimentales cuando se propone la ecuación (3). Los valores mínimos de error cuadrado se encuentran en función de parámetros X_0 , X_{max} y μ .

Producción de esporas

Al finalizar la fermentación se realizó un conteo de esporas recuperadas del medio de soporte, para la recuperación se preparó una solución de 100 mililitros de *Tween* 80 al 0.01 %. Para determinar el contenido de esporas por volumen contenido en la suspensión se determinó con ayuda de la cámara Neubauer, las diluciones fueron de acuerdo al manual para el Manejo de Hongos Entomopatógenos (Cañedo & Ames, 2004) de 1:10, 1:100 y 1:100, la suspensión se llevó a la cámara y se colocó el cubreobjetos. Se observó con el lente de 40X y se contaron en total 13 cuadrados (5 arriba, 5 abajo y 3 en diagonal).

Se determinó el número de esporas por mililitro y el número total de esporas utilizando las siguientes formulas:

$$\text{Esporas/mililitro} = (x) (25)(10000)(\text{dilución})$$

$$\begin{aligned} & \text{Esporas/g de soporte} \\ = & (\text{esporas/mililitro}) (\text{Vol. recuperado de suspensión de esporas})/\text{g de soporte} \end{aligned}$$

RESULTADOS

Evaluación de crecimiento

Para realizar la cinética de crecimiento de *Beauveria bassiana* se evaluó la actividad respiratoria que *B. bassiana* produjo durante la fermentación, capturando los valores mediante el uso del analizador (sensor). El proceso se realizó dentro de un periodo de 168 horas, a partir de las 48 horas se visualizó crecimiento de micelio blanco característico del hongo en el soporte, tanto en el medio líquido como en el medio de soporte, al finalizar la fermentación se produjo un aumento masivo de micelio de color blanco. En la figura 1 se muestra la tasa de producción del CO_2 de 2 fermentaciones, se registró como la tasa más alta

de CO₂ en la fermentación 1, como se muestra indicado de color azul, aproximadamente a las 68.5 horas hubo una producción de 1.35 g de CO₂/ml.

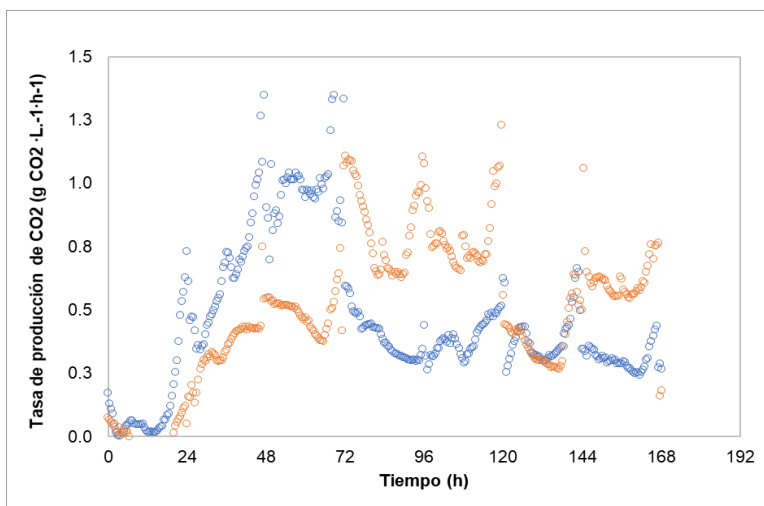


Figura 1. Tasa de producción de CO₂ por *B. bassiana*.

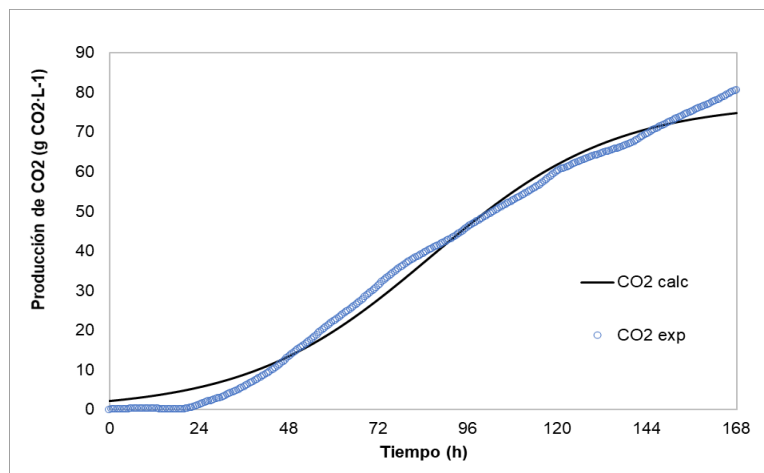


Figura 2. Producción de CO₂ por *B. bassiana* con ajuste de los datos al modelo Verlhust-Pearl.

En la figura 2 se puede identificar la producción de CO₂ acumulado, de acuerdo con la figura, seguido de la fase estacionaria, después de llegar a la producción máxima por ambas fermentaciones, se puede observar que los valores se presentan disminuciones y aumentos de las concentraciones en las horas siguientes, entre las 144 y 168 horas, indicando que en el medio líquido como en el soporte aún se presenta un aumento de producción de micelio. La evaluación del CO₂ se realizó de acuerdo a la metodología expresada por Rodríguez-Durán et al. (2011) aplicado hacia un bioproceso para la producción de Tanasa en SSF por *A. niger* GH1. El ajuste de R² a los datos introducidos fue de 0.99, con una velocidad de crecimiento (μ) de 0.04, los resultados son comparados con los descritos en la fermentación de *B. bassiana* por (Lara Juache , 2020) donde el ajuste de R² fue de 0.097 y la tasa específica de velocidad de crecimiento de 0.046.

Evaluación de producción de pigmento

A lo largo del proceso de fermentación se tomaron muestras cada 24 horas para estimar los valores de producción de pigmento. Como un indicativo de producción es la coloración que puede llegar a observarse en el medio a partir de las 72 horas de fermentación (Ávila-Hernández et al., 2022), para la comprobación y tener en cuenta la estimación de la cinética de producción, se realizó una curva de calibración por espectrofotometría. En la figura 3 se observa la cinética producida por *Beauveria bassiana*, en donde se muestra una concentración promedio de 177.7 mg/L de oosporeína en la muestra tomada a las 72 horas y a las 168 horas se observó una concentración de 1011.5 mg/L.

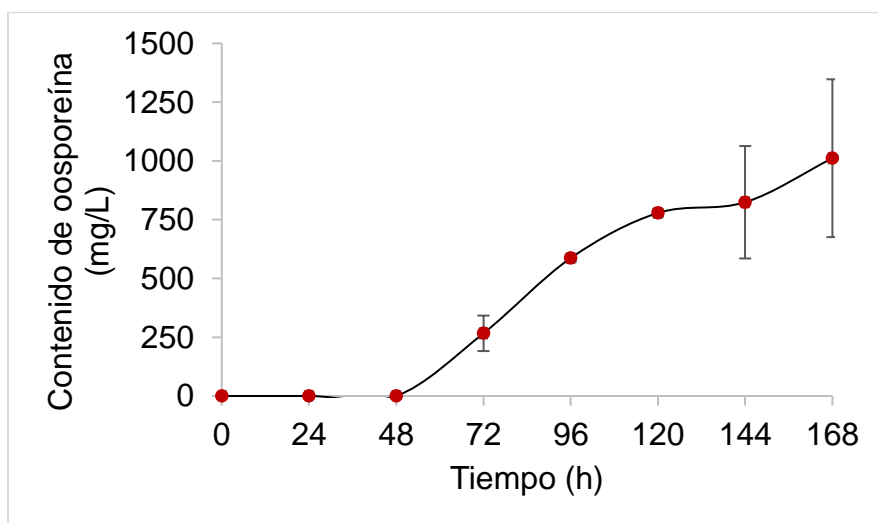


Figura 3. Cinética de producción de oosporeína.

CONCLUSIONES

El reactor de biopelícula presentó un buen funcionamiento para llevar a cabo fermentaciones de hongos entomopatógenos. Se logró evaluar el crecimiento que presentó *Beauveria bassiana* PQ2 durante el proceso, presentando valores aceptables en cuanto a CO₂ producido, se obtuvo una concentración de esporas máxima de 8.19×10^8 y se evaluó la producción promedio de oosporeína obtenida de cada repetición, validando que el reactor presenta un buen sistema para realizar fermentaciones, mostrando resultados buenos que se encuentran dentro de los estándares para la obtención de metabolitos secundarios.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Zárate, P., Wong-Paz, J. E., Rodríguez-Duran, L. V., Buenrostro-Figueroa, J., Michel, M., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E., Ascacio-Valdés, J. A., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2018). On-line monitoring of *Aspergillus niger* GH1 growth in a bioprocess for the production of ellagic acid and ellagitannase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 247, 412–418. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.115>

- Aguilar-Zarate, P., Cruz-Hernandez, M. A., Montanez, J. C., Belmares-Cerda, R. E., & Aguilar, C. N. (2014). Enhancement of tannase production by *Lactobacillus plantarum* CIR1: validation in gas-lift bioreactor. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(11), 2305-2316.
- Ávila-Hernández, J. G., Carrillo-Inungaray, M. L., De-La-Cruz-Quiroz, R., Wong-Paz, J. E., Muñoz-Márquez, D. B., Parra, R., Aguilar, C. N., & Aguilar-Zárate, P. (2020). *Beauveria bassiana* secondary metabolites: A review inside their production systems, biosynthesis, and bioactivities. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2020(4), 1–33. <https://doi.org/10.29267/MXJB.2020.5.4.1>
- Ávila-Hernández, J. G., Aguilar-Zárate, P., Carrillo-Inungaray, M. L., Michel, M. R., Wong-Paz, J. E., Muñoz-Márquez, D. B., ... & Martínez-Ávila, G. C. G. (2022). The secondary metabolites from *Beauveria bassiana* PQ2 inhibit the growth and spore germination of *Gibberella moniliformis* LIA. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(1), 143-152.
- Borges, D. D. A. O. ; S. J. A. N. G. E. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos . *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 44, 49–55.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. <https://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org
- García García, M. A., Cappello García, S., Leshner Gordillo, J. M., & Molina Martínez, R. F. (2014). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*. *HORIZONTE SANITARIO*, 10(2), 21. <https://doi.org/10.19136/hs.a10n2.229>
- Lara-Juache, H. R., Ávila-Hernández, J. G., Rodríguez-Durán, L. V., Michel, M. R., Wong-Paz, J. E., Muñoz-Márquez, D. B., ... & Aguilar-Zárate, P. (2021). Characterization of a Biofilm Bioreactor Designed for the Single-Step Production of Aerial Conidia and Oosporein by *Beauveria bassiana* PQ2. *Journal of Fungi*, 7(8), 582.
- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 177. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Rodríguez-Duran, L. V, Contreras-Esquivel, J. C., & Prado, L. A. (2011). Optimization of Tannase Production by *Aspergillus niger* in Solid-State Packed-Bed Bioreactor Pomegranate and DM View project Popping quality in sorghum grain View project. *Article in Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.4014/jmb.1103.03025>
- Rosales-López, C. (2019). Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la producción y el escalamiento de productos de interés comercial. *Revista Tecnología En Marcha*, 32, 41–46. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4626>
- Ruíz-Leza, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de ingeniería química*, 6(1), 33-40.