

Producción de *Beauveria spp.* con fines agrícolas

Production of *Beauveria spp.* for agricultural purposes

Pablo Roberto Vela Núñez¹, Julio Pineda Insuasti², Astrid Stefanía Duarte Trujillo³, Claudia Patricia Soto Arroyave⁴, Camilo Alejandro Pineda Soto⁵

¹ Universidad Técnica del Norte (UTN), Ibarra, Ecuador.

² Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA), Ibarra, Ecuador.

³ Organización Micológica Internacional (OMI), Colombia.

⁴ Universidad Católica de Oriente (UCO), Rionegro, Colombia.

⁵ Escuela Politécnica Nacional (EPN), Quito, Ecuador

Autor para correspondencia: velapablo1981@gmail.com

Recibido: octubre 15 de 2018

Aceptado: diciembre 25 de 2018

RESUMEN

Beauveria spp. es un hongo entomopatógeno comúnmente empleado para control biológico en cultivos agrícolas. Muchos de los bioinsumos agrícolas se preparan con base en este hongo, siendo de primera necesidad, la optimización de la producción. Por ello, el propósito de este trabajo es describir el proceso tecnológico de producción de esporas de *Beauveria spp.* que permita la implementación de parámetros de operación óptimos. La Fermentación Bifásica es la más adecuada para la producción de propágulos, ya que combina simplicidad de la fermentación sólida con la alta eficiencia de la fermentación líquida.

PALABRAS CLAVES: fermentación, parámetro de operación, propágulos.

ABSTRACT

Beauveria spp. is an entomopathogenic fungus commonly used for biological control in agricultural crops. Many of the agricultural bio-inputs are prepared based on this fungus, being of prime necessity, the optimization of production. Therefore, the purpose of this work is to describe the technological process of production of spores of *Beauveria spp.* that allows the implementation of optimal operation parameters. Biphasic Fermentation is the most suitable for the production of propagules, since it combines the simplicity of solid fermentation with the high efficiency of liquid fermentation.

KEYWORDS: fermentation, operation parameter, propagules.

INTRODUCCIÓN

La preocupación sobre el impacto negativo de los insecticidas químicos ha ocasionado cambios en los patrones del consumo del mercado, que viran hacia lo ecológico y/o orgánico, cobrando gran importancia el uso de Agentes de Control Biológico (BCA, por sus siglas en inglés) (Feng, 1994). El biocontrol

constituye una estrategia biotecnológica ecológicamente limpia y compatible con la agricultura orgánica y el Manejo Integrado de Plagas (MIP, por sus siglas en inglés) (Monte y Llobell, 2003). El objetivo de usarlo es crear un equilibrio entre las plagas y los biocontroladores, de modo que la plaga llegue a un nivel donde ya no sea dañina. Además, el biocontrol presenta amplias ventajas sobre las

prácticas convencionales de control de plagas, ya que es económico, no genera resistencia en las plagas, no pone en riesgo la salud de los fumigadores y no afecta el medio ambiente (Hanke, 2012).

Los bioinsumos son productos elaborados a partir de microorganismos, los cuales son seleccionados por su capacidad de promover el crecimiento vegetal, directamente al facilitar la absorción de nutrientes por la planta o indirectamente al contribuir al control de enfermedades y plagas (Nora Altier, Elena Beyhaut, 2012). Entre los microorganismos empleados se incluyen hongos, actinomicetos y bacterias (Murillo, Rueda, García, y Ruiz Espinoza, 2010). Para la selección de los aislados fúngicos con potencial como BCA, se debe seleccionar las cepas con rápido crecimiento, esporulación abundante y alta patogenicidad a plagas objetivo, además de bajos costos de producción. Por otro lado, los bioinsumos formulados deben presentar larga vida útil tras almacenamiento a condiciones ambientales, sin perder significativamente su viabilidad e infectividad. Se recomienda una vida útil de 18 meses para el mercado agrícola (Couch y Ignoffo, 1981).

Beauveria spp. es un hongo entomopatógeno, empleado exitosamente como BCA de insectos en cultivos agrícolas. Está comprobado que puede colonizar epi o endofíticamente una amplia gama de especies de plantas, reforzando su sistema inmunológico contra insectos y hongos patógenos como *Pythium* spp, *Rhizoctonia* spp, y *Fusarium* spp. (Elliot *et al.*, 2000; Ownley, Gwinn, y Vega, 2010; Rondot y Reineke, 2016; White *et al.*, 2002). Entre los insectos susceptibles a *Beauveria* spp. se encuentran el escarabajo de la patata de Colorado, *Lepitnotarsa decemlineata* (Allee, Goettel, Gol'berg, Whitney, y Roberts, 1990); la hormiga roja de fuego, *Solenopsis invicta* Burenk (Bradleighvinson y Siebeneicher, 1991); la oruga de pino, *Dendrolimus Punctata* Walker (Long y Du, 1988); la cucaracha alemana, *Blattella germánica* (Cai y Liu, 1988); el barrenador

menor, *Elasmopalpus hgnosellus* (McDowell, Funderburk, Boucias, Gilreath, y Lynch, 1990); el gusano falso medidor, *Trichoplusia ni* (Ignoffo, García, Kroha, y Crouch, 1982); el gusano de seda de mora, *Bombyx mori* (Huang, 1988); el saltamontes migratorio, *Melanoplus sanguinipes* (Feng, 1994); piojo harinoso, *Planococcus ficus* (Rondot y Reineke, 2016); entre otros.

Beauveria spp. se cultiva fácilmente en medios sólidos y líquidos, con la diferencia de que en fermentación sólida se producen conidios aéreos ocasionados por su ciclo biológico, mientras que en fermentación líquida se producen blastosporas como consecuencia de la fragmentación de las hifas por las fuerzas mecánicas de agitación (Bidochka, Pfeifer, y Khachatourians, 1987a; Feng, 1994), aunque se considera que la conidiación depende de la naturaleza del aislado y de las condiciones fisiológicas particulares usadas (M. C. Rombach, 1989).

Las blastosporas son inestables durante el secado post-fermentación debido a su pared fina, mientras las conidiosporas son mucho más resistentes (Yin, Chen, Chen, Guo, y Li, 1988b), por lo que se ha estado estudiando su producción a gran escala. Se han producido conidios aéreos mediante fermentación bifásica, es decir, que la producción de micelios vegetativos se hace en medio líquido, seguida de una conidiación superficial del micelio sobre un nutriente o portador inerte; sin embargo, este tipo de fermentación requiere de mucha mano de obra. También se ha incursionado en la fermentación sumergida, con el objetivo de producir conidios sumergidos similares a los conidios aéreos en cuanto a estabilidad, virulencia y morfología (Feng, 1994).

En vista de la importancia de la inducción de la conidiación y de la inhibición de la formación de blastosporas, es imprescindible ampliar los conocimientos al respecto. Por tanto, el propósito de este trabajo es describir el proceso tecnológico de producción de esporas

de *Beauveria* spp., mediante una amplia revisión de la literatura que permita el uso de parámetros de operación óptimos.

GENERALIDADES DEL PROCESO

Existen métodos muy variados para la producción de conidios de hongos entomopatógenos, pudiendo ir desde lo simple a lo complejo según el medio de cultivo empleado para su producción y el grado de tecnificación del proceso. Muchos experimentos a escala laboratorio han sido llevados a cabo con el fin de determinar la composición del medio de cultivo y los parámetros óptimos para la producción de biomasa fúngica, evaluando a su vez, sustratos alternativos de bajo costo que mejoren la producción, la infección y almacenamiento de estos microorganismos.

La producción en masa de hongos entomopatógenos se consigue de dos maneras principales: cultivo líquido y cultivo sólido (B. Alves, Filho, y Roberts, 2003). La producción de conidios en cultivos líquidos es más rápida que en los cultivos sólidos. Las Blastosporas se producen normalmente en cultivos líquidos agitados; y pese a que son más delicados y de corta duración que las conidiosporas, pueden ser igual o más virulentas (Bartlett y Jaronski, 1988; Hall, 1981; Pham, Kim, Kim, y Kim, 2009; Taylor y Feng, 1994). Según Kononova (1978), la conidiación sumergida incluye cinco fases de desarrollo: (1) hinchazón y germinación de conidios; (2) formación de micelios y conidióforos; (3) ramificación del micelio y conidiación inicial; (4) conidiación masiva; (5) separación de conidios en cultivo líquido.

Las blastosporas se pueden formular como un polvo eficaz, duradero, humectable o concentrado en suspensión por un proceso sofisticado, pero comercialmente viable (Kim, Je, Skinner, y Parker, 2013). Sin embargo, la mayoría de los productos pesticidas a base de hongos se hacen con conidios a partir de cultivos sólidos, los cuales deben ser

separados del sustrato para formular el bioinsumo, lo que aumenta la dificultad del proceso (Lee, Kim, Skinner, Parker, y Kim, 2016), pese a que los costos de producción sean bajo, debido a la asequibilidad de las materias primas. Básicamente hay tres procesos de producción que utilizan medios sólidos: Producción en sacos de polipropileno, en botellas de vidrio y en bandejas (Lopes, 2008).

Como la fermentación sumergida es más costosa que la sólida y tiende a producir blastosporas en mayor proporción que conidios sumergidos, se ha incursionado en la producción de *Beauveria* spp. por fermentación bifásica, con el objetivo de producir conidios sumergidos que sean similares a los conidios aéreos en estabilidad y virulencia, así como en su morfología. La producción de conidios aéreos se realiza en dos etapas. En la primera etapa el hongo se desarrolla en condiciones sumergidas, mientras en la segunda etapa el inóculo líquido se transfiere a un medio sólido para que ocurra la esporulación (Hall y Papierok, 1982). Según Soper y Ward (Soper y Ward, 1981), la fermentación bifásica combina las ventajas de los medios sólidos y líquidos; lo que permite que el hongo crezca en fermentadores hasta el final de la fase logarítmica obteniendo una producción máxima de biomasa micelial. Aunque este método requiere de gran cantidad de mano de obra siendo más costosa su implementación (M. C. Rombach, 1989).

PRODUCCIÓN DEL INÓCULO

Las cepas de trabajo se cultivan por lo general en Agar Glucosa- Peptona de soya (Rondot y Reineke, 2016), Agar Papa-Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (Bidochka *et al.*, 1987a) o Agar de Dextrosa-Sabouraud (SDA, por sus siglas en inglés) (Medo, Michalko, Medová, y Cagáñ, 2016) o Agar Harina de Avena a 22-26 °C, alternando luz y oscuridad (Greenfield *et al.*, 2016). Para obtener el inóculo líquido, los conidios se cosechan vertiendo tween 80 al 0,02 % sobre las cajas de Petri y raspando

suavemente con una varilla de vidrio la superficie de las colonias de 8 días de edad (Pham *et al.*, 2009); luego se suspende en Solución de Ringer concentrada con 0,02% de Tween 80 (Rondot y Reineke, 2016), caldo estéril de levadura-glucosa (Leckie *et al.*, 2008) o caldo Dextrosa-Saboraud (Ying y Feng, 2004) y se deja incubando durante 6 días a 24-26 °C (Lee *et al.*, 2016). La concentración de conidios en la solución se mide con un hemocitómetro o una cámara de Neubauer.

FERMENTACIÓN

El inóculo se vierte en el medio de cultivo y se incuba por el tiempo correspondiente. Para medios líquidos, como caldo de glucosa y extracto de levadura, se reporta un tiempo de incubación de 4 a 5 días a temperatura ambiente en bioreactores con capacidad de 7 u 8 litros. Los micelios se cosechan mediante filtración al vacío a través de un tamiz de malla 18 (abertura de malla de 1 mm) o un embudo de Buchner cubierto con papel de filtro Whatman # 4, y se secan al horno. El caldo se recolecta y se refrigera hasta su posterior análisis (Leckie *et al.*, 2008).

Para la fermentación sólida, se esteriliza el sustrato a 121 °C por 45 minutos en bolsas de polipropileno, una vez enfriado se inocula con suspensión de esporas y se incuba a 24-26 °C durante 6-7 días, pudiendo alargarse hasta las dos semanas. Posteriormente, el cultivo se seca por ventilación a 34 °C durante 1 día y a temperatura ambiente durante otro día más. Finalmente, los conidios se recogen del sustrato empleando un tamiz vibrante (78 Mesh por cm) y se dejan secar durante un día más. Algunos sustratos humectan el sustrato con una solución de ácido cítrico al 4 %, para reducir la contaminación bacteriana (Feng, Pu, Ying, y Wang, 2004; Kim, Kassa, Skinner, Hata, y Parker, 2011). Lee y colaboradores (2016) emplearon bolsas de polipropileno con perforaciones de 15 micras de diámetro, lo que les permitió posteriormente sumergir las bolsas incubadas en agua para lavar el sustrato con agitación y obtener una nueva solución de

esporas con una concentración promedio de 1×10^6 conidios/ml, útil para biopreparados.

Es necesario recordar que tanto los bioreactores como los medios de cultivo deben ser previamente esterilizados para garantizar la asepsia del cultivo. Se han reportado condiciones de esterilización de medios de cultivo a 120 °C por 20 minutos (Medo y Cagáñ, 2011; Meyling y Eilenberg, 2006); y de bioreactores a 248 °C, 200 rpm de agitación y un flujo de 4 L de aire comprimido por minuto de aireación durante 1 día (Leckie *et al.*, 2008).

PARÁMETROS DE OPERACIÓN

Composición del medio: la composición del medio esta inherentemente relacionada con la cantidad y calidad del hongo producido (Kassa *et al.*, 2008). La proporción C:N óptima es de 22,4 y el mejor medio para fermentación líquida descrito se conforma de una solución con 3% de harina de maíz, 2% de polvo de maíz y 2% de salvado de arroz (Pham *et al.*, 2009). Alguno de los sustratos utilizados para el crecimiento son generalmente productos vegetales ricos en almidón como granos y polvo de mijo italiano (*Setaria itálica*) (Kim *et al.*, 2011), salvado de trigo (M. C. Rombach, Aguda, y Roberts, 1988), arroz (Feng, 1994), patatas, avena, maíz y frijol. De estos, el arroz cocido es uno de los medios más comúnmente utilizados para la producción de *B. bassiana* a gran escala (Leite, L. G., Batista Filho, A., Almeida, J. D., y Alves, 2003). El lactosuero también ha sido empleado por algunos autores, gracias a su contenido de lactosa y proteínas, como fuente de azúcar y nitrógeno, correspondientemente (Kassa *et al.*, 2008). Igualmente, los gránulos de alginato de sodio con salvado de trigo también han sido empleados para la inmovilización de las esporas (Knudsen, Johnson, y Eschen, 1990; Marques, Alves, y Marques, 1999).

Está demostrado que la composición del medio líquido puede determinar la producción de conidios (Feng, 1994). Yin y colaboradores

(1988a) indujeron la producción de conidios sumergidos al emplear un medio líquido conformado con un 2% de jarabe de maíz, 3% de sacarosa y diversas sales basales. La conidiación sumergida está relacionada con la naturaleza de la fuente de carbono y la presencia de nitrato como fuente de nitrógeno, por ejemplo, en la forma de KNO_3 y NaNO_3 (Kononova, 1978; Schamne, 2010; Thomas, Khachatourians, y Ingledew, 1987); sin embargo, el uso de NH_4NO_3 induce la producción de blastosporas en fermentadores (Chen *et al.*, 1990). Por otro lado, la adición de fosfato reduce significativamente la producción de conidios, mientras la de quitina presenta un efecto contrario (Hegedus, Bidochka, y Khachatourians, 1990)

Bidochka y colaboradores (1987b) estudiaron el crecimiento de *B. Bassiana* en cultivo líquido probando diferentes medios: 0,2 % de extracto de levadura - 1 % de peptona - 2 % de glucosa; 1 % de peptona - 2 % de glucosa; 1 % de peptona; 2 % de glucosa. Encontraron que la producción de blastosporas se da en todos los medios líquidos a excepción del compuesto únicamente por glucosa. En peptona-glucosa, el rendimiento de blastosporas fue cuatro veces mayor que en el extracto de levadura-peptona-glucosa. Sin embargo, la producción más alta de biomasa surgió al usar el medio levadura-peptona-glucosa.

La sustitución de glucosa por otra fuente de carbono simple como citrato, lactosa, sorbitol, almidón, fructosa o glicerol disminuye el rendimiento de conidios sumergidos y/o aumenta la proporción de blastosporas (Thomas *et al.*, 1987), además, disminuye la adhesión de los conidios aéreos; aunque la combinación de extracto de levadura y sacarosa o maltosa, induce una mayor conidiación (M. C. ubmerge. Rombach, 1989). Por otro lado, la presencia de N-acetilglucosamina promueve la adhesión conidial, mientras los detergentes le inhiben (Holder y Keyhani, 2005). En consecuencia, los tensoactivos como aceite de ricino, éter lauril de polioxietileno, tween 80, tween 20, entre

otros, se emplean para disminuir la adhesión de los propágulos al sustrato y puedan fácilmente disolverse en la solución acuosa en que se sumerjan. El tensoactivo más eficaz es Silwet L-77 (Lee *et al.*, 2016). La adición de sodio y potasio aparte de servir como fuente de nutrientes, sirve también como para regular la presión osmótica (B. Alves *et al.*, 2003).

Temperatura: estudios han demostrado que este hongo puede crecer adecuadamente a un rango de temperatura de 20-25 °C (Hajek, 1997), aunque un estudio demuestra que la temperatura óptima de crecimiento micelial es a 25-27 °C (Pham *et al.*, 2009).

Humedad: las conidiosporas germinan en un ambiente con alta humedad (Couch y Ignoffo, 1981).

Iluminación: para la inducción de los conidios aéreos en medios sólidos se incuban en condiciones de oscuridad (Rondot y Reineke, 2016; Wagner y Lewis, 2000), aunque algunos autores emplean un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Ownley *et al.*, 2010); o 12 horas de luz y 12 de oscuridad (Greenfield *et al.*, 2016).

pH: bajos pH disminuyen la adhesión conidial, aunque no de manera drástica (Holder y Keyhani, 2005). El óptimo pH inicial para la producción de esporas es 5,2 (Pham *et al.*, 2009).

Agitación: las fuerzas mecánicas de la agitación fragmentan los micelios y promueven la formación de blastosporas (Bartlett y Jaronski, 1988; Hall, 1981; Pham *et al.*, 2009). Se reporta que la frecuencia agitación de medios líquidos que permite la mayor producción de esporas es de 200 rpm (Pham *et al.*, 2009).

Afinidad de los propágulos: *Beauveria spp.* produce al menos tres propágulos unicelulares distintos: conidios aéreos, células vegetativas denominadas blastosporas y conidios sumergidos; que se pueden aislar de placas de agar, de cultivos líquidos ricos en nutrientes y

de cultivos sumergidos bajo condiciones de limitación de nutrientes, respectivamente. Los conidios aéreos se adhieren mal a las superficies débilmente polares y rápidamente a las superficies hidrófobas e hidrófilas. Por el contrario, las blastosporas se unen mal a las superficies hidrófobas, formando pequeños agregados; pero se unen a las superficies hidrófilas y polares débiles, con la diferencia de que con esta última requiere un mayor tiempo de incubación para unirse. Por su parte, los conidios sumergidos muestran una especificidad de unión más amplia a superficies hidrofóbicas, débilmente polares e hidrofílicas (Holder y Keyhani, 2005).

RENDIMIENTO

Las tasas de germinación se calculan mediante un conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Goldman y Green, 2008). Una de las formas para determinar la viabilidad de los conidios de los hongos entomopatógenos es usar suspensiones fúngicas estandarizadas a concentraciones definidas, las cuales se dispersan en placas que contienen Agar Sabouraud o PDA. Las placas se incuban a 24-26 ° C, con un fotoperiodo de 12 horas y humedad relativa del 60-80%. Después de 24 horas el porcentaje de conidios germinados y no germinados se cuantificaron con un microscopio de luz (S. B. Alves, 1998).

La determinación del rendimiento de cultivos sólidos es complicada, ya que los hongos están íntimamente ligados a la matriz sólida en la que se desarrollan, lo que dificulta la medición de la biomasa producida. Por el contrario, en el cultivo sumergido, la biomasa puede separarse y cuantificarse más fácilmente por diferencial de peso seco. Bajo este contexto, se han realizado estudios que permitan estimar de forma indirecta la cantidad de biomasa generada mediante la medición de otros componentes producidos proporcionalmente

con el crecimiento celular, tales como la glucosamina, los azúcares totales y el ergosterol. Los resultados obtenidos por Desgranges, Vergoignan, Georges y Durand (1991) muestran que las mediciones de glucosamina son un buen indicador del desarrollo de la biomasa fúngica. Sin embargo, este indicador de biomasa sólo puede ser utilizado para comparar diferentes medios que tienen los mismos constituyentes Incluso si las relaciones C/N son diferentes.

CONCLUSIONES

Beauveria spp. es un hongo entomopatógeno comúnmente empleado para control biológico en cultivos agrícolas. Muchos de los bioinsumos agrícolas se preparan con base en este hongo, siendo la primera necesidad, la producción de la mayor cantidad de conidios al menor costo.

Los propágulos de *Beauveria* spp. pueden ser conidios aéreos, conidios sumergidos o blastosporas; los cuales se producen por fermentación sólida, líquida o líquida con agitación, respectivamente. La producción de propágulos depende de la composición del medio y de parámetros de operación que le inducen o inhiben. El fin de controlar estos parámetros es la de producir la mayor cantidad de conidiosporas, que son más viables y estables en contraste con las blastosporas.

La Fermentación en Estado Sólido presenta menores costos de producción y produce conidios aéreos, que son los propágulos más viables, sin embargo, la Fermentación Líquida es más rápida, presenta mayores rendimientos y es más fácil medir la biomasa producida. Por tanto, ha tomado gran importancia la Fermentación Bifásica, la cual consta de un inóculo líquido que se vierte sobre un sustrato sólido; se han empleado varios tipos de bioceldas, de las cuales las bolsas perforadas facilitan la posterior extracción de las esporas en solución.

REFERENCIAS

- Allee, L. L., Goettel, M. S., Gol'berg, A., Whitney, H. S., & Roberts, D. W. (1990). Infection by *Beauveria bassiana* of *Leptinotarsa decemlineata* larvae as a consequence of fecal contamination of the integument following per os inoculation. *Mycopathologia*, 111(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/BF02277296>
- Alves, B., Filho, A. B., & Roberts, D. W. (2003). Effect of salts, vitamins, sugars and nitrogen sources on the growth of three genera of Entomophthorales: *Batkoa*, *Furia*, and *Neozygites*, 107(July), 872–878. <https://doi.org/10.1017/S0953756203007974>
- Alves, S. B. (1998). *Controle microbiano de insetos* (2ª ed.). Piracicaba: FEALQ. Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300160104>
- Bartlett, M. C., & Jaronski, S. T. (1988). Mass production of entomopathogenic fungi for biological control of insects. En M. N. Burge (Ed.), *Fungi in Biological Control Systems* (pp. 61–85). Manchester, UK: Manchester University Press. <https://doi.org/10.1002/jctb.280480109View/save citation>
- Bidochka, M. J., Pfeifer, T. A., & Khachatourians, G. G. (1987a). Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures. *Mycopathologia*, 99(2), 77–83. <https://doi.org/10.1007/BF00436909>
- Bidochka, M. J., Pfeifer, T. A., & Khachatourians, G. G. (1987b). Development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in liquid cultures, 83, 77–83.
- Bradleighvinson, S., & Siebeneicher, S. R. (1991). Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. *Journal of Invertebrate Pathology*, 285, 280–285.
- Cai, B. L., & Liu, A. X. (1988). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to cockroaches. En Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, & Q. F. Xu (Eds.), *Study and Application of Entomogenous Fungi in China* (pp. 101–103). Beijing: Academic Periodical Press.
- Chen, C. J., Wu, J. W., Li, Z. Z., Wang, Z. X., Li, Y. W., Chang, S. H., ... Tan, Y. C. (1990). Application of microbial pesticides in IPM China. En C. J. Cheng (Ed.), *Integrated Management of Pine Caterpillars in China* (pp. 214–308). Beijing: Forestry Publishing House.
- Couch, T. L., & Ignoffo, C. M. (1981). Microbial Control Formulation of insect pathogens. En H. D. Burges (Ed.), *Microbial Control of Pests and Plant diseases 1970-1980* (pp. 621–634). London: Academic Press.
- Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M., & Durand, A. (1991). Biomass estimation in solid state fermentation. *Plateforme de pré-développement en Biotechnologie*, 200–205.
- Elliot, S. L., Sabelis, M. W., Janssen, A., Van der Geest, L. P. S., Beerling, E. A. M., & Fransen, J. (2000). Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecology Letters*, 3(3), 228–235. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00137.x>
- Feng, M. G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, 4(1), 3–34. Recuperado a partir de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583159409355309>
- Feng, M. G., Pu, X. Y., Ying, S. H., & Wang, Y. G. (2004). Field trials of an oil-based emulsifiable formulation of *Beauveria bassiana* conidia and low application rates of imidacloprid for control of false-eye leafhopper *Empoasca vitis* on tea in southern China. *Crop Protection*, 23(6), 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.004>
- Goldman, E., & Green, L. H. (2008). *Quantitation of Microorganisms. Practical Handbook of Microbiology* (2ª ed.). CRC Press.
- Greenfield, M., Gómez-Jiménez, M. I., Ortiz, V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench

- inoculation. *Biological Control*, 95, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>
- Hajek, A. E. (1997). Ecology of Terrestrial Fungal Entomopathogens. En J. G. Jones (Ed.), *Advances in Microbial Ecology* (pp. 193–249). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9074-0_5
- Hall, R. A. (1981). The fungus *Verticillium lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. En *Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970–1980* (Burgess, H., pp. 483–498). London: Academic Press.
- Hall, R. A., & Papierok, B. (1982). Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance, 205–240.
- Hanke, G. (2012). El control biológico: base de la agricultura sostenible. *La Revista Agraria*, 144(13), 10–11. Recuperado a partir de <http://www.larevistaagraria.org/content/el-control-biológico-base-de-la-agricultura-sostenible>
- Hegedus, D. D., Bidochka, M. J., & Khachatourians, G. G. (1990). Applied Microbiology Biotechnology *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin , two hexosamines or glucose, 641–647.
- Holder, D. J., & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260–5266. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5260>
- Huang, Y. X. (1988). Experiment on the virulence of *Beauveria bassiana* to *Bombyx mori* in different culture stage. En Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, & Q. F. Xu (Eds.), *Study and Application of Entomogenous Fungi in China* (pp. 80–82). Beijing: Academic Periodical Press.
- Ignoffo, C. M., García, C., Kroha, M., & Crouch, T. L. (1982). Use of larvae of *Trichoplusia ni* to bioassay conidia of *Beauveria bassiana*. *Journal of Economic Entomology*, 75(2), 275–276.
- Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B. L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., ... Humber, R. A. (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, 112, 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.12.004>
- Kim, J. S., Je, Y. H., Skinner, M., & Parker, B. L. (2013). An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science*, 69(5), 576–581. <https://doi.org/10.1002/ps.3497>
- Kim, J. S., Kassa, A., Skinner, M., Hata, T., & Parker, B. L. (2011). Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(6), 697–704. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0850-2>
- Knudsen, G. R., Johnson, J. B., & Eschen, A. J. (1990). Alginate Pellet Formulation of a *Beauveria bassiana* (Fungi : Hyphomycetes) Isolate Pathogenic to Cereal Aphids. *Journal of Economic Entomology*, 83(6), 2225–2228. <https://doi.org/10.1093/jee/83.6.22252225-2228>
- Kononova, E. V. (1978). Selection of commercial strains of the fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. En *First Joint US/USSR Conference on the Production, Selection and Standardization of Entomopathogenic Fungi of the US/USSR Joint Working Group on the Production of Substances by Microbiological Means* (pp. 172–191). National Science Foundation (USA). Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19830883357>
- Leckie, B. M., Ownley, B. H., Pereira, R. M., Klingeman, W. E., Jones, C. J., & Gwinn, K. D. (2008). Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 18(7), 697–710. <https://doi.org/10.1080/09583150802262906>
- Lee, S. J., Kim, S., Skinner, M., Parker, B. L., & Kim, J. S. (2016). Screen bag formulation of *Beauveria* and *Metarhizium* granules to manage *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(3), 887–892. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.08.005>

- Leite, L. G., Batista Filho, A., Almeida, J. D., & Alves, S. B. (2003). Produção de fungos entomopatogênicos. *Ribeirão Preto: AS Pinto*, 59.
- Long, F. Z., & Du, K. H. (1988). Study on the pathogenic mechanism of *Beauveria bassiana* to the Masson's pine caterpillar. En Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, & Q. F. Xu (Eds.), *Study and Application of Entomogenous Fungi in China* (pp. 80–82). Beijing: Academic Periodical Press.
- Lopes, R. B. (2008). *Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios*. FEALQ.
- Marques, E. J., Alves, S. B., & Marques, I. M. R. (1999). Effects of the temperature and storage on formulations with mycelia of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42(2), 153–160.
- McDowell, J. M., Funderburk, J. E., Boucias, D. G., Gilreath, M. E., & Lynch, R. E. (1990). Biological activity of *Beauveria bassiana* against *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) on leaf substrates and soil. *Environmental Entomology*, 19, 137–141. Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9030096>
- Medo, J., & Cagáň, Ľ. (2011). Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biological Control*, 59(2), 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.07.020>
- Medo, J., Michalko, J., Medová, J., & Cagáň, Ľ. (2016). Phylogenetic structure and habitat associations of *Beauveria* species isolated from soils in Slovakia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.08.009>
- Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2006). Isolation and characterisation of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedgerow vegetation. *Mycological Research*, 110(2), 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.09.008>
- Monte, E., & Llobell, A. (2003). Trichoderma in organic agriculture. En *V World Avocado Congress* (pp. 725–733). Recuperado a partir de http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p725.pdf
- Murillo, B., Rueda, E. O., García, J. L., & Ruiz Espinoza, F. H. (2010). *Agricultura orgánica*. (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Ed.). Ciudad de México, México: Plaza y Valdés S.A.
- Nora Altier, Elena Beyhaut, M. R. & F. R. (2012). Plataforma De Bioinsumos De Uso Agrícola En Base a Microorganismos Benéficos. *INIA*, (29), 47–50. Recuperado a partir de [http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos compartidos/18429300612191129.pdf](http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/18429300612191129.pdf)
- Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: Ecology and evolution. *BioControl*, 55(1), 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9241-x>
- Pham, T. A., Kim, J. J., Kim, S. G., & Kim, K. (2009). Production of Blastospore of Entomopathogenic Submerged Batch Culture. *Mycobiology*, 37(3), 218–224.
- Rombach, M. C. (1989). Producción of *Beauveria bassiana* [deuteromycotina. hyphomycetes] sympoduloconidia in submerged culture. *Entomophaga*, 34(1), 45–52. <https://doi.org/10.1007/BF02372586>
- Rombach, M. C., Aguda, R. M., & Roberts, D. W. (1988). Storing dry *Beauveria bassiana* mycelium. *International Rice Research Newsletter*, 13, 37–38. Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PH19910024139>
- Rombach, M. C. (1989). Production of *Beauveria bassiana* [Deuteromycotina. Hyphomycetes] sympoduloconidia in submerged culture. *BioControl*, 34(1), 45–52.
- Rondot, Y., & Reineke, A. (2016). Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.10.006>
- Schamne, P. A. (2010). *Effect of additives and Fishfertilquitosana® in solid media during conidia*

production of Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin and Beauveria bassiana (Bals.) Vuillemin. Universidade estadual do centro-oeste, UNICENTRO – PR.

- Soper, R. S., & Ward, M. G. (1981). Production, formulation and application of fungi for insect control. *Biological control in crop production*, 161–180.
- Taylor, P., & Feng, M. G. (1994). Biocontrol Science and Technology Production , formulation and application of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana for insect control : current status Production , Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus Beauveria bassiana for, (April 2013), 37–41.
- Thomas, K. C., Khachatourians, G. G., & Ingledew, W. M. (1987). Production and properties of Beauveria bassiana conidia cultivated in submerged culture. *Canadian journal of microbiology*, 33(1), 12–20. <https://doi.org/doi:10.1139/m87-003>
- Wagner, B. L., & Lewis, L. C. (2000). Colonization of corn, Zea mays, by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3468–3473. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3468-3473.2000>
- White, J. F., Belanger, F., Meyer, W., Sullivan, R. F., Bischoff, J. F., & Lewis, E. a. (2002). Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes - Development of symbiotic interactions with plants. *Symbiosis*, 33(3), 201–213. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Yin, F. M., Chen, Q. C., Chen, Y. G., Guo, G. I., & Li, Z. W. (1988a). Studies of Submerged Culture of Beauveria bassiana Conidia. *Study and Application of Entomogenous Fungi in China*, 1, 105–110.
- Yin, F. M., Chen, Q. C., Chen, Y. G., Guo, G. L., & Li, Z. W. (1988b). Pathogenicity of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae to cockroaches. En Y. W. Li, Z. Z. Li, Z. Q. Liang, J. W. Wu, Z. K. Wu, & Q. F. Xu (Eds.), *Study and Application of Entomogenous Fungi in China* (pp. 105–110). Beijing: Academic Periodical Press.
- Ying, S. H., & Feng, M. G. (2004). Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of Beauveria bassiana and Paecilomyces fumosoroseus as fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 323–331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02311.x>