



Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

“BIOQUÍMICA DE LA INTERACCIÓN HONGO  
ENTOMOPATÓGENO- CUTÍCULA DE TRIATOMINO”

**TESIS DOCTORAL**

ROSANA CRESPO

DIRECTOR: DRA. MARTA PATRICIA JUÁREZ

CO-DIRECTOR: DR. RICARDO J. POLLERO

**-2006-**

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales, se realizó en el Instituto de investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, bajo la dirección de la Dra. M. Patricia Juárez y el Prof. Dr. Ricardo J. Pollero.

En memoria de mi Madre,  
a mis Hijos y a Esteban

## Mi reconocimiento

Al Dr. Rodolfo R. Brenner por haberme brindado la oportunidad de comenzar el presente trabajo en las instalaciones del INIBIOLP, como su director.

A la actual directora del INIBIOLP, Prof. Dra. María J. Tacconi de Alaniz por permitirme completar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas que me otorgara oportunamente.

A las siguientes entidades que mediante los subsidios otorgados han financiado gran parte de este trabajo: Comisión Argentino Brasileña de Biotecnología, CABBIO; Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 08-09653; Organización Mundial de la Salud, Programa especial para investigación y entrenamiento en enfermedades tropicales (TDR) A20036 y Comunidad Europea, Chagas Disease Intervention Activities (CDIA) ICA4-CT-2003-10049.

## Mi agradecimiento

A la Dra. M. Patricia Juárez por haberme guiado en la realización de este trabajo, y por brindarme un apoyo constante y gran dedicación en mi formación científica.

Al Dr. Rodolfo R. Brenner por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en el trabajo científico, como mi director de becas.

Al Prof. Dr. Ricardo J. Pollero por brindarme su confianza y comprensión.

Al Dr. Roberto Lecuona y al Ing. Gustavo Dal Bello por la provisión de material biológico utilizado en este trabajo.

Al Dr. Angel Catalá, quien en ciertas ocasiones me permitió utilizar sus instalaciones.

A la Dra. Claudia López Lastra por su buena voluntad y predisposición en su asesoramiento en la sistemática e identificación de *Beauveria bassiana*.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 12, con quienes he trabajado en equipo y muy gratamente durante estos años, y que con gran calidez y paciencia me han ayudado en la realización de este trabajo.

A mis amigos, que me han alentado, aconsejado, respetado y acompañado en todos los buenos y malos momentos.

A mi papá y mi familia, que han estado siempre a mi lado.

A la Dra. Margarita García de Bravo y a todos mis compañeros de la cátedra de Biología por su comprensión y cariño.

A todos los integrantes del INIBIOLP, quienes de alguna u otra forma contribuyeron con la realización de este trabajo.

Publicaciones en revistas científicas periódicas derivadas de este trabajo de tesis:

Biochemical interaction between entomopathogenous fungi and their insect-host-like hydrocarbons. R. Crespo, M.P. Juárez and L.F.R. Cafferata. *Mycologia*, **92**(3), 2000, pp 528-536.

Characterization and Carbon Metabolism in Fungi Pathogenic to *Triatoma infestans*, a Chagas Disease Vector. Juárez M.P., Crespo R., Calderón Fernández G., Lecuona R., Cafferata L.F.R. *Journal of Invertebrate Pathology*. **76**, 2000, pp 198-207.

Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. R. Crespo, M.P. Juárez., G.M. Dal Bello, S. Padin, G. Calderón Fernández and N. Pedrini. *BioControl* **47**(6), 2002, pp 685-96.

Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. R. Crespo, N. Pedrini , M.P. Juárez, G.M. Dal Bello. *Microbiological Research*. Artículo en prensa.

Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events. N. Pedrini, R. Crespo, M.P. Juárez and N. Tacconi de Alaniz. *Mycologia*. Artículo en prensa.

Trabajos derivados de este plan de tesis y enviados para su evaluación en revistas científicas periódicas:

Effect of alkane-grown *Beauveria bassiana* on *Triatoma infestans*, a Chagas disease vector. N. Pedrini, R. Crespo, M.P. Juárez and F. Tarocco

Resumen .....	I
Summary .....	V
<b>Capítulo I. Introducción</b> .....	1
<b>I.A.- Los hongos entomopatógenos como herramientas de control de plagas</b> .....	2
I.A.1. Aspectos generales de los Hongos .....	2
I.A.2. Clasificación taxonómica de hongos entomopatógenos .....	3
I.A.3. Relación patógeno-huésped .....	4
I.A.3.1. Morfología, composición y función de la superficie del insecto huésped .....	6
I.A.3.2. Mecanismos de acción de hongos entomopatógenos .....	7
I.A.4. Control de insectos plaga .....	15
I.A.4.1. Los hongos como agentes de control biológico .....	16
I.A.4.2 <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	20
I.A.4.2.a. Clasificación taxonómica .....	20
I.A.4.2.b. Caracteres generales .....	20
I.A.4.2.c. Capacidad insecticida de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> .....	22
<b>I.B.- <i>Triatoma infestans</i>, vector de la enfermedad de Chagas</b> .....	24
I.B.1. Problemática de la enfermedad de Chagas .....	24
I.B.2. Composición química de la cutícula de <i>Triatoma infestans</i> .....	25
I.B.3. Control de vectores .....	26
<b>I.C.- Bioquímica de microorganismos</b> .....	28
I.C.1. Aspectos generales del metabolismo en hongos .....	28
I.C.1.1. Requerimientos nutricionales .....	28
I.C.1.2. Utilización de la glucosa .....	29
I.C.1.3. Utilización de hidrocarburos .....	30
I.C.1.3.1. Incorporación de alcanos a la célula .....	31
I.C.1.3.2. Oxidación de los alcanos .....	31
I.C.1.3.3. Activación de los ácidos grasos a sus ésteres de CoA .....	33
I.C.1.3.4. $\beta$ -oxidación de los acil-CoA's .....	33
I.C.1.3.5. Utilización del acetil-CoA .....	37
I.C.1.3.6. Enzimas inducibles en presencia de hidrocarburos o ácidos grasos .....	39
I.C.1.4. Lípidos de hongos .....	40
I.C.1.4.1. Significancia biológica de los lípidos .....	40
I.C.1.4.2. Composición lipídica de hongos .....	40
I.C.1.5. Compuestos orgánicos volátiles .....	43
<b>Objetivos</b> .....	46
<b>Capítulo II. Materiales y métodos</b> .....	48
II.1. Reactivos, drogas, solventes y accesorios utilizados .....	49
II.2. Organismos utilizados. Procedencia. Mantenimiento.....	49
II.3. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de los microorganismos .....	50
II.4. Métodos de esterilización .....	53
II.5. Crecimiento y desarrollo de los microorganismos fúngicos .....	53
II.6. Bioensayos .....	56

II.7. Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) del crecimiento del hongo sobre la cutícula del insecto .....	56
II.8. Germinación “in vitro” .....	57
II.9. Estudios bioquímicos y metabólicos de los hongos entomopatógenos .....	58
II.9.1. Extracción de los lípidos totales del hongo .....	58
II.9.2. Análisis de los lípidos totales del hongo por cromatografía en capa fina (TLC).....	58
II.9.3. Composición de ácidos grasos de los hongos .....	59
II.9.3.1. Derivatización de los ácidos grasos .....	59
II.9.3.2. Análisis por cromatografía gaseosa capilar (CGC) .....	60
II.9.3.3. Análisis por cromatografía gaseosa capilar acoplada a espectrometría de masa (CGC-MS) .....	61
II.9.4. Composición de los hidrocarburos de los hongos .....	62
II.9.4.1. Método de obtención de los hidrocarburos .....	62
II.9.4.2. Análisis por cromatografía gaseosa capilar (CGC) .....	62
II.9.4.3. Análisis por cromatografía gaseosa capilar acoplada a espectrometría de masa (CGC-MS) .....	64
II.9.5. Composición de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) de los hongos .....	64
II.9.5.1. Técnicas empleadas para el análisis de los VOC.....	64
II.9.5.2. Análisis de los VOC por SPME-cromatografía gaseosa capilar (CGC) .....	67
II.9.5.3. Análisis de los VOC por cromatografía gaseosa capilar acoplada a espectrometría de masa (CGC-MS) .....	68
II.9.6. Estudio del metabolismo lipídico de los hongos .....	69
II.9.6.1. Técnicas empleadas para la detección y cuantificación de la radiactividad incorporada en los lípidos fúngicos .....	69
II.9.6.2. Análisis de los lípidos totales por radio cromatografía en capa fina (radio-TLC)	70
II.9.6.3. Análisis de los [ <sup>3</sup> H] ácidos grasos por radio cromatografía líquida de alta resolución (radio-HPLC) .....	71
II.9.7. Análisis de los [ <sup>3</sup> H]-compuestos orgánicos volátiles ([ <sup>3</sup> H] –VOC) .....	72
II.9.7.1. Cuantificación de los [ <sup>3</sup> H]-VOC .....	72
II.9.7.2. Análisis de los [ <sup>3</sup> H]-VOC por radio-HPLC .....	72
II.9.8. Cuantificación de [ <sup>3</sup> H]-vapor de H <sub>2</sub> O producido por el hongo durante el metabolismo del hidrocarburo .....	72
II.9.9. Caracterización preliminar de la enzima catalasa .....	73
II.9.9.1. Fraccionamiento celular .....	73
II.9.9.2. Ensayos de la actividad enzimática .....	74
II.9.9.3. Determinación del contenido de proteínas .....	74
II.9.10. Análisis de la ultraestructura .....	75
<b>Capítulo III. Resultados</b> .....	<b>77</b>
III.A. Estudios sobre el crecimiento de los hongos entomopatógenos en distintas fuentes de carbono y el desarrollo de enfermedad en el insecto huésped .....	78
III.A.1. Crecimiento del hongo en distintas fuentes de carbono .....	78
III.A.2. Crecimiento de los hongos sobre la cutícula del insecto .....	82
III.A.3. Germinación “in vitro” .....	86
III.A.4. Bioensayos .....	88
III.A.4.1. Evolución de la enfermedad .....	88
III.A.4.2. Porcentaje y tiempo de mortalidad de los insectos .....	88
III.B. Estudios bioquímicos y metabólicos de hongos entomopatógenos crecidos en medio de cultivo con glucosa o con hidrocarburo como fuentes de carbono.....	93

---

III.B.1. Composición de lípidos totales .....	93
III.B.2. Análisis por CGC y CGC-MS de los ácidos grasos .....	95
III.B.3. Composición de hidrocarburos .....	101
III.B.4. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) .....	107
III.B.5. Metabolismo de lípidos .....	112
III.B.5.1. Incorporación de [ <sup>14</sup> C] acetato .....	112
III.B.5.2. Utilización de [ <sup>14</sup> C] <i>n</i> -hexadecano .....	115
III.B.5.3. Utilización de [ <sup>3</sup> H] <i>n</i> -octacosano .....	117
III.B.5.3.1. Incorporación de los productos de degradación de [ <sup>3</sup> H] <i>n</i> -octacosano en lípidos totales .....	117
III.B.5.3.2. Incorporación de los productos de degradación de [ <sup>3</sup> H] <i>n</i> -octacosano en ácidos grasos .....	122
III.B.5.3.3. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOC), productos de degradación del [ <sup>3</sup> H] <i>n</i> -octacosano .....	122
III.B.5.3.4. Cuantificación de [ <sup>3</sup> H]-vapor de H <sub>2</sub> O producido durante la degradación del [ <sup>3</sup> H] <i>n</i> -octacosano .....	124
III.B.6. Caracterización preliminar de la enzima catalasa .....	126
III.B.7. Ultraestructura de <i>Beauveria bassiana</i> crecida en medio de cultivo con glucosa o con hidrocarburos como fuente de carbono.....	128
<b>Capítulo IV. Discusión</b> .....	132
<b>Conclusiones</b> .....	158
<b>Bibliografía</b> .....	160

**RESUMEN**

Los hongos entomopatógenos son microorganismos enemigos naturales de insectos, que participan en la regulación biológica de los mismos. En la actualidad se han descrito aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos, incluidas en 100 géneros diferentes. Varias de estas especies, principalmente de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*, son producidas en distintos países como bioinsecticidas, para controlar insectos plaga del agro. En relación con el estudio de la enfermedad del Chagas, se han detectado en varios países, cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, patógenas a distintas especies de Triatomíneos. Estos hongos entomopatógenos presentan un gran potencial bioinsecticidas para controlar poblaciones de insectos vectores que habitan en zonas peridomiciliarias, donde no resulta factible la utilización de los insecticidas tradicionales. Estos microorganismos, que ingresan al insecto huésped a través de la superficie cuticular, poseen un gran potencial para el control de insectos hematófagos.

La enfermedad de Chagas en Argentina es transmitida principalmente por *Triatoma infestans*, un insecto vector hematófago (Reduviidae, Triatominae). Más de 20 millones de personas de personas se encuentran infectadas en América del Sur y Central con *Trypanosoma cruzi*, el protozoo responsable de la enfermedad. Esta enfermedad resulta del contacto hombre-vector a nivel domiciliario, y los factores de tal interacción surgen de elementos condicionantes de naturaleza socioeconómica y cultural. El control del insecto vector resulta un método directo para lograr una disminución en la transmisión de la enfermedad. El gran avance en el control de la misma de acuerdo a la Iniciativa del Cono Sur (en la que participaron la OMS, la OPS y los Ministerios de Salud de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), se basó en el control del vector con dosis masivas de insecticidas. Sin embargo, las intervenciones con insecticidas tradicionales para el control de transmisión vectorial de enfermedades, están potencialmente comprometidas por el desarrollo de resistencia y consideraciones ecológicas. Por lo tanto, es imperativo desarrollar técnicas de control de plagas de bajo impacto ecológico. Los progresos obtenidos en estos programas se deben al mejor conocimiento de la biología, ecología, y comportamiento de los insectos y organismos relacionados a ellos. En el INIBIOLP ha sido ampliamente estudiada la composición, estructura y función de los componentes lipídicos cuticulares de *T. infestans*. La superficie más externa de la cutícula del mismo está constituida por una mezcla

compleja de compuestos lipídicos no polares de largas y muy largas cadenas carbonadas principalmente hidrocarburos saturados lineales y ramificados de C27 a C33. La principal función de esta capa de lípidos es restringir la pérdida de agua, controlar la absorción de sustancias químicas, la actividad de microorganismos, y actuar en procesos de comunicación química. Considerando esta fracción como blanco de ataque, es posible afectarla:

- Por inhibición química de su síntesis.
- Por acción de microorganismos. En hongos unicelulares, como en bacterias, es conocida la capacidad de degradación de hidrocarburos, y la utilización de los mismos como fuente de carbono para su desarrollo. A partir de datos preliminares desarrollados en este laboratorio, se demostró la capacidad de hongos entomopatógenos de metabolizar eficientemente hidrocarburos y se inició este proyecto de tesis. El objetivo principal fue investigar las posibles rutas metabólicas de degradación y utilización de los hidrocarburos cuticulares de insecto por acción de distintos hongos entomopatógenos. Para ese fin se analizó la composición y metabolismo lipídico de estos hongos. En esta tesis se utilizaron cepas de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* crecidas en medios de cultivo conteniendo o bien glucosa como única fuente de carbono (hongo control), o hidrocarburos sintéticos análogos a los del insecto blanco (hongo adaptado). Se analizó la composición lipídica de las cepas crecidas en ambos sustratos. Las cepas control presentaron un predominio marcado de los esteroides sobre los fosfoacilglicéridos y ácidos grasos libres, mientras que las cepas adaptadas, mostraron un predominio de triacilglicéridos y fosfoacilglicéridos. En *B. bassiana* crecida en un medio de cultivo con glucosa, los ácidos grasos mayoritarios fueron el ácido palmítico, ácido oleico y ácido linoleico. La composición de ácidos grasos de los hongos incubados con un hidrocarburo de muy larga cadena, fue cuantitativamente diferente a la cepa control, con una disminución en el porcentaje del ácido linoleico y un incremento en los ácidos saturados palmítico, eicosanoico y heptadecanoico. Los hidrocarburos detectados en distintas cepas de *Beauveria* y *Metarhizium* correspondieron principalmente a una serie de alcanos lineales con un rango de 15 a 38 átomos de carbono, con una distribución homogénea de cadenas pares e impares. Los análisis de composición y estructurales de hidrocarburos y ácidos grasos se efectuaron por cromatografía gaseosa capilar (CGC) y por CGC acoplada a espectrometría de masa (MS).

El metabolismo lipídico de las distintas cepas de hongos crecidos en hidrocarburos análogos a los cuticulares, se analizó empleando trazadores radiactivos. Con técnicas cromatográficas con detección de radiactividad (radio-TLC, radio-HPLC) se identificaron los productos de degradación del hidrocarburo así como los compuestos lipídicos sintetizados a partir de los mismos. Cuando se incubaron los hongos en un medio de cultivo con [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano, se observó que *M. anisopliae* incorporó radiactividad en la fracción fosfolipídica, mayoritariamente en el ácido palmítico de la fosfatidiletanolamina. *B. bassiana* incubada en el mismo sustrato, en cambio, incorporó la radiactividad principalmente en la fracción de ácidos grasos libres (ácido palmítico, ácido oleico y ácido undecanoico). Los hongos incubados en [ $^{14}\text{C}$ ] *n*-hexadecano metabolizaron casi la totalidad del sustrato, y la marcación se detectó únicamente en los fosfoacilglicéridos. Los [ $^3\text{H}$ ] compuestos volátiles producidos por *B. bassiana* control y adaptada incubada con [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano se cuantificaron en un contador de centelleo líquido y se indentificaron por radio-HPLC. Se observó un incremento en la producción de [ $^3\text{H}$ ] acetato por la cepa adaptada con respecto a la cepa control. Los compuestos orgánicos volátiles (VOC) producidos por ambas cepas se analizaron por CGC y CGC-MS mediante muestreo del espacio de cabeza. Se detectaron principalmente acetato, etanol, decano, sesquiterpenos y derivados de alquilnaftalenos y alquilbencenos dependiendo de la fuente de carbono y de la metodología de extracción de los VOC utilizada (acidificación o microextracción en fase sólida, SPME).

La ruta propuesta para el catabolismo de *n*-alcanos, análoga a la descrita para levaduras, se iniciaría con una oxidación terminal catalizada por una citocromo-P450 microsomal. Sucesivas reacciones de oxidación originarían las moléculas de acil-CoA's, que vía  $\beta$ -oxidación en los peroxisomas proveen unidades de acetil-CoA indispensables para el metabolismo celular. Observaciones de la ultraestructura de las cepas fúngicas, demostraron una mayor cantidad de peroxisomas en los hongos adaptados, con respecto a los hongos control. La catalasa, enzima marcadora de peroxisomas, fue utilizada en este trabajo como parámetro bioquímico del proceso de  $\beta$ -oxidación. La actividad de esta enzima se cuantificó en homogenato y pellet de 20.000xg, empleando técnicas espectrofotométricas. Se observó un incremento significativo de la actividad en el homogenato de hongos crecidos en hidrocarburos de *T. infestans*, así como en los pellets 20.000xg de los hongos adaptados a crecer en hidrocarburos sintéticos. Finalmente se investigó el efecto de la adaptación del hongo y su potencial efecto bioinsecticida. Se observó una disminución significativa en el tiempo letal mediano

(TLM) de los insectos infectados con las cepas adaptadas y un incremento en el porcentaje de germinación de las mismas, con respecto a las cepas control.

Con el desarrollo de este trabajo de tesis se demostró que:

- los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* son capaces de metabolizar una variedad de hidrocarburos, similares a los componentes cuticulares del insecto modelo utilizado (*T. infestans*),

- los productos lipídicos de la oxidación de los hidrocarburos son utilizados por los hongos para la biosíntesis de sus estructuras celulares, así como para la producción de energía,

- los hongos adaptados a crecer en medios de cultivo con hidrocarburos de muy larga cadena similares a los HC cuticulares de *T. infestans* presentan:

- a) un incremento en la capacidad degradativa de los hidrocarburos,
- b) una modificación composicional en los patrones lipídicos de los hongos,
- c) una modificación en el patrón de los compuestos orgánicos volátiles liberados,
- d) un incremento en los productos volátiles de  $\beta$ -oxidación,
- e) un incremento en el número de peroxisomas, organelas donde ocurre la  $\beta$ -oxidación en hongos, en correspondencia con un aumento en la actividad de la catalasa, enzima marcadora de peroxisomas,
- f) un incremento en la capacidad bioinsecticida, manifestado en un aumento del porcentaje de germinación y una disminución del TLM.

Todas las evidencias indican una capacidad para la degradación y eficiente utilización metabólica de los hidrocarburos de muy largas cadenas carbonadas análogos a los constituyentes de la primer barrera de defensa del insecto huésped. Cuando la capacidad de degradación de hidrocarburos es aumentada o potenciada (adaptación), se produce un incremento de la virulencia del hongo, así como una destrucción de la barrera protectora del insecto contra los factores ambientales.

Los resultados de este trabajo aportan al conocimiento de los mecanismos de la interacción del hongo con la cutícula de su insecto huésped, y proporcionan información valiosa para alcanzar el objetivo final de contribuir al desarrollo de nuevas estrategias ecológicamente aceptables para el control de insectos plaga.

**SUMMARY**

Entomopathogenic fungi are microorganisms that are natural enemies of insects, which participate in their biological regulation. At present, approximately 700 entomopathogenic fungi species, included in almost 100 genera have been described. Several of these species, mainly of the genera *Beauveria* and *Metarhizium*, are produced as bioinsecticides in different countries to control a variety of agricultural pests. In relation to the study of Chagas disease, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* strains pathogenic to different species of Triatomins, have been detected in many countries. These entomopathogenic fungi provide a great bioinsecticide potential to control insect vector populations in peridomestic habitats, where the use of the traditional insecticides is not feasible. These microorganisms usually penetrate the insect through the cuticular surface, exhibiting a great potential for the control of hematophagous insects.

*Triatoma infestans*, an hematophagous insect (Reduviidae, Triatominae), is the main Chagas disease vector in Argentina. More than 20 million people in South and Central America are infected with *Trypanosoma cruzi*, the protozoan responsible for the disease. This disease results from the contact at the domiciliary level between the man and the vector, such interaction is mediated by conditioning elements of the socioeconomic and cultural environment. In order to achieve a decrease in the disease transmission, vector insect control is a direct method. The great success in such control, accordance with the South Cone Initiative (in which participated the OMS, OPS and the Health Ministries of Argentina, Bolivia, Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay) was based on the use of massive dose of insecticides. However, the interventions with traditional insecticides for the control of vectorial transmission of diseases are potentially jeopardized by resistance development and ecological considerations. Therefore, it is imperative to develop techniques for plague control with less ecological impact. Improvements obtained in these programs are due to a better knowledge in biology, ecology, and behavior of insects and organisms related to them. The composition, structure and function of the lipidic components of *T. infestans* cuticle have been extensively studied in the INIBIOLP. The outer most cuticular surface of *T. infestans* is constituted by a complex mixture of non-polar lipids formed by long and very long carbon chains, mainly straight and branched saturated hydrocarbons from C27 to C33. The mayor role of cuticular lipids is to restrict water loss, control chemicals

absorption, activity of microorganisms, and participate in chemical communication events.

Considering this fraction as a target, it is possible to affect it by:

- chemical inhibition of their synthesis.

- action of microorganisms. In unicellular fungi, also in bacteria, it is well known the ability to degrade hydrocarbons, and its utilization as carbon source for its own development. Preliminary data from this laboratory showed the capacity of entomopathogenic fungi to metabolize hydrocarbons efficiently, thereby starting this project. The main purpose was to investigate the potential metabolic pathways of degradation and utilization of the insect cuticular hydrocarbons by different entomopathogenic fungi. To this end, the lipid composition and metabolism of these fungi were analyzed. *Beauveria* and *Metarhizium* strains grown either in cultivation media containing glucose as the sole exogenous carbon source (control fungi), or synthetic hydrocarbons similar to those of the target insect (adapted fungi), were used in this work. The lipid composition of the strains grown in both substrates were analyzed. The control strains showed a marked prevalence of sterols over phosphoacylglycerides and free fatty acids, whereas the adapted strains showed predominantly triacylglycerides and phosphoacylglycerides. Palmitic, oleic and linoleic acid were the major fatty acids detected in *B. bassiana* grown in a cultivation media with glucose. The fatty acid composition of the fungi incubated with a very long hydrocarbon chain was quantitatively different to the control strain, with a decrease in the percentage of linoleic acid and an increase in palmitic, eicosanoic and heptadecanoic acids. The hydrocarbons detected in different strains of *Beauveria* and *Metarhizium* corresponded mainly to a series of straight alkanes in a range of 15 to 38 carbon atoms with an homogeneous distribution of even and odd chains. Composition and structural analyses of hydrocarbons and fatty acids were done using capillary gas chromatography (CGC) and CGC coupled to mass spectrometry (MS).

The lipid metabolism of the different fungal strains grown in insect-like hydrocarbons was analyzed using radioactive tracers. Using chromatography techniques with radioactivity detection (radio-TLC, radio-HPLC), the degradation products of the hydrocarbon, as well as the lipidic components synthesized from them, were identified. When fungi were incubated in a cultivation media with [<sup>3</sup>H] *n*-octacosane, *M. anisopliae* incorporated radioactivity in the phospholipid fraction, mainly in the palmitic acid of the phosphatidylethanolamine. However, *B. bassiana* incubated in the same substrate, incorporated the radioactivity mostly in the free fatty acid fraction (palmitic,

oleic and undecanoic acid). Fungi incubated with [<sup>14</sup>C] *n*-hexadecane fully metabolized the substrate, the radioactive labeling was only detected in the phosphoacylglycerides. Volatile [<sup>3</sup>H] compound produced by control and adapted *B. bassiana* incubated with [<sup>3</sup>H] *n*-octacosane were quantified in a liquid scintillation counter, and then identified by radio-HPLC analysis. An increment in the production of [<sup>3</sup>H] acetate by the adapted strain was observed compared to the control strain. The volatile organic compounds (VOC) produced by both strains were analyzed by headspace sampling and CGC and CGC-MS analysis. Depending on the source of carbon and the VOC extraction methodology used (acidification or solid phase microextraction, SPME), acetate, ethanol, decane, sesquiterpenes and alkylnaphthalenes and alkylbenzenes derivatives were mainly detected.

The proposed pathway for the *n*-alkanes catabolism, similar to the one described for yeasts, is probably initiated with a terminal oxidation catalyzed by a microsomal cytochrome-P450. Successive oxidation reactions will eventually provide the appropriate fatty acyl CoA for complete degradation to acetyl-CoA in the peroxisomes, the site of  $\beta$ -oxidation in fungi. Fungal ultrastructure analysis showed higher amounts of peroxisomes in the adapted fungi, compared with the control fungi. Catalase the peroxisome enzyme marker, was used in this work as biochemical parameter of the  $\beta$ -oxidation process. The activity of this enzyme was measured in homogenate and 20.000 xg pellet, using spectrophotometric techniques. A significant increase in the activity was observed in the homogenate of fungi grown in hydrocarbons of *T. infestans*, as well as in the 20.000xg pellets of the fungi adapted to grow in synthetic hydrocarbons. Finally, the effect of fungal adaptation and its potential bioinsecticidal effect were investigated. A significant decrease in the median lethal time of the insects infected with the adapted strains was observed, and also an increment in the percentage of its germination, compared with the control strains.

Within this thesis work it was demonstrated that:

- the entomopathogenic fungi, *B. bassiana* and *M. anisopliae*, are able to metabolize a variety of hydrocarbons, similar to the cuticular components of the insect model used herein (*T. infestans*),
- the lipidic products of hydrocarbon oxidation are used by the fungi for the biosynthesis of their cellular structures, as well as for energy production,
- when fungi is adapted to grow in cultivation media with very long chain hydrocarbons similar to the cuticular HC of *T. infestans*, the following observations can be outlined:

- a) an increase in the hydrocarbons degradation capacity,
- b) fungal lipid pattern varies quantitatively,
- c) a modification in the pattern of the volatile organic compounds released,
- d) an increase in the volatile products of  $\beta$ -oxidation,
- e) an increase in the peroxisome number, organelles where the  $\beta$ -oxidation occurs in fungi, in association with an increase in the activity of catalase, the peroxisome enzyme marker,
- f) an increase in the bioinsecticide capacity, as shown by an increase of the germination percentage and a decrease of the median lethal time (TLM).

All gathered evidences indicate the degradation ability and efficient metabolic utilization of the very long chain hydrocarbons analogous to the constituents of the first defense barrier of the host insects. When the hydrocarbon degradation capacity is increased or enhanced (adaptation), an increase in the virulence of the fungi occurs, as well as a destruction of the protection barrier of the insect against the environmental factors.

These findings are useful in order to gain in the understanding of the biochemical interaction between entomopathogenic fungi and the cuticle of its insect host. They provide valuable information to help achieve the long-term goal to develop ecologically friendly tools to control insect pests.

# Capítulo I

## Introducción

## **I.A. Los hongos entomopatógenos como herramientas de control de plagas**

### **I.A.1. Aspectos generales de los hongos**

Los hongos constituyen un grupo polifilético de organismos con una amplia variedad morfológica, en su comportamiento y en su ciclo de vida. Los hongos pueden definirse como organismos eucarióticos, aclorófilos, con nutrición heterófila y/o absorptiva, saprófitos, parásitos o simbioses y de distribución cosmopolita. Son organismos provistos de pared celular de quitina y/o celulosa, (al menos) en la fase de reproducción. El cuerpo fúngico se denomina talo o micelio, no presenta diferenciación de verdaderos tejidos ni órganos y es generalmente inmóvil, conformado por estructuras plasmodiales, ameboidales, pseudoameboidales, unicelulares o multicelulares filamentosas. El micelio puede ser septado o no septado, multinucleado con núcleos genéticamente idénticos (homocarióticos) o distintos (heterocarióticos), haploides, dicarióticos (con dos núcleos haploides diferentes), o diploides.

De acuerdo a su función, el micelio puede ser vegetativo o de fructificación. En la fase vegetativa, primera fase de desarrollo, crece con estructuras filamentosas llamadas hifas, células levaduriformes u otras unidades vegetativas. Este micelio vegetativo cumple con las funciones de nutrición, sostén, propagación y resistencia. En una segunda fase de desarrollo se origina el micelio de fructificación a partir del micelio vegetativo. Su función es generar hifas fértiles que producen células que intervienen en la reproducción sexual, asexual o parasexual del hongo.

La reproducción sexual se realiza en tres etapas: plasmogamia (unión de los protoplastos), cariogamia (fusión de los núcleos) y meiosis. La reproducción parasexual implica la formación de puentes de unión entre células o anastomosis entre hifas de diferentes talos que posibilita el intercambio de núcleos y la fusión entre núcleos genéticamente idénticos o diferentes. Estos núcleos diploides son muy inestables y raramente sufren meiosis, recuperando la dotación cromosómica haploide mediante la eliminación aleatoria de cromosomas.

La reproducción asexual puede ser por fragmentación del soma y crecimiento de un nuevo individuo a partir de cada fragmento; fisión de células somáticas en células hijas; gemación de células somáticas o esporas y producción de esporas o conidios. Estos últimos formarán un tubo germinal que dará origen a un nuevo micelio.

Los conidios son células que se generan en hifas especializadas denominadas conidióforos. Los conidióforos pueden formarse de hifas somáticas sin ninguna organización evidente o bien pueden organizarse en cuerpos fructíferos definidos (picnidio, acérvulo). Son estructuras sin movimiento propio que intervienen en la propagación de los hongos por aire, agua, animales, etc. Tienen un nivel metabólico bajo y se producen como respuesta primaria al deterioro físico y químico del ambiente. Presentan una pared celular cuya composición físico-química particular proporciona al protoplasma protección contra varios factores de stress ambiental como la radiación ultravioleta, desecación, lisis enzimática y compuestos tóxicos. Se compone principalmente de quitina, glucanos, proteínas y glicoproteínas (manoproteínas, galactomanoproteínas y xylomanoproteínas). La superficie de los conidios consiste en una capa rica en proteínas hidrofóbicas (Boucias et al. 1991a). Las hidrofobinas constituyen un grupo de estas proteínas, que incrementan la resistencia de los conidios a la desecación, e intervienen en los procesos de adhesión de las estructuras fúngicas a las superficies hidrofóbicas (Bidochka et al., 1995; Wösten, 2001).

Los blastosporos son células de composición similar a los conidios que se desarrollan en medios sumergidos (medios de cultivo líquido, hemocele de insectos), pero son de mayor tamaño, de pared celular más delgada y con menor resistencia y viabilidad que los conidios (Muller-Kogler y Samsinakova, 1970; Taborsky, 1992).

### **I.A.2. Clasificación taxonómica de hongos entomopatógenos**

Debido a la complejidad y heterogeneidad del grupo, existen diversos criterios de clasificación, basados principalmente en el tipo de reproducción y en las características fenotípicas. La siguiente clasificación fue propuesta por Alexopoulos (1996).

Reino FUNGI

Phylum CHYTRIDIOMYCOTA

Phylum ZYGOMYCOTA

Phylum ASCOMYCOTA

Phylum BASIDIOMYCOTA

Los hongos que se agrupan en estos phyla constituyen un grupo monofilético con reproducción sexual (estado teleomorfo) conocida. Los hongos de los cuales se

desconoce su fase sexual se incluyen dentro de un grupo artificial de hongos denominados imperfectos o mitospóricos: los Fungi Imperfecti (antes denominados Deuteromycetes). La mayoría de estos hongos contienen estructuras fúngicas similares a las descritas en el estado asexual (estado anamorfo) de los Ascomycetes, por lo que podrían considerarse pertenecientes a este grupo pero con una fase sexual que no ha evolucionado o que aún no ha sido descubierta.

Los hongos pueden ser:

- Unicelulares (levaduras)
- Filamentosos. Filamento es un término que se utiliza en botánica para designar organismos que tienen divisiones en un solo plano. Cuando este filamento se encuentra en un hongo se denomina hifa. Por ende los hongos que desarrollan hifas se denominan hongos filamentosos.

### **I.A.3. Relación patógeno-huésped**

Las asociaciones simbióticas entre el grupo de los insectos y los microorganismos son altamente frecuentes en la naturaleza. Los microorganismos pueden vivir una parte de su vida en asociación con organismos de otras especies. Se define como parásito a un organismo integrante de una asociación, que genera un daño y/o vive a expensas de otro organismo denominado huésped. Cuando el parásito crece y se multiplica en el interior o sobre el huésped, puede provocar enfermedad (alteración de las funciones normales) o muerte del mismo. En este último caso se denomina microorganismo patógeno. Existen especies patógenas obligadas o patógenas facultativas, que infectan sólo a huéspedes débiles o enfermos (Prescott et al., 1999).

La relación entre un organismo patógeno (hongo entomopatógeno) y su huésped (insecto), produce la enfermedad de este último. Para describir las características biológicas de la enfermedad se define (Alves, 1986; Lecuona, 1996; Shapiro-Ilan et al., 2005):

- Patogenicidad: es la potencial habilidad de un organismo para provocar una enfermedad. Es un término cualitativo que hace referencia a un concepto de todo o nada.
- Infección: es la penetración y multiplicación de un microorganismo en el insecto.

- Virulencia: se refiere a la intensidad o grado de la enfermedad; es decir que es un parámetro relativo y debe ser comparado entre distintas cepas sobre el mismo huésped. Es un término que cuantifica la patogenicidad. La virulencia se mide en base a la respuesta de un insecto frente a inóculos conocidos y es expresada como porcentaje de mortalidad, dosis letal media (LD50), dosis que produce la muerte del 50% de los insectos; o concentración letal media (LC50), concentración que provoca la muerte del 50% de los insectos. Sin embargo de acuerdo al método de aplicación empleado, por ejemplo por pulverización de la dieta, no puede determinarse con certeza la cantidad de patógenos en contacto con el insecto, y por lo tanto estos parámetros no pueden ser estrictamente evaluados en ese caso. El tiempo letal medio (TLM), es el tiempo en el cual se produce la muerte del 50% de los insectos a una dosis constante, y es el parámetro más utilizado en los ensayos a campo. Este parámetro puede ser afectado por cambios nutricionales, presencia de otros microorganismos, factores climáticos, infección del hongo a insectos de susceptibilidades diferentes e incluso por la multiplicación del mismo en medios de cultivo sintéticos (Lecuona, 1996).

La enfermedad puede ser epizootica cuando un gran número de insectos sufre una caída abrupta e inusual de su población en un período de tiempo corto; o enzoótica cuando las características de la enfermedad se repiten anualmente, con una baja incidencia, pero constante, sobre una determinada población.

El desarrollo de una enfermedad es un proceso dinámico en el cual las interacciones entre el patógeno, el huésped y el ambiente resultan en modificaciones morfológicas y fisiológicas del microorganismo y de su insecto huésped.

El curso de la enfermedad puede ser demostrado con una curva epizootica (Alves, 1998) que se divide en tres fases:

- Preepizootica con un número bajo de insectos parasitados debido a una baja eficiencia del inóculo.
- Epizootica con un gran número de insectos parasitados debido a la elevada multiplicación y diseminación de patógeno (porción culminante de la curva).
- Postepizootica con la disminución de la población debido a la gran mortalidad producida por el patógeno.

### I.A.3.1. Morfología, composición y función de la superficie del insecto huésped

El primer contacto que presentan la mayoría de los microorganismos entomopatógenos con su huésped es a través de la cutícula. Esta capa superficial del insecto cumple con las siguientes funciones principales: restringir la pérdida de agua, controlar la absorción de sustancias químicas, intervenir en procesos de comunicación química y actuar como barrera contra la actividad de microorganismos (Blomquist et al., 1987; Juárez, 1994a).

Estructuralmente la cutícula de los insectos presenta dos zonas, la epicutícula y la procutícula que constituyen a su vez las capas más externas del integumento (Fig. I.1). La epicutícula es la zona de contacto inicial del insecto con el hongo y por lo tanto la composición físico-química de la misma tiene un rol fundamental en el proceso de la infección. La epicutícula está constituida por un número variable de capas según la especie, que se denominan de afuera hacia adentro: cemento, capa cerosa o lipídica, cuticulina y epicutícula interna. La capa lipídica presenta principalmente compuestos de muy larga cadena (20 a >40 carbonos) y escasa reactividad como hidrocarburos, alcoholes grasos, ceras, glicéridos y ácidos grasos libres de muy variadas estructuras (Lockey, 1985, Lockey, 1988). Las capas más internas están constituidas por estructuras proteicas altamente tanificadas, sustancias fenólicas y componentes lipídicos comunes a las capas más externas (Wigglesworth, 1975). La procutícula, en cambio está compuesta principalmente por proteínas y quitina.

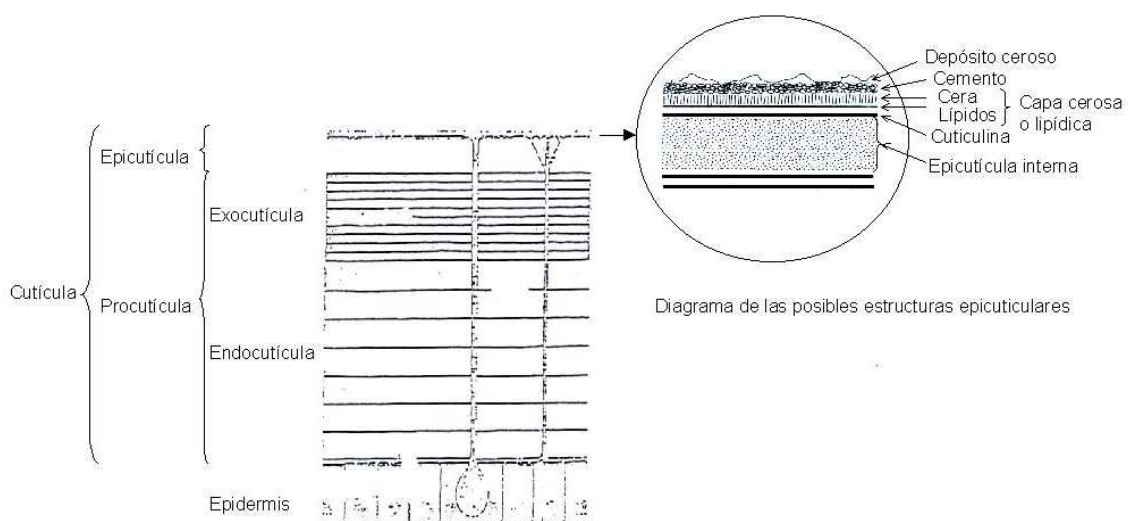


Fig. I.1. Esquema de la composición de las distintas zonas del integumento de insectos

El insecto huésped presenta en la faz externa de su tegumento esclerotizado, una porción o placa dorsal denominada tergo, una placa ventral denominada esterno, y un par de pleuras laterales. Éstas a su vez están sujetas a fragmentaciones secundarias que originan los escleritos denominados terguitos, esternitos o pleuritos. Entre estas zonas típicamente esclerotizadas existen membranas o líneas de suturas. Los insectos presentan además zonas membranosas de articulación entre los distintos segmentos denominadas membranas intersegmentarias. La morfología superficial de la cutícula es característica de cada especie y del estado de desarrollo del insecto.

### **I.A.3.2. Mecanismos de acción de hongos entomopatógenos**

A diferencia de los virus y bacterias entomopatógenas que ingresan a su huésped generalmente por vía digestiva, estos hongos actúan principalmente como insecticidas de contacto y deben atravesar la cutícula de su insecto huésped para lograr una colonización exitosa. En este caso, la cutícula provee un sustrato de adhesión y de nutrición, así como las señales químicas necesarias para la germinación del hongo y su posterior invasión al insecto blanco (Boucias y Pendland, 1991b; Hajek y St. Leger, 1994).

El ciclo de vida de los hongos entomopatógenos en un insecto huésped puede dividirse en las siguientes etapas (basado en Roberts y Humber, 1981 y Fargues, 1984) (Fig. I.2):

#### *1- Adsorción de los propágulos fúngicos a la superficie cuticular.*

Las condiciones ambientales favorables de temperatura y humedad, conjuntamente con una compatibilidad del conidio con la cutícula del insecto, pueden desencadenar el desarrollo de la enfermedad. Las características morfológicas y fisiológicas de la cutícula (que pueden generar un microclima especial y propicio para el crecimiento del hongo), así como las características de comportamiento del insecto (que puede refugiarse en sitios con temperatura y humedad favorables para el hongo), podrían considerarse mecanismos naturales de regulación de las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo óptimo del hongo en el huésped.

Los conidios constituyen el estado infectivo del hongo por ser las primeras estructuras fúngicas que entran en contacto con el insecto huésped. Pueden ser estructuras

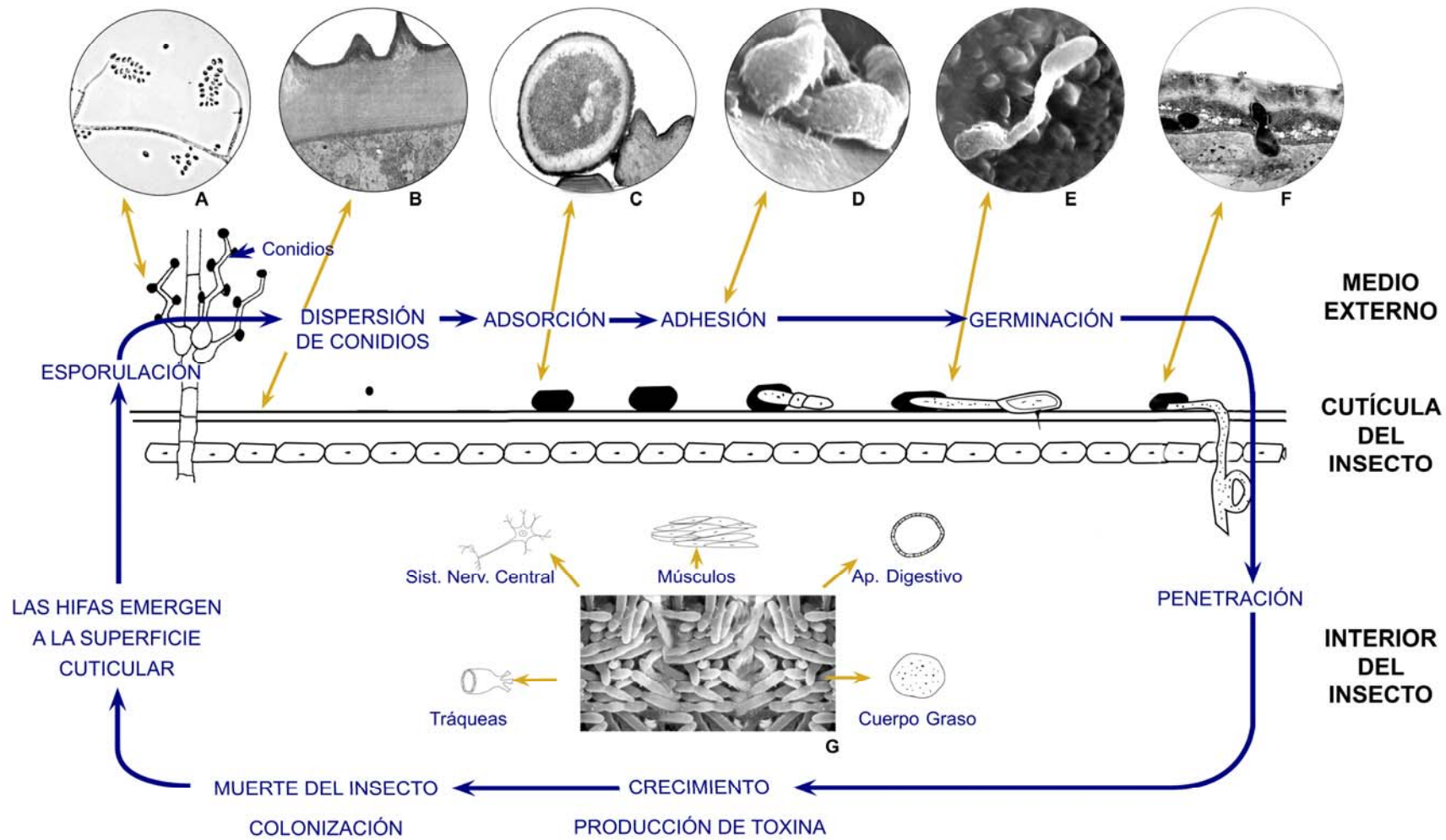


Figura I.2. Esquema del ciclo de vida de un hongo entomopatógeno y su relación con el huésped. A) Microfotografía de estructuras de *Beauveria bassiana*. Se observa el desarrollo de conidióforos y conidios. B) Sección de cutícula de insecto en estado larval. Se observa la cutícula como una gruesa capa acelular, y parte del tejido epidérmico subyacente. Fotografía de Boucias y Pendland, 1991b. C) Conidio adherido a la cutícula de su insecto huésped. Fotografía de Boucias y Pendland, 1991b. D) Microspía electrónica de barrido de conidios y tubos germinales adheridos a la superficie cuticular del insecto mediante secreciones fúngicas. Fotografía de Lecuona, 1989. E) Germinación de un conidio sobre la epicutícula de un insecto analizado por microspía electrónica de barrido. Fotografía de St. Leger et al., 1991. F) Sección del integumento de un insecto infectado con un hongo entomopatógeno. Se observa una hifa penetrando la cutícula y alcanzando el tejido epitelial. Fotografía de Boucias y Pendland, 1982. G) Microspía electrónica de barrido de hifas fúngicas en el hemocele del insecto infectado. Fotografía de Boucias y Pendland, 1991a.

hidrofóbicas o hidrofílicas, de acuerdo a la composición físicoquímica de su capa más externa (Boucias y Pendland, 1991b). Los conidios hidrofóbicos poseen una lámina externa de composición química aún no bien caracterizada formada por fascículos entrecruzados con estructuras en forma de bastones, con tamaños y disposición variables de acuerdo a la especie y a las condiciones de cultivo del hongo (Boucias y Latgé, 1988). Se han reportado proteínas hidrofóbicas en la pared celular de los conidios de varias especies de hongos filamentosos, denominadas hidrofobinas (Bidochka et al., 1995, Wösten, 2001, Paris et al., 2003). Esta composición particular de los conidios de algunos géneros como *Nomuraea*, *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*, genera uniones no covalentes del tipo hidrofóbicas con las capas lipídicas más superficiales no polares del insecto. Los conidios hidrofílicos no poseen una capa externa organizada y en muchos casos se caracterizan por poseer una capa mucilaginosa que protege al conidio contra la desecación y los compuestos tóxicos, conteniendo además sustancias de adhesión que pueden intervenir en los procesos de adsorción y/o adhesión del conidio a la cutícula de su huésped (Eilenberg et al., 1986, Latge et al., 1988). Los géneros *Conidiobolus*, *Entomophthora*, *Hirsutella* y *Verticillum* entre otros, son ejemplos de hongos entomopatógenos con conidios hidrofílicos.

La interacción inicial del conidio con la cutícula del insecto es un proceso pasivo que se produce por interacciones inespecíficas de carácter físico-químico, como son las interacciones hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno, etc (Boucias y Latgé, 1988)

## *2- Adhesión o consolidación de la interfase entre propágulos pregerminantes y la epicutícula*

Esta etapa implica la formación de envolturas o matrices de sustancias adhesivas mucilaginosas e hidrofóbicas secretadas por el hongo cuya composición no se conoce con exactitud, aunque se sugieren estructuras glucoproteicas y/o polisacáridos (Boucias y Pendland, 1991b); formación de microextensiones en las células fúngicas y modificaciones en la cutícula del huésped, producidas por el microorganismo. Las modificaciones más frecuentes implican la predigestión de la epicutícula por diversas enzimas como lipasas, N-acetylglucosaminidasa, proteasas y esterases que se localizan en gránulos en el extremo apical de los conidios previo a la formación del apresorio (Ratault y Vey, 1977, Fargues, 1984).

La adhesión es un proceso activo que requiere un estímulo específico del huésped (Fargues, 1984; Nielsen et al., 2000) y ocurre frecuentemente en las regiones intersegmentales, en las setas y/o espinas, o en las patas del insecto (Boucias et al., 1988, Sosa Gomez et al., 1997, Fernandez et al., 2001).

### 3- Germinación del hongo y crecimiento en la superficie cuticular del insecto

Cuando las condiciones de temperatura y humedad son apropiadas se produce un incremento del tamaño de los conidios con la aparición de una o varias evaginaciones que se prolongan generando estructuras hifales denominadas tubos germinales o germinativos a partir de los cuales pueden originarse a su vez, hifas laterales cortas y especializadas como órganos de fijación que se denominan apresorios. Estas estructuras proporcionan al hongo una sujeción mecánica frente a fuerzas opuestas generadas por las condiciones ambientales adversas, favoreciendo el inicio de la penetración (Müller y Loeffler, 1976). En la mayoría de los deuteromicetes patógenos ocurre la producción del apresorio conjuntamente con la secreción de sustancias viscosas mucilaginosas (Bidochka et al., 1997). La germinación y el crecimiento del hongo son etapas que generan estructuras de rápido desarrollo y gran colonización, pero muy vulnerables a los distintos factores de stress ambiental.

La germinación de los conidios es un evento crucial de la infección, por ser el primer paso en el ingreso del hongo al huésped. La disponibilidad de nutrientes en la cutícula del insecto, es uno de los factores principales que condiciona este proceso (St. Leger et al., 1994). Los hongos requieren de una fuente de carbono exógena como glucosa, N-acetylglucosamina, glucosamina, quitina, almidón y/o lípidos (Smith y Grula, 1981), y poseen diversas enzimas (quitinasas, proteasas, lipasas y esterases, entre otras) capaces de degradar estos compuestos (Ratault y Vey, 1977; Ferron, 1985; St. Leger et al., 1986a; St. Leger et al., 1986b; St. Leger et al., 1991).

Los componentes químicos de la cutícula del huésped, sin embargo, pueden favorecer o inhibir la germinación del microorganismo. Se ha reportado, por ejemplo, que fracciones epicuticulares de *Ostrinia nubilalis*, una de las mayores plagas de los cultivos de maíz en Europa, favorecen la germinación de cepas de *Beauveria* patógenas, e inhiben el crecimiento de hifas de cepas no patógenas (Lecuona et al., 1997). Los ácidos tetradecanoico y eicosanoico, por ejemplo, pueden producir una estimulación del crecimiento fúngico (Szafranek et al., 2001), o bien impedir la consolidación del

propágulo en la misma (Fargues, 1984, Boucias y Pendland, 1991b). Se ha reportado que ácidos grasos de cadenas cortas a medianas, como el ácido pentanoico, 2,4-hexadienoico y dodecanoico, pueden inhibir el crecimiento fúngico (Sosa-Gómez et al., 1997; Szafranek et al., 2001).

En cuanto a la influencia de la composición química del hongo en el proceso de germinación, se ha citado que los conidios hidrofóbicos al tomar contacto con una fuente de carbono o nitrógeno, muestran valores de germinación mayores que los conidios hidrofílicos (Boucias y Pendland, 1991).

#### *4- Penetración del hongo en el insecto huésped*

Los eventos tempranos de la infección fúngica, previos a la penetración, resultan cruciales para el hongo debido a los riesgos de deshidratación y fotodegradación a los que se encuentra expuesto en la superficie del insecto. Las hifas desarrolladas a partir de los conidios comienzan el proceso de penetración al insecto para alcanzar prontamente una mayor protección y sustrato alimenticio. La vía de entrada más frecuente de los hongos entomopatógenos al insecto, es a través de la cutícula, generalmente en zonas donde el integumento ofrece menor resistencia (regiones intersegmentarias, bases de los pelos y setas). Eventualmente los hongos pueden ingresar a través de orificios naturales, como cavidad bucal, espiráculos, orificio anal o sifonal (Tanada y Kaya, 1993), o bien heridas y sitios de ruptura de la cutícula. El mecanismo de penetración del hongo es generalmente una combinación de procesos físicos (presión mecánica del tubo germinal) y químicos (secreción de enzimas líticas). Asimismo las propiedades particulares de la cutícula del huésped, principalmente su espesor, grado de esclerotización y presencia de sustancias antifúngicas y/o disponibilidad de nutrientes, son factores importantes que pueden determinar la penetración del hongo (Charnley, 1984). En insectos con integumento delgado y escasamente esclerotizado como Homópteros y Lepidópteros, el tubo germinal penetra sin alteraciones importantes de su morfología (Tanada y Kaya, 1993), mientras que los tubos germinales forman estructuras más complejas, como apresorios, que secretan sustancias mucoides adherentes y enzimas líticas en cutículas esclerotizadas resistentes a la degradación (McCauley et al., 1968, Goettel et al., 1989, St. Leger et al., 1991, Tanada y Kaya, 1993).

Las hifas infectantes que provienen de un apresorio o de un tubo germinal, pueden formar un haustorio. Este último ingresa a las células del huésped formando hifas intracelulares, que absorben sustancias nutricias y las transportan hacia otras zonas del talo del hongo.

#### *5- Crecimiento del hongo en el hemocele*

En el interior del insecto los hongos se desarrollan generalmente como células de tipo levaduriforme, los blastosporos, que se multiplican rápidamente por gemación desarrollando protoplastos y estructuras ameboides sin pared celular. La ausencia de pared celular sería una estrategia adaptativa del hongo para evadir los mecanismos de defensa del insecto infectado. Se ha reportado que los hongos que carecen o enmascaran los componentes antigénicos propios de la pared celular, no desencadenan una reacción inmunitaria en el huésped (Perez Consuegra, 2004, Wang y St. Leger, 2006).

#### *6- Producción de toxinas fúngicas*

Las toxinas cumplen un rol importante en el modo de acción de los hongos entomopatógenos. Si bien estos compuestos no serían los responsables directos de la muerte del insecto, ésta ocurre más rápidamente cuando el hongo infectante produce grandes cantidades de toxinas. En estos casos, la toxemia conjuntamente con la deficiencia nutricional del insecto y con la destrucción de sus tejidos por la invasión y crecimiento del hongo en su interior, desencadenarían la muerte del mismo (Cañedo y Ames, 2004).

La mayoría de las toxinas fúngicas que se han descrito hasta el momento (Tabla I.1), son péptidos cíclicos de bajo peso molecular (Fig. I.3), con propiedades antibióticas, antifúngicas o insecticidas (Peeters et al., 1989, Strasser et al., 2000, Vey et al., 2001). Sin embargo se ha reportado recientemente una toxina de alto peso molecular (Bassiacridina) sintetizada por *Beauveria bassiana* (Quesada-Moraga y Vey, 2004).

Tabla I.1. Toxinas sintetizadas por distintos géneros de hongos patógenos de insectos.

Nombre de la toxina	Hongo que sintetiza la toxina	Referencia
Dextrusinas	<i>Metarhizium</i>	Roberts et al., 1992
Beauvericina, bassianolida, bassianinas, tenellinas, oosporeína, beauverolides, isarolides, bassiacridina	<i>Beauveria</i>	Quesada-Moraga y Vey, 2004
Ciclosporina, efraeptinas	<i>Tolyocladium</i>	Hoppert et al., 2001, Strasser et al., 2000
Leucinostatinas, Beauvericina	<i>Paecilomyces</i>	Mikami et al., 1984, Klaric y Pepeljnjak, 2005
Cordicepina	<i>Cordyceps</i>	Alves, 1986

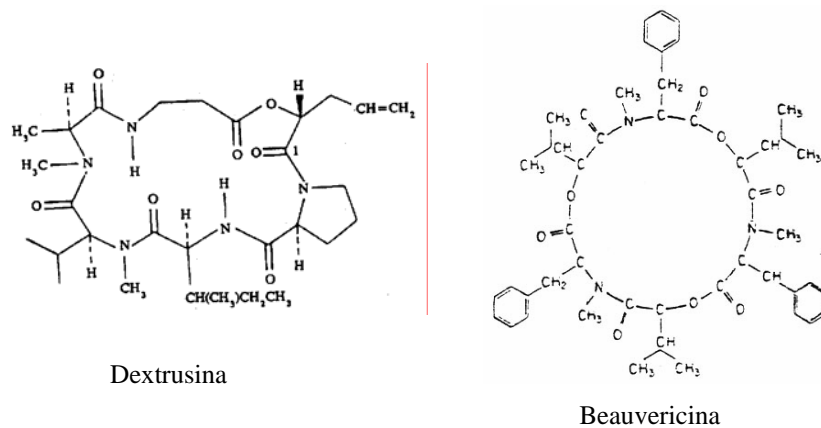


Fig. I.3. Estructura de dos toxinas sintetizadas por hongos entomopatógenos

### 7- Muerte del insecto, producción y dispersión de conidios

El desarrollo hifal en el interior del insecto es muy variable, ya que puede abarcar únicamente las zonas próximas al sitio de penetración o bien puede invadir completamente a su huésped (Ferron, 1985). El crecimiento de las hifas comienza en el hemocele y continúa avanzando hasta alcanzar los distintos órganos del insecto. Cuando el hongo invade el intestino, el insecto sufre parálisis con interrupción de la alimentación y pérdida de peso. Se producen además, cambios en el comportamiento,

tales como temblores, alteraciones en la coordinación, y una postura rígida y elevada. Luego deviene la muerte del insecto por deficiencias en la alimentación, invasión y destrucción de tejidos, e intoxicación con toxinas fúngicas (como se mencionó en ítem anterior). Con la muerte del insecto termina el desarrollo parasítico del hongo y empieza la fase saprofítica del mismo.

El crecimiento del hongo en el hemocele forma masas micelianas que producen la momificación del huésped (Ferron, 1985, Tanada y Kaya, 1993, Boucias y Pendland, 1998). Asimismo se produce un agotamiento de los nutrientes y por consiguiente una situación de stress alimenticio para el hongo, que sale al exterior del insecto fundamentalmente por las regiones intersegmentales o por aberturas naturales (espiráculos, boca y ano). Cuando las condiciones ambientales son favorables, se produce la esporulación del hongo sobre el cadáver generando esporas o conidios. Esta propiedad del hongo de generar estructuras de resistencia, permite mantener una fuente de microorganismos latentes que pueden permanecer sobre la materia orgánica del suelo o sobre los cadáveres de los insectos, con capacidad de reproducirse y renovarse de forma continua. La dispersión del patógeno puede ocurrir por varias vías: los micelios originados en los cadáveres pueden diseminarse en el suelo, o bien los conidios pueden ser dispersados por el viento, el agua, u otro mecanismo pasivo, e infectar a otros insectos cuando las condiciones de temperatura y humedad sean favorables. Asimismo los insectos infectados pueden desplazarse antes de morir trasladando el patógeno a distintas regiones (Cañedo y Ames, 2004).

#### **1.A.4. Control de insectos plaga**

Los mecanismos de control de insectos plaga en la actualidad, se basan mayoritariamente en el uso de pesticidas químicos tradicionales (carbamatos, piretroides) que son aplicados en grandes extensiones de terreno generalmente mediante métodos de dispersión aérea (Lomer et al., 1997). El uso inadecuado de estos compuestos químicos de elevada toxicidad, afectan a las zonas tratadas por las siguientes razones:

- Generan problemas en la salud humana (personal aplicador y consumidores).
- Se producen residuos tóxicos de difícil eliminación.

- Provocan desequilibrios ecológicos debido a que la inespecificidad del insecticida que produce la muerte de gran variedad de organismos, habiéndose reportado graves daños a la fauna benéfica (Woodbridge et al., 1995).
- Tienen una potencial generación de resistencia en insectos plagas.

El conocimiento del impacto que produce el uso de pesticidas químicos sobre el medio ambiente y la salud humana, así como la aparición de fenómenos de resistencia, ha motivado el desarrollo de estrategias que impliquen una reducción de la aplicación de estos compuestos. Si bien los compuestos químicos continúan siendo el mecanismo principal de control, las tendencias actuales se orientan al uso de biocidas con menor toxicidad. Los programas de manejo integrado de plagas (MIP) disminuyen el empleo de insecticidas tradicionales debido a la incorporación de microorganismos patógenos a los formulados comerciales. Se ha demostrado que los biopesticidas no producen residuos tóxicos, no afectan a insectos benéficos, su aplicación no es nociva para el hombre y son efectivos en el control de insectos que han desarrollado resistencia a pesticidas químicos (Harris y Dent, 2000). La mayoría de los biopesticidas emplean enemigos naturales de insectos plaga y se aplican en el área de la agricultura y horticultura. La importación de enemigos naturales es un recurso muy utilizado en la actualidad, pero los programas de control biológico se basan principalmente en la búsqueda de los enemigos naturales locales.

#### **I.A.4.1. Los hongos como agentes de control biológico**

Numerosos hongos son capaces de sobrevivir sobre insectos u otros invertebrados (ácaros, crustáceos y nematodos) y por ende son enemigos naturales con un gran potencial como biocontroladores de los mismos. Las principales ventajas de estos microorganismos son:

- Presentar un potencial epizootico importante ya que pueden dispersarse rápidamente a través de una población haciendo que ésta colapse en pocas semanas,
- Presentar grados variables de especificidad. Pueden infectar un amplio rango de insectos, de distintos órdenes o familias relacionadas, o bien pueden ser específicos de un grupo restringido de especies, e incluso de una única especie, sin afectar al resto de las poblaciones animales y vegetales (Boucias y Pendland, 1991b, Johnson et al., 1992, Tanada y Kaya, 1993, Goettel et al., 1995),

- Capacidad de colonizar un ecosistema, reproducirse y renovarse en forma continua y persistente si encuentran las condiciones ambientales adecuadas,
- Invadir el cuerpo de su huésped a través de su cutícula o exoesqueleto. A diferencia de las bacterias y virus entomopatógenos que ingresan por ingesta, los hongos presentan un gran potencial para controlar insectos chupadores y/o hematófagos,
- No contaminar el medio ambiente,
- No afectar la salud humana ni la de otros animales superiores.

La mayoría de los grupos taxonómicos de hongos presentan miembros entomopatógenos (Tabla I.2). Se han descrito aproximadamente 750 especies, incluidas en más de 100 géneros diferentes, que pertenecen principalmente al orden Entomophthorales del Phylum Zygomycota, así como al orden Hypocreales del Phylum Ascomycota (Roberts, 1989, Alves, 1986, Samson et al., 1993, Tanada y Kaya, 1993, Howard y Miller, 1996, Hajek, 1997, Bidochka y Small, 2005, Furlong y Pell, 2005, Rehner, 2005, Roy et al., 2006).

Tabla I.2. Hongos entomopatógenos de los grupos taxonómicos principales\*

Grupo taxonómico	Géneros de hongos entomopatógenos
Chitridiomycetes	<i>Coelomomyces, Coelomycidium, Myiophagus</i>
Oomycetes	<i>Couchia, Lagenidium, Leptolegnia, Pythium, Saprolegnia</i>
Zygomycetes	<i>Sporodiniella, Entomophaga, Entomophthora, Erynia, Eryniopsis, Furia, Massospora, Meristacrum, Neozygites, Batkoa, Strongwellsea, Pandora, Tarichium, Zoophthora, Conidiobolus</i>
Ascomycetes	<i>Cordyceps, Calonectria, Cordycepioideus, Torrubiella, Nectria, Hypocrella, Myriangium, Podonectria, Paecilomyces, Akanthomyces, Aschersonia, Engydontium, Gibellula, Hymenostilbe, Paraisaria, Polycephalomyces, Pseudogibellula, Sorosporella, Tolypocladium, Verticillium, Culicinomyces, Nomuraea, Hirsutella, Beauveria, Metarhizium, Lecanicillium, Cordycepioideus</i>
Basidiomycetes	<i>Filobasidiella, Septobasidium, Uredinella</i>
Fungi Imperfecti	<i>Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Pleurodesmospora, Sporothrix, Stilbella, Tetranacrium, Tilachlidium, Aegerita, Tetracrium, Cladosporium, Colletotrichum</i>

\*Tabla basada en Samson et al., 1993, Tanada y Kaya, 1993 y Alves, 1998, Hodge, 2003.

Las numerosas especies de insectos infectadas con hongos entomopatógenos, pertenecen principalmente a los órdenes Díptera, Coleóptera, Lepidóptera, Ortóptera, Hemíptera e Himenóptera (Roberts y Hajek, 1992, Rehner, 2005). La mayoría de estos insectos son perjudiciales para el hombre y se los agrupa en insectos plaga del agro e insectos plaga de interés sanitario. Si bien existen varias líneas de investigación con el objetivo de aplicar los hongos entomopatógenos al control biológico de estos insectos, en la actualidad se emplean principalmente como agentes de control de insectos plaga del agro (Roberts y Hajek, 1992; Estrada y López, 1997; Lomer, 2001). El mayor programa de biocontrol con micoinsecticidas se realizó en China donde se aplicaron cepas de *B. bassiana* para controlar un insecto fitófago, *Dendrolimus* sp., en aproximadamente un millón de hectáreas de bosques de pinos afectados por dicha plaga (Xu, 1988). En Brasil una plaga de la caña de azúcar, *Mahanarva posticata*, fue controlada durante más de diez años con cepas de *M. anisopliae* (Alves, 1986). En Cuba se emplean con mucho éxito *M. anisopliae* en el control de *Lissorhoptus brevisrostris* en cultivos de arroz, *B. bassiana* para *Cosmopolites sordidus*, y *Pachnaeus litus*, plagas de cultivos del plátano y cítricos respectivamente, así como *Verticillium lecanii* para reducir poblaciones de *Bemisia tabaci* en los cultivos de tomate y porotos (Fernández-Larrea Vega, 2001). Asimismo en EEUU, Australia, Inglaterra, Francia, Canadá, Corea y varios países de Africa (Proyecto LUBILOSA (Lutte Biologique contre les Locustes et Sauteriaux, [www.cgiar.org/iita/research/lubilosa/index.htm](http://www.cgiar.org/iita/research/lubilosa/index.htm)), se han implementado estrategias de control de saltamontes, langostas, grillos, moscas blancas, áfidos, trips y ácaros, en cultivos ornamentales de alfalfa, pastos, maíz y papa, entre otros, basados en distintas especies de hongos entomopatógenos, con resultados altamente satisfactorios (Lomer et al., 1997, Jenkins et al., 1998).

En Argentina se están desarrollando formulados comerciales para el control de algunas especies de insectos (mosca doméstica, cucarachas), y hay numerosos estudios realizados con el objetivo de utilizar micoinsecticidas como estrategia de control de insectos plagas del agro y de interés sanitario (López Lastra, 1999; Lecuona et al., 2001; Dal Bello et al., 2001; López Lastra y Scorsetti, 2002; Luz et al., 2004; Lecuona et al., 2005). Sin embargo estos métodos de control no están incorporados a los planes actuales de regulación de poblaciones consideradas plagas y los insecticidas químicos continúan siendo la herramienta principal de control en la actualidad. Si bien estos productos de origen biológico están empezando a asumir un papel importante en el campo de la agricultura sostenible, la implementación de los mismos resulta un proceso

lento. El mayor obstáculo que presenta el uso de estos microorganismos como biocontroladores, es su elevada susceptibilidad a los factores ambientales como la luz UV, la temperatura y la humedad, que restringen la supervivencia prolongada de los conidios en el medio ambiente. Actualmente se están desarrollando y optimizando diversos medios de vehiculización y conservación de los conidios con formulados en base a aceites minerales y vegetales, o bien utilizando medios líquidos con emulsionantes (Bateman, 1998, Monzón, 2001) que garanticen la estabilidad y viabilidad del producto (Moore et al.1995).

#### *Aplicación a gran escala de microorganismos*

El cultivo de los microorganismos en placas se utiliza para estudios de laboratorio, estandarización de condiciones de crecimiento, ensayos preliminares o pruebas pilotos de producción industrial. La aplicación a gran escala de los hongos entomopatógenos en sistemas naturales implica una producción masiva de estructuras fúngicas que sean resistentes a diversos factores abióticos (temperatura, humedad, UV) y bióticos (otros microorganismos). Hasta el momento los hongos entomopatógenos se producen en medio líquido o en medio sólido utilizando distintas variedades de granos como sustrato nutritivo. El medio sólido resulta más ventajoso por sus bajos costos de producción, alto rendimiento, y por generar estructuras fúngicas de mayor resistencia (conidios) que las desarrolladas en los medios de cultivo líquido (blastosporos). Los conidios son las estructuras de resistencia y dispersión más utilizadas para ser aplicadas a campo aunque también se han realizado algunos ensayos con blastosporos y micelio deshidratado (Pereira y Roberts, 1990; Feng et al., 1994, Arcas et al., 1999).

La conservación del hongo y el mejoramiento genético de las cepas virulentas previamente seleccionadas, son dos mecanismos fundamentales para lograr un incremento de su potencial bioinsecticida. La conservación es un componente crítico ya que requiere medios de vehiculización que permitan una dispersión y viabilidad del hongo en condiciones ambientales adversas. En la actualidad estos inconvenientes están siendo sorteados mediante la preparación de formulados fúngicos. La formulación es el proceso por el cual el ingrediente activo (conidios, hifas o blastosporos) se combina con materiales inertes tales como aceites, solventes, emulsificantes y otros aditivos, que protegen al hongo en el momento de la aplicación, evitan su sedimentación (garantizando una mezcla homogénea necesaria para una buena aplicación y

distribución) y ayudan a aumentar su viabilidad en el medio ambiente (Aud, 1991; Prior et al., 1995). Los formulados mayormente utilizados consisten en suspensiones de conidios en aceites de origen mineral o vegetal, o en medios acuosos con sustancias emulsificantes (Feng et al., 1994). Los formulados en aceites son muy eficientes en la protección de las estructuras fúngicas, pero muchos grupos de hongos entomopatógenos poseen conidios hidrofílicos (como se describió en el ítem I.A.3.2) con una solubilidad incompatible con un sustrato aceitoso. La hidrofobicidad de los conidios de varios hongos, en cambio, es una propiedad que resulta muy ventajosa para lograr estos formulados.

Varias cepas de *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *M. flavoviride*, son frecuentemente producidas a gran escala, en distintos lugares del mundo (Feng et al., 1994, Jenkins y Goettel, 1997, Burges, 1998, Butt y Copping, 2000).

#### **I.A.4.2 *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae***

##### **I.A.4.2.a Clasificación taxonómica**

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Género	<i>Beauveria</i> <i>Metarhizium</i>
Especie	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>

Basada en Hodge, 2003.

##### **I.A.4.2.b. Caracteres generales**

*B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *M. anisopliae* (Sorokin), son especies que se encuentran habitualmente en el suelo. Poseen características especiales que les permiten sobrevivir en forma saprofítica sobre material orgánico en descomposición, o bien sobre

seres vivos. Estos hongos pueden ser parásito o patógenos oportunista de ácaros, crustáceos e insectos. El micelio de ambas cepas es ramificado y septado con conidiogénesis acrópeta (el conidio más joven en posición apical) en *B. bassiana* y basípeta (el conidio más joven próximo a la célula conidiogénica) en *M. anisopliae*. Los conidióforos de *B. bassiana* producen células conidiogénicas con una parte basal globosa que genera un eje de crecimiento en zig-zag con los conidios ubicados en los vértices (Fig. I.4.A). *M. anisopliae* posee conidióforos simples o empaquetados sobre una masa de estroma fúngico con aspecto de almohadilla o candelabro, células conidiogénicas cilíndricas y conidios en columnas (Fig. I.4.B). Los conidios pueden ser esféricos o cilíndricos, hialinos, no pigmentados y miden entre  $1\mu$  y  $5\mu$  (microconidios) (Samson et al., 1993, Hodge, 2003). Estos hongos son fácilmente cultivados en el laboratorio debido a su desarrollo miceliano, así como la producción de conidióforos y de conidios. Las condiciones favorables para la formación de esporas son generalmente distintas y más restringidas que aquellas que controlan el crecimiento miceliano (Jenkins y Goettel, 1997). Por ejemplo, la calidad y concentración de los nutrientes que favorecen la esporulación son muy específicos. En el caso de *B. bassiana* los valores máximos de esporulación se obtienen con el agregado de glucosa, aceites vegetales y glutamina, lisina o serina al medio de cultivo. Sin embargo, el crecimiento microbiano puede lograrse en medios de cultivo sintéticos, líquidos o sólidos, que contienen como fuentes nutritivas, únicamente dextrosa, nitratos y macrominerales (Taborsky, 1992, Cañedo y Ames, 2004). Asimismo períodos con ausencia o disminución en la disponibilidad de nutrientes, pueden estimular la esporulación.

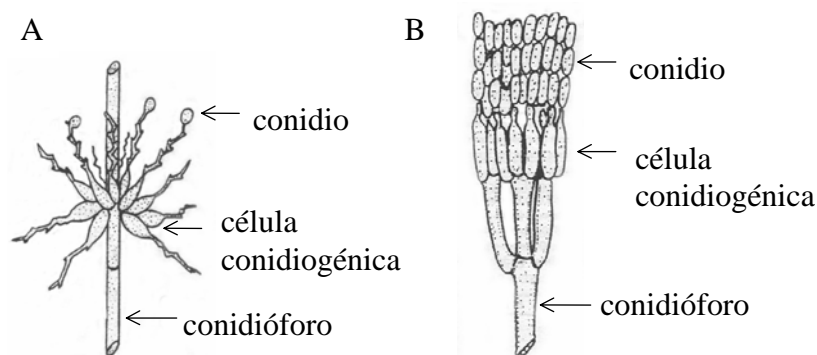


Fig. I.4. Esquema de los hongos *Beauveria bassiana* (A) y *Metarhizium anisopliae* (B)

El crecimiento del hongo es variable de acuerdo al medio de cultivo y a los nutrientes utilizados. En un medio de cultivo líquido (crecimiento sumergido) desarrollan principalmente conglomerados hifales y blastosporos (Latgé y Moletta, 1988). En el medio de cultivo sólido, agar o granos de cereales, se desarrollan agregados hifales y sobre la superficie de los mismos, se genera una población homogénea de conidios (células vegetativas). En medios de cultivo con agar, *B. bassiana* desarrolla colonias blancas y algodonosas en forma rampante que pueden presentar un pigmento amarillo-anaranjado en el reverso de las colonias maduras. *M. anisopliae* en cambio, desarrolla colonias verdosas. Cuando los hongos crecen sobre insectos u otros organismos vivos, desarrollan colonias que emergen de sus huéspedes generando manojos hifales aéreos y polvorientos. Estas estructuras cubren completamente, a manera de manto verde y/o blanco a sus huéspedes, por lo que se denominan frecuentemente muscardina verde (*M. anisopliae*) y muscardina blanca (*B. bassiana*).

#### **1.A.4.2.c. Capacidad insecticida de *B. bassiana* y *M. anisopliae***

*B. bassiana* y *M. anisopliae* son enemigos naturales de varias especies de artrópodos (insectos y ácaros) tanto en sus estadios larvarios como en el adulto, presentando una lista extensa de hospederos que incluye a moscas blancas, áfidos, saltamontes, termitas, escarabajos, gorgojos, chinches, hormigas y mariposas. Aprovechando esta propiedad bioinsecticida, así como la fácil disponibilidad y desarrollo de estos hongos en el laboratorio, *B. bassiana* y *M. anisopliae* son utilizadas como micoinsecticidas en distintas regiones del mundo.

En 1835 el científico italiano Agostino Bassi de Lodi demostró que los hongos eran causantes de enfermedades en larvas de insectos y *Beauveria bassiana* (denominación otorgada en honor a su descubridor), fue el primer microorganismo reconocido como agente patógeno contagioso en animales pero no en el hombre. Actualmente existen varias empresas comerciales que están desarrollando formulados insecticidas con estos microorganismos. Las especies o cepas de hongos patógenos obligados, son los que preferentemente se utilizan como herramientas de control de los insectos perjudiciales para el hombre (Roberts y Hajek, 1992). Asimismo *B. bassiana* y *M. anisopliae* no sólo presentan una considerable variación en su rango de hospederos, sino también exhiben variaciones en cuanto a su virulencia y patogenicidad. Distintas especies de hongos y

aún distintas cepas de una misma especie pueden ser más o menos virulentas para un huésped determinado (Bateman et al., 1996, Lecuona et al., 2001).

## **I.B.- *Triatoma infestans*: vector de la enfermedad de Chagas**

### **I.B.1 Problemática de la enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas (Trypanosomiasis americana) constituye un grave problema médico social en la mayoría de los países de Latinoamérica, con una población de 20 millones de personas infectadas (WHO, 1997). En Argentina el área de infección chagásica incluye todo el territorio desde el norte del país hasta la provincia de Chubut, pero las regiones más afectadas son principalmente las provincias del noroeste y centro del país con clima cálido o templado y seco (Formosa, Chaco, Santiago del Estero, La Rioja, San Juan y Córdoba). Datos recientes reportan un incremento en el número de personas infectadas, principalmente niños, en la región noroeste del país (Gürtler et al, 2005).

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi*, un protozoo flagelado de muy difícil eliminación en el paciente debido a la complejidad de sus mecanismos de evasión inmunitaria (Palau, 2000). Los estudios sobre el *T. cruzi* para lograr un control de la enfermedad son muy numerosos y el aporte científico más reciente ha sido la determinación del genoma completo del parásito (El-Sayed et al., 2005). Sin embargo, no existe ninguna vacuna o tratamiento efectivo para esta tripanosomiasis. Esta enfermedad se presenta en humanos con manifestaciones clínicas de gravedad variable y se caracteriza por anemia, edema en los párpados y afecciones cardíacas. Es una de las parasitosis de mayor morbilidad, especialmente en personas de bajo nivel económico que viven en áreas rurales, cuyas viviendas facilitan la domiciliación del insecto transmisor de la infección. Los reservorios de tripanosomas pueden ser, además del hombre, animales domésticos (perro, gato, cabra) y silvestres (comadreja, armadillos, ratas, murciélagos).

Los vectores de este parásito son insectos hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, tribus Triatomini y Rhodniini. Estos insectos se encuentran en distintos hábitats: domiciliario, peridomiciliario (que abarca construcciones precarias próximas al domicilio, por ejemplo corrales de animales domésticos), o silvestre (campo, selva, desierto). El principal triatomino vector de la enfermedad en nuestra región, es *Triatoma infestans*. Los métodos de control del mismo se han basado principalmente en el uso de insecticidas químicos. Éstos han demostrado ser eficientes en el control de insectos domiciliarios, pero no es un método aplicable a la región del

peridomicilio. Esta zona es el blanco actual de todos los programas de control integral del vector, dado que constituye el refugio natural para poblaciones remanentes luego de la aplicación de insecticidas en las viviendas, así como para las poblaciones silvestres en proceso de domiciliación, y para las especies secundarias de hábito antropófilo y/o zoófilo. La necesidad de alternativas a los pesticidas químicos tradicionales para emplear en el peridomicilio, así como en el control de poblaciones resistentes (Picollo et al., 2005) es clara y evidente. Tecnologías basadas en el control biológico, control natural, mejoramiento de viviendas, prácticas culturales adecuadas, y otras medidas terapéuticas de bajo impacto ambiental, podrían ser ampliamente utilizadas.

### **I.B.2. Composición química de la cutícula de *Triatoma infestans***

La primer barrera a la penetración de insecticidas de contacto, químicos o biológicos, es la cutícula del insecto blanco. La composición, estructura y funciones de los componentes lipídicos cuticulares de *T. infestans* han sido ampliamente estudiadas en el INBIOLP (Juárez et al., 1984, Juárez y Brenner, 1985, Juárez y Blomquist, 1993). Como se describió previamente, en la epicutícula predominan compuestos no polares de muy larga cadena y escasa reactividad: hidrocarburos, alcoholes grasos, ceras, glicéridos y ácidos grasos libres de muy variadas estructuras. Los hidrocarburos mayoritarios son mezclas complejas de cadenas lineales o metil ramificados de 17 a más de 41 átomos de carbono. Los HC lineales son en su mayoría de número impar de átomos de carbono, y predominan los HC de C27 a C33, siendo el n-nonacosano (*n*-C29) y el n-hentriacontano (*n*-C31) los componentes mayoritarios. Se han detectado también monometil, dimetil, trimetil alcanos (Juárez y Blomquist, 1993). La fracción de hidrocarburos epicuticulares, puede ser considerada como blanco de ataque pudiendo afectarla por inhibición química de su síntesis (Juárez, 1994a, Juárez, 1995) o por acción de microorganismos. En cuanto a la morfología observada por microscopía electrónica de barrido, la superficie cuticular de *T. infestans* presenta un patrón estrellado o romboidal con gran cantidad de pelos, poros y depósitos cerosos (Fig. I.5).

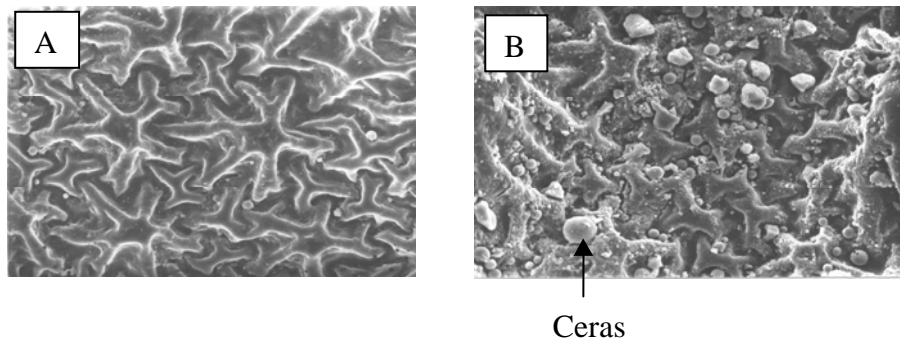


Fig. I.5. Microscopía electrónica de barrido de la superficie cuticular de una ninfa de *Triatoma infestans*. Se observa el patrón estrellado de la superficie abdominal dorsal (A), y los depósitos de ceras cuticulares (B). Fotografías cedidas por la Dra Patricia Juárez.

### I.B.3. Control de vectores

El control de los vectores de enfermedades es una herramienta fundamental para evitar la propagación de los microorganismos patógenos de difícil erradicación en el paciente. El gran avance en el control de la enfermedad de Chagas en Sudamérica (Iniciativa del Cono Sur: OMS, OPS y Ministerios de Salud de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), se basó en la aplicación de dosis masivas de insecticidas químicos principalmente en la región domiciliaria. En Argentina, se han utilizado insecticidas desde la década del 60, con resultados eficientes para la eliminación del insecto en domicilio. Sin embargo, se han detectado recientemente focos con muy elevados niveles de resistencia. Las zonas afectadas son Bolivia y norte y sur de la provincia de Salta (Vassena et al., 2005, Zerba, 2005). Asimismo, experiencias preliminares (en este laboratorio) indican que el aumento en los niveles de resistencia se correlaciona con un incremento en la cantidad de hidrocarburos cuticulares (Juárez et al., no publicado). En las áreas de peridomicilio, no existen aún herramientas efectivas de control, ya que la efectividad y conveniencia de las aplicaciones químicas en estas áreas es muy reducida. Estas zonas son de vital importancia en el control, dado que la eficacia de un tratamiento domiciliar se puede ver significativamente reducida por reinvasión desde el peridomicilio. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas técnicas, métodos o productos para el tratamiento, principalmente del peridomicilio, es perentoria.

Los hongos entomopatógenos presentan un gran potencial como biocontroladores de estos insectos vectores de enfermedades, aunque su uso no se encuentra aún

implementado. El primer trabajo que ha demostrado su eficacia para el control en domicilio de insectos de interés sanitario, como los mosquitos *Anopheles*, vectores de malaria, ha sido recientemente publicado (Enserink, 2005, Scholte et al., 2005). En otras enfermedades tropicales, principalmente la tripanosomiasis africana y americana, hay reducidos ejemplos de insectos vectores considerados como blanco de ataque de microorganismos fúngicos (Kaaya y Munyinyi, 1995). La mayoría de los estudios sobre su aplicación para el control de los vectores americanos se realizaron en el triatomo *Rhodnius prolixus*, y se basan principalmente en la detección de cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* patógenas de triatomos (Silva y Messias, 1985, Romaña y Fargues, 1987, Luz et al., 1998, Luz et al., 2003), y en el análisis de susceptibilidad de los mismos a las distintas cepas fúngicas. A partir de estos estudios se ha demostrado la gran susceptibilidad de triatomos a estos microorganismos, por lo que presentan un gran potencial bioinsecticida para controlar *T. infestans* (Romaña y Fargues, 1992, Luz et al., 1999, Lecuona et al., 2001). Recientemente se reportó la primera cepa de *B. bassiana* aislada de una infección natural de *T. infestans* (Marti et al., 2004). A su vez, la producción de estos microorganismos es económica, ofrecen buenas posibilidades para ser usados en formulaciones oleosas, y pueden ser pulverizados en ultra bajo volumen en aplicaciones aéreas (Luna Rodríguez y Lecuona, 2002). A pesar de todos estos aspectos, no hay aún disponible un formulado bioinsecticida que contribuya a disminuir la densidad poblacional de triatomos. Asimismo no hay antecedentes de estudios bioquímicos aplicados al desarrollo de estrategias de control de los mismos.

## **I.C.- Bioquímica de microorganismos**

### **I.C.1. Aspectos generales del metabolismo en hongos**

Los procesos metabólicos que ocurren en los hongos y que se corresponden con los de otras células eucarióticas constituyen el denominado metabolismo primario. Éste comprende el conjunto de vías catabólicas (degradación de macromoléculas para obtener moléculas simples con liberación de energía), y las vías anabólicas (síntesis de moléculas complejas con utilización de energía). Sin embargo, cuando los aportes de sustrato se hacen limitantes, o los efectos ambientales perturban la función normal de las rutas metabólicas primarias, se activan las rutas metabólicas secundarias. Por lo tanto, los productos metabólicos de los microorganismos se clasifican usualmente como metabolitos primarios y secundarios. Los primarios están generalmente involucrados en la fase activa de crecimiento, mientras que los secundarios se acumulan durante el período posterior a dicha fase. No poseen funciones directas sobre el crecimiento del hongo pero se suponen de importancia para la supervivencia del mismo. Estos metabolitos secundarios tienen una gran diversidad estructural y son producidos específicamente por varios grupos taxonómicos de hongos (Müller y Loeffler, 1976, Jelen y Wasowicz, 1998, Prescott et al., 1999).

#### **I.C.1.1. Requerimientos nutricionales**

Los hongos presentan un crecimiento óptimo en condiciones ambientales particulares (oscuridad, alto porcentaje de humedad) y con disponibilidad de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Generalmente secretan exoenzimas hidrolíticas para digerir las sustancias exógenas y absorber los productos solubles (Prescott et al., 1999). Los requerimientos nutricionales son variables de acuerdo a las exigencias alimenticias de cada especie, pero en general son capaces de desarrollarse en presencia de los siguientes compuestos exógenos:

- Nitrógeno: la mayoría de los hongos son capaces de utilizar sales de amonio, en especial sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno. Algunos hongos pueden utilizar también nitratos o nitrógeno inorgánico.
- Azufre: este elemento es absorbido generalmente en forma de sulfato.

- Fósforo: es un factor de crecimiento esencial para muchos hongos e incorporado generalmente como fosfato.
- Factores de crecimiento: algunos hongos necesitan incorporar inositol, ácido pantoteico, vitamina B6, biotina y tiamina.
- Otras moléculas esenciales para algunos hongos son: el potasio, magnesio, calcio, cobre, manganeso, molibdeno y zinc.
- Carbono: los compuestos carbonados que pueden utilizar los hongos como fuentes de energía son: hidratos de carbono o lípidos. Estos compuestos pueden ser de origen exógeno o endógeno.
  - Hidratos de carbono: la glucosa constituye la principal fuente de carbono, pero pueden utilizar además dextrosa y maltosa (Taborsky, 1992). El glucógeno es el principal componente de reserva endógena de glucosa. Otros componentes frecuentes son los polioles, la trehalosa y raramente el almidón.
  - Lípidos: los hongos no requieren usualmente de lípidos exógenos para su desarrollo, sin embargo pueden utilizar los ácidos grasos e hidrocarburos como fuentes de carbono alternativas.

### I.C.1.2. Utilización de la glucosa

La glucosa puede ser catabolizada mediante tres vías metabólicas diferentes (Fig. I.6): glucólisis, vía de las pentosas fosfato, y la ruta de Entner-Doudoroff. En todos los casos el ácido pirúvico o piruvato, es un producto metabólico. La oxidación del piruvato por un complejo enzimático produce una molécula de acetyl-CoA.

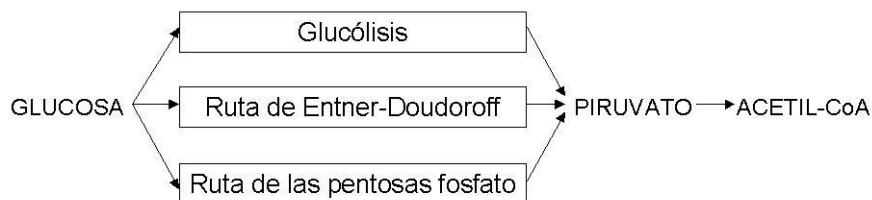


Fig. I.6. Esquema de las posibles vías metabólicas de degradación de la glucosa.

Algunos hongos (*Aspergillus* y *Penicillium*) poseen glucosa oxidasas que, en condiciones aeróbicas, catalizan la oxidación de la glucosa generando ácido glucónico o gluconato (Fig. I.7). Durante la reacción se produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un compuesto oxidativo y tóxico, que es degradado enzimáticamente por la catalasa (Müller y Loeffler, 1976). El gluconato es también un componente nocivo para la célula por lo que se secreta o se metaboliza al ingresar en la vía de las pentosas fosfato.

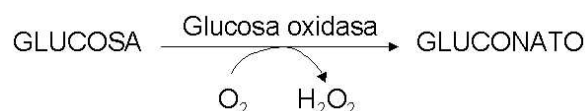


Fig. I.7. Esquema de la vía de oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa

En condiciones anaeróbicas los hongos realizan generalmente procesos de fermentación alcohólica, generando alcohol etílico a partir del piruvato (Prescott et al., 1999, Nelson y Cox, 2004).

### I.C.1.3. Utilización de hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos químicos de gran diversidad que incluyen desde hidrocarburos saturados (alcanos) e insaturados (alquenos, alquinos), hasta complejos compuestos policíclicos aromáticos. La capacidad de los microorganismos de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono ha sido reportada desde el año 1950 (Zobell, 1950), y ampliamente estudiada desde entonces con fines biotecnológicos para la producción de compuestos de utilidad para el hombre (proteínas, ácidos dicarboxílicos, polioles) (Tanaka y Fukui, 1989, Lindley, 1992), y de biorremediación (biodegradación de los hidrocarburos del petróleo, los contaminantes más ampliamente dispersos en el medio ambiente) (Leahy y Colwell, 1990, Neujahr, 1990, Whyte et al., 1998, Margesin et al. 2000, Romero et al., 2000, Bachoon et al., 2001, Romero et al. 2002, Barathi y Vasudevan, 2003, Margesin et al., 2003, Roling et al., 2003, Mishra et al., 2004, Cubitto et al., 2004). Sin embargo los estudios bioquímicos se han realizado principalmente en bacterias y levaduras crecidos en hidrocarburos aromáticos y alifáticos de cadenas medianas a largas C10-C20 (Osumi et al., 1974, Finnerty, 1990, Sorkhoh et al., 1990, Ueda y Tanaka, 1990, Whyte et al., 2002). Asimismo, la primer patente biotecnológica se desarrolló en microorganismos recombinantes con múltiples plásmidos involucrados

en distintas rutas de degradación de estos hidrocarburos (Chakrabarty, 1981). Los hongos filamentosos con capacidad de degradar hidrocarburos han sido reportados en muy escasos trabajos (Walker y Cooney, 1973, St. Leger et al., 1988, Lecuona et al., 1997, April et al., 2000, Romero et al. 2002), y son más escasos aún, con un único y preliminar reporte en bacterias, los estudios de microorganismos con capacidad de degradar HC de muy largas cadenas (Radwan et al., 1996).

El proceso general de asimilación de alcanos puede dividirse en varias etapas detalladas a continuación (Tanaka y Fukui, 1989):

#### **I.C.1.3.1. Incorporación de alcanos a la célula**

No se han reportado evidencias de enzimas que degraden extracelularmente los hidrocarburos, motivo por el cual las células necesitan incorporar estos sustratos nutritivos para su utilización (Lindley, 1992). Los mecanismos de ingreso de hidrocarburos a la célula, no se conocen con exactitud, pero la incorporación de los mismos ocurriría por contacto directo o bien por una vía indirecta. Esta última implicaría una previa solubilización o emulsión (pseudosolubilización) del hidrocarburo (Kappeli y Fiechter, 1977). Se han descrito, principalmente en bacterias y levaduras, compuestos con propiedades biosurfactantes que incrementan la disponibilidad del sustrato para la célula (Moran et al., 2000, Calvo et al., 2004, Menezes Bento et al., 2005). Varias moléculas de glicolípidos (ramnolípidos) y glicosfingolípidos son ejemplos de surfactantes bacterianos (Weete, 1976; Desai y Banat, 1997, Inakollu et al., 2004). Moléculas de fosfoacilglicéridos (PL), péptidos, ácidos grasos, lipopolisacáridos y polímeros complejos de glicolípidos y péptidos, se reportaron en levaduras (Cooper y Zajic, 1980).

Los hidrocarburos incorporados a la célula, se localizan en vesículas membranosas como depósitos intracelulares (Meissel et al., 1973, Cooney et al., 1980, Lindley, 1992).

#### **I.C.1.3.2. Oxidación de los alcanos**

La oxidación de los hidrocarburos es una reacción dependiente de oxígeno, catalizada por complejos enzimáticos de monooxigenasas o dioxigenasas (Lindley, 1992, van Beilen et al., 1994). Los mecanismos propuestos para la oxidación de alcanos en microorganismos son los siguientes (Fig. I.8):

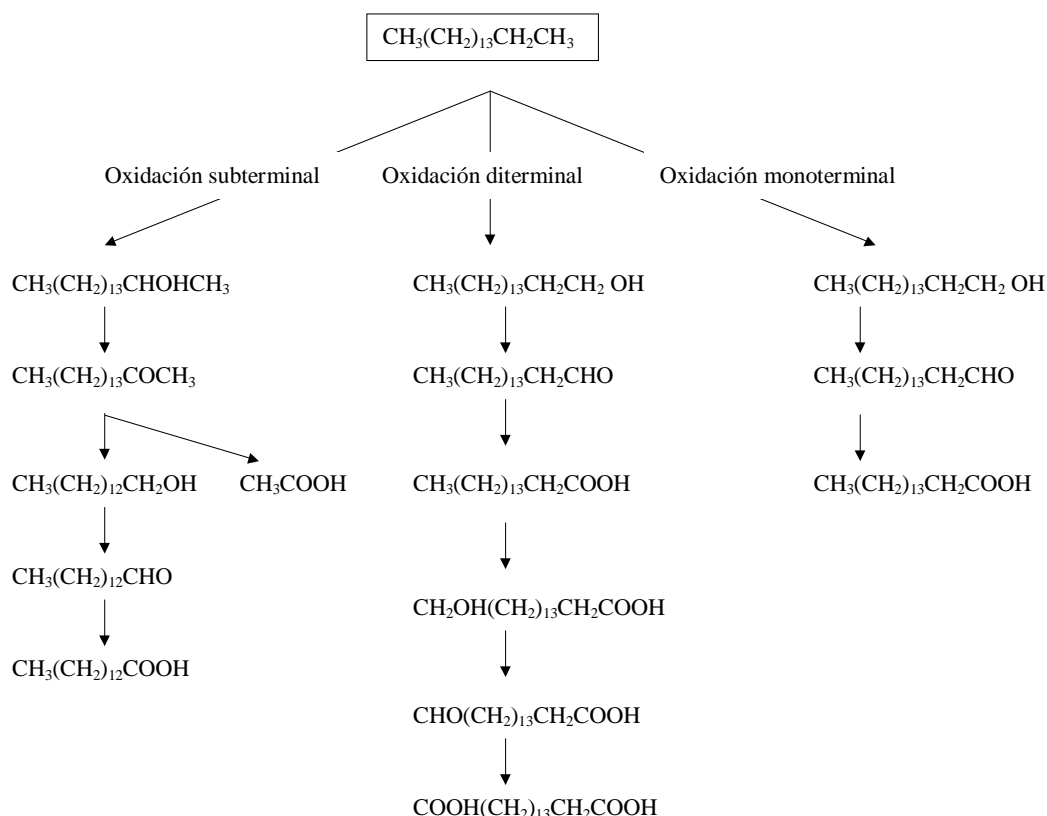


Fig. I.8. Vías propuestas para la oxidación de alcanos en microorganismos

- Oxidación subterminal: la oxidación del carbono subterminal (C2) por enzimas monooxigenasas produce compuestos intermediarios como metil cetonas o alcoholes secundarios (Allen et al., 1971, Britton, 1984; Ashraf et al., 1994, Whyte et al, 1998).
- Oxidación diterminal: enzimas dioxigenasas catalizan reacciones de oxidación en los carbonos de ambos extremos de la molécula de hidrocarburo con la producción de ácidos dicarboxílicos (Yi y Rehm, 1982, Broadway et al., 1993, Maeng et al., 1996, Scheller et al., 1998)
- Oxidación monoterminal: es el mecanismo predominante en bacterias y levaduras (Gallo et al., 1973, Tanaka et al., 1982, Boulton y Ratledge, 1984, Britton, 1984, May y Katoposis, 1990, Watkinson y Morgan, 1990, Tanaka y Ueda, 1993). La reacción inicial de oxidación consiste en la hidroxilación del grupo metilo terminal por un complejo enzimático de monooxigenasas constituido, generalmente de una

citocromo P-450 y NADPH citocromo c reductasa, localizado en la membrana del retículo endoplasmático.

Estas reacciones iniciales desencadenan la cascada enzimática de alcohol dehidrogenasas y aldehído dehidrogenasas, que generan el ácido correspondiente (Tanaka et al., 1982, Tanaka y Fukui, 1989, Ueda y Tanaka, 1990). Las enzimas alcohol dehidrogenasas y aldehído dehidrogenasas, se localizan en distintas organelas celulares: retículo endoplasmático, mitocondrias (Gallo et al., 1973) y peroxisomas (Yamada et al., 1980)

#### **I.C.1.3.3. Activación de los ácidos grasos a sus ésteres de CoA**

El ácido graso producido por la oxidación del hidrocarburo, es activado mediante una unión tioéster con la coenzima A (CoA), formando una molécula de acil-CoA. Esta reacción está catalizada por un grupo de enzimas ATP-dependientes denominadas acyl-CoA sintetasas. Se han reportado distintas acyl-CoA sintetasas que presentan especificidad de sustrato y se localizan en mitocondrias, retículo endoplasmático y peroxisomas (Mishina et al., 1978, Yamada et al., 1980, Tanaka y Ueda, 1993, Coleman et al., 2002). En levaduras existen al menos dos grupos de acil-CoA sintetasas de ácidos grasos de cadenas largas. La acil-CoA sintetasa I es fosfatidilcolina independiente, con gran resistencia a las altas temperaturas y a los detergentes. Se encuentra en células crecidas en ácidos grasos así como en células crecidas en glucosa. El pool de acil-CoA's producidos por esta enzima se utiliza en la síntesis de los lípidos celulares. La acil-CoA sintetasa II, en cambio, es dependiente de fosfatidilcolina, se sintetiza únicamente en células crecidas con ácido oleico, y provee los acil-CoA's que por degradación total generan moléculas acetil-CoA's (Mishina et al., 1978, Numa, 1981).

#### **I.C.1.3.4. $\beta$ -oxidación de los acil-CoA's**

Las moléculas de acil-CoA's activadas pueden ser degradadas por un proceso de  $\beta$ -oxidación. Éste consiste en una serie de ciclos de reacciones oxidativas, cada uno produce un acortamiento en dos átomos de carbono de la cadena del acil-CoA, generando una molécula de acetil-CoA por ciclo. Todos los seres vivos utilizan el

mecanismo de  $\beta$ -oxidación como vía oxidativa. En los organismos eucariotas, este proceso metabólico ocurre en mitocondrias y/o peroxisomas. La  $\beta$ -oxidación mitocondrial, sin embargo, sólo se ha reportado en animales y en algunas algas (Kunau et al., 1996). En ambas organelas los intermediarios de reacción son similares, pero difieren en las enzimas que catalizan la mayoría de las reacciones. Una de las principales diferencias ocurre en la primera etapa del proceso oxidativo (Fig. I.9).

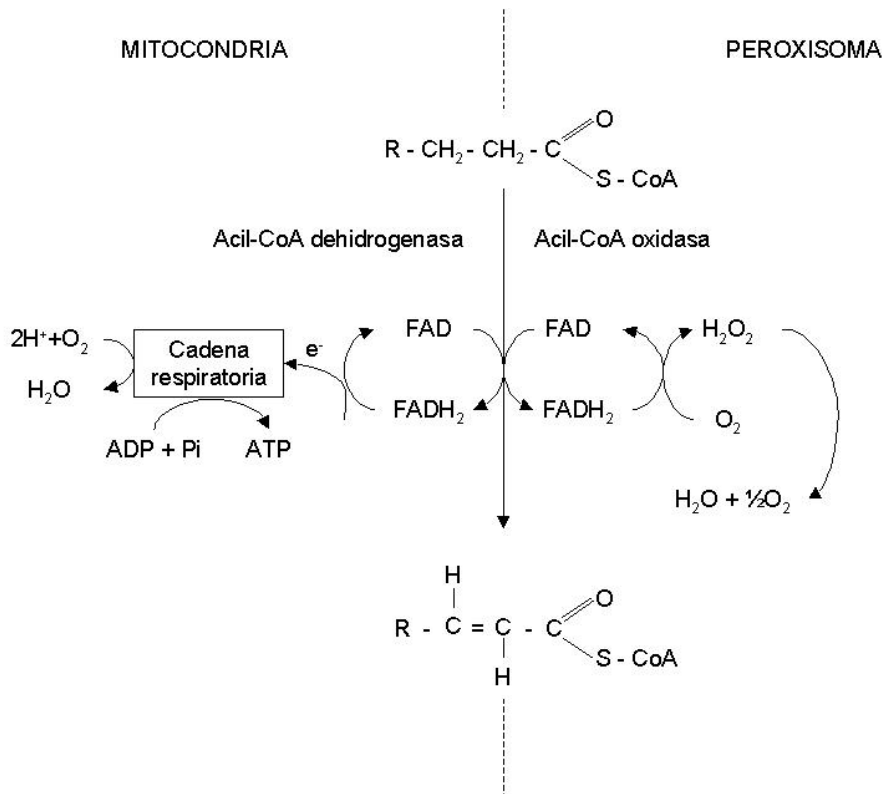


Fig. I.9. Comparación de la primera etapa de la  $\beta$ -oxidación en mitocondrias y peroxisomas. Esquema de Nelson y Cox, 2004.

En los peroxisomas, las enzimas que catalizan la primera reacción pertenecen al grupo de las acil-CoA oxidasas, mientras que en las mitocondrias son las acil-CoA dehidrogenasas. El  $FADH_2$  generado en la reacción peroxisomal cede sus electrones al oxígeno formando una molécula de peróxido de hidrógeno y liberando energía química en forma de calor. El  $FADH_2$  generado en la reacción mitocondrial en cambio, cede sus electrones a la cadena transportadora de electrones mitocondrial y la energía química se almacena finalmente en moléculas de ATP.

En organismos que presentan  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal, se evidencia una diferencia funcional entre ambas. En mitocondrias ocurre la degradación de ácidos grasos de cadenas carbonadas medianas y largas, con producción de energía en forma de

ATP, mientras que los peroxisomas degradan ácidos grasos de muy largas cadenas, eicosanoides, ácidos dicarboxílicos, ácido proanoico y algunos xenobióticos, que no están involucrados en la producción primaria de energía. En organismos eucariotas inferiores, como levaduras y hongos filamentosos, así como en la mayoría de las plantas, la  $\beta$ -oxidación ocurre exclusivamente en los peroxisomas (Mishina et al., 1978, Kunau et al., 1988, Kunau et al., 1996, Valenciano et al., 1996). Los peroxisomas son organelas rodeadas de una membrana con una matriz granular fina y un centro cristalino. Poseen varias enzimas: D-aminoácido oxidasa, isocitrato liasa, malato sintetasa, isocitrato dehidrogenasa, uricasa, carnitina acyltransferasa, glicerol - 3Pdehidrogenasa, acilCoA oxidasas y catalasa (Yamada et al., 1980, Tanaka y Ueda, 1993, Nelson y Cox, 2004). Los peroxisomas presentan una gran variedad numérica, con diferentes formas y tamaños, de acuerdo al tipo celular y a la disponibilidad de nutrientes (Fukui y Tanaka, 1979, Veenhuis et al., 2000) (Fig.1.10).

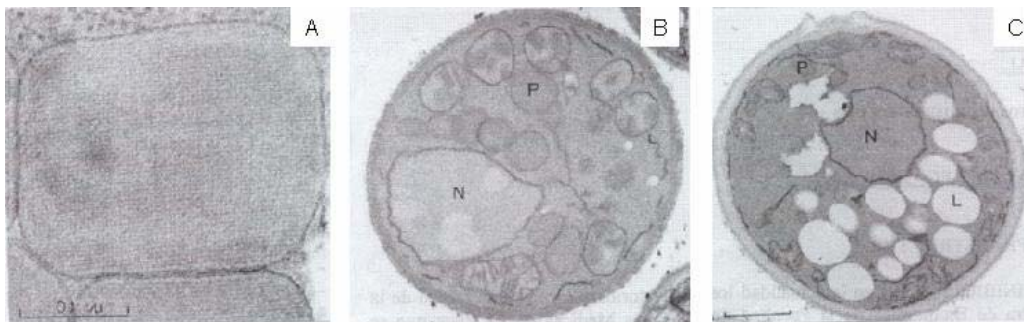
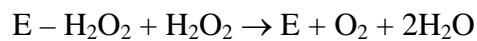
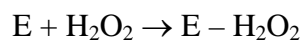


Figura I.10. Ultraestructura de distintas clases de levaduras con proliferación de peroxisomas. Se observan peroxisomas cuboides de *Hansenula polymorpha* crecida en metanol (A). Se observa gran proliferación de peroxisomas redondeados en *Trichosporon cutaneum* crecido en etilamina como única fuente de carbono y nitrógeno (B), y en *Saccharomyces cerevisiae* crecida en medio de cultivo con ácido oleico (C). La barra representa 1  $\mu$ m. N, núcleo; P, peroxisoma. Gráfico modificado de Veenhuis, 2000.

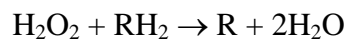
La biogénesis de los peroxisomas consiste de tres etapas principales: síntesis de la membrana, importación de proteínas de la matriz y proliferación. La proliferación ocurre por división de las organelas preexistentes, acompañado de la importación de proteínas de la matriz, sintetizadas en el citosol y direccionadas a la organela por secuencias señales específicas para peroxisomas (Lazarow y Fujiki, 1985, Subramani, 1998). La proliferación peroxisomal puede ser inducida por un amplio grupo de compuestos (clofibratos, phtalatos, herbicidas, metanol, ácidos grasos, etc), que no sólo afectan el tamaño y cantidad de organelas, sino que también inducen enzimas peroxisomales (Bohnet et al., 1991, Kunau et al., 1996).

Como se mencionó en el ítem anterior, las primeras reacciones de oxidación en los peroxisomas incluyen la oxidación del acil-CoA por una acil-CoA oxidasa (Fig. I.9). Esta reacción genera  $H_2O_2$  que es un componente nocivo para la célula (especie reactiva del oxígeno) por causar daños oxidativos a componentes celulares fundamentales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, entre otros. El mecanismo de detoxificación empleado por la célula, consiste en degradar el  $H_2O_2$  mediante una reacción catalizada por la enzima catalasa (Gregory y Fridovich, 1974, Alberts, 2004)

El  $H_2O_2$  puede actuar como sustrato y dador de  $H_2$  simultáneamente (función catalítica), produciendo  $H_2O$  y  $O_2$ .



La catalasa también puede utilizar el  $H_2O_2$  para oxidar diversas sustancias (alcoholes, aldehídos) mediante una reacción de peroxidación (función peroxidativa):



La catalasa es un enzima tetramérica compuesta por cuatro subunidades idénticas, con grupo hemo como grupo prostético. Se ha reportado más de un gen de la catalasa en distintos hongos filamentosos (Bussink y Oliver, 2001, Kawasaki y Aguirre, 2001) y levaduras (Okada et al., 1987). Existen al menos dos variedades morfológicas y funcionales principales. Las catalasas de subunidades pequeñas de localización peroxisomal (48-55 KD), y las catalasas de subunidades grandes (80-100 KD) que pueden localizarse en el citosol o ser secretadas al espacio extracelular (Kawasaki y Aguirre, 2001, Díaz et al., 2001, Michán et al., 2002)

La vía de  $\beta$ -oxidación comienza con la reacción catalizada por una enzima acil-CoA oxidasa (Fig. I.9) y continúa con una serie de reacciones oxidativas (Nelson y Cox, 2004). Los productos obtenidos de esta cascada de reacciones son: un compuesto con un par de átomos de carbono menos que el sustrato inicial, y una molécula de acetil-CoA.

### **I.C.1.3.5. Utilización del acetil-CoA**

Las moléculas de acetil-CoA generadas en el proceso de  $\beta$ -oxidación previamente descrito, pueden ser sustrato de distintas rutas metabólicas. A continuación se detallan la vía de degradación total y la vía de síntesis de otros compuestos celulares (Tanaka y Ueda, 1993, Kunau et al., 1996, Nelson y Cox, 2004).

#### *Oxidación final de acetil-CoA vía ciclo del ácido tricarboxílico (CAT)*

Los grupos acetilos generados en los peroxisomas son exportados a mitocondrias por dos isoformas (peroxisomal y mitocondrial) de la enzima carnitina acetiltransferasa (Ueda et al., 1984, Tanaka y Ueda, 1993, Kunau et al., 1996). Las moléculas de acetil-CoA se condensan con el oxalacetato e ingresan al ciclo del ácido tricarboxílico donde son oxidadas hasta  $\text{CO}_2$ . En estas reacciones se producen compuestos con gran poder reductor como NADH y  $\text{FADH}_2$  que ceden sus electrones a la cadena transportadora de electrones mitocondrial liberando la energía utilizada en la síntesis del ATP.

#### *Formación de intermediarios del ciclo CAT vía ciclo de glioxilato*

Los grupos acetilos pueden formar también malato y succinato, intermediarios del ciclo del CAT, mediante el ciclo del glioxilato. Las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa son las enzimas reguladoras de este ciclo. En las levaduras estas enzimas se localizan en los peroxisomas (Tanaka y Fukui, 1989).

La oxidación final del acetil-CoA vía CAT, así como la formación de intermediarios del ciclo vía ciclo de glioxilato, son mecanismos que implican una estrecha relación de la actividad peroxisomal con la producción de energía mitocondrial (Kunau et al., 1996) (Fig. I.11).

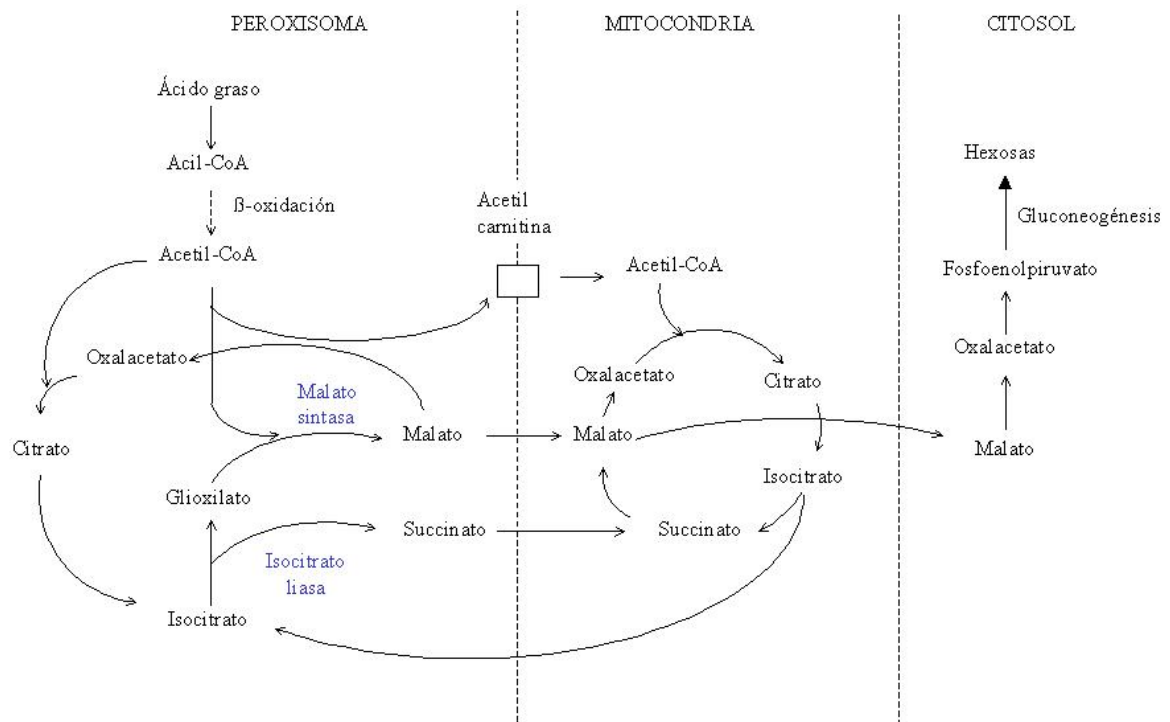


Figura I.11. Esquema básico del metabolismo del acetil-CoA. Modificado de Tanaka et al 1993 y Nelson y Cox, 2004.

### Síntesis de novo de ácidos grasos

La síntesis *de novo* de ácidos grasos a partir de acetil-CoA, producido por β-oxidación de los hidrocarburos en bacterias y levaduras, no presenta variaciones con el mecanismo de síntesis de los organismos superiores. La síntesis de ácidos grasos de mediana longitud de cadena comienza en el citosol con la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA catalizada por el sistema multienzimático de la acetil-CoA carboxilasa.

La conversión de acetil y malonil-CoA en palmitato es catalizada por la enzima ácido graso sintetasa en una serie de reacciones de condensación y reducción que generan ácidos grasos de longitud de cadena mediana (hasta 16 carbonos):



Los ácidos grasos saturados de mayor longitud de cadena y los ácidos grasos insaturados, se sintetizan a partir de los ácidos grasos de cadenas medianas por distintos sistemas enzimáticos de elongación. El sistema elongante existe en dos fracciones

particuladas, en mitocondrias, la acetil-CoA es el principal sustrato en diversos tejidos, en cambio, en microsomas, la malonil-CoA es la que actúa como dador de los dos átomos de carbono.

### *Gluconeogénesis*

En plantas, ciertos invertebrados y algunos microorganismos, el acetato puede servir como fuente de energía o bien como fuente de fosfoenolpiruvato para la síntesis de carbohidratos (gluconeogénesis). Mediante reacciones anapleróticas el fosfoenolpiruvato puede sintetizarse a partir del oxalacetato (producido vía ciclo de glioxilato y/o ciclo del CAT) en una reacción reversible catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Nelson y Cox, 2004) (Fig. I.11). Se ha reportado que las levaduras sintetizan glucosa utilizando los grupos acetilos producidos por  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Tanaka y Fukui, 1989).

### *Síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y otros compuestos*

Los microorganismos sintetizan sus 20 aminoácidos a partir de compuestos intermediarios de la glucólisis, del ciclo del CAT y de la vía de las pentosas fosfato. Los aminoácidos a su vez, son precursores de muchos compuestos celulares como proteínas, hormonas, coenzimas, nucleótidos, alcaloides, polímeros de pared celular, antibióticos y pigmentos (Nelson y Cox, 2004).

### **I.C.1.3.6. Enzimas inducibles en presencia de hidrocarburos o ácidos grasos**

En microorganismos se han reportado enzimas con capacidad de aumentar su actividad enzimática en presencia de hidrocarburos o ácidos grasos. Se ha demostrado la inducción de:

- Enzimas que catalizan las primeras etapas de la ruta catabólica de dichos sustratos como citocromo P-450 monooxigenasas microsomales, alcohol dehidrogenasas y aldehído dehidrogenasas (Gallo et al., 1973, Yamada et al., 1980)
- Enzimas que catalizan el proceso de  $\beta$ -oxidación, como acil-CoA oxidasas, acil-CoA dehidrogenasas y catalasa (Tanaka y Ueda, 1993, Valenciano et al., 1996, Kunau et al., 1996, Alconada y Juárez, 2006)

- Enzimas del ciclo del glioxilato como isocitrato liasa y malato sintasa (Okada et al., 1986; Tanaka y Fukui, 1989).

#### **I.C.1.4. Lípidos de hongos**

##### **I.C.1.4.1. Significancia biológica de los lípidos**

Los lípidos son sustancias orgánicas solubles en solventes orgánicos y poco solubles en agua que cumplen diversas funciones en los microorganismos fúngicos:

- Son una fuente importante de reserva energética
- Son componentes estructurales en membranas celulares
- Forman láminas protectoras en paredes celulares
- Son hormonas sexuales
- Son de importancia taxonómica y diagnóstica
- Son segundos mensajeros

Los ácidos grasos pueden cumplir importantes roles como:

- Moléculas antimicrobianas
- Moléculas transportadoras de cationes en las mitocondrias
- Aceptores de hidrógenos durante los procesos oxidativos (Pupin et al., 2000)
- Moléculas emulsionantes de compuestos de elevada hidrofobicidad (Tanaka y Fukui, 1989)

##### **I.C.1.4.2. Composición lipídica de hongos**

Los reportes de lípidos de hongos incubados en medios de cultivo conteniendo glucosa como principal fuente de carbono, destacan generalmente la presencia de esteroides, fosfoacilglicéridos, diacilglicéridos y ácidos grasos libres (Boucias et al., 1984; Benyagoub et al., 1996). También se han reportado triacilglicéridos, ésteres de esteroides, esfingolípidos e hidrocarburos. La composición lipídica sin embargo, varía de acuerdo con los parámetros ambientales, las condiciones de cultivo, el estado de desarrollo y la especie (Goyal y Khuller, 1994; Pupin et al., 2000).

Los ácidos grasos en hongos son compuestos alifáticos saturados e insaturados con una longitud de cadena de C10 a C26. La nomenclatura de los ácidos grasos que se utilizarán en este trabajo es la siguiente:

Ácido graso	
láurico	12:0
mirístico	14:0
pentadecanoico	15:0
palmítico	16:0
palmitoleico	16:1
heptadecanoico	17:0
heptadecenoico	17:1
esteárico	18:0
oleico	18:1
linoleico	18:2
linolénico	18:3
nonadecanoico	19:0
nonadecenoico	19:1
eicosanoico	20:0
eicosenoico	20:1
behénico	22:0
lignocérico	24:0

Usualmente los ácidos grasos de cadenas pares se encuentran en mayor proporción que los de cadenas impares. Los ácidos palmítico, oleico y linoleico son los ácidos grasos predominantes (Ratray et al., 1975, Boucias et al., 1984, Viljoen et al., 1986, Kerwin, 1987, Goyal y Khuller, 1994, Tuller et al., 1999, Pupin et al., 2000). El ácido palmitoleico y esteárico son también componentes frecuentes en los hongos (Viljoen et al., 1986). Asimismo se reportaron ácidos grasos particulares como hidroxiaácidos de largas cadenas, ácido alfa linoleico, ácidos acetilénicos, ramificados acetoácidos y epoxiaácidos (Ratray et al., 1975, Kolattukudy, 1976, Pupin et al., 2000). La mayoría de

los ácidos grasos se encuentran esterificados en los distintos componentes lipídicos del hongo, sólo un pequeño porcentaje del total de los lípidos se encuentra como ácidos grasos libres (Benyagoub et al., 1996).

Los ácidos grasos fúngicos, son cuantitativamente muy variable de acuerdo a la especie, el estado de desarrollo del hongo, el sustrato nutritivo y las condiciones ambientales (Daum et al., 1999, Tuller et al. 1999). El ácido linoleico por ejemplo, representa el 66% de los ácidos grasos en *Penicillium atrovirens* (Pupin et al., 2000), y decrece durante la germinación, con un incremento del ácido oleico. En las levaduras, es muy frecuente la presencia del ácido oleico como componente mayoritario. Sin embargo, en *Candida albicans* predominan los ácidos palmítico, palmitoleico y linoleico en las formas filamentosas y los ácidos grasos saturados, con el ácido mirístico como ácido mayoritario, en las formas levaduriformes (Goyal y Khuller, 1994). Asimismo, se ha reportado que las modificaciones de composición pueden reflejar la fuente de carbono utilizada como sustrato (Yano et al., 1971, Rattray et al., 1975).

Los triacilglicéridos (TG) son ésteres de ácidos grasos, principalmente de los ácidos oleico, palmítico y esteárico (Sorkhoh et al., 1990), y glicerol. Constituyen los lípidos de reserva energética más importante de la mayoría de los organismos eucariotas. En los hongos se encuentran en el citoplasma formando gotas rodeadas de una monocapa de fosfolípidos y proteínas (Ratledge, 1984, Kamisaka et al., 1999).

Los monoglicéridos (MG) y diglicéridos (DG) son moléculas de glicerol esterificadas con una o dos moléculas de ácidos grasos respectivamente. Son constituyentes menores de los extractos lipídicos y se encuentran usualmente esterificados con ácidos grasos saturados C14:0 y C16:0 (Domnas y Warner, 1991)

Los fosfolípidos (PL) son compuestos anfipáticos con un grupo polar unido por un enlace fosfodiéster a un carbono del alcohol glicerol (glicerofosfolípido) o de esfingosina (esfingolípidos), y cadenas no polares de ácidos grasos unidos mediante enlaces éster, eter o amidas, a la molécula del alcohol (glicerol o esfingosina). Los PL constituyen los lípidos estructurales mayoritarios de todos los sistemas membranosos de la célula. Entre los distintos grupos fúngicos, se han reportado valores de PL menores al 2% de los lípidos totales, hasta un 24% en distintas especies del género *Glomus* (Gaspar, 1995, Jabaji-Hare, 1998). Las clases de lípidos polares mayoritariamente detectados fueron fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS) (Goyal y Khuller, 1994, Benyagoub et al., 1996, Tuller et al. 1999). En levaduras se ha reportado que la PE es el único componente de la membrana

que rodea los depósitos de TG (Ratledge, 1984). Los ácidos grasos saturados mirístico, esteárico y palmítico, e insaturados, palmitoleico y linoleico, son los componentes más frecuentes de los PL en hongos (Ratray et al., 1975, Goyal y Khuller, 1994; Benyagoub et al., 1996, Tuller et al., 1999).

Los glicolípidos son lípidos polares formados por una molécula de glicerol o esfingosina con un azúcar simple o un oligosacárido complejo como su extremo polar. Son componentes minoritarios entre los que se encuentran esteril glicósidos, monogalactosildiglicéridos, sulfolípidos y acilglucosos. Estos últimos son elementos de reserva y transporte de la glucosa intracelular (Ratray et al., 1975). Se han reportado glicolípidos como moléculas surfactantes (Lindley, 1992).

Los esteroides (ST) poseen un núcleo planar formado por anillos fusionados de seis y cinco átomos de carbono. Poseen funciones estructurales, de regulación de la fluidez de membranas, y son precursores de hormonas y ácidos biliares. En levaduras, el ergosterol es el esteroide mayoritario (Ratray et al., 1975, Kolattukudy, 1976, Benyagoub et al., 1996, Tuller et al., 1999). Otros esteroides presentes en hongos son dihidroergosterol, brassicasterol, lanosterol, fungisterol, stigmaesterol, colesterol y fucosterol (Ratray et al., 1975, Kolattukudy, 1976). Los esteroides en los hongos constituyen uno de los componentes cuantitativamente más variables. Se han reportado valores menores al 10% en hongos filamentosos (Benyagoub et al., 1996), hasta un 81% en la levadura *Candida tropicalis*. En este último caso, los esteroides estarían posiblemente implicados en la esporulación (Ratray et al., 1975).

Los hidrocarburos (HC) son compuestos inertes formados por átomos de carbono e hidrógeno. Son muy escasos los estudios realizados en hidrocarburos fúngico donde se han reportado alcanos, alquenos y escualeno (Ratray et al., 1975, Kolattukudy, 1976).

#### **I.C.1.5. Compuestos orgánicos volátiles**

Los hongos producen compuestos orgánicos volátiles (VOC) durante su metabolismo primario y secundario. Estos compuestos son variables de acuerdo a la especie, a la disponibilidad de nutrientes y a los factores ambientales, principalmente temperatura y humedad (Jelen y Wasowicz, 1998, Fiedler et al., 2001). Entre los VOC mayormente producidos por los hongos se encuentran los alcoholes alifáticos, carbonilos, ésteres, lactonas, compuestos aromáticos y terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos)

sintetizados por distintas vías metabólicas (Jelen y Wasowicz, 1998, Magan y Evans, 2000) (Fig. I.12).

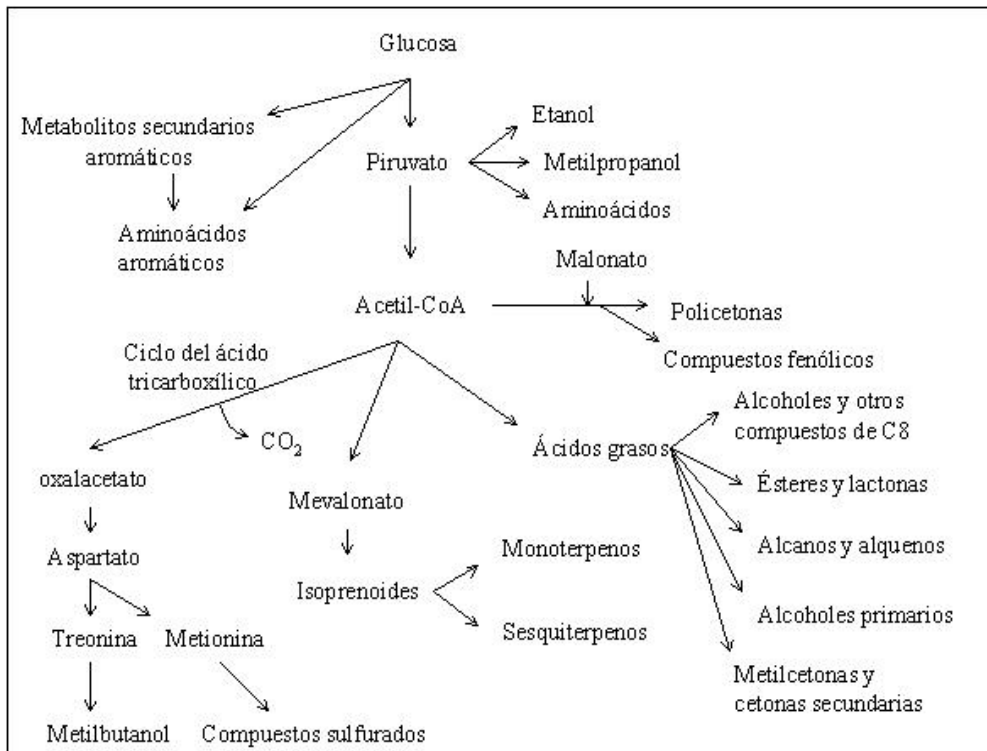


Fig. I.12. Esquema de las distintas rutas metabólicas de síntesis de compuestos volátiles principales en hongos. Modificado de Magan et al., 2000

Un amplio espectro de hidrocarburos sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), ha sido detectado en cultivos de hongos (Fig. I.13). Estos compuestos, generalmente asociados a un metabolismo secundario, suelen utilizarse como carácter taxonómico, por ser muy específicos (Magan y Evans, 2000); y como indicadores de la formación de aflatoxinas (micotoxinas), por ser intermediarios de la ruta de síntesis de las mismas (Desjardins et al., 1993, Jelen et al., 1997, Schnürer et al., 1999).

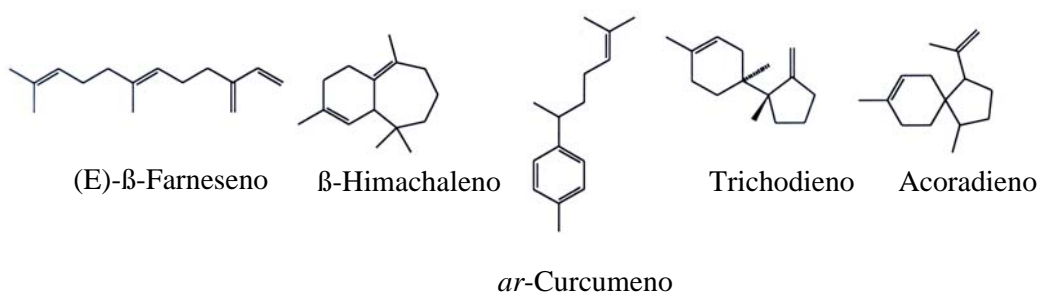


Figura I.13. Estructura de algunos metabolitos sesquiterpenos producidos en hongos.

El rol que cumplen los VOC en estos microorganismos es variado y en muchos casos aún desconocido. Algunos VOC tienen efectos inhibitorios sobre otros microorganismos y otros tienen poder attractante de insectos (Hedlund et al., 1995, Magan et al., 2000). Asimismo se ha postulado que la producción de volátiles podría ser una vía de eliminación de intermediarios tóxicos del metabolismo en condiciones desfavorables, y que ocurriría especialmente durante la esporulación y producción de toxinas (Zeringue et al., 1993).

## OBJETIVOS

El control de insectos vectores de enfermedades es un método altamente eficiente para lograr una disminución en la transmisión de la enfermedad. El empleo de nuevas estrategias de control ecológicamente aceptables, como métodos alternativos a los pesticidas químicos tradicionales, es indispensable y urgente. Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes bioinsecticidas. En el marco de estas premisas se analizaron por primera vez diversos aspectos bioquímicos, metabólicos y biológicos de la interacción entre hongos entomopatógenos y los hidrocarburos componentes cuticulares de su insecto huésped.

La originalidad del trabajo se basa fundamentalmente en que:

- No hay reportes de estudios detallados del metabolismo lipídico en hongos entomopatógenos.
- No hay reportes previos de estudios de hongos entomopatógenos con capacidad de degradar hidrocarburos de muy largas cadenas, componentes esenciales de la barrera de defensa cuticular del insecto huésped.

En base a lo antedicho y utilizando como modelo al insecto *Triatoma infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas en nuestro país, y los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, se diseñaron los experimentos para alcanzar los siguientes objetivos:

- I- Estudiar la composición y metabolismo lipídico de hongos patógenos de *T. infestans*, utilizando hongos crecidos en glucosa y en hidrocarburos de largas y muy largas cadenas de carbonos, análogos a los de la cutícula del insecto.
- II- Investigar las posibles rutas metabólicas de degradación y utilización de los hidrocarburos de muy largas cadenas, de estructura similar a la de los hidrocarburos del insecto.

- III- Caracterizar los productos metabólicos de la degradación de los hidrocarburos análogos a los de la cutícula de *T. infestans*.
- IV- Incrementar la capacidad de degradación de los hidrocarburos cuticulares mediante un proceso de adaptación del hongo a crecer en un medio de cultivo conteniendo hidrocarburo como única fuente de carbono.
- V- Determinar parámetros bioquímicos indicadores del incremento de la capacidad de degradar hidrocarburos por los hongos entomopatógenos.
- VI- Correlacionar el incremento de la capacidad de los hongos de degradar hidrocarburos cuticulares de *T. infestans* con su virulencia.

## Capítulo II

# Materiales y Métodos

## II.1. Reactivos, drogas, solventes y accesorios utilizados

Los solventes utilizados (hexano, cloroformo, metanol, etanol, diclorometano, acetonitrilo) fueron grado proanálisis obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania) y Carlo Erba (Milán, Italia).

Los trazadores radiactivos [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano (4mCi/mmol), [ $^{14}\text{C}$ ] *n*-hexadecano (60 mCi/mmol) y [ $^{14}\text{C}$ ] acetato (56 mCi/mmol) fueron adquiridos en New England Nuclear (Boston, Estados Unidos).

Las placas cromatográficas de ácido silícico utilizadas fueron provistos por Aldrich (Milwaukee, WI) y las placas de alta resolución (HPTLC Silicagel 60) fueron provistas por Merck. El ácido silícico utilizado para relleno de columnas de purificación fue Biosil A (Bio-Rad Lab, Richmond, Canadá).

Los hidrocarburos y estándares de ácidos grasos fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, Estados Unidos).

Las fibras de microextracción en fase sólida se adquirieron en Supelco (Bellefonte, Estados Unidos)

El colorante azul brillante de Coomassie G-250 y Sigma fast DAB (3,3'-Diaminobenzidina) se adquirieron en Sigma Chemical Company (St. Louis, Estados Unidos)

## II.2. Organismos utilizados. Procedencia. Mantenimiento.

- Hongos entomopatógenos. Se utilizaron las siguientes cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*: **Bb10** aislada de *Diatraea saccharalis* en Elortondo, Santa Fe, Argentina, 1990, **Bb5** aislada de *Diatraea saccharalis* en Lincoln, Buenos Aires, Argentina, 1990 y **Ma6** aislada de *Deois flavopicta* en Espíritu Santo, Brasil, 1990. Estas tres cepas pertenecen a la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos, IMYZA (INTA, Castelar, Argentina), Dr. Roberto Lecuona. **Bb5500** aislada de *Diatraea saccharalis* en Oliveros, Santa Fe, Argentina, 1993, depositada en USDA-ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures, Ithaca, Nueva York, Humber, 1998, ARSEF 5500. **BbGHA** y **MaESC1** obtenidas de formulados comerciales de Mycotech, MT, Estados Unidos y EcoScience, MA, Estados Unidos respectivamente. Las cepas fueron mantenidas mediante resiembras periódicas en placas agar-Sabouroud modificado y/o mediante pasajes por el insecto huésped.

- Insectos. Se emplearon ejemplares de *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) de 4to estadio, criados en insectario a 28° C, 60% de humedad relativa, y alimentados con sangre de gallina (INIBIOLP).

### II.3. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de los microorganismos.

#### A) Medio agar

Los medios de cultivo agar completo (MC) y mínimo (MM) se prepararon en erlenmeyers de 500 ml, se esterizaron en autoclave y se dispusieron en placas de Petri de 10 cm de diámetro bajo campana de flujo laminar. Para el análisis de los compuestos volátiles liberados por los hongos, el medio de cultivo se colocó en viales de vidrio de 20 ml diseñados especialmente en nuestro laboratorio y denominados viales para análisis de espacio de cabeza o headspace analysis (HSA) (como se describe en el ítem II.9.5.1.). Estos viales HSA tienen un cierre hermético con tapas de teflon a medida, septum de goma y una tapa plástica a rosca perforada (Fig. II.1). El medio de cultivo agar se colocó en el vial de manera tal que ocupara un tercio del volumen de su volumen. El volumen restante (fase gaseosa) se denomina espacio de cabeza.



Figura II.1. Vial para análisis de espacio de cabeza o headspace analysis (vial HSA)

-Medio agar completo con glucosa como fuente de carbono (MC):

PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K.....	0.4 g.
PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> , .....	1.4 g.
SO <sub>4</sub> Mg.....	0.6 g.
ClK.....	1 g.
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> , .....	1.4 g.
Glucosa.....	20 g.
Extracto de levadura .....	10 g.
Agar.....	15 g.
Agua destilada.....	1000 ml.

-Medio agar mínimo (MM):

El medio de cultivo carente de fuentes de carbono (MM), se preparó con los mismos compuestos que el MC pero sin glucosa ni extracto de levadura.

-Medio agar mínimo con hidrocarburo como fuente de carbono (MM+HC):

Se utilizaron los siguientes hidrocarburos como fuentes de carbono alternativas a la glucosa:

a- Hidrocarburos cuticulares de insecto.

Método de extracción de hidrocarburos cuticulares de *T. infestans*. Se extrajeron los lípidos de exuvios de insectos de 4<sup>to</sup> estadio por inmersión en hexano durante 48 horas. El exuvio contiene solamente lípidos epicuticulares (Juárez y Brenner, 1985). Se colectó el sobrenadante y se filtró con papel Wathman N°1. La fracción de hidrocarburos se fraccionó del resto de los compuestos lipídicos por elución del extracto en minicolumnas (8 cm x 0,5 cm) de biosil-A activado, utilizando 6 ml de hexano por mg de hidrocarburo sembrado.

b- Hidrocarburos sintéticos de largas cadenas de carbonos: *n*-hexadecano y *n*-octadecano. Estos compuestos fueron elegidos como modelo experimental básico.

c- Hidrocarburos sintéticos de muy largas cadenas carbonadas similares a los encontrados en la cutícula del insecto: *n*-tetracosano y *n*-octacosano.

Para la preparación del MM+HC se adicionó al medio mínimo solidificado, una solución del hidrocarburo en hexano (30% w/v). Cada uno de los hidrocarburos se adicionó de manera individual cubriendo un área de la superficie del medio de cultivo.

Únicamente el *n*-hexadecano, hidrocarburo en estado líquido a temperatura ambiente, formó una película de sustrato sobre toda la superficie del medio de cultivo. Las placas y viales de cultivo se mantuvieron destapados en campana de flujo laminar hasta la evaporación completa del solvente obteniendo de esta manera el MM con una lámina de hidrocarburo sobre su superficie.

-Medio agar mínimo con trazadores radiactivos como fuentes de carbono:

Sobre el MM solidificado se adicionó con una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l y punta roma, 1-2  $\mu$ l de la solución del sustrato radiactivo. Los sustratos radiactivos utilizados fueron [ $^3$ H] *n*-octacosano en hexano (1  $\mu$ Ci/ $\mu$ l), [ $^{14}$ C] *n*-hexadecano en hexano (0,5  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) y [ $^{14}$ C] acetato en etanol (0,5  $\mu$ Ci/ $\mu$ l). Para evitar la solidificación del hidrocarburo [ $^3$ H] *n*-octacosano y la consiguiente obstrucción de la aguja, esta solución ([ $^3$ H] *n*-octacosano en hexano) se mantuvo a baño María mientras se agregaba el sustrato al medio de cultivo. La evaporación de los solventes se realizó de manera similar a la descrita previamente.

#### B) Fermentación en sustrato sólido (FSS)

Se utilizaron botellas de vidrio de 1000 ml conteniendo 90g de arroz parbolizado. La cantidad de agua destilada fue ajustada al comienzo del proceso para alcanzar el 40% en base seca.

*FSS con hidrocarburos:* los granos de arroz fueron recubiertos con una delgada capa de agar conteniendo un 15% de hidrocarburo sintético (*n*-octacosano) o hidrocarburos de insecto.

El crecimiento de los hongos en este medio de cultivo sólido se realizó en el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (Fac. Cs. Exactas, UNLP)

#### C) Medio líquido

El medio de cultivo líquido se preparó en erlenmeyers de 250 ml con los mismos componentes y proporciones de sales minerales utilizados en el medio agar, pero sin adicionar el componente polimerizante. La solución del hidrocarburo en hexano, se adicionó al MM bajo campana de flujo laminar una vez autoclavado el medio. Los erlenmeyers se mantuvieron destapados hasta la evaporación del hexano.

#### II.4. Métodos de esterilización

Se empleó el método de calor húmedo mediante autoclave de Chamberland con 1 atmósfera de presión y 121°C durante 20 minutos, para la esterilización de medios de cultivo y tapas de teflon de los viales HSA utilizados para el análisis de los compuestos orgánicos volátiles. El material de vidrio fue esterilizado alternativamente con autoclave y con calor seco en horno a 180°C durante 24 horas. La ebullición (100°C durante 15 minutos) fue utilizada para tapas plásticas, tapas de teflon y septums de viales HSA.

#### II.5. Crecimiento y desarrollo de los microorganismos fúngicos

Los hongos utilizados en todos los ensayos fueron incubados en estufa de cultivo a 26°C, 40-60% de humedad y en oscuridad. Los medios de cultivo, sustratos nutritivos, y tiempo de incubación utilizados fueron variables y se describen a continuación:

- *crecimiento del hongo en insecto*: Los hongos fueron inoculados periódicamente en ninfas de *Triatoma infestans* como estrategia de activación de los microorganismos en su insecto huésped. Las ninfas infectadas mediante la técnica de inmersión descrita posteriormente en ítem II.6 “Bioensayos”, fueron incubadas durante 6 a 10 días a 26°C, 80% de humedad y oscuridad (condiciones de incubación del hongo). Los insectos muertos se incubaron en cámara húmeda durante 24-72 horas a 26°C. En la cámara húmeda se logran las condiciones de humedad óptimas para inducir la emergencia del micelio fuera del insecto y la esporulación del hongo. La cámara húmeda se realizó en placas de Petri de vidrio de 10 cm de diámetro conteniendo papel absorbente humedecido con agua estéril. Los insectos muertos se colocaron en tapas plásticas (4 cm de diámetro) sobre el papel húmedo. Luego de la incubación se utilizó el ansa bacteriológica para coleccionar una porción del hongo emergente del insecto, que se sembró en forma de estrías en medio MC con antibiótico estreptomycinina (130 mg/l). Se incubaron durante un período de 12-14 días y se conservaron a 4°C.

- *crecimiento del hongo en medio agar*: Las colonias, previamente activadas, fueron repicadas en placas de Petri con MC e incubadas durante 12-14 días. Los hongos crecidos en este medio de cultivo se denominaron hongos control o **FS<sub>0</sub>**. Estos hongos repicados posteriormente en MM+HC, fueron incubados 12-14 días obteniendo así los

denominados hongos adaptados ó **FS<sub>1</sub>**. Un segundo repique e incubación en MM+HC se realizó para obtener los correspondientes hongos adaptados ó **FS<sub>2</sub>** (Fig. II.2).

- *crecimiento del hongo en medio agar con sustratos radioactivos*. Los hongos FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub> (aproximadamente  $5 \times 10^5$  conidios) fueron sembrados con ansa en gancho sobre el sustrato radiactivo (adicionado al MM como se detalló en ítem II.3) e incubados durante 48 horas (Fig. II.2).

- *crecimiento del hongo en medio sólido o fermentación en sustrato sólido (FSS)*. El crecimiento de los hongos denominados hongos control o FS<sub>0</sub> se realizó por siembra e incubación de los hongos activados (como se describió previamente) sobre granos de arroz estéril en jarras de vidrio durante 12-14 días. Posteriormente estos hongos se sembraron e incubaron en granos de arroz recubiertos con una fina capa de agar conteniendo un 15% del hidrocarburo sintético *n*-octacosano (*n*-C28) o de hidrocarburos cuticulares de *T. infestans*. De manera similar a la detallada en el crecimiento del hongo en medio agar, los hongos obtenidos luego del primer repique e incubación en este medio de cultivo se denominaron hongos adaptados o FS<sub>1</sub>, mientras que un segundo repique e incubación se realizó para obtener los denominados hongos adaptados o FS<sub>2</sub>. El material fermentado (arroz/micelio/conidio) fue secado con un flujo de aire comprimido (con bajo contenido de humedad) durante 15 días. La separación de los conidios se realizó por tamizado con una malla de 300 µm de tamaño de poro.

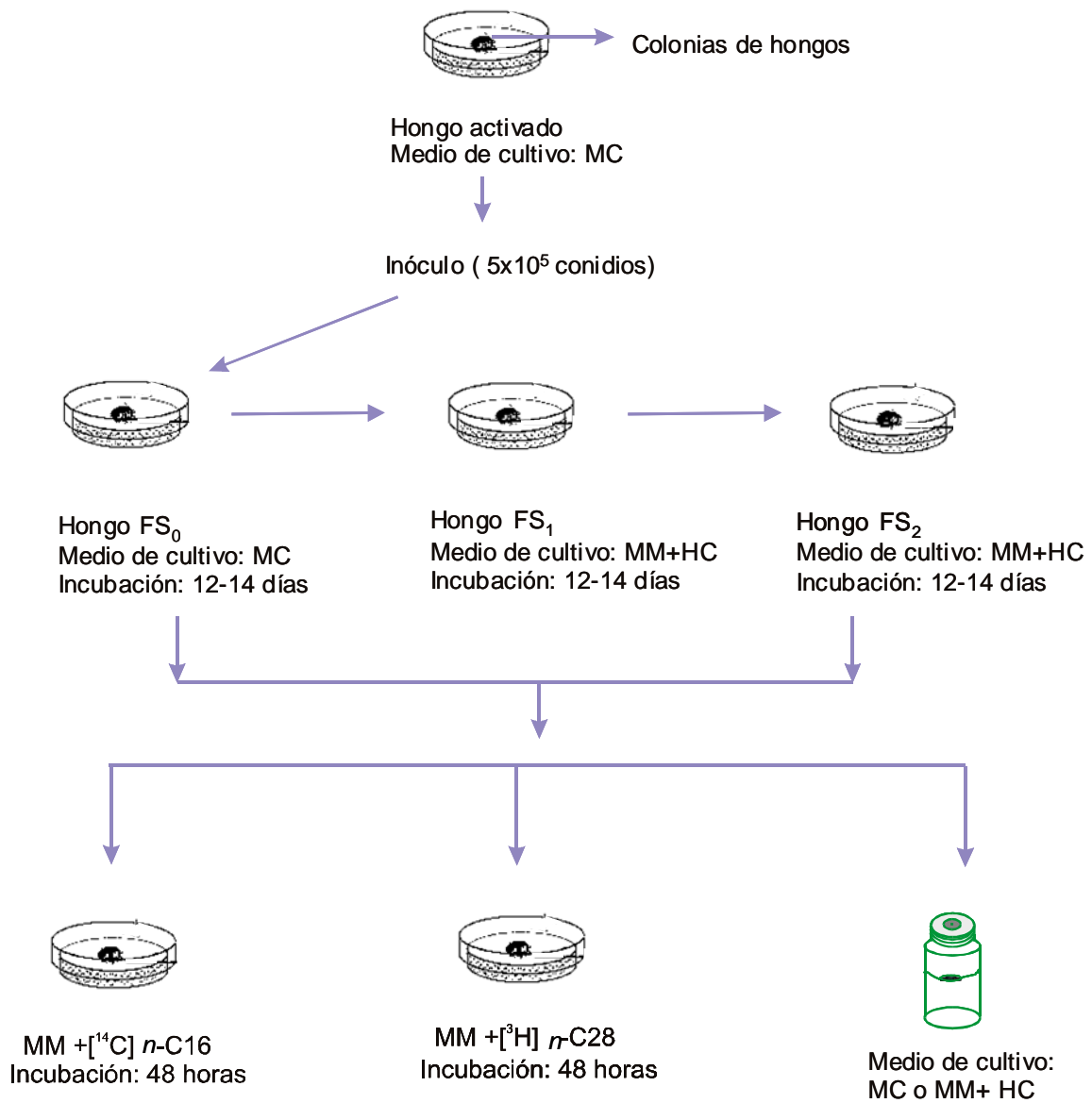


Figura II.2. Esquema de los procedimientos experimentales utilizados en el cultivo de hongos en medio agar con distintas fuentes de carbono.

## II.6. Bioensayos

Se designan con este nombre a los ensayos realizados en el laboratorio con organismos vivos. A través de ellos se evaluó el tiempo letal medio (TLM =  $\sum [\text{Días}_n \times \text{insecto infectado}_n] / \text{Total de insectos infectados}$ ) (Lecuona y Díaz, 2001), que es uno de los parámetros indicadores de la virulencia de un microorganismo sobre un insecto huésped. Este parámetro indica el tiempo necesario para matar el 50% de los insectos a una dosis determinada.

Los insectos utilizados fueron ninfas de 4to estadio y adultos, de *T. infestans* provenientes de crías de laboratorio, con un desarrollo biológico homogéneo y en perfecto estado sanitario. La inoculación de los mismos se realizó después de una semana de ayuno, por el método de inmersión en vasos de precipitado con 10 ml de una suspensión conidial de  $0,8 \times 10^8$  conidios/ml, durante 6 segundos. Para obtener suspensiones homogéneas se sumergieron las colonias de las distintas cepas (controles y adaptadas) en agua destilada estéril con 0,01% del detergente Tween 80, y se agitaron con buzo magnético durante varios minutos. El conteo de los conidios se realizó en cámara de Neubauer. Para analizar el efecto del hongo por individuo, se colocaron los insectos en recipientes individuales y se incubaron en las condiciones óptimas de crecimiento del hongo (como se describió previamente). Para reproducir la situación real de hábitos gregarios de estos insectos, y evaluar las posibles variaciones de los parámetros de virulencia debido al contacto entre los individuos infectados, se realizaron lotes de 10-12 insectos por recipiente y se incubaron en las mismas condiciones que los lotes individuales. En estos ensayos, los insectos testigos o lotes controles, fueron insectos sumergidos en agua destilada. Los insectos muertos se registraron cada 12 ó 24 horas. La infección fúngica fue corroborada mediante cámara húmeda descrita anteriormente.

## II.7. Análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) del crecimiento del hongo sobre la cutícula del insecto.

Se inocularon insectos, como se describió en bioensayos, con suspensiones de  $0,8 \times 10^8$  conidios/ml de BbGHA FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub> durante un período de 48 horas. La disección de los insectos, empleando pinzas de uso oftalmológico, se efectuó con un corte transversal en la base de la cabeza para la extracción de la misma, y luego dos cortes longitudinales

a ambos lados del abdomen. Finalmente un corte transversal cerca de la unión del tórax con el abdomen, y otro, también transversal, a la altura del último par de somitos, liberó el integumento de los órganos abdominales.

*Fijación de las muestras.* Se fijaron las muestras con formol 0,5% durante una hora y se postfijaron en formol al 1% durante 24 horas. El fijador se reemplazó tres veces durante ese período y finalmente se lavó varias veces con agua bidestilada.

*Deshidratación.* Se realizó con concentraciones crecientes de alcohol etílico pro análisis, 30%, 50%, 70%, 90% y 100%. Se realizaron tres lavados, de 15-20 minutos cada uno, con cada una de las distintas concentraciones.

Las muestras fueron posteriormente procesadas con el método del punto crítico (Baltec CP 30) y metalizadas con oro paladio en argón en cámara de alto vacío. Distintos campos de la superficie del insecto se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio electrónico de barrido, JEOL JSM-T100 (Servicio de Microscopía Electrónica, Museo de Ciencias Naturales, UNLP).

## **II.8. Germinación “*in vitro*”**

- *Germinación en medio de cultivo líquido:* Los hongos FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub> obtenidos del cultivo en placas de Petri (como se detalló anteriormente) fueron sembrados en erlenmeyers conteniendo ¼ de su volumen con medio de cultivo líquido completo o medio mínimo con una lámina superficial de hidrocarburo (5% w/v). Se incubaron durante 24 horas en baño térmico a 26°C con agitación a 200 rpm y en oscuridad. A distintos intervalos de tiempo, se tomaron muestras de 1 ml del cultivo y se contabilizó el número de conidios germinados en una cámara de Neubauer. Para cada intervalo se contaron 100 conidios por campo, con la observación de 4 campos por muestra y por intervalo. Se consideró un conidio germinado cuando presentaba un tubo germinal mayor o igual que el tamaño del radio del conidio.

-*Germinación en agua:* Se prepararon suspensiones de Bb10 FS<sub>0</sub> y Bb10 FS<sub>2</sub> (obtenidas de FSS) en agua destilada con tween 80 (0,01%). Estas suspensiones (del orden de  $5 \times 10^7$  conidios/ml) se incubaron en estufa a 26°C y a distintos intervalos de tiempo: 0.5; 2.5; 4.5 y 6.5 horas. Se colectó una alícuota de cada cepa y se realizó el recuento de conidios germinados, empleando una cámara de Neubauer. El recuento de conidios germinados se realizó de manera similar a la mencionada anteriormente.

## **II.9. Estudios bioquímicos y metabólicos de los hongos entomopatógenos**

### **II.9.1. Extracción de los lípidos totales del hongo**

Los lípidos totales de las colonias fueron extraídos con una solución cloroformo:metanol (2:1 v/v) de acuerdo al método Folch (Folch, 1957), en una relación de una parte de muestra a veinte partes de mezcla extractiva. Se mantuvo en heladera durante 24 a 48 horas para lograr la completa extracción de los compuestos. A la mezcla obtenida se agregó la quinta parte de agua destilada. La separación de la fase superior acuosa (metanol-agua) de la fase inferior orgánica (cloroformo), se realizó por centrifugación a 2000xg durante 15 minutos.

### **II.9.2. Análisis de los lípidos totales del hongo por cromatografía en capa fina (TLC)**

La fase clorofórmica proveniente de la extracción de lípidos totales (descrita en el ítem anterior) se concentró por evaporación con un gas inerte (N<sub>2</sub>) y se analizó por cromatografía en capa fina (TLC). Las muestras se sembraron en banda o en punto, en placas de alta resolución (HPTLC), y su desarrollo se efectuó en cubas de vidrio con diferentes mezclas de solventes:

- a) hexano 100% para separar compuestos de muy baja polaridad,
- b) hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1) para la separación de los lípidos neutros,
- c) cloroformo:metanol:ácido acético: agua (65:25:3:1,5) para la separación de los lípidos de alta polaridad,
- d) benceno: eter etílico: agua: ácido acético (40:50:2:0,2) con un desarrollo de  $\frac{3}{4}$  partes de la placa para separar esteroides de diacilglicéridos.

Las corridas cromatográficas se desarrollaron en cubas previamente saturadas con los vapores de la mezcla de solventes correspondiente.

El revelado de las muestras se realizó mediante los siguientes métodos:

- 1) Con vapores de yodo (I<sub>2</sub>). Se colocó la placa desarrollada y seca en una cuba conteniendo yodo bisublimado durante 10 minutos. Es un método cualitativo que

permite visualizar las zonas con lípidos ya que el yodo (colorante inespecífico) los tiñe de un color parduzco.

- 2) Por calcinación. Se realizó la inmersión de la placa cromatográfica en una solución de ácido sulfúrico en etanol (5%) y posteriormente se colocó en estufa a 100°C durante 1 hora. Es un método destructivo, inespecífico, con una alta sensibilidad, que produce la carbonización de los compuestos que se observan como manchas negras.

La identificación de los distintos lípidos se realizó por comparación con los correspondientes estándares sembrados en forma simultánea en la misma placa.

El peso seco de los lípidos totales se obtuvo por evaporación y secado con nitrógeno de la fase orgánica o clorofórmica. La muestra se fue gaseando y pesando en balanza analítica hasta lograr peso constante.

### **II.9.3. Composición de ácidos grasos de los hongos**

#### **II.9.3.1. Derivatización de los ácidos grasos**

Se utilizaron dos métodos alternativos de derivatización:

A) Transesterificación: se evaporó el extracto clorofórmico conteniendo los lípidos totales a seco con N<sub>2</sub>, se resuspendió en tolueno (0,5 ml) y se agregó 1,5 ml de una solución BF<sub>3</sub> (8% metanol) en tubos de cierre herméticos. Se gasearon con N<sub>2</sub> y se calentaron durante 1 hora a 100° C. Se dejó enfriar y se agregó 3 ml de cloroformo y 2 ml de H<sub>2</sub>O. Se gaseó con N<sub>2</sub>, se agitó con vortex y se mantuvo en heladera hasta la aparición de dos fases bien definidas. La fase orgánica conteniendo los ésteres metílicos se transfirió a un nuevo tubo y se realizaron dos lavados sucesivos con 2 ml de H<sub>2</sub>O cada uno. Los ésteres metílicos obtenidos en la fase orgánica fueron sembrados en placas de TLC para su purificación. Las placas se desarrollaron dos veces en cubas con hexano, y luego en una mezcla de solventes de éter de petróleo: éter etílico: ácido acético (80:20:1). La zona correspondiente a los ésteres metílicos fue raspada con espátula y colectada en tubos de ensayo. La recuperación de los ésteres metílicos se realizó con tres lavados sucesivos de la sílica con hexano destilado.

B) Saponificación y derivatización: alternativamente, el extracto clorofórmico se transfirió a tubos de ensayo con tapa esmerilada, se evaporó el extracto a seco con  $N_2$  y se agregaron 2 ml de una solución de  $K(OH)$  en metanol al 5-10% (p/v). Se gasearon con  $N_2$  y se calentaron durante 1 hora a  $80^\circ C$ . En esta etapa se produce la hidrólisis de los lípidos mediante la cual se liberan los ácidos grasos (fracción saponificable) componentes de los mismos y forman sales. Se dejó enfriar y se agregaron 2 ml de hexano y 1 ml de agua destilada. Se agitó con vórtex enérgicamente y se descartó la fase superior. Este procedimiento de extracción de la fracción de insaponificables (hidrocarburos, alcoholes, esteroides) se repitió tres veces. La fracción inferior se acidificó con 0,5 ml de ácido clorhídrico 12 N, se agitó con vórtex y se extrajeron los ácidos grasos libres con tres lavados de 2 ml de hexano cada uno. Se evaporó a seco con  $N_2$ . Se agregó 1,5 ml de trifluoruro de boro (8% metanol) y se calentó a  $64^\circ C$  durante 1 hora. Se dejó enfriar, se agregaron 3 ml de cloroformo y 2 ml de agua destilada y se agitó con vortex. Se descartó la fase superior acuosa y se realizaron dos nuevos lavados con 2 ml agua destilada cada uno. Se evaporó a seco con  $N_2$  y los ésteres metílicos se resuspendieron en hexano.

### II.9.3.2. Análisis por cromatografía gaseosa capilar (CGC)

Este método permite la separación y cuantificación de compuestos que permanezcan en estado gaseoso a las temperaturas usualmente empleadas en las columnas de separación. Los ácidos grasos de cadena corta cumplen dicho requisito mientras que los de cadenas más largas necesitan ser derivatizados en sus ésteres metílicos que son compuestos más volátiles y estables que los respectivos ácidos grasos libres.

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 6890, con control electrónico de la neumática, empleando una columna capilar polar Omega Wax 250 de 30 m, 0,32 mm ID y 0,5 mm de espesor (Alltech Associates, Arlington Heights, Estados Unidos) y detector de ionización de llama (FID).

Condiciones de corrida:

Gas portador .....	He
T° de la cabeza de inyección.....	$260^\circ C$
T° inicial del horno .....	$175^\circ C$
Tiempo inicial a $175^\circ C$ .....	3 min

---

T° final del horno	.....	220 °C
Tiempo final a 220°C	.....	15 min
Incremento de la T°	.....	3 °C/min

La identificación tentativa de los ácidos grasos se basó en el tiempo de retención. El tiempo de retención ( $t_r$ ) de un compuesto es el tiempo en que el mismo permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal. El  $t_r$  es característico de cada compuesto y depende de la columna, de la fase móvil, y del programa de temperaturas utilizado. En un principio se calculan los tiempos de retención de compuestos de identidad conocida (estándares) en las condiciones de corrida seleccionadas. El tiempo de retención relativo ( $t_{rr}$ ) es el cociente entre el tiempo de retención de un componente dado y el correspondiente a otra sustancia utilizada como patrón de referencia. Los tiempos de retención relativos, permiten una estimación de la longitud de cadena del compuesto por un método gráfico de determinación de longitud de cadena equivalente (LCE). Empleando el método de los cuadrados mínimos se obtiene una ecuación lineal de regresión  $y = a + bx$  donde  $y$  es el  $t_{rr}$  y  $x$  es la longitud de cadena o número de carbonos.

### **II.9.3.3. Análisis por cromatografía gaseosa capilar acoplada a espectrometría de masa (CGC-MS)**

La cromatografía gaseosa por sí sola resulta insuficiente para decidir la identidad de los compuestos, por lo que la utilización de la espectrometría de masa como herramienta complementaria resulta indispensable. En este método de análisis, el compuesto es bombardeado con una corriente de electrones de baja energía y el mismo se ioniza en distintos fragmentos. La naturaleza de los iones y su abundancia relativa depende de la estructura de las moléculas bombardeadas. Compuestos de estructuras diferentes presentarán patrones de fragmentación distintos, pudiéndose considerar al espectro de masa, como la huella dactilar de un compuesto. En general los resultados obtenidos se grafican como abundancia iónica en función de la masa iónica. El análisis de los espectros de masa obtenidos permiten efectuar la identificación del compuesto.

El equipo utilizado para estos análisis fue un cromatógrafo Hewlett-Packard Modelo 5890, Serie 2 Plus, con detector de ionización de llama (FID) acoplado a un detector

cuadrupolo Hewlet-Packard 5972A. Se empleó una columna metil-fenil silicona Heliflex RSL-150 de 30m de largo X 0,25 mm ID y 0,25 $\mu$ m de espesor (Laboratorio LADECOR Fac. de Cs. Exactas, UNLP). El impacto electrónico se efectuó a 70 eV.

Condiciones de corrida:

Gas portador .....	He (12 psi)
T° de la cabeza de inyección.....	230 °C
T° inicial del horno .....	110 °C
Tiempo inicial a 110°C .....	5 min
T° final del horno .....	230 °C
Tiempo final a 230°C .....	15 min
Incremento de la T° .....	5 °C/min

## **II.9.4. Composición de los hidrocarburos de los hongos**

### **II.9.4.1. Método de obtención de los hidrocarburos**

Los hidrocarburos se extrajeron por inmersión de las colonias fúngicas en hexano (6ml/g) durante 24 horas. El solvente fue transferido a otro tubo y posteriormente se realizaron dos lavados con hexano calentado previamente en placa térmica, para aumentar la eficiencia de extracción. El extracto obtenido se particionó (5:1 v/v) con agua bidestilada en balones de vidrio. No se utilizaron recipientes plásticos para evitar la contaminación de las muestras con componentes propios del recipiente. Se descartó la fase superior acuosa y la fase orgánica fue filtrada con filtros de tamaño de poro 0,2  $\mu$ m, luego se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético (TCA) al 15% para descartar proteínas hidrofóbicas, y se realizó una partición con dos volúmenes de agua bidestilada. Se colectó la fase superior orgánica y se deshidrató con MgSO<sub>4</sub>. El extracto se evaporó en cuba de vacío hasta un mínimo volumen y se sembró en columnas de 0,5 cm de diámetro, rellenas con ácido silícico (altura de relleno: 2,5 cm). Los hidrocarburos fueron eluidos con hexano destilado.

### **II.9.4.2. Análisis por cromatografía gaseosa capilar (CGC)**

Los hidrocarburos de Bb5 y Ma6 se analizaron en un cromatógrafo Shimadzu R9A

empleando una columna capilar con fase estacionaria DB-5 (J&W Scientific, Folsom, USA) de 30 mX 0,32mm ID. Cabe destacar que este cromatógrafo no poseía regulación automática de flujo dificultando la regulación del mismo, de modo que el inyector no logró operarse en modo sin división (modo splitless). Esto resultó en una operación de baja sensibilidad. Posteriormente se adquirió un cromatógrafo de primera generación utilizado para el resto de los análisis. En este último, el adecuado control del modo splitless de inyección permitió que la totalidad de la muestra ingrese en la columna cromatográfica, lográndose condiciones de alta sensibilidad, óptimas para analizar muestras pequeñas o escasas.

Condiciones de corrida para el análisis de hidrocarburos de Bb5 y Ma6:

Gas portador .....	He
T° de la cabeza de inyección.....	290 °C
T° del detector FID .....	350 °C
T° inicial del horno .....	180 °C
Incremento de la T° .....	3 °C/min
T° (T2) del horno .....	300 °C
Tiempo final .....	30 min

Los hidrocarburos de Bb10 se analizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 6890 (descrito en ítem II.9.4.2.) empleando la columna DB-5 descrita previamente.

Condiciones de corrida:

Gas portador .....	He
T° de la cabeza de inyección.....	280 °C
Inyector .....	Modo splitless
T° del detector FID .....	310 °C
T° inicial del horno (T1) .....	50 °C
Tiempo a T1 .....	1 min
Incremento de la T° T1 .....	50 °C/min
T° (T2) del horno .....	200 °C
Incremento de la T° T2 .....	3 °C/min
T° final del horno (T3).....	300 °C
Tiempo a T3 .....	15 min

La identificación de los hidrocarburos se basó en el tiempo de retención relativo de cada compuesto, como se describió en el ítem II.9.4.2.

#### **II.9.4.3. Análisis por cromatografía gaseosa capilar acoplada a espectrometría de masa (CGC-MS)**

La identificación de los compuestos detectados por CGC fue confirmada por espectrometría de masa empleando el cromatógrafo y columna descritos en el ítem II.9.4.3 (análisis de ácidos grasos por CGC-MS).

Condiciones de corrida:

Gas portador .....	He (12 psi)
T° de la cabeza de inyección.....	230 °C
T° inicial del horno .....	110 °C
Tiempo inicial a 110°C .....	5 min
T° final del horno .....	290 °C
Tiempo final a 290°C .....	10 min
Incremento de la T° .....	5 °C/min

#### **II.9.5. Composición de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) de los hongos**

##### **II.9.5.1. Técnicas empleadas para el análisis de los VOC**

- *Técnica de muestreo de la fase vapor en equilibrio, por análisis del espacio de cabeza (HSA)*. Esta técnica se basa en el principio de equilibrio de los compuestos orgánicos, entre una muestra líquida o sólida, y la fase gaseosa circundante, cuando se encuentran en un recipiente herméticamente cerrado. Es posible extraer alícuotas de la fase gaseosa por distintos mecanismos para su posterior análisis por cromatografía gaseosa o líquida. Los VOC pueden colectarse por arrastre con un gas inerte, con solventes o con materiales que captan y fijan estos compuestos (trampas). Las muestras a analizar se disponen en viales herméticamente cerrados (HSA) para evitar la pérdida de los VOC (como se describió en ítem II.3).

- *Técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (SPME)*. Esta técnica consiste en poner en contacto la fase gaseosa con una fibra de sílice fundida recubierta con un material adsorbente y protegida con una aguja de metal (Fig. II.3.A). La muestra se coloca en un vial HSA. Con la aguja de metal se perfora el septum de goma (de la tapa del vial), y se expone el material adsorbente al espacio de cabeza de la muestra durante un período de tiempo que oscila entre 15 y 30 minutos (Fig. II.3.B). Se retira la fibra del vial y se inyecta en el cromatógrafo gaseoso (Fig. II.3.C). En el inyector del CGC se expone el material adsorbente a altas temperaturas, y los analitos se desorben en el interior del mismo. Los diversos materiales adsorbentes que recubren la fibra de sílice se clasifican según su polaridad en: polares (poliacrilato, carbowax-divinilbenceno, carbowax- resina templada), no polares (polidimetilsiloxano), y bipolares (combinación de las anteriores). No se emplean solventes para la extracción.

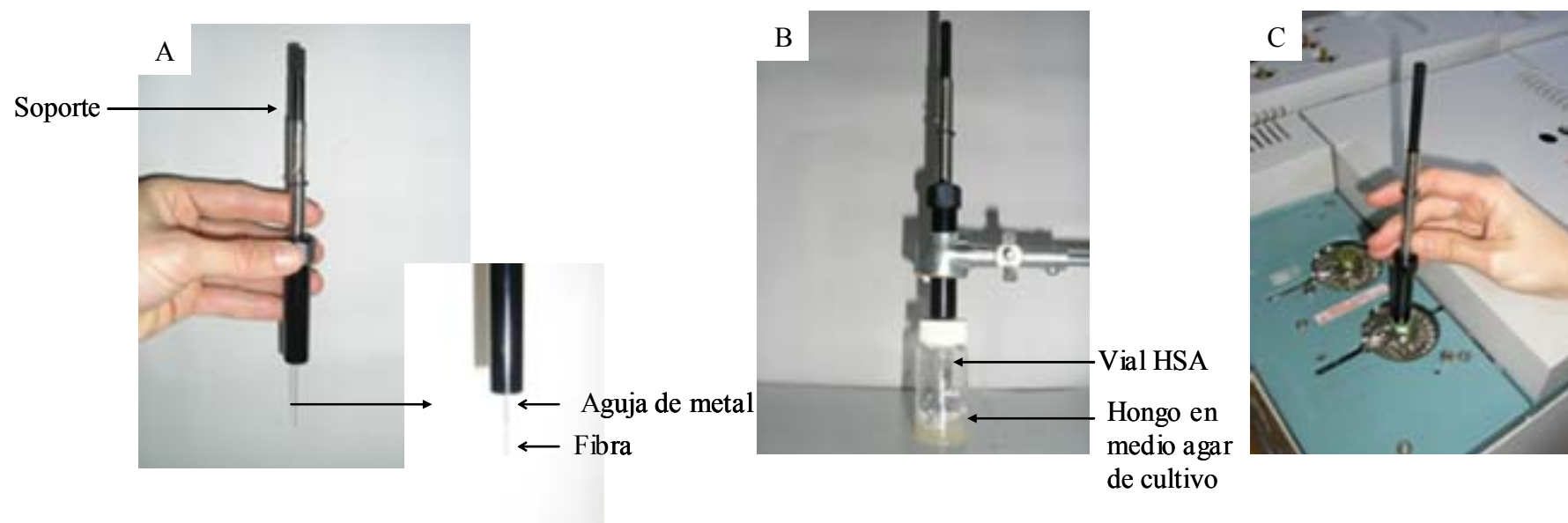


Figura II.3. Técnica de microextracción en fase sólida de espacio de cabeza (SPME) y procedimientos de colección de muestras para el análisis por cromatografía gaseosa capilar (CGC) de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) producidos por los hongos. A) Soporte con aguja de metal, que contiene la fibra en su interior (inserto), B) Exposición de la fibra a los VOC de la muestra y C) Inyección de la muestra en el cromatógrafo. Vial HSA, vial para análisis de espacio de cabeza como se detalla en texto.

- *Método de extracción con hexano.* Se agregó hexano destilado en el interior de los viales HSA conteniendo el cultivo fúngico, se agitó durante 1-2 minutos y se colectó el solvente con pipeta Pasteur. El extracto fue filtrado para eliminar todas las partículas del hongo, se precipitaron las proteínas con TCA, se realizó una partición con agua bidestilada. La fase orgánica se deshidrató con  $MgSO_4$ .

### II.9.5.2. Análisis de los VOC por SPME-cromatografía gaseosa capilar (CGC)

Se analizaron los VOC liberados por Bb10 crecida durante 6 días en viales HSA conteniendo medio agar completo y medio mínimo + *n*-octacosano. Transcurrido el período de incubación, los viales con el cultivo del hongo se calentaron en un baño de arena a 60°C durante 20 minutos. Posteriormente se expuso la fibra a la fase gaseosa del vial (espacio de cabeza) durante 20 minutos sin retirar el vial del baño térmico. Se utilizaron fibras de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) de 65- $\mu$ m y fibras de carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) de 75- $\mu$ m. La desorción de los VOC se produjo en el inyector del cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard 6890 (descrito en ítem II.9.4.2), el análisis se efectuó empleando una columna capilar con fase estacionaria DB-5.

Condiciones de corrida:

Gas portador .....	He
T° de la cabeza de inyección.....	250 °C
Inyector .....	Modo splitless
T° del detector FID .....	280 °C
T° inicial del horno (T1) .....	40 °C
Tiempo a T1 .....	3 min
Incremento de la T° T1 .....	5 °C/min
T° T2 del horno .....	80 °C
Incremento de la T° T2 .....	20 °C/min
T° T3 del horno .....	150 °C
Incremento de la T° T3 .....	30 °C/min
T° final del horno (T4) .....	250 °C
Tiempo a T4 .....	10 min

La identificación de los VOC se realizó por CGC-MS como se detalla en el ítem siguiente.

El extracto obtenido por el método de extracción con hexano generó serios inconvenientes de contaminación, similares a los descritos en el análisis de hidrocarburos (Resultados, ítem III.B.3), motivo por el cual no pudieron ser analizados.

### **II.9.5.3. Análisis de los VOC por cromatografía gaseosa capilar acoplada a espectrometría de masa (CGC-MS)**

El análisis de los compuestos volátiles extraídos por la técnica de HS-SPME se realizó en un cromatógrafo Finnigan Polaris Q con trampa iónica con fuente iónica a 200°C y línea de transferencia a 275°C (Dto Química Orgánica, Univ. Nacional del Centro, Olavarría). Las condiciones de corrida fueron similares a las utilizadas en el análisis por CGC (descritas en el ítem anterior). La identificación de los compuestos detectados se realizó mediante el análisis comparativo de los patrones de fragmentación obtenidos con los espectros de una biblioteca de masa NIST/EPA/NIH, NIST 98, así como con los patrones de elución de los compuestos estándares sembrados en idénticas condiciones.

Los compuestos volátiles fueron alternativamente liberados de los cultivos de *B. bassiana* con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y temperatura, y colectados con una jeringa Hamilton especial para gases de 500 µl, tal como se detalla posteriormente en el ítem II.9.8.2. Para este análisis se sembró el hongo en viales HSA conteniendo MM + 3 µl de una solución de *n*-tetracosano en hexano al 30% (sustrato frío), y se incubó durante un período de 48 horas a 26°C. Los VOC se analizaron por CGC-MS empleando el cromatógrafo y columna citados en el ítem II.9.3.3 con las siguientes condiciones de corrida:

Gas portador .....	He (12 psi)
T° de la cabeza de inyección.....	230 °C
Inyector .....	Modo splitless
T° inicial del horno .....	50 °C
Tiempo inicial a 50°C .....	1 min
T° final del horno .....	200 °C
Incremento de la T° .....	5 °C/min
T° del detector .....	180 °C

## II.9.6. Estudio del metabolismo lipídico de los hongos

Los estudios metabólicos de degradación de hidrocarburos y síntesis de compuestos lipídicos en *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se realizaron con distintos precursores radiactivos como [<sup>14</sup>C] acetato, [<sup>14</sup>C] *n*-hexadecano y [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano, utilizados como trazadores metabólicos.

### II.9.6.1. Técnicas empleadas para la detección y cuantificación de la radiactividad incorporada en los lípidos fúngicos.

- *Contador de centelleo líquido (CCL)*. La radiactividad incorporada en las fases orgánica y acuosa, obtenidas de la partición del extracto lipídico con el método de Folch (como se detalló en ítem II.9.2), se cuantificó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1701, cuyo método de detección está basado en el recuento de los centelleos que produce una muestra con agentes radiactivos al ser excitada (fluorescencia). Alícuotas de 100 a 300 µl de las muestras a analizar, se colocaron en viales descartables de material plástico con 3 ml de solución de centelleo (Ultima Gold, Packard, USA). El líquido de centelleo es una mezcla que contiene solvente, emulsificador y fluor. Esta mezcla sirve para convertir la energía de la partícula emitida durante el proceso de decaimiento radiactivo ( $\alpha$ ,  $\beta$ , etc), en luz, la cual es detectada por el contador de centelleo.

- *Contador de radiactividad por barrido (radio-TLC)*. La detección de radiactividad se realizó cualitativamente empleando un scanner de radiactividad Berthold LB-2723 que determinó las zonas con emisión radiactiva luego del desarrollo del cromatograma. Detectadas las zonas con radiactividad, se calcularon los  $R_f$  (distancia recorrida por el soluto/distancia recorrida por el solvente) correspondientes, y se refirieron a estándares sembrados y desarrollados en similares condiciones.

- *Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de radiactividad (radio-HPLC)*. Esta técnica consiste en una cromatografía con una fase móvil líquida, que pasa a presión constante a través de una columna de pequeño diámetro que contiene una fase estacionaria sólida o líquida. Dependiendo del tipo de fase fija y del fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía puede ser de adsorción, de reparto,

iónica o de exclusión por tamaño. En este trabajo se utilizó la cromatografía de reparto en fase reversa, que posee como fase estacionaria un hidrocarburo alifático unido químicamente a un soporte sólido de sílica, y se emplearon fases móviles polares. La separación de los distintos componentes de la muestra estará determinada por la afinidad de los mismos (en términos de polaridad) por la fase móvil o por la fase estacionaria. La radiactividad de las muestras es registrada, por un módulo acoplado al HPLC que detecta la fluorescencia asociada a la ionización de las partículas  $\beta$  de los elementos radiactivos ( $^3\text{H}$  ó  $^{14}\text{C}$ ).

### II. 9.6.2. Análisis de los lípidos totales por radio cromatografía en capa fina (radio-TLC)

Se utilizaron distintas cepas de *B. bassiana* y una cepa de *M. anisopliae*, crecidos durante 48 horas en placas de Petri con medio de cultivo agar + un sustrato radiactivo. Se seccionó con una espátula de metal, un cuadrado de aproximadamente  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  del agar conteniendo la colonia, y se colocó en un tubo de ensayo con 4 ml de solución cloroformo:metanol (2:1). Se mantuvieron a  $4^\circ\text{C}$  durante 24-48 horas y mediante el método Folch y partición con agua (como se describió anteriormente), se obtuvieron los compuestos lipídicos no polares en la fase orgánica, y los compuestos polares en la fase acuosa. Con alícuotas de 200 ó 300  $\mu\text{l}$  del volumen total obtenido, se determinó la radiactividad de cada una de las fases empleando el contador de centelleo líquido. Con el fin de verificar la eficacia del proceso de extracción, se prepararon placas control con medio de cultivo agar mínimo + el sustrato radiactivo y se procesaron de manera similar a las placas con el cultivo del hongo.

La fase orgánica obtenida se evaporó hasta reducir al mínimo su volumen y se sembró en placa de silicagel con estándares apropiados (triacilglicéridos, diacilglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol, fosfolípidos y alcoholes grasos). La placa cromatográfica se desarrolló dos veces sucesivas en hexano, para separar completamente el sustrato remanente (hidrocarburo no utilizado por el hongo) de la muestra a analizar. Finalmente la placa se desarrolló en una mezcla de solventes (éter de petróleo: éter etílico:ácido acético; 80:20:1). La distribución de radiactividad incorporada en las distintas clases lipídicas se determinó en el contador de radiactividad por barrido (radio-TLC) y se identificaron los distintos lípidos por comparación de sus  $R_f$  con los obtenidos en los compuestos estándares.

### II.9.6.3. Análisis de los [<sup>3</sup>H] ácidos grasos por radio cromatografía líquida de alta resolución (radio-HPLC)

- Lípidos sintetizados por Bb10 a partir del [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano

Se analizó la fracción de [<sup>3</sup>H] ácidos grasos libres cuya marcación fue detectada previamente por radio-TLC (como se describió en ítem anterior). La sílica correspondiente a dicha zona fue separada de la placa por raspado y colocada en tubos de ensayo con 7 ml de una mezcla de extracción hexano: eter etílico (1:1). Se agitó con vórtex y se conservó a 4°C durante 2 horas para que decante la sílica. Se extrajo el sobrenadante, se filtró, y se concentró hasta un volumen mínimo. El extracto obtenido se sembró en minicolumnas de sílice activado. Se eluyó el sustrato remanente con hexano, y posteriormente los ácidos grasos con hexano: eter etílico (1:1).

- Lípidos sintetizados por Ma6 a partir del [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano

Se analizó la fracción de los lípidos polares detectados previamente por radio-TLC de manera similar a la detallada en el ítem anterior. Se colectó por raspado, la sílica de la zona correspondiente a los lípidos polares, se colocó en un tubo de ensayo con tapa esmerilada y se realizó la hidrólisis alcalina (saponificación) descrita en el ítem II.9.3.1. El extracto con los ácidos grasos libres se purificó en minicolumnas de Biosil tal como se describió para *B. bassiana*.

Los [<sup>3</sup>H]-ácidos grasos obtenidos se analizaron por radio-HPLC en fase reversa empleando una columna C18 (25 cm x 4,6 mm tamaño de partícula de 5 μm) acoplada a un sistema de liberación de solvente Spectra Physics SP 8700, empleando un detector de radiactividad Radiomatic Flo-One/Beta y un detector de absorbancia (Merck) a 205 nm. La fase móvil utilizada fue metanol:agua:ácido acético (90:10:0,2) con un flujo de 0,7 ml/min.

El sustrato radiactivo [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano, previo a su utilización, se sembró en minicolumnas de biosil activado, se eluyó con hexano destilado y se analizó por radio-HPLC, con el objetivo de chequear el grado de pureza. Para este análisis se utilizó una columna C8 y una mezcla de acetonitrilo:hexano (96:4) como fase móvil, a un flujo de 0,6 ml/min.

### **II.9.7. Análisis de los [<sup>3</sup>H]-compuestos orgánicos volátiles ([<sup>3</sup>H]-VOC)**

Las cepas de Bb10 crecidas en glucosa (FS<sub>0</sub>) y en hidrocarburo (FS<sub>2</sub>), se sembraron sobre un medio de cultivo agar mínimo + [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano en viales HSA y se incubaron durante un período de 48 horas a 26°C.

#### **II.9.7.1. Cuantificación de los [<sup>3</sup>H]-VOC**

Los [<sup>3</sup>H]-VOC producidos por *B. bassiana* fueron colectados por arrastre con aire comprimido a través de tubos de PVC en viales HSA que contenían 6 ml de una solución acuosa de K(OH) al 10%. El tiempo de arrastre fue de 50 horas en cámara fría (4°C). Los [<sup>3</sup>H]VOC obtenidos en la solución se cuantificaron en el CCL.

#### **II.9.7.2. Análisis de los [<sup>3</sup>H]-VOC por radio-HPLC**

Los viales HSA con los cultivos de *B. bassiana* incubada con el sustrato radiactivo, se acidificaron con 300 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N y se mantuvieron en baño de arena a 100 °C durante una hora. La extracción de los volátiles de la fase vapor en equilibrio estático con el material sólido (espacio de cabeza), se realizó con una jeringa Hamilton para gases (gastight) de 500 µl. Las alícuotas se inyectaron directamente en el radio-HPLC, o bien se colectaron por burbujeo en 2ml de alcohol metílico contenido en un vial HSA, y se inyectó el solvente con la muestra en solución. El análisis se realizó empleando una columna C8 en fase reversa (tamaño de partícula 5 µm; 25 cm x 4,6 mm) y la fase móvil utilizada fue metanol (100%) con un flujo de 0,6 ml/min.

### **II.9.8. Cuantificación de [<sup>3</sup>H]-vapor de H<sub>2</sub>O producido por el hongo durante el metabolismo del hidrocarburo**

Se cuantificó el [<sup>3</sup>H]-vapor de H<sub>2</sub>O liberado por Bb10 y Ma6 incubadas durante 48 horas en placas de Petri con MM + [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano. Las placas de cultivo se colocaron de manera invertida en la estufa de cultivo y sobre la tapa se colocaron recipientes con 200 mg de K(OH) en granallas. Finalizada la incubación se colectó la solución acuosa de K(OH) y se cuantificó la radiactividad incorporada en la misma, utilizando el contador de centelleo líquido.

## II.9.9. Caracterización preliminar de la enzima catalasa

Se utilizó Bb10 crecida 12 días en medio de cultivo agar con glucosa (cepa FS<sub>0</sub>) o con *n*-octacosano como fuentes de carbono (cepa FS<sub>2</sub>). Se analizaron también cultivos de Bb10 crecida en sustrato sólido con y sin el agregado de hidrocarburos (cuticulares o sintéticos).

### II.9.9.1. Fraccionamiento celular

#### - *Obtención del homogenato*

Las hifas y/o conidios se colocaron en viales plásticos con buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0 (PBS) y con 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) como agente inhibidor de proteasas. Se agregaron perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro y se procesaron en un homogeneizador Mini-Bead Beater (BioSpec, Bartlesville, Estados Unidos). Este mecanismo de homogeneización mecánica (por fricción) puede incrementar la temperatura del homogenato desnaturalizando las proteínas. Por tal motivo la homogeneización se realizó con varios intervalos en los que las muestras se colocaron en hielo para evitar dicho proceso. Posteriormente las muestras se centrifugaron varias veces a 2.000 xg durante 15 minutos en una ultramicrocentrífuga refrigerada. El sobrenadante se colectó de entre las perlas con una jeringa de insulina con aguja de metal (21G x1”) que funcionó a modo de filtro. Este sobrenadante denominado homogenato en este trabajo, es un homogenato libre de núcleos, de citoesqueleto y de células enteras (que no han sido lisadas en la homogeneización). Este homogenato se conservó a 4°C hasta su análisis o posterior fraccionamiento.

#### - *Obtención del pellet de 20.000 xg*

El homogenato se centrifugó a 20,000 xg durante 30 minutos a 4 °C en una ultracentrífuga refrigerada. Se descartó el sobrenadante y se colectó el precipitado (pellet) con mitocondrias y peroxisomas. Al pellet obtenido se adicionó solución buffer PBS y se centrifugó nuevamente a 20.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. Este proceso de lavado se repitió dos veces.

En este trabajo se utilizó el pellet de 20.000 xg para el análisis de la actividad de catalasa, enzima marcadora de peroxisomas, asumiendo la ausencia de actividad de esta enzima en las mitocondrias, como se ha reportado en la mayoría de los hongos (Mishina et al., 1978, Kunau et al., 1996, Valenciano et al., 1996).

### II.9.9.2. Ensayos de la actividad enzimática

Se midió la actividad de la catalasa en homogenato y en pellet de 20.000 xg de *B. bassiana* FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub>. La actividad de esta enzima se determinó en función del consumo de su sustrato, el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), medido en un espectrofotómetro Aminco DW 2000 de doble haz (Aminco, Urbana, Estados Unidos). La cinética de degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue medida como descenso en la absorbancia a una longitud de onda de 240 nm, en función del tiempo. La reacción enzimática se realizó en cubetas de cuarzo con ranura de 10 mm. A una solución 15-20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estabilizada a 25°C en el espectrofotómetro, se agregó la muestra, se homogeneizó con espátulitas plásticas, y se midió la actividad de la enzima durante 2 minutos. Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima que puede descomponer 1 μmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 1 minuto, en una solución pH 7.0 y a una temperatura de 25 °C.

### II.9.9.3. Determinación del contenido de proteínas

Las proteínas totales del homogenato y del pellet de 20,000 xg se cuantificaron según el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) por espectrofotometría, a 595 nm de longitud de onda. El procedimiento de cuantificación fue el siguiente:

- Preparación del reactivo. Se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución se le agregó 100 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% (p/v), la solución resultante se diluye a un volumen final de 1000 ml. La solución obtenida se filtró varias veces con papel de filtro para eliminar el exceso de colorante no disuelto.
- Se preparó una solución estándar de albúmina, conteniendo 10 mg en 10 ml de agua bidestilada (1 μg/μl)
- Las soluciones conteniendo de 0 a 25 μg de estándar de albúmina, se pipetearon en tubos plásticos y se ajustó el volumen final a 200 μl con agua bidestilada.
- Se agregó a cada tubo 2500 μl de reactivo de Bradford.

Tubo	Blanco	1	2	3	4	5
Albúmina estándar (µg)	0	5	10	15	20	25
Solución de albúmina 1µg/µl (µl)	0	5	10	15	20	25
Agua bidestilada (µl)	200	195	190	185	180	175
Reactivo de Bradford (µl)	2500	2500	2500	2500	2500	2500

- Se calculó una curva patrón de proteínas: cantidad de albúmina contra absorbancia obtenida a una longitud de onda de 595 nm.
- La muestra se diluyó en agua bidestilada, se pipeteó en tubos 200 µl de la solución problema, se agregó 2500 µl de reactivo y se leyó a una longitud de onda de 595 nm.
- Aplicando una ecuación de regresión lineal se calculó la cantidad de proteína contenida en la muestra.

### II.9.10. Análisis de la ultraestructura

Se analizó la ultraestructura de Bb10 crecidas en placas de Petri con MC (cepa FS<sub>0</sub>) o con MM+ *n*-octacosano como fuente de carbono (cepas FS<sub>1</sub> y FS<sub>2</sub>). Una pre-fijación de las colonias se realizó con 2-3 gotas de glutaraldehído al 2% durante 5 minutos. Se seccionaron con una gillette, las colonias en cuadrados de 1 cm de lado, y fueron separadas del agar con una espátula de metal. Cada una de las muestras fue colectada en un eppendorf al que se agregó 500µl de glutaraldehído y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas (fijación). Luego se realizaron los lavados colocando al hongo en una solución buffer de fosfato 0,2 M, pH 7,4 durante 30 minutos (los dos primeros lavados) y durante 24 horas (el tercer y último lavado). El buffer se fue descartando entre los lavados, con pipeta Pasteur. Un último lavado se realizó con buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 durante 30 minutos. Posteriormente las muestras se trataron con diaminobenzidina (DAB), un colorante específico para catalasa, enzima marcadora de peroxisomas. El DAB en presencia de la enzima, reacciona con el peróxido de hidrógeno y forma un precipitado marrón oscuro (Fig. II.4)



Figura II.4. Reacción de oxidación de la diaminobenzidina (DAB) catalizada por una enzima marcadora de peroxisomas.

Solución DAB:

3,3'-Diaminobenzidina	0,7 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,6 mg
Tris buffer	0,06 M
Agua destilada	1 ml

*Tratamiento de los hongos con DAB.* Se agregaron 500 µl de la solución DAB a cada muestra y se dejó actuar durante 30-60 minutos a T° ambiente y en oscuridad (viales color caramelo). Transcurrido el tiempo de la reacción, la solución DAB se descartó de la muestra y ésta se lavó dos veces con 1 ml de agua destilada durante 30 minutos cada vez.

La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio 1% durante 2 horas a 4°C. La deshidratación se realizó con concentraciones crecientes de etanol: 50%, 70%, 80%, 95% y 100%) y finalmente con óxido de propileno. La infiltración y polimerización se realizaron en resina epoxi. Las muestras se cortaron en secciones de aproximadamente 60 nm de espesor con ultramicrotomo. La técnica de tinción utilizada consistió en una doble tinción con una solución acuosa de acetato de uranilo 1-2% y citrato de plomo de Reynolds, en una atmósfera libre de CO<sub>2</sub>. La observación de las muestras se realizó en un microscopio electrónico de transferencia Jeol Jem-1200 Ex II (Servicio Central de Microscopía Electrónica, Fac.Cs. Veterinarias, UNLP).

## Capítulo III

# Resultados

### III.A. Estudios sobre el crecimiento de los hongos entomopatógenos en distintas fuentes de carbono y el desarrollo de enfermedad en el insecto huésped

#### III.A.1. Crecimiento del hongo en distintas fuentes de carbono

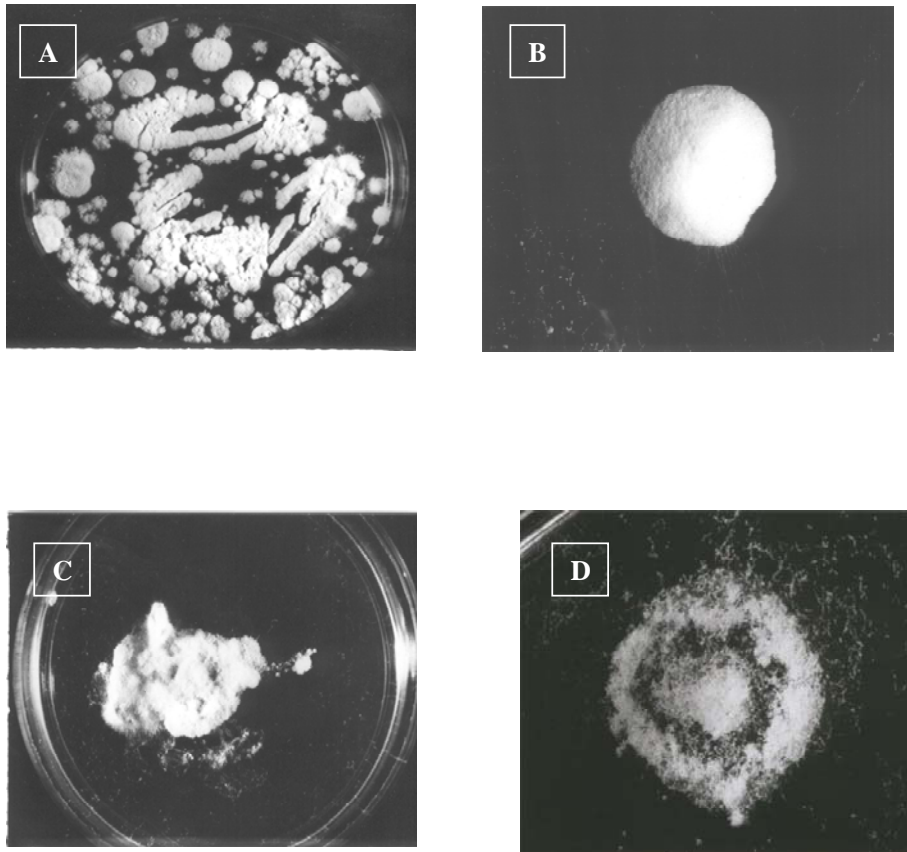
Se observó el crecimiento de las cepas de hongos entomopatógenos utilizadas en este trabajo, en los siguientes medios de cultivo y fuentes de carbono:

A) Medio de cultivo agar completo (MC) y agar mínimo (MM) enriquecido con: lípidos cuticulares (incluyendo la fracción de hidrocarburos) de *T. infestans*, o con hidrocarburos sintéticos lineales de distintas longitudes de cadena. Los hidrocarburos sintéticos utilizados fueron *n*-C16, *n*-C24 y *n*-C28 que se agregaron al medio de cultivo de manera individual (como se detalla en materiales y métodos). Las figuras III.1 a III.3 muestran distintas cepas y especies de hongos entomopatógenos crecidos durante 12-14 días en medios de cultivo conteniendo las diversas fuentes de carbono. Se observó un desarrollo de colonias blancas y algodonosas en las cepas de *B. bassiana* (Fig. III.1, III.2), a diferencia de *M. anisopliae* (Fig. III.3) que desarrolló colonias de coloración verdosa independientemente del sustrato utilizado. Los hongos sembrados en MC desarrollaron colonias sobre toda la superficie del medio de cultivo, debido a la disponibilidad homogénea del sustrato. En cambio, los hongos crecidos en MM al que se adicionaron superficialmente las distintas fuentes de carbono, desarrollaron colonias únicamente sobre la superficie ocupada por el sustrato. Los hongos crecidos en MM enriquecido con lípidos cuticulares (Fig. III.1B) desarrollaron colonias de aspecto similar a las colonias crecidas en MC (Fig. III.1A). Los hongos crecidos en MM enriquecido con cada uno de los hidrocarburos sintéticos mencionados previamente, demoraron su crecimiento y adquirieron un aspecto más compacto que las cepas control (Fig. III.1C y D; III.2 C; III.3 B y C).

A partir del crecimiento de los hongos en estas condiciones de cultivo, se obtuvieron colonias fúngicas con hifas y conidios. Los hongos incubados durante 12 días se encontraban en la última etapa del ciclo del hongo, la fase de esporulación, y por lo tanto los conidios fueron las estructuras predominantes.

B) Medio de cultivo sólido (FSS): Bb10 crecida durante 12-14 días en granos de arroz con o sin el agregado de hidrocarburos (cuticulares o sintéticos) en su superficie,

Figura III.1: *Beauveria bassiana*10 crecida en medio de cultivo agar con distintas fuentes de carbono



- A) Bb10 crecida en medio de cultivo completo (detallado en Mat. y Met.) con glucosa como fuente de carbono. Se observa el desarrollo de colonias blancas y algodonosas sobre toda la superficie de la placa.
- B) Bb10 crecida en medio de cultivo mínimo (detallado en Mat. y Met.) enriquecido con lípidos e hidrocarburos cuticulares de *T. infestans*. Se observa el desarrollo del hongo exclusivamente sobre la superficie cubierta por el sustrato carbonado.
- C) Bb10 crecida en medio de cultivo mínimo enriquecido con *n*-octacosano. Se observa el desarrollo de colonias de aspecto compacto que cubren completamente la superficie cubierta por el hidrocarburo.
- D) Bb10 crecida en medio de cultivo mínimo enriquecido con *n*-tetracosano. Se observa el desarrollo del hongo sobre la superficie cubierta por el hidrocarburo utilizado como sustrato.

Figura III.2. *Beauveria bassiana* GHA crecida en medios de cultivo con distintas fuentes de carbono

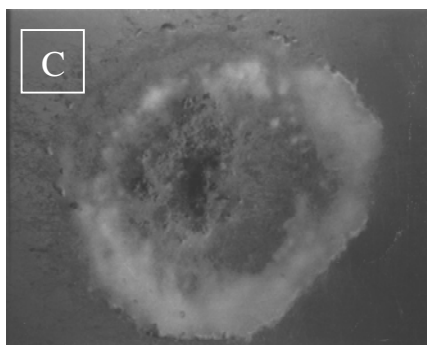
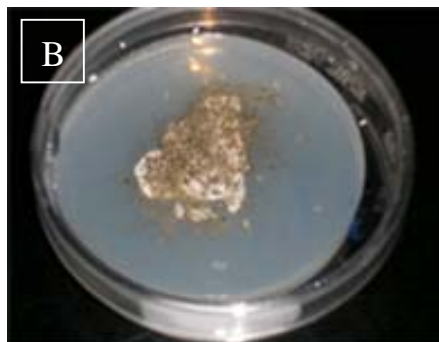
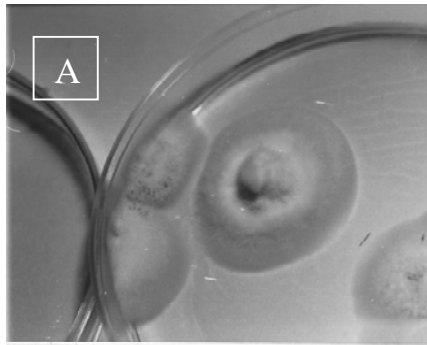


A) *Bb*GHA crecida en MC (detallado en Mat. y Met.) con glucosa como fuente de carbono. Se observa el desarrollo de colonias blancas y algodonosas sobre todas las líneas de siembra debido a la alta disponibilidad del sustrato carbonado en el medio de cultivo.

B) *Bb*GHA crecida en MM (detallado en Mat. y Met.) enriquecido con *n*-hexadecano que se encuentra en estado líquido a T° ambiente y cubre la totalidad de la superficie del medio de cultivo. Los conidios fueron homogéneamente distribuídos en la placa al sembrarse en el sustrato líquido y desarrollaron colonias de aspecto similar a las crecidas en glucosa.

C) *Bb*GHA crecida en MM enriquecido con *n*-octacosano. Se observa un desarrollo compacto y homogéneo del hongo únicamente sobre la superficie cubierta por el hidrocarburo.

Figura III.3. *Metarhizium anisopliae* 6 crecida en medios de cultivo con distintas fuentes de carbono



A) Ma6 crecida en MC (detallado en Mat. y Met.) con glucosa como fuente de carbono.  
B) y C) Ma6 crecida en MM (detallado en Mat. y Met.) enriquecido con *n*-octacosano (B) y *n*-tetracosano (C). Se observa el desarrollo del hongo sobre el hidrocarburo utilizado como sustrato.

desarrolló colonias similares al hongo crecido en medio agar. El óptimo crecimiento del hongo en este sustrato sólido, permitió obtener una mayor producción de conidios necesarios para los estudios bioquímicos desarrollados en este trabajo. Asimismo los conidios fueron las únicas estructuras fúngicas obtenidas a partir de los hongos crecidos en estas condiciones de cultivo, debido al procesamiento de las muestras que se detalla en materiales y métodos.

C) Medio de cultivo líquido utilizando glucosa o hidrocarburos sintéticos como fuente de carbono. Cuando se incubó BbGHA en este medio de cultivo se observó a los 5-6 días de incubación, un gran desarrollo de la masa micelial, tanto en el medio de cultivo con glucosa como en el medio conteniendo *n*-octacosano como única fuente de carbono. En este último caso las hifas se desarrollaron y esporularon sobre la película sólida de hidrocarburo, formando una estructura compacta de hifas y conidios (Fig. III.4).

### III.A.2. Crecimiento del hongo sobre la cutícula del insecto

La cutícula de ejemplares juveniles de *T. infestans* (descrita en introducción) infectados con *B. bassiana* GHA FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub> (ver materiales y métodos) se analizó por microscopía electrónica de barrido (MEB) (Fig. III.5 y 6). Las estructuras fúngicas se observaron principalmente asociadas a pelos, orificios naturales, zonas intersegmentarias, pliegues y cavidades naturales de terguitos y esternitos. Los insectos inoculados con Bb GHA FS<sub>0</sub> e incubados durante 24 horas presentaron gran cantidad de conidios no germinados formando acúmulos distribuidos de manera irregular sobre toda la superficie cuticular (Fig. III.5 B y C). En los insectos incubados durante 48 horas, se evidenció el inicio de la germinación, observándose conidios con prolongaciones germinales incipientes o de pequeña longitud (Fig. III.5 E), así como un desarrollo escaso de estructuras fúngicas filamentosas (Fig. III.5 F). Los insectos infectados con Bb GHA FS<sub>2</sub> en condiciones similares de incubación, presentaron un gran desarrollo de hifas, muy anastomosadas, formando láminas de aspecto compacto sobre la superficie cuticular a las 24 horas de la infección (Fig. III.6 A). La figura III.6 B muestra un grupo de conidios que desarrollaron hifas que se prolongan sobre la cutícula, sin penetrar al insecto. A las 48 horas se observó la presencia masiva de conidios, e hifas de mayor tamaño (Fig. III.6 C) que las desarrolladas por las cepas control (Fig. III.5 F). Asimismo se observaron importantes alteraciones en la superficie cuticular como grandes fisuras y

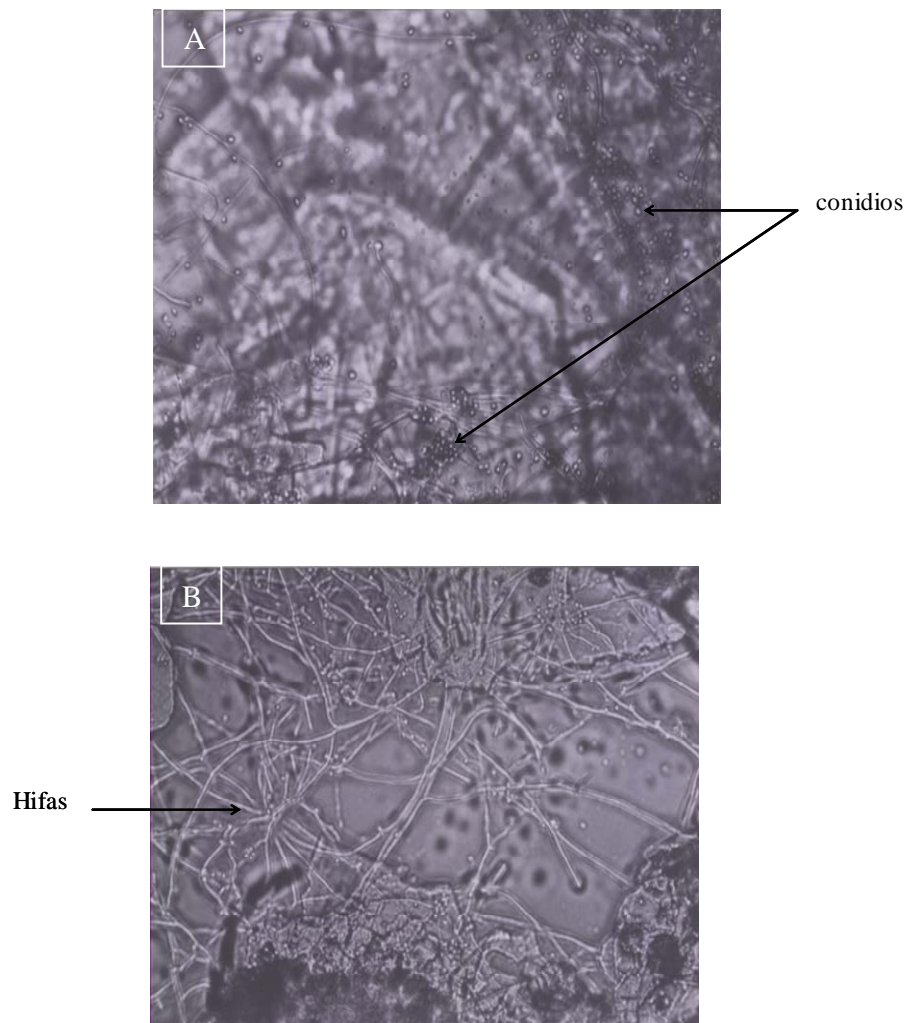
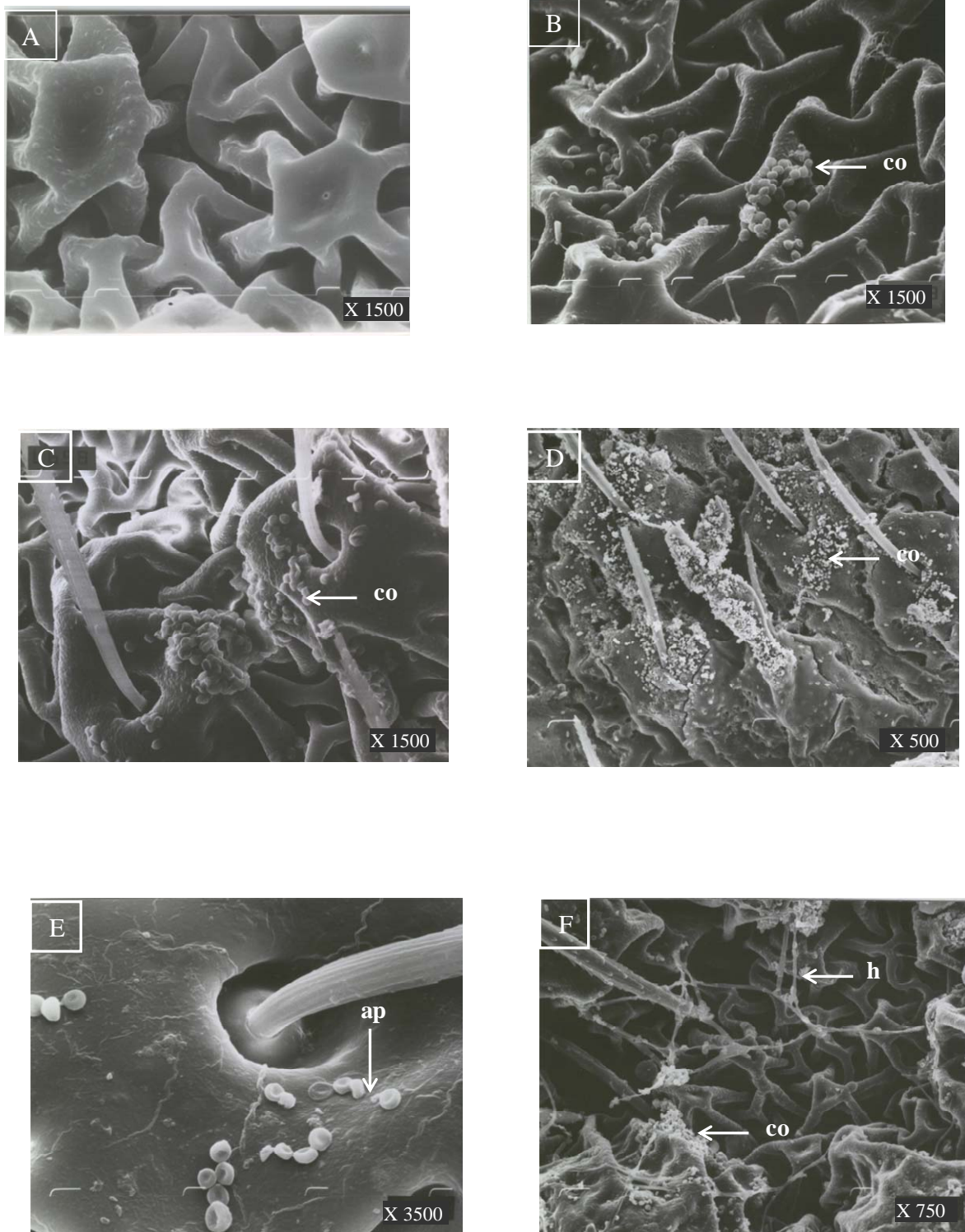


Figura III.4. Fotomicrografía de *Beauveria bassiana* GHA crecida durante 6 días en MM líquido enriquecido con *n*-octacosano. Se observan conidios (A) e hifas (B) como estructuras refringentes sobre la lámina opaca del hidrocarburo utilizado como sustrato. (x 400).

Figura III.5. Microscopía electrónica de barrido de *Beauveria bassiana* GHA FS<sub>0</sub>\* sobre la cutícula de *Triatoma infestans*



\*FS<sub>0</sub>: hongo crecido en medio agar completo con glucosa como se detalla en materiales y métodos

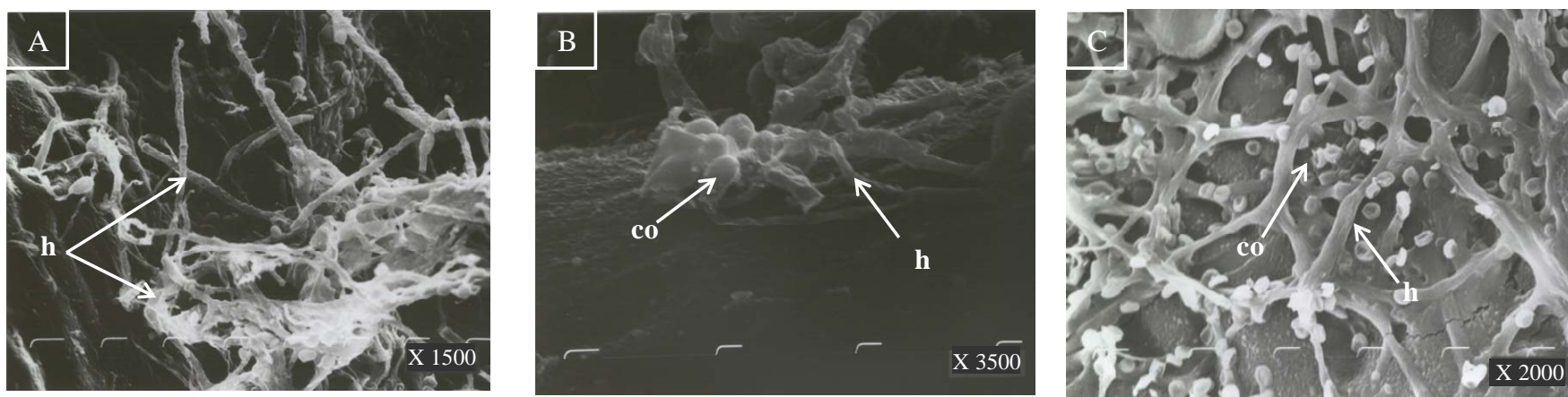
A) Cutícula de ninfa (4to estadio) de *T. infestans* sin infección fúngica. Se observa el patrón estrellado característico (descrito en introducción)

B, C) BbGHA FS<sub>0</sub> crecida sobre la cutícula del insecto después de 24 horas de la infección. Se observan grupos de conidios sin germinar adheridos a la superficie cuticular.

D, E, F) BbGHA FS<sub>0</sub> crecida sobre la cutícula del insecto después de 48 horas de la infección. Se observan conidios asociados principalmente a pelos (D), conidios con el desarrollo de apresorios (E) y el desarrollo de hifas (F).

ap: apresorio, h:hifas, co: conidios

Figura III.6. Microscopía electrónica de barrido de *Beauveria bassiana* GHA FS<sub>2</sub>\* sobre la cutícula de *Triatoma infestans*



A y B) BbGHA FS<sub>2</sub> crecida sobre la cutícula del insecto después de 24 hs de la infección. Se observan hifas agrupadas de manera compacta formando grandes masas fúngicas que se separan fácilmente de la cutícula en el procesamiento del material (A). Se observan además grupos de conidios que originan hifas desarrolladas sobre la superficie cuticular (B).

C) BbGHA FS<sub>2</sub> crecida sobre la cutícula del insecto después de 48 horas de la infección. Se observa el gran desarrollo del cuerpo fúngico con sus hifas y conidios.

\*FS<sub>2</sub>: hongo crecido en medio agar mínimo enriquecido con *n*-octacosano (como se describe en materiales y métodos), h:hifa, co:conidio.

zonas de degradación y/o desintegración.

### III.A.3. Germinación “*in vitro*”

La germinación de conidios generados por BbGHA y Bb10, en medio de cultivo agar y en sustrato sólido respectivamente, se evaluó luego de la incubación del hongo en los siguientes medios acuosos:

#### a) Medio de cultivo líquido.

Los conidios de BbGHA (FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub>) fueron incubados en medio líquido completo y/o en medio mínimo enriquecido con *n*-octacosano. Cuando el hongo FS<sub>0</sub> fue incubado en medio completo el 100% de los conidios germinó a las 12 horas, mientras que se observó un porcentaje menor cuando el hongo (FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub>) fue incubado en medio mínimo conteniendo hidrocarburos. Durante las tres primeras horas de incubación el porcentaje de conidios germinados fue similar en BbGHA FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub> (5-6%), sin embargo a mayor tiempo se observó un incremento del porcentaje únicamente en BbGHA FS<sub>2</sub>, alcanzando un valor máximo de 21% a las 24 horas (Fig. III.7). El comportamiento de los conidios de la cepa control (FS<sub>0</sub>), fue notoriamente distinto al observado en la cepa adaptada (FS<sub>2</sub>). Los conidios FS<sub>0</sub> no presentaron modificaciones en su porcentaje de germinación durante el resto del período de incubación (24 horas), manteniendo un valor máximo de 5,8%, muy inferior al observado en la cepa FS<sub>2</sub> (Fig. III.7). Estos resultados evidenciaron una mayor dificultad de BbGHA FS<sub>0</sub> de germinar en presencia de hidrocarburos como sustrato carbonado durante este período de incubación en las condiciones descritas.

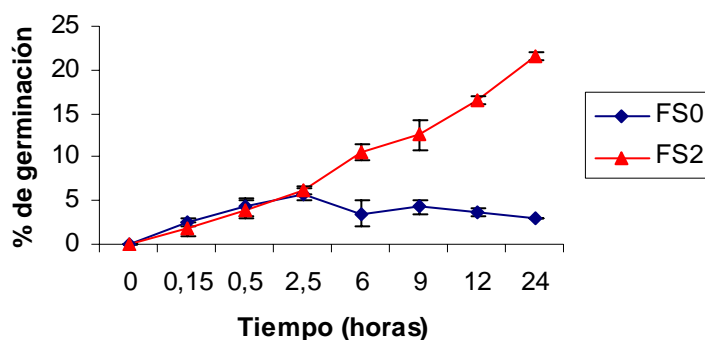


Figura III.7. Porcentaje de germinación de *Beauveria bassiana* GHA. El hongo fue crecido en medio de cultivo agar con glucosa (FS<sub>0</sub>) y en MM enriquecido con *n*-C28 (FS<sub>2</sub>). El porcentaje de germinación se evaluó en medio líquido con *n*-C28 (como se detalla en materiales y métodos).

#### b) Agua.

Los conidios de Bb10 FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub> incubados en un medio acuoso carente de sustratos carbonados, mostraron diferencias en el porcentaje de germinación a tiempos cortos de incubación (Fig. III.8). A las 2,5 horas ya se detectaron en Bb10 FS<sub>2</sub> los valores máximos de germinación (23%). Las cepas FS<sub>0</sub> en cambio, demoraron el desarrollo de tubos germinales con respecto a las cepas FS<sub>2</sub> y alcanzaron los valores máximos a las 6,5 horas de incubación. Si bien los porcentajes máximos fueron similares para ambas cepas, Bb10 FS<sub>2</sub> alcanzó dichos valores antes que Bb10 FS<sub>0</sub>, evidenciando una mayor velocidad de germinación de la misma.

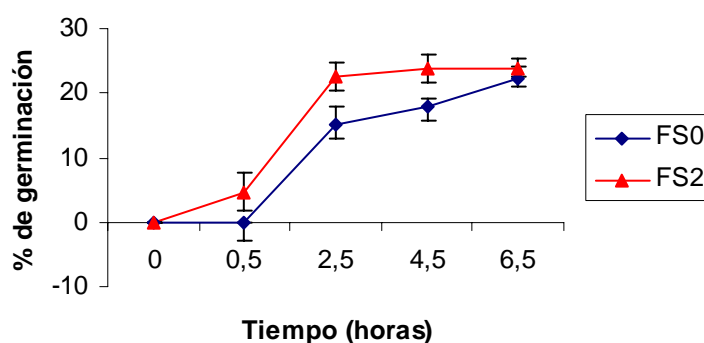


Figura III.8. Porcentaje de germinación de *Beauveria bassiana* 10 crecida en sustrato sólido (FS<sub>0</sub>) y en sustrato sólido + *n*-C28 (FS<sub>2</sub>), evaluada en medio acuoso (como se detalla en materiales y métodos)

### III.A.4. Bioensayos

Estos ensayos se realizaron infectando ninfas de *T. infestans* de 4to estadio y adultos, con distintas cepas de *B. bassiana* crecidas en medios de cultivo conteniendo hidrocarburo o glucosa como fuente de carbono (como se describe en materiales y métodos). La evolución de la enfermedad y el tiempo de mortalidad de los insectos infectados fueron variables de acuerdo a la fuente de carbono utilizada.

#### III.A.4.1. Evolución de la enfermedad

Los insectos infectados con *B. bassiana* FS<sub>0</sub> mostraron una disminución en la velocidad de sus movimientos a partir del 3<sup>er</sup> ó 4<sup>to</sup> día de la infección. Permanecieron la mayor parte del tiempo en estado de reposo con sus patas totalmente flexionadas pero mostraron un comportamiento habitual ante los estímulos externos, con respuestas rápidas de escape y movimientos coordinados. Posteriormente (24 ó 48 horas después), las respuestas a los estímulos fueron progresivamente más lentas y con movimientos sin coordinación, hasta sufrir una parálisis total y muerte del insecto. Los insectos inoculados con los hongos FS<sub>2</sub>, presentaron síntomas de la enfermedad a las 24 horas de la infección, adquiriendo cierta rigidez en sus patas, notablemente visible en su estado de reposo. Sus respuestas a los estímulos externos eran lentas pero aún coordinadas. A partir del 3<sup>er</sup> ó 4<sup>to</sup> día adquirieron una postura corporal rígida y muy elevada con sus patas extendidas. Sólo se evidenciaban algunos signos de vida, como movimiento leves y poco perceptibles de antenas y patas. Finalmente se observó la muerte y momificación del insecto.

#### III.A.4.2. Porcentaje y tiempo de mortalidad de los insectos

Se inocularon ninfas de 4<sup>to</sup> estadio y adultos de *T. infestans* con conidios de *B. bassiana* crecidos en medio de cultivo agar y sustrato sólido con diferentes fuentes de carbono (como se describe en materiales y métodos). Para evaluar la capacidad insecticida del hongo en cada caso, se emplearon los siguientes parámetros de virulencia: porcentaje de mortalidad y TLM. En insectos utilizados como testigos el porcentaje de mortalidad fue menor al 10%. La mortalidad de los insectos por infección fúngica fue corroborada por cámara húmeda (Fig. III.9).

Figura III.9. Ninfas de 4<sup>to</sup> estadio de *Triatoma infestans* infectadas con *Beauveria bassiana*



Se observan tres ninfas de *T. infestans* infectadas con *B. bassiana*. El insecto del centro de la imagen no se colocó en cámara húmeda luego de su muerte, mientras que los insectos a ambos lados del mismo, fueron incubados en cámara húmeda durante 48-72 horas (como se detalla en materiales y métodos). Se observa que en condiciones óptimas de temperatura y humedad (incubación en cámara húmeda) el micelio del hongo emerge del insecto y se desarrolla con su aspecto blanco algodonoso característico (como se describe en introducción). Los dos insectos a la izquierda se dispusieron en posición dorsal, el insecto de la derecha en posición ventral.

A) *T. infestans* infectada con Bb10 adaptada a crecer en medio de cultivo con *n*-octacosano (*n*-C28)

Los bioensayos realizados en ninfas de 4<sup>to</sup> estadio tratadas con Bb10 colocadas en recipientes individuales (como se detalló en materiales y métodos), mostraron variaciones significativas en los parámetros de virulencia del hongo crecido en medio agar mínimo + *n*-C28 (FS<sub>2</sub>), con respecto a los hongos crecidos en glucosa (FS<sub>0</sub>). Con altas concentraciones de conidios (0,5-0,75 x10<sup>8</sup> con/ml) el TLM de las ninfas inoculadas con Bb10 FS<sub>2</sub>, disminuyó significativamente en un 18,5% con respecto al de los insectos tratados con Bb10 FS<sub>0</sub> (Tabla III.1). Asimismo suspensiones conidiales de Bb10 crecida en sustrato sólido enriquecido con *n*-octacosano (FS<sub>2</sub>) produjeron una disminución significativa de 17,1% (Tabla III.1). Con suspensiones conidiales de menor concentración (5 x10<sup>6</sup> conidios/ml) no se observaron variaciones estadísticamente significativas pero se observó una tendencia a incrementar el porcentaje de mortalidad (de 42% a 56%), y disminuir el TLM de los insectos tratados con Bb10 FS<sub>2</sub> con respecto a la cepa control (8,1 ± 1,3 días y 9 ± 2,5 días respectivamente).

Los bioensayos realizados con varios insectos en un mismo recipiente (descrito en materiales y métodos) mostraron una disminución significativa (p<0,02) en el TLM de las ninfas infectadas con Bb10 crecida durante un único período de adaptación en *n*-octacosano (FS<sub>1</sub>) con respecto a los insectos tratados con la cepa control (FS<sub>0</sub>). Los valores obtenidos fueron de 4,30 ± 0,85 días y 5,65 ± 0,21 días, respectivamente. Estos resultados demostrarían que debido al contacto entre insectos, aumentarían las probabilidades de infección, reflejadas en un aumento significativo de la virulencia de los hongos FS<sub>1</sub> con respecto a la cepa control. No se observó diferencia significativa en el TLM de los insectos tratados individualmente con las cepas FS<sub>1</sub> y FS<sub>0</sub>.

En insectos adultos, se observó una disminución en el TLM de los insectos tratados con Bb10 FS<sub>2</sub> con respecto a los tratados con Bb10 FS<sub>0</sub>, como se observó en los estadios juveniles, pero no se obtuvieron datos suficientes para un análisis estadístico adecuado por la interrupción en la provisión del hongo debido a la transferencia del uso de la cepa Bb10 a una empresa biotecnológica.

Tabla III.1. Tiempo letal mediano (TLM) y porcentaje de mortalidad de ninfas de 4<sup>to</sup> estadio de *T. infestans* tratadas con *B. bassiana*10 crecida en medios de cultivo con glucosa y enriquecidos con *n*-octacosano.

Cepa	Medio de cultivo	Fuente de carbono <sup>a</sup>	MLT <sup>b</sup> (días)	% mortalidad	conidios/ml
Bb10	Medio agar	Glucosa (FS <sub>0</sub> )	5.85 ± 0.19	100	0.75 x 10 <sup>8</sup>
		<i>n</i> -octacosano (FS <sub>2</sub> )	4.90 ± 0.41 <sup>d</sup>	100	"
Bb10	FSS <sup>c</sup>	Arroz (FS <sub>0</sub> )	6.12 ± 0.74	100	0.5 x 10 <sup>8</sup>
		Arroz+C28 (FS <sub>2</sub> )	5.04 ± 0.65 <sup>e</sup>	100	"

<sup>a</sup>FS<sub>0</sub>: cepa crecida 12 días en medio de cultivo completo, FS<sub>2</sub>: cepa crecida durante dos períodos de 12 días cada uno en medio de cultivo enriquecido con hidrocarburo (como se describe en materiales y métodos)

<sup>b</sup>Los valores representan promedios de 4-7 replicados de 10 insectos cada una ± desviación estandar.

<sup>c</sup>FSS: fermentación en sustrato sólido

<sup>d</sup> FS<sub>2</sub> y FS<sub>0</sub> significativamente diferente (test *t*-student, P< 0.006).

<sup>e</sup> FS<sub>2</sub> y FS<sub>0</sub> significativamente diferente (test *t*-student, P< 0.03).

B) *T. infestans* infectada con Bb5500 adaptada a crecer en medio de cultivo con *n*-hexadecano (*n*-C16)

Por las razones anteriormente expuestas se utilizó para estos ensayos otra cepa de *B. bassiana*, Bb5500. Los primeros bioensayos se realizaron para confirmar la patogenicidad de la cepa a *T. infestans*. Se observó que Bb5500 es una cepa patógena del insecto pero de menor virulencia que Bb10. El porcentaje de mortalidad de los insectos tratados con altas concentraciones de Bb5500 crecida en glucosa (1 x 10<sup>8</sup> con/ml) fue del orden del 50%, mientras los insectos infectados con Bb10 a menores concentraciones (0,5 x 10<sup>8</sup> con/ml) presentaron 100% de mortalidad (Tabla III.1). Asimismo el TLM fue mayor en los insectos tratados con Bb5500 que en los tratados con Bb10 (Tabla III.1 y III.2).

Cuando se analizaron los parámetros de virulencia de Bb5500 crecida en *n*-hexadecano, no se observaron diferencias significativas en el TLM y en el porcentaje de

mortalidad de las ninfas tratadas con estos hongos con respecto a la cepa control (Tabla III.2).

Tabla III.2. Tiempo letal mediano (TLM) y porcentaje de mortalidad de ninfas de *T. infestans* tratadas con *B. bassiana* 5500 crecida en medios de cultivo con glucosa y enriquecidos con *n*-hexadecano.

Cepa	Medio cultivo	de Fuente carbono	de MLT <sup>a</sup> (días)	% mortalidad	conidios/ml
Bb 5500	Medio agar	Glucosa	9.05 ± 0.62	51.2	1 x 10 <sup>8</sup>
		Hexadecano	8.7 ± 0.68	52.5	1 x 10 <sup>8</sup>

<sup>a</sup>Los valores representan promedios de 8 replicados de 10 insectos (± desviación estandar).

### **III.B. Estudios bioquímicos y metabólicos de hongos entomopatógenos crecidos en medio de cultivo con glucosa o con hidrocarburo como fuente de carbono.**

#### **III.B.1. Composición de lípidos totales**

##### *- Hongos crecidos en medio de cultivo con glucosa*

El análisis por cromatografía HPTLC de los lípidos de Bb10 y Bb5500 crecidas en MC (hongo control: FS<sub>0</sub>), mostró que el componente mayoritario en ambas cepas correspondió a la fracción de los esteroides (Fig. III.10 y III.11). En ambas cepas se observaron además fosfoacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres y triacilglicéridos en proporciones diferentes. En Bb5500 se observó una mayor proporción de ácidos grasos libres que en Bb10, así como una menor proporción de diacilglicéridos. En las dos cepas sin embargo, fue escasa la proporción de triacilglicéridos. En Bb10 se observó que las clases lipídicas mayoritarias de la fracción de lípidos polares, analizadas por TLC tal como se describe en materiales y métodos, fueron fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y fosfatidilinositol.

El peso seco de lípidos totales (determinado como se detalla en materiales y métodos) fue de 24,7 mg/gr de hongo (w/w) en las colonias de Bb5500.

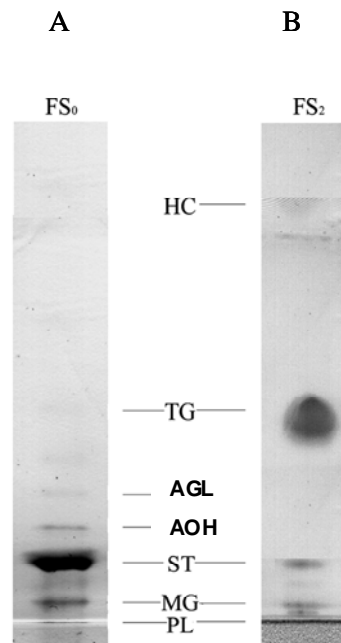


Figura III.10. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de la composición de lípidos totales de *Beauveria bassiana* 10 crecida en medio de cultivo completo (A) y en medio de cultivo mínimo enriquecido con *n*-octacosano (B). La mezcla de solventes utilizada fue la siguiente: hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1). HC, hidrocarburos; TG, triacilglicéridos; AGL, ácidos grasos libres; AOH, alcoholes; ST, esteroides; MG, monoacilglicéridos; PL, lípidos polares.



Figura III.11. Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) de la composición de lípidos totales de *Beauveria bassiana* 5500 crecida en medio de cultivo completo. La mezcla de solventes utilizada fue la siguiente: hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1). AGL, ácidos grasos libres; ST, esteroides; PL, lípidos polares.

*-Hongos crecidos en medio de cultivo con hidrocarburos*

Bb10 crecida en MM + *n*-C28 (cepa adaptada: FS<sub>2</sub>) mostró una composición lipídica notablemente diferente de la cepa control. La figura III.10 ilustra las variaciones cuantitativas en las clases de lípidos de las cepas crecidas en ambas condiciones de cultivo. En Bb10 FS<sub>2</sub> predominaron los triacilglicéridos y fosfoacilglicéridos, pero se detectaron además pequeñas cantidades de esteroides y del resto de los componentes presentes en la cepa control. Asimismo se observó mayor cantidad de lípidos de muy baja polaridad (detectados próximos al frente del solvente)(Fig. III.10B) que en la cepa control (Fig. III.10A). Éstos corresponderían a los hidrocarburos del hongo junto con el hidrocarburo remanente no metabolizado utilizado como fuente de carbono.

La composición de los lípidos polares fue cualitativamente similar a la cepa control, con un predominio de las fracciones correspondientes a fosfatidilcolina/fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina.

Bb10 adaptada mostró un patrón lipídico similar al de la cepa control luego de permanecer 12-14 días a 4 °C.

En la cepa Bb5500 no se detectaron variaciones en el perfil de lípidos mayoritarios (esteroides y fosfoacilglicéridos) cuando se utilizó *n*-hexadecano como fuente de carbono. Sin embargo, la cantidad de lípidos totales fue notablemente menor.

La composición y estructura de los hidrocarburos y ácidos grasos de los hongos crecidos en glucosa y en alcanos (detallados previamente), fueron analizadas mediante cromatografía gaseosa capilar y espectrometría de masa como se describe a continuación.

**III.B.2. Análisis por CGC y CGC-MS de los ácidos grasos**

Los ácidos grasos obtenidos de los lípidos totales de las cepas Bb10 y Bb5500 crecidas en distintas fuentes de carbono fueron derivatizados a sus ésteres metílicos para su análisis por CGC y CGC-MS (como se describe en materiales y métodos).

*- Hongos crecidos en medio de cultivo con glucosa*

En la cepa Bb10 se observó un elevado porcentaje de ácidos grasos de cadenas pares de átomos de carbono (Tabla III.3 columna 1). Los ácidos grasos insaturados mayoritarios fueron el ácido linoleico (48,9%) y ácido oleico (10%), mientras que los

ácidos grasos saturados mayoritarios fueron el ácido palmítico (28,9%) y el ácido esteárico (5,5%). Se observaron ácidos grasos impares y de largas cadenas carbonadas en pequeñas cantidades, o como componentes traza. En la cepa Bb5500 (Tabla III. 4 columna 1) también se observó un alto porcentaje de ácidos grasos pares insaturados, en este caso el ácido oleico representó un 60,6% y el ácido linoleico un 14,6%. Se detectaron asimismo pequeños porcentajes de ácidos grasos monoinsaturados de 16, 17 y 20 átomos de carbono. Los principales ácidos grasos saturados detectados fueron el ácido palmítico (12,4%) y el ácido esteárico (5,5%).

La composición de los ácidos grasos de las cepas Bb10 y Bb5500 es cualitativamente similar en ambas cepas, aunque difieren cuantitativamente (Tablas III.3 y III 4, Fig. III.12). Se observaron diferencias significativas en los ácidos grasos mayoritarios, ácido palmítico, ácido oleico y ácido linoleico. Asimismo se observó que el ácido linoleico fue el ácido mayoritario en Bb10 mientras que en la cepa Bb5500 fue el ácido oleico (Fig. III.12).

*-Hongos crecidos en medio de cultivo con n-octacosano*

Se observaron diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición de ácidos grasos de Bb10 crecida en MC (FS<sub>0</sub>) y en MM+C28 (FS<sub>2</sub>) (Tabla III.3, Fig. III.13). En los hongos FS<sub>0</sub> se observó que los ácidos mayoritarios (que representan más del 90% de los ácidos grasos totales) fueron compuestos de cadenas pares de átomos de carbono,

Tabla III.3. Composición porcentual de ácidos grasos de *Beauveria bassiana* 10

Acido graso	<i>Beauveria bassiana</i> 10	
	FS0 <sup>a</sup>	FS2 <sup>b</sup>
15:0	1.7 ± 0.3	1.1 ± 0.4
16:0	28.9 ± 2.7	26.7 ± 15.7
16:1	1.4 ± 0.2	3.2 ± 2.9
17:0	2.1 ± 0.2	18.5 ± 4.4
17:1	0.3 ± 0.0	6.9 ± 4.6
18:0	5.5 ± 0.8	7.5 ± 4.9
18:1	10.0 ± 0.6	9.1 ± 5.3
18:2	48.9 ± 1.8	4.7 ± 4.1
19:0	n/d	0.5 ± 0.1
19:1	n/d	0.8 ± 0.4
20:0	3.0 ± 3.1	18.3 ± 5.1
22:0	tr	3.7 ± 1.8
Insaturados/ saturados	1.5	0.3
Pares/ impares	23.8	2.6

<sup>a</sup> Bb10 FS<sub>0</sub>: crecida en medio agar con glucosa (MC)

<sup>b</sup> Bb10 FS<sub>2</sub>: crecida en medio agar enriquecido con *n*-octacosano (MM+C28) como se detalla en materiales y métodos.

Los datos representan valores promedios ± desviación estándar, n=4

tr=trazas

n/d= no detectado

Tabla III.4. Composición porcentual de ácidos grasos de *Beauveria bassiana* 5500

Acido graso	<i>Beauveria bassiana</i> 5500	
	FS0 <sup>a</sup>	FS1 <sup>b</sup>
14:0	tr	0.5 ± 0.13
15:0	tr	0.5 ± 0.04
16:0	12.4 ± 1.6	21.8 ± 4.35
16:1	1.94 ± 0.1	2.1 ± 0.18
17:0	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.04
17:1	0.5 ± 0.07	0.5 ± 0.02
18:0	5.5 ± 3.1	5.2 ± 1.02
18:1	60.6 ± 5.1	39.1 ± 2.01
18:2	14.6 ± 1.15	26.2 ± 3.65
18:3	1.1 ± 1.02	1.6 ± 0.10
20:1	2.2 ± 1.2	1.5 ± 0.37
Insaturados/ saturados	4.3	2.4
Pares/ impares	75.6	58

<sup>a</sup> Bb5500 crecida en medio agar con glucosa (MC) como se detalla en materiales y métodos. Los datos representan valores promedios ± desviación estándar, n=4.

<sup>b</sup> Bb5500 crecida en medio agar enriquecido con *n*-hexadecano (MM+C16) como se detalla en materiales y métodos. Los datos representan valores promedios ± desviación estándar, n=3.

tr=trazas

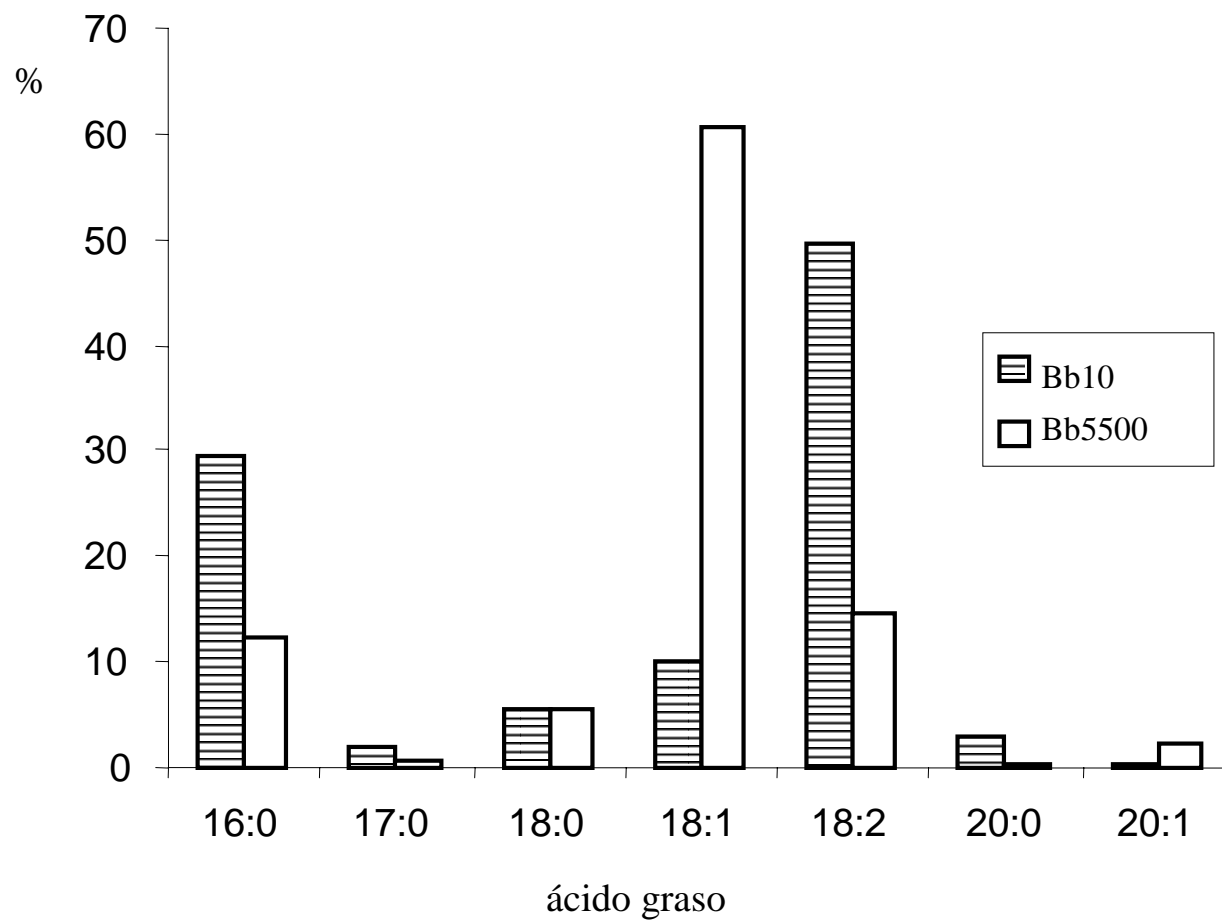
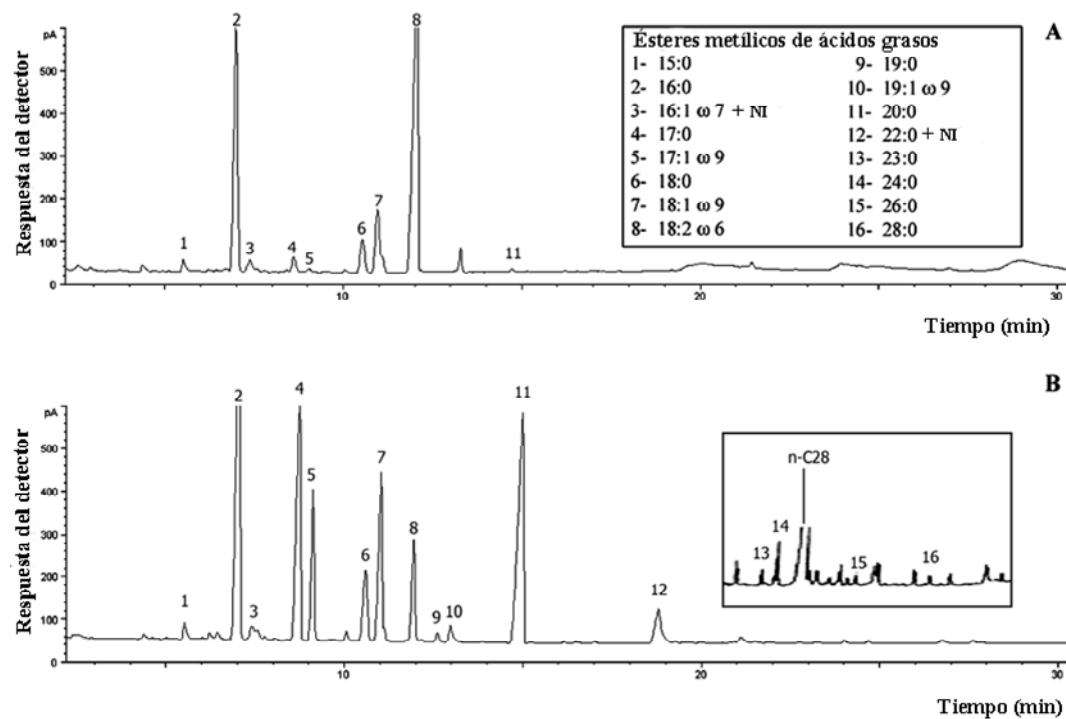


Figura III.12. Comparación de los ácidos grasos mayoritarios de dos cepas de *Beauveria bassiana* crecidas en medio de cultivo con glucosa.

Figura III.13. Análisis por cromatografía gaseosa capilar de los ésteres metílicos de ácidos grasos de *Beauveria bassiana*.



Bb10 crecida en medio de cultivo con glucosa (FS<sub>0</sub>) (A) y Bb10 crecida con hidrocarburo como fuente de carbono (FS<sub>2</sub>)(B). El inserto en B muestra la presencia de *n*-octacosano (identificado por espectrometría de masa) utilizado como sustrato para el crecimiento del hongo.

saturados e insaturados (16:0, 18:0, 18:1 y 18:2). Los ácidos grasos de cadena impar representaron sólo un 4,1%. En Bb10 FS<sub>2</sub> en cambio, se observó un predominio de ácidos grasos saturados con un alto porcentaje de compuestos de cadena impar de átomos de carbono (27,8%). Los ácidos palmítico, heptadecanoico y eicosanoico fueron los componentes mayoritarios representando el 26,7%, 18,5% y 18,3% respectivamente. El incremento de la síntesis de ácidos grasos saturados e impares, principalmente el ácido heptadecanoico, determinó una importante modificación en la relación insaturados/saturados, y pares /impares de los hongos FS<sub>2</sub> con respecto a la cepa control (Tabla III.3). Asimismo se observaron trazas de ácidos de muy largas cadenas carbonadas (22:0, 23:0, 24:0, 26:0 y 28:0) no detectados en la cepa control.

La identidad de los ácidos grasos fue corroborada mediante el análisis de los patrones de fragmentación de cada uno de los compuestos analizados por GCG-MS. Asimismo se detectó en pequeñas cantidades, y se identificó por su patrón característico de fragmentación el *n*-C28, hidrocarburo utilizado como fuente de carbono para el desarrollo del hongo (Fig. III.13, inserto). A pesar de los sucesivos procesos de extracción y purificación de ácidos grasos, tal como se detalla en materiales y métodos, el hidrocarburo remanente (no metabolizado por el hongo) se observó reiteradamente como contaminante en las muestras de *B. bassiana* crecida en medios de cultivo con *n*-octacosano.

#### *-Hongos crecidos en medio de cultivo con n-hexadecano*

Los perfiles de ácidos grasos obtenidos de Bb5500 crecida en hidrocarburo de longitud de cadena mediana (*n*-hexadecano), fueron similares cualitativamente a los obtenidos en Bb5500 crecida en glucosa. Sin embargo, se observaron diferencias cuantitativas significativas en sus componentes principales (Tabla III.4). En ambas cepas el ácido oleico fue el componente mayoritario seguido de los ácidos linoleico y palmítico, sin embargo en la cepa adaptada se observó un incremento en la síntesis de los ácidos palmítico y linoleico, en tanto el ácido oleico disminuyó proporcionalmente con respecto a la cepa control (Tabla III.4). En consecuencia se observó un cambio en la relación ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados de 4.3 en la cepa control a 2.4 en la cepa adaptada.

### **III.B.3. Composición de hidrocarburos**

El análisis por CGC y CGC-MS de dos cepas de *B. bassiana* y una cepa de *M. anisopliae* mostró que los hidrocarburos de estos hongos corresponden principalmente a una serie de alcanos lineales con un rango de 15 a 38 átomos de carbono y una distribución homogénea de cadenas pares e impares (Fig. III.14 y III.15). Se calcularon las longitudes de cadena equivalentes (LCE) y la identidad de estos compuestos se confirmó mediante el análisis por GCG-MS en base a sus patrones de fragmentación (Tabla III.5). Se detectaron trazas de hidrocarburos metil ramificados tales como monometilalcanos, en su mayoría con el grupo metilo ubicado en posiciones internas (carbonos 8-, 9-, 10- y 11-). En algunos casos, el grupo metilo se detectó en posición central como en el 19-trimetilheptatriacontano, o bien en una posición terminal como en los hidrocarburos 2- y 3-metilnonacosano y 4-metiloctacosano. Asimismo se detectaron trazas de hidrocarburos di y trimetilramificados tales como el 2,8-dimetilpentacosano y el 3,9,13-trimetilpentacosano.

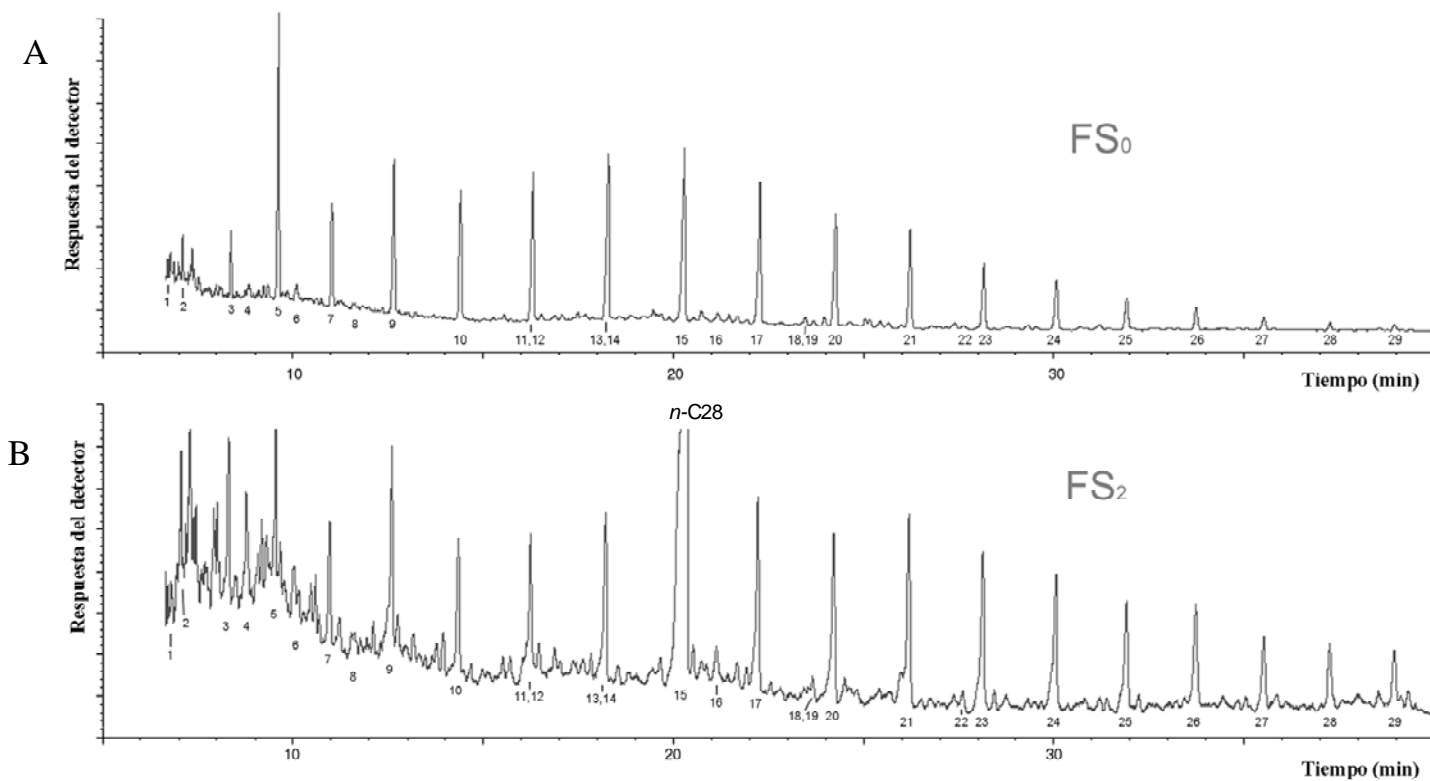
*- Hongos crecidos en medio de cultivo con glucosa*

El análisis comparativo de los hidrocarburos de dos cepas de *B. bassiana* (Bb10 y Bb5) y una cepa de *M. anisopliae* (Ma6), mostró variaciones interespecíficas así como entre las cepas analizadas. En las dos cepas de *B. bassiana* los componentes mayoritarios fueron hidrocarburos de cadenas pares de átomos de carbono. En Bb10 el componente mayoritario fue el *n*-C22 (Fig. III.14A) mientras que en la cepa Bb5 predominaron los hidrocarburos *n*-C22, *n*-C24, *n*-C28 y *n*-C32 (Fig. III.15A). Los hidrocarburos obtenidos de Ma6 en cambio, mostraron una distribución homogénea con proporciones similares de hidrocarburos pares e impares (Fig. III.15B).

Los hidrocarburos de Bb5 y Ma se analizaron en un período anterior a la adquisición del cromatógrafo de primera generación (HP 6890) como fue descrito en materiales y métodos. Estos análisis se efectuaron en un cromatógrafo Shimadzu R9A sin regulación automática de flujo, entre otras diferencias de avance tecnológico con respecto al HP 6890, operando en condiciones de menor sensibilidad como se describió en materiales y métodos (Fig. III.15).

*-Hongos crecidos en medio de cultivo con n-octacosano*

Los perfiles cromatográficos de Bb10 FS<sub>2</sub> no mostraron diferencias cualitativas con los perfiles de Bb10 crecida en glucosa, pero se observó un incremento en la cantidad

Figura III.14: Análisis por cromatografía gaseosa capilar de los hidrocarburos de *Beauveria bassiana*.

Bb10 crecida en medio de cultivo con glucosa (FS<sub>0</sub>) (A) y Bb10 crecida en medio de cultivo con octacosano como única fuente de carbono (FS<sub>2</sub>) (B). El pico mayoritario en B corresponde al hidrocarburo utilizado como fuente carbono. Los números corresponden a los hidrocarburos detallados en la tabla III.5.

Tabla III.5. Hidrocarburos de *Beauveria bassiana*<sup>a</sup>

Número de pico <sup>b</sup>	Hidrocarburo	LCE	Iones diagnósticos
1	9-metiloctadecano	18.30	140/141, 154/155
2	<i>n</i> -eicosano	20.00	282
3	<i>n</i> -heneicosano	21.00	296
4	8-, 10-metil heneicosano	21.36	126/127, 154/155
5	<i>n</i> -docosano	22.00	310
6	11-metil docosano	22.40	168/169, 182/183
7	<i>n</i> -tricosano	23.00	324
8	9-metil tricosano	23.32	140/141, 190/191
9	<i>n</i> -tetracosano	24.00	338
10	<i>n</i> -pentacosano	25.00	352
11	3,9,13-trimetil + 4,8- y 2,8-dimetilpentacosano	25.95	154/155, 196/197, 224/225, 264/265, 362/363, 392/393 140/141, 264/265, 308/309
12	hexacosano	26.00	366
13	No identificado	26.95	
14	<i>n</i> -heptacosano	27.00	380
15	<i>n</i> -octacosano	28.00	394
16	4-metil + 9,19-dimetiloctacosano	28.51	364/365, 408 140/141, 154/155, 292/293
17	<i>n</i> -nonacosano	29.00	408
18	2-metilnonacosano	29.56	378/379, 408
19	3-metilnonacosano + 4,10-dimetilnonacosano	29.66	364/365, 422 168/169, 296/297, 364/365, 392/393
20	<i>n</i> -triacontano	30.00	422
21	<i>n</i> -hentriacontano	31.00	436
22	5,15-dimetil hentriacontano + no identificado	31.77	238/239, 252/253, 406/407
23	<i>n</i> -dotriacontano	32.00	450
24	<i>n</i> -tritriacontane	33.00	464
25	<i>n</i> -tetratriacontane	34.00	478

---

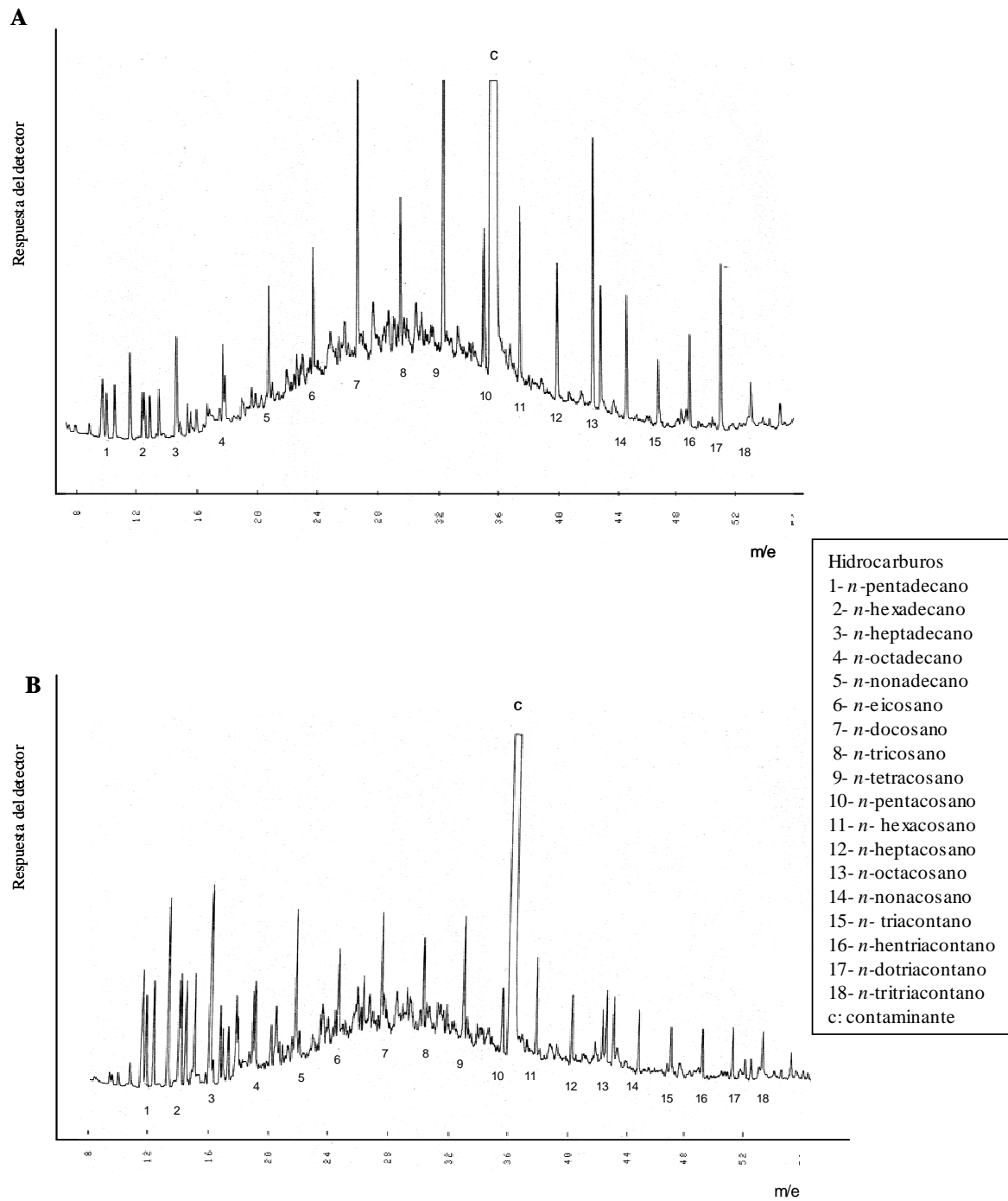
26	n-pentatriacontane	35.00	492
27	n-hexatriacontane	36.00	506
28	n-heptatriacontane	37.00	520
29	n-octatriacontane	38.00	534

---

<sup>a</sup>Bb10 crecida en medio agar con glucosa (MC) como se detalla en materiales y métodos. La longitud de cadena equivalente (LCE) fue calculada como se describe en materiales y métodos. Los números fraccionarios de LCE indican la presencia de ramificación.

<sup>b</sup>Los números corresponden a los hidrocarburos de la figura III.14.

Figura III.15. Análisis por cromatografía gaseosa capilar de los hidrocarburos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*



Bb5 (A) y Ma ESC1 (B) crecidas en medio de cultivo con glucosa como fuente de carbono (FS<sub>0</sub>).

relativa de los hidrocarburos de muy largas cadenas (con más de 28 carbonos) con respecto a esta cepa control (Fig. III.14).

La obtención y purificación de los hidrocarburos fúngicos presentó serios inconvenientes debido a la presencia de proteínas hidrofóbicas de bajo peso molecular y solubles en el solvente orgánico (hexano) utilizado para la extracción de los hidrocarburos. Si bien se realizaron varios métodos de separación por filtración y precipitación proteica (descritos en materiales y métodos), se logró una escasa eficiencia de purificación. La fracción de hidrocarburos obtenidos de Bb10 crecida en *n*-octacosano fue extremadamente escasa e implicó el procesamiento de gran cantidad de material para su detección. Estos contaminantes proteicos se depositaron en la columna cromatográfica, así como en el inyector del cromatógrafo, por lo que no fue posible incrementar el número de repeticiones estadísticamente representativas para una cuantificación de los hidrocarburos fúngicos.

#### **III.B.4. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOC)**

Los metabolitos volátiles producidos por Bb10 y Bb GHA crecidas en distintas fuentes de carbono se analizaron por CGC y CGC-MS empleando la técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME). En la tabla III.6 se detallan los componentes identificados. La tabla III.7 muestra el porcentaje relativo de los VOC mayoritarios obtenidos luego de un período de 6 días de incubación de Bb GHA en medio agar con glucosa (FS<sub>0</sub>) o con *n*-octacosano (FS<sub>2</sub>). Con períodos de incubación más cortos, de dos a tres días, los perfiles cromatográficos fueron similares pero de menor magnitud, lo que dificultó la cuantificación.

##### *- Hongos crecidos en medio de cultivo con glucosa*

Los compuestos detectados en los hongos crecidos en glucosa empleando dos clases de fibras diferentes CAR/PDMS y PDMS/DVB, fueron cualitativamente similares y la identidad de los mismos fue asignada de acuerdo al análisis de los patrones de fragmentación de cada uno de los compuestos detectados por GCG-MS (tabla III.6). Los componentes mayoritarios detectados fueron diisopropilnaftalenos, alcohol etílico,

Tabla III.6. Identificación de los compuestos orgánicos volátiles (VOC)  
de *B. bassiana*<sup>a</sup> por SPME-CGC-MS

Compuesto	LCE	Iones diagnósticos
Etanol		31, 45
No identificado	6.65	
No identificado	6.69	
n-Decano	10.00	142
Benceneacetaldehído	10.25	65, 91, 120
Alquil benceno 1	10.44	91, 119, 134
Alquil benceno 2	10.74	119, 134
Alquil benceno 3	10.83	91, 119, 134
Metil alquil cetona 1	10.94	43, 57, 127
n-Undecano	11.00	156
Alquil benceno 4	11.26	91, 119, 134
Naftaleno	11.93	128
n-Dodecano	12.00	170
Metil alquil cetona 2	12.77	43, 58, 59
Sesquiterpeno 1	14.07	67, 93, 105, 119, 161, 189, 204
No identificado	14.63	
1-pentadeceno	14.97	210
Sesquiterpeno 2	14.99	91, 105, 119, 133, 161, 189, 204
Sesquiterpene 3	15.16	93, 105, 119, 161, 189, 204
Sesquiterpeno 4	15.23	67, 93, 105, 119, 189, 204
Sesquiterpeno 5	15.48	105, 119, 161, 204
n-Hexadecano	16.00	226
Diisopropil naftaleno 1	16.32	141, 155, 197, 212
Diisopropil naftaleno 2	16.69	141, 155, 197, 212

<sup>a</sup>Bb10 crecida en medio agar con glucosa (MC) y analizada por SPME-CGC-MS.

La longitud de cadena equivalente (LCE) fue calculada como se describe en materiales y métodos.

Los compuestos asignados tentativamente como alquilbencenos, sesquiterpenos y diisopropil naftalenos en función de sus patrones de fragmentación, se numeran en forma creciente al tiempo de elución.

derivados de alquilbencenos y sesquiterpenos (tabla III.7). Los perfiles cromatográficos fueron sin embargo, cualitativamente diferentes de acuerdo a la fibra utilizada. Empleando la fibra CAR/PDMS se observaron perfiles cromatográficos con un elevado porcentaje de compuestos de corta longitud de cadena y alta polaridad como el alcohol etílico, que representó más del 50% de los VOC colectados, mientras que los alquilnaftalenos representaron sólo el 20,5%. Por el contrario mediante el análisis de los VOC con la fibra PDMS/DVB, se observó un perfil con sólo un 10,2% de alcohol etílico y un alto porcentaje de compuestos de mayor peso molecular como los derivados de alquilnaftalenos (57,73%), derivados de alquilbencenos (11,23%) y sesquiterpenos (6,44%) (Tabla III.7).

Debido a la captación selectiva de cada fibra, observada en estos ensayos, se seleccionó (para el análisis comparativo de los VOC producidos por el hongo crecido en glucosa o en hidrocarburo) la fibra PDMS/DVB, por captar mayor proporción de los compuestos de polaridad intermedia.

#### *-Hongos crecidos en medio de cultivo con n-octacosano*

Se observó una modificación sustancial en el perfil de los VOC en función de la fuente de carbono utilizada. En hongos crecidos en hidrocarburo, el *n*-decano fue el componente mayoritario (82,2%), seguido de los compuestos derivados de alquilnaftalenos (15,8%). Asimismo se observaron sólo trazas del resto de los componentes detectados en los hongos crecidos en glucosa (Tabla III.7).

#### *-Hongos crecidos en medio de cultivo con n-tetracosano*

Estos ensayos fueron efectuados con anterioridad a la adquisición del sistema SPME. La metodología utilizada para la extracción de los compuestos volátiles de Bb10 crecida en MM + *n*-tetracosano fue empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, temperatura y jeringa especial para gases, tal como se detalló en materiales y métodos. Cuando se analizaron los VOC del hongo por CGC, se detectó un pico mayoritario con un tiempo de retención equivalente al estándar de ácido acético (Fig. III.16). El análisis por CGC-MS permitió identificar en forma concluyente al ácido acético por la presencia de los fragmentos característicos de masa 43, 45 y 60 (inserto Fig. III.16).

Tabla III.7. Compuestos orgánicos volátiles (VOC) mayoritarios de *Beauveria bassiana* analizados por SPME-CGC

Compuesto <sup>b</sup>	Porcentaje de VOC <sup>a</sup>	
	Cepas crecidas en glucosa (FS <sub>0</sub> ) <sup>c</sup>	Cepas crecidas en n-octacosano (FS <sub>2</sub> ) <sup>c</sup>
	PDMS/DVB	PDMS/DVB
Etanol	10.22 ± 2.57	tr
No identificado	7.74 ± 1.23	tr
No identificado	3.49 ± 0.56	tr
<i>n</i> -Decano	tr	84.21 ± 5.47
Alquil benceno 2	4.98 ± 1.66	tr
Alquil benceno 4	6.25 ± 0.95	tr
Sesquiterpeno 1	0.22 ± 0.08	tr
No identificado	1.62 ± 0.24	tr
Sesquiterpeno 4	5.08 ± 1.19	tr
Sesquiterpeno 5	1.14 ± 0.12	tr
<i>n</i> -Hexadecano	1.52 ± 0.27	tr
Diisopropil naftaleno 1	22.18 ± 1.05	6.59 ± 2.39
Diisopropil naftaleno 2	35.55 ± 3.00	9.20 ± 3.15

<sup>a</sup>Valores promedios ocho repeticiones ± error estándar.

<sup>b</sup>Los compuestos se identificaron por CGC-MS y se detallan en tabla III.6.

<sup>c</sup>Como se describe en materiales y métodos.

tr: trazas.

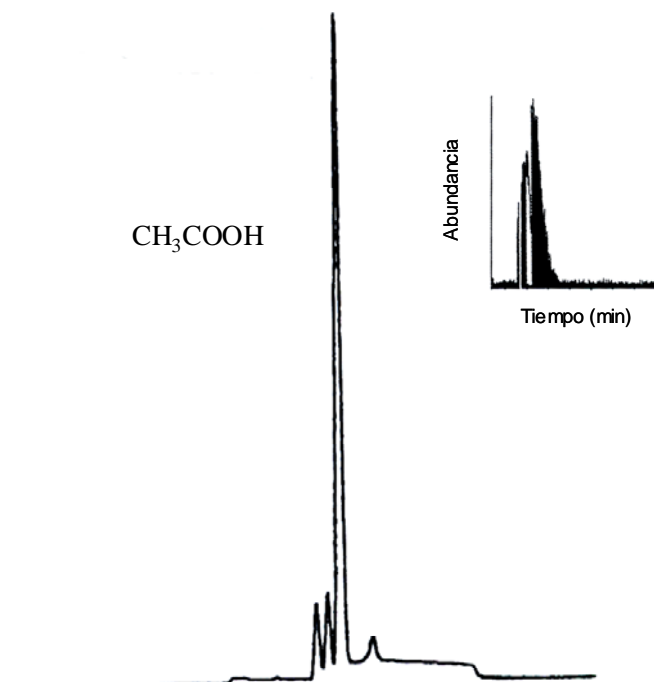


Figura III.16. Perfil cromatográfico de CGC-MS de los compuestos orgánicos volátiles producidos por *Beauveria bassiana*10 crecida en medio de cultivo mínimo enriquecido con *n*-tetracosano. Inseto: Abundancia de los fragmentos iónicos de  $m/z$  43, 45 y 60.

### III.B.5. Metabolismo de lípidos

Se realizaron ensayos “*in vivo*” con cepas de *B. bassiana* o *M. anisopliae* incubadas durante 48 horas en medio de cultivo mínimo conteniendo los siguientes precursores radiactivos, utilizados como trazadores metabólicos: [ $^{14}\text{C}$ ] acetato, [ $^{14}\text{C}$ ] n-hexadecano y [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano. Se cuantificó la incorporación de la radiactividad en las diferentes cepas y se analizó la distribución de la marcación en las distintas clases de lípidos.

#### III.B.5.1. Incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ] acetato

##### a) Incorporación porcentual de la radiactividad

La cuantificación se realizó en un contador de centelleo líquido como se detalló en materiales y métodos.

##### - Hongos crecidos en medio de cultivo con glucosa

*B. bassiana*<sub>10</sub> crecida en glucosa (FS<sub>0</sub>) incorporó un 23,8% de [ $^{14}\text{C}$ ] acetato en sus componentes celulares. Un 19% de la radiactividad fue incorporada en compuestos lipídicos y un 4.8% en metabolitos solubles en la fracción acuosa (Tabla III.8).

##### - Hongos crecidos en medio de cultivo con *n*-tetracosano

La incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ] acetato por *B. bassiana*<sub>10</sub> adaptada (FS<sub>2</sub>) se redujo a un 8,6%, con un bajo porcentaje de incorporación en los compuestos lipídicos (5.3%) y una incorporación de 3.3% en la fase acuosa. Estos resultados evidenciaron un incremento relativo de los metabolitos polares en Bb10 (FS<sub>2</sub>) comparado con la cepa control (Tabla III.8).

Tabla III.8. Distribución porcentual de la radiactividad incorporada por *Beauveria bassiana* 10 crecida en [1-<sup>14</sup>C]acetato de sodio.

Condiciones de crecimiento	Fase orgánica	Fase acuosa	Número de ensayos (n)
FS <sub>0</sub> <sup>a</sup>	19.0 ± 8.0	4.8 ± 0.7	5
FS <sub>2</sub> <sup>b</sup>	5.3 ± 3.0	3.3 ± 0.6	7

<sup>a</sup>FS<sub>0</sub>: Bb10 crecida 12 días en MC e incubada 2 días en MM+ [<sup>14</sup>C]acetato,

<sup>b</sup>FS<sub>2</sub>: Bb10 crecida 12 días en MM + n-C24 e incubada 2 días en MM + [<sup>14</sup>C]acetato.

Los valores representan el promedio de los porcentajes de recuperación ± desviación estándar.

#### **b) Análisis de la distribución de la radiactividad en las diferentes fracciones lipídicas.**

La detección de radiactividad en las placas de radio-TLC se realizó en un contador de radiactividad por barrido (scanner) tal como se describió en materiales y métodos.

##### *- Hongos crecidos en medio de cultivo con glucosa*

Se observó que Bb10 crecida en glucosa e incubada 48 horas en [<sup>14</sup>C] acetato, incorporó la marcación principalmente en la fracción de [<sup>14</sup>C] fosfoacilglicéridos, y en menor proporción en la fracción de [<sup>14</sup>C] triacilglicéridos y [<sup>14</sup>C] ácidos grasos libres. Se detectó también una importante incorporación de radiactividad en la fracción de [<sup>14</sup>C] hidrocarburos (Fig. III.17).

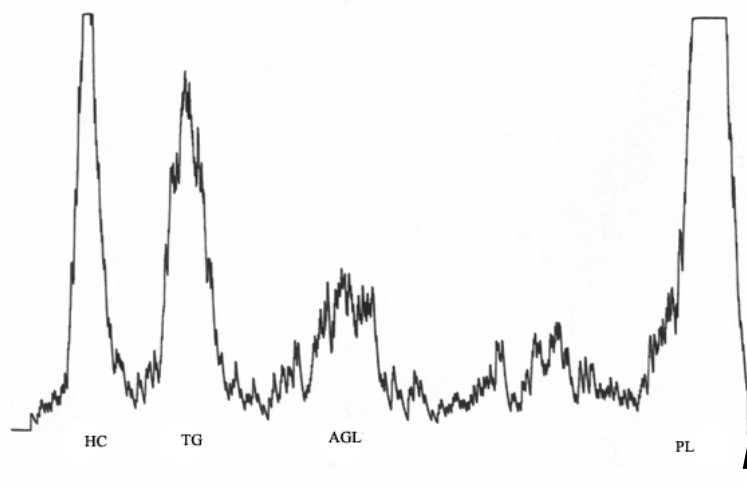


Figura III.17. Análisis por radio-TLC de los extractos lipídicos de Bb10 FS<sub>0</sub> incubada 48 horas en medio de cultivo mínimo conteniendo [<sup>14</sup>C] acetato. La mezcla de solventes utilizada fue hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1). HC: hidrocarburo; TG: triacilglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; PL: lípidos polares. La flecha indica el origen de la corrida.

Cuando se analizó la incorporación de [<sup>14</sup>C] acetato en los lípidos de BbGHA, se observó un perfil lipídico diferente al de Bb10 crecida en condiciones de cultivo similares. BbGHA incorporó un mayor porcentaje de radiactividad en la fracción correspondiente a los alcoholes grasos con respecto a la cepa Bb10, y no se detectó síntesis de hidrocarburos (Fig. III.18).

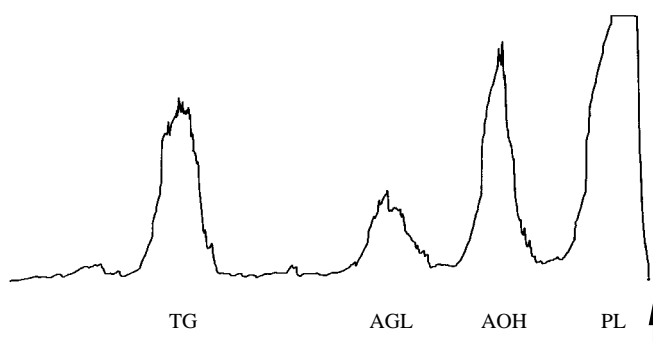


Figura III.18. Análisis por radio-TLC de los extractos lipídicos de BbGHA FS<sub>0</sub> incubada 48 horas en medio de cultivo conteniendo [<sup>14</sup>C] acetato. La mezcla de solventes utilizada fue hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1). TG: triacilglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; AOH: alcoholes; PL: lípidos polares. La flecha indica el origen de la corrida.

*-Hongos crecidos en medio de cultivo con n-tetracosano*

Bb10 crecida en hidrocarburo (FS<sub>2</sub>) mostró un metabolismo marcadamente diferente a la cepa control, debido a que incorporó el acetato radiactivo únicamente en la fracción de los lípidos polares (Fig. III.19). En esta fracción se observó que la radiactividad fue incorporada principalmente en la zona de elución de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol (zona PC/PI), con una escasa incorporación en fosfatidiletanolamina (inserto Fig. III.19).

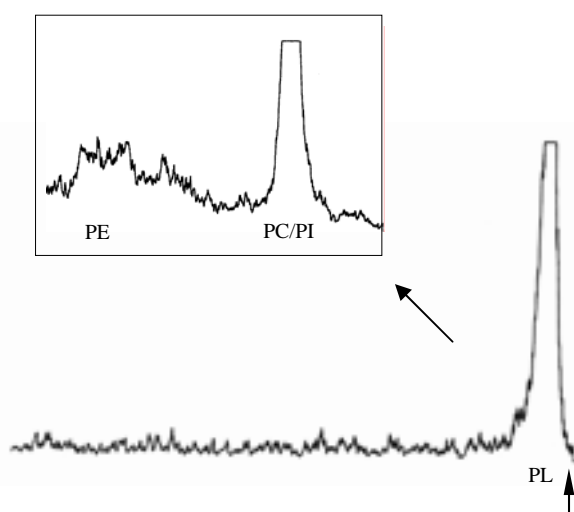


Figura III.19. Análisis por radio-TLC de los extractos lipídicos de Bb10 crecida en MM+ *n*-tetracosano (FS<sub>2</sub>), repicada e incubada 48 horas en un medio de cultivo conteniendo [<sup>14</sup>C] acetato. La mezcla de solventes utilizada fue hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1). PL, lípidos polares. Inserto: análisis por radio-TLC de la fracción de lípidos polares. La mezcla de solventes utilizada fue cloroformo: metanol: ácido acético: agua (65:25:3:1,5). PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol. La flecha indica el origen de la corrida.

### III.B.5.2. Utilización de [<sup>14</sup>C] *n*-hexadecano

*- Hongos crecidos en medio de cultivo con glucosa*

Las cepas de *B. bassiana*, BbGHA y Bb5500, incubadas con un hidrocarburo de larga cadena ([<sup>14</sup>C] *n*-hexadecano) incorporaron radiactividad únicamente en la fracción de los lípidos polares. La escasa radiactividad detectada en la fracción de hidrocarburos correspondería al hidrocarburo remanente no utilizado por el hongo, a hidrocarburos del hongo, o a una combinación de ambos (Fig. III.20).

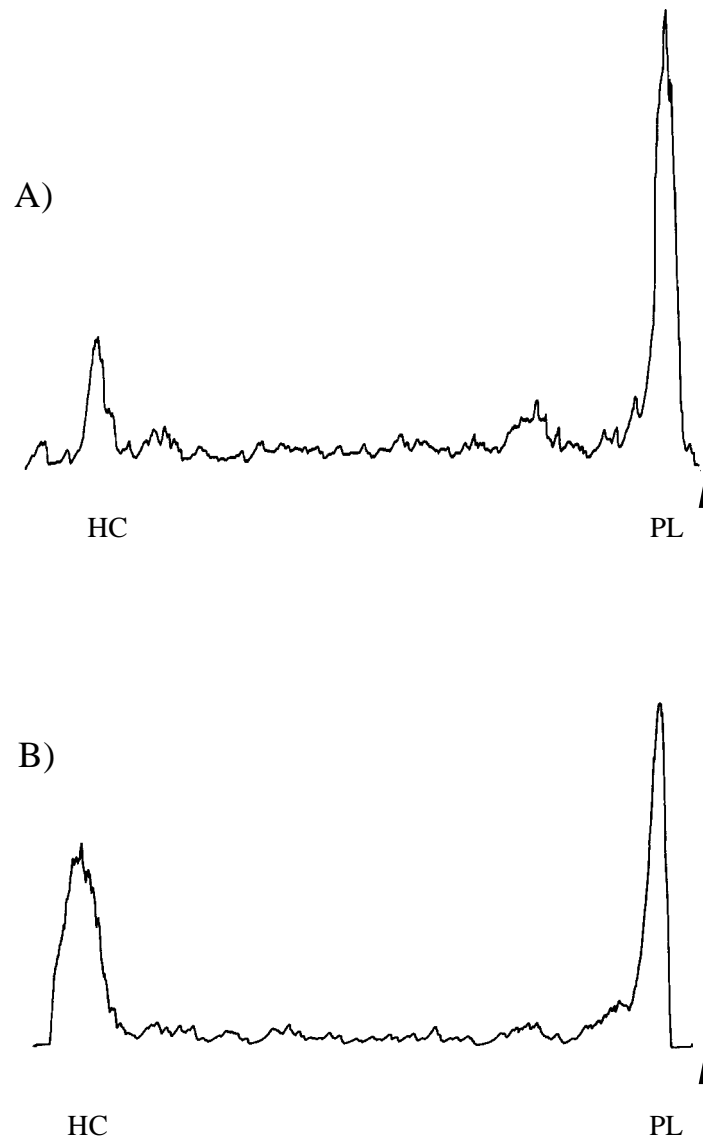


Figura III.20. Análisis por radio-TLC de los extractos lipídicos de *B. bassiana* GHA (A) y *B. bassiana* 5500 (B) crecidas en medio con glucosa, repicadas e incubadas 48 horas en un medio de cultivo conteniendo [ $^{14}\text{C}$ ] *n*-hexadecano. La mezcla de solventes utilizada fue la siguiente: hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1). HC: hidrocarburos; PL: lípidos polares. Las flechas indican el origen de las corridas.

### **III.B.5.3. Utilización de [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano**

#### **III.B.5.3.1. Incorporación de los productos de degradación de [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano en lípidos totales**

##### **a) Incorporación porcentual de la radiactividad**

Se cuantificó la radiactividad incorporada en las dos fases obtenidas de la partición del extracto lipídico según el método de Folch (como se detalla en materiales y métodos). En la fase orgánica se obtuvieron los compuestos lipídicos sintetizados por el microorganismo, así como el hidrocarburo remanente (sustrato que no fue metabolizado por el hongo), mientras que la fase acuosa contenía los productos metabólicos de alta polaridad (Tabla III.9). En Ma6 no se detectaron diferencias en la incorporación de radiactividad entre las cepas control y adaptadas. En las cepas Bb10 y Bb5, en cambio, se detectó una incorporación de 2,8 y 1,8 veces menor, respectivamente, en la fase orgánica de las cepas adaptadas con respecto a las cepas control. Asimismo se observó un incremento en el porcentaje relativo de la fase acuosa con respecto a la fase orgánica en los hongos adaptados (Tabla III.9).

Tabla III.9. Distribución porcentual de la radioactividad incorporada por cepas entomopatógenas (*B. bassiana* 10, *B. bassiana* 5 y *M. anisopliae* 6) crecidas en [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano como única fuente de carbono.

Cepa fúngica	Condiciones de cultivo <sup>a</sup>	Fase orgánica <sup>b</sup>	Fase acuosa <sup>c</sup>
Ma6	FS <sub>0</sub>	56.1 ± 2.9	3.3 ± 2.6
	FS <sub>2</sub>	53.6 ± 7.3	3.5 ± 0.5
Bb10	FS <sub>0</sub>	62.9 ± 4.5	2.7 ± 1.0
	FS <sub>2</sub>	21.9 ± 15.1	1.9 ± 0.8
Bb5	FS <sub>0</sub>	54.9 ± 19.3	4.1 ± 1.5
	FS <sub>2</sub>	29.8 ± 8.3	4.3 ± 1.9

<sup>a</sup>Cepas crecidas 12 días en medio agar con extracto de levadura (FS<sub>0</sub>) o con hidrocarburo (FS<sub>2</sub>) y luego incubadas durante 48 horas en medio mínimo + [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano como se describe en materiales y métodos.

<sup>b</sup>Radiactividad detectada en lípidos.

<sup>c</sup>Radiactividad incorporada en metabolitos solubles en agua.

Los datos representan valores promedios ± desviación estándar, n=4

## b) Análisis de la distribución de la radiactividad en las diferentes fracciones lipídicas

### - Hongos crecidos en medio de cultivo con glucosa

Las fracciones orgánicas de las cepas Ma6, Bb10, Bb5 y BbGHA se analizaron por radio-TLC (como se describe en materiales y métodos). Las tres cepas de *B. bassiana* mostraron perfiles similares con un alto porcentaje de incorporación de radiactividad en la fracción de los ácidos grasos libres, mientras que las fracciones correspondientes a triacilglicéridos, alcoholes y compuestos polares presentaron menores valores de incorporación (Fig. III.21). El pico mayoritario de [ $^3\text{H}$ ]-hidrocarburos correspondería en su mayor parte al sustrato no metabolizado.

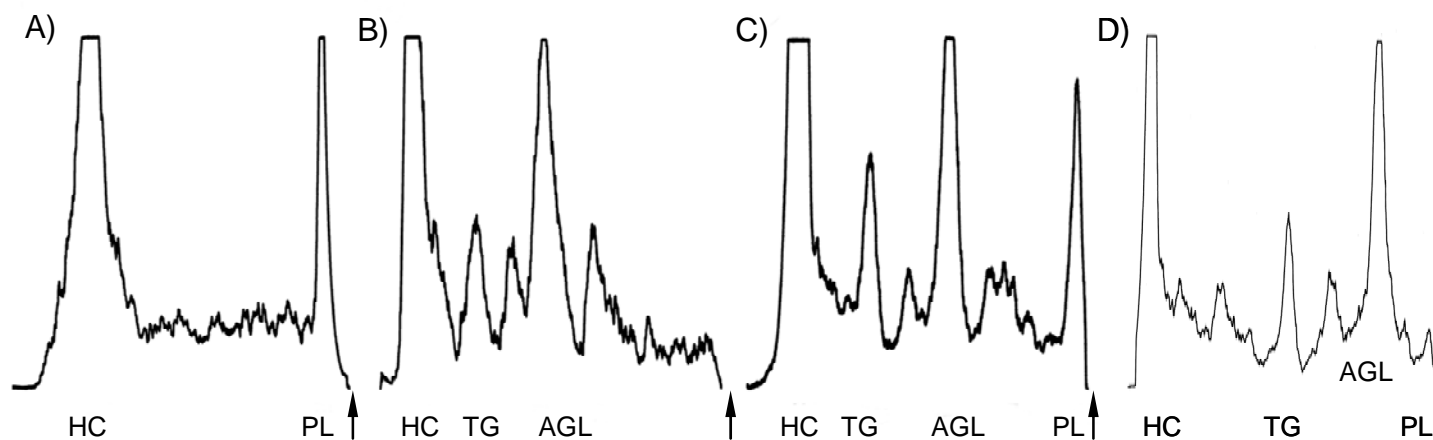


Figura III.21. Análisis por radio-TLC de los extractos lipídicos de *Metarhizium anisopliae* FS<sub>0</sub> y *Beauveria bassiana* FS<sub>0</sub>, incubados durante 48 horas en MM+ [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano como única fuente de carbono. A) Ma6, B) Bb10, C) Bb5, D) Bb5500. La mezcla de solventes utilizada fue: hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1). HC, hidrocarburos; TG, triacilglicéridos; AGL, ácidos grasos libres; PL, lípidos polares. Las flechas indican el origen de las corridas.

La cepa de Ma6, en cambio, incorporó radiactividad principalmente en la fracción de lípidos polares (Fig. III.21). Esta fracción extraída y analizada por radio-TLC con un sistema de solventes adecuado para separar compuestos de alta polaridad mostró incorporación de radiactividad únicamente en fosfatidiletanolamina (Fig. III.22). El análisis de la distribución de la marcación en ácidos grasos se detalla en el ítem siguiente (III.B.5.3.2).

*-Hongos crecidos en medio de cultivo con n-octacosano*

Las cepas de Bb10 adaptadas (FS<sub>2</sub>) mostraron un perfil cromatográfico similar al obtenido en las cepas control, con un alto porcentaje de incorporación en la fracción de ácidos grasos libres y triacilglicéridos, y una menor incorporación en alcoholes y fosfoacilglicéridos. La cepa de Ma6 FS<sub>2</sub> en cambio, mostró un perfil diferente al hongo crecido en glucosa. Se detectó radiactividad en las fracciones de ácidos grasos libres y lípidos polares. La marcación en la fracción de hidrocarburos correspondería al sustrato remanente (Fig. III.23).

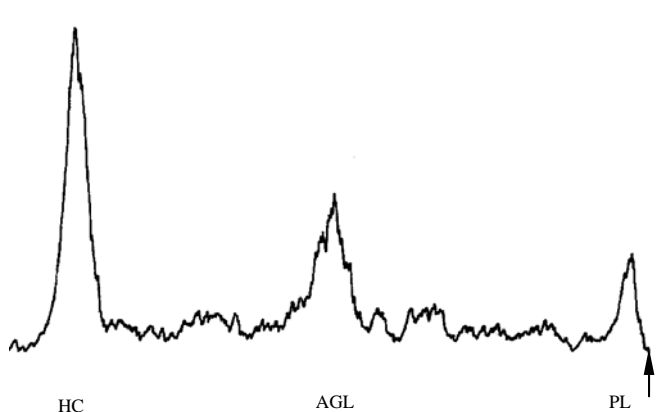


Figura III.23. Análisis por radio-TLC de los extractos lipídicos de *Metarhizium anisopliae* 6 (FS<sub>2</sub>), repicada e incubada 48 horas en [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano. La mezcla de solventes utilizada fue la siguiente: hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:1). PL, lípidos polares; AGL, ácidos grasos libres; HC, hidrocarburos. La flecha indica el origen de la corrida.

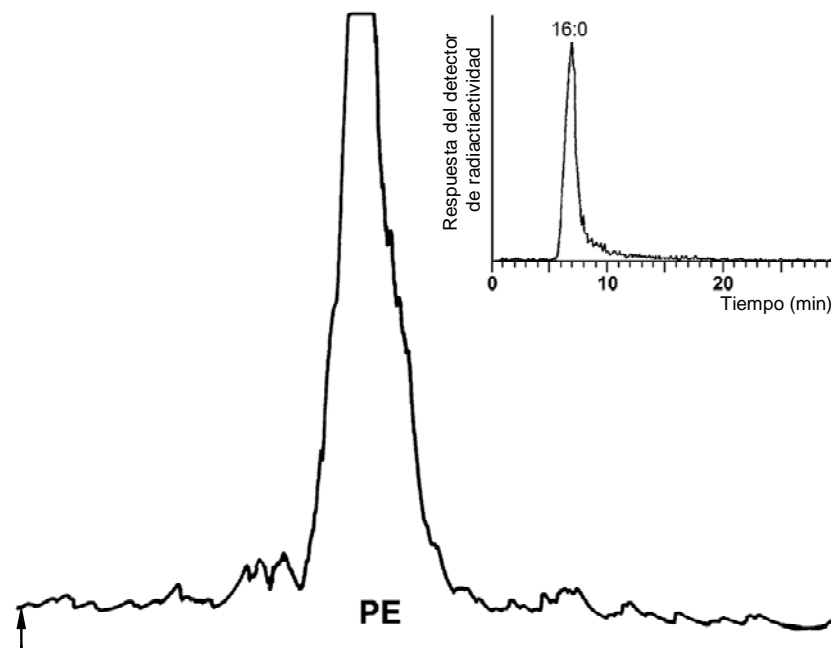


Figura III.22. Análisis por radio-TLC de la fracción de lípidos polares de *Metarhizium anisopliae* 6 FS<sub>0</sub> incubado durante 48 horas en MM + [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano como única fuente de carbono (como se describe en mat y met). La mezcla de solventes utilizada fue la siguiente: cloroformo: metanol: ácido acético: agua (65:25:3:1,5). PE: fosfatidiletanolamina. Inserto: análisis por radio-HPLC de los ácidos grasos de PE. 16:0, ácido palmítico. La flecha indica el origen de la corrida.

### **III.B.5.3.2. Incorporación de los productos de degradación de [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano en ácidos grasos**

#### *- Hongos crecidos en medio de cultivo con glucosa*

Los ácidos grasos de las fracciones lipídicas que incorporaron un mayor porcentaje de radiactividad en las distintas cepas, se analizaron por radio-HPLC (como se describe en materiales y métodos). En Ma6 se analizó la fracción de los lípidos polares (Fig. III.21.A) y se detectó radiactividad principalmente en el ácido palmítico (Fig. III.22, inserto). En Bb10 se analizó la fracción de los ácidos grasos libres (Fig. III.21.B) y se observó la incorporación de radiactividad en varios compuestos. El ácido graso que incorporó la mayor cantidad de marcación fue un ácido graso de longitud de cadena mediana, que eluyó posteriormente al ácido decanoico sembrado como estándar, mientras que menor incorporación de radiactividad se detectó en los ácidos palmítico y ácido oleico (Fig. III. 24).

Se detectaron además trazas del [<sup>3</sup>H] hidrocarburo utilizado como sustrato, a pesar de todos los procesos de purificación realizados durante las distintas etapas de la obtención de las muestras (mencionadas en materiales y métodos).

### **III.B.5.3.3. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOC), producto de degradación del [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano**

En los ensayos descritos en el ítem III.B.5.3.1, se observó que en los hongos incubados con [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano, la recuperación total de la radiactividad (fase orgánica más fase acuosa) fue de alrededor del 60% en las tres cepas analizadas (Ma6, Bb10 y Bb5) (Tabla III.9). Un porcentaje aún menor se detectó en las cepas adaptadas de Bb10 y Bb5, con una recuperación total de 24-34%. Estos resultados evidenciaron que un alto porcentaje de la radiactividad inicial no fue recuperada con el diseño experimental utilizado (cultivo en placas de Petri). Considerando la posible formación de compuestos volátiles no colectados con este diseño, se utilizó un diseño de cultivo diferente empleando viales cerrados herméticamente (viales HSA) y la técnica de muestreo del espacio de cabeza para el estudio de los VOC liberados por el hongo (como se describe en materiales y métodos).

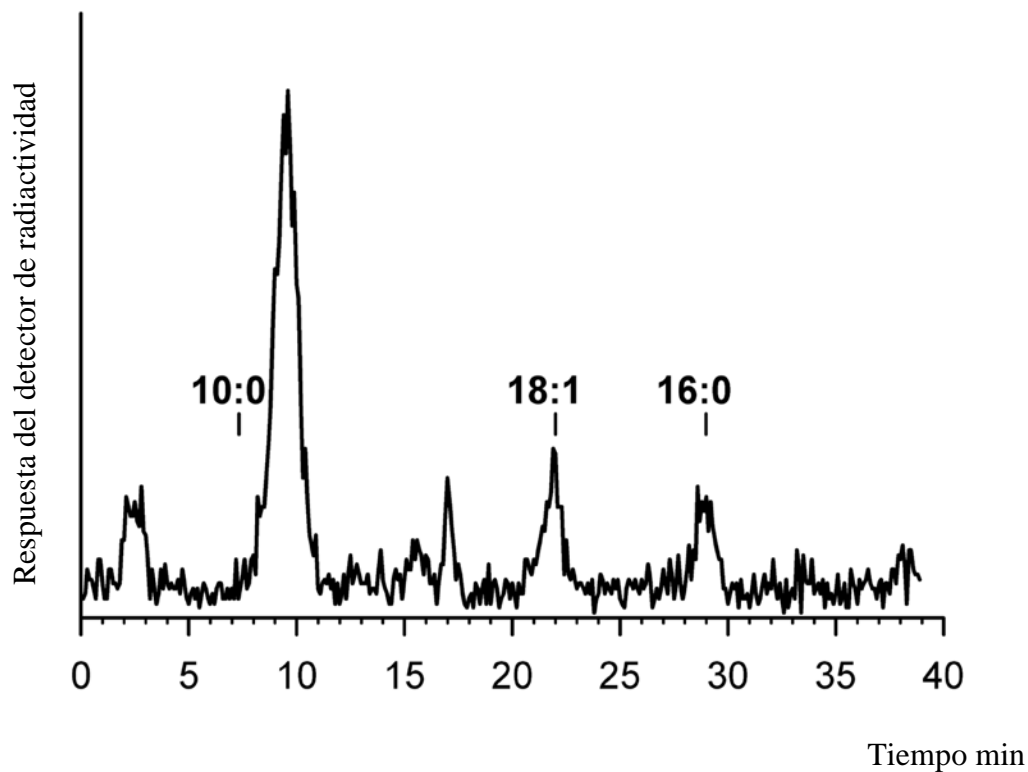


Figura III.24. Análisis por radio-HPLC de los ácidos grasos libres del extracto lipídico de *Beauveria bassiana* 10 FS<sub>0</sub> incubada durante 48 horas en un MM + [<sup>3</sup>H]-octacosano como única fuente de carbono.

- *Análisis e identificación de los VOC radiactivos*

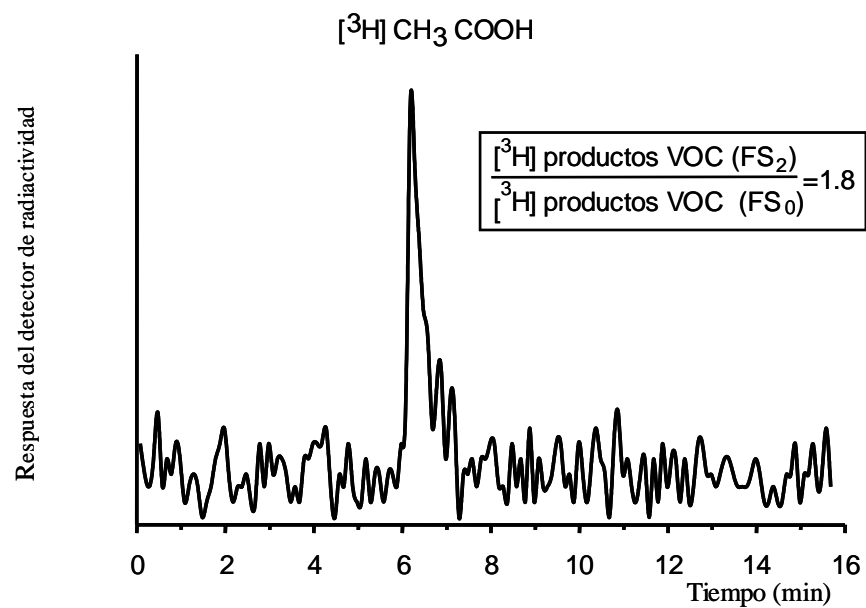
Los [<sup>3</sup>H] VOC producidos por *B. bassiana*10 (FS<sub>0</sub> y FS<sub>2</sub>) por incubación durante 48 horas en viales HSA con MM + [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano, fueron colectados utilizando jeringas Hamilton para gases, y se analizaron por radio-HPLC (como se describe en materiales y métodos). Se detectó un único pico de radiactividad con un tiempo de retención coincidente con el estándar de [<sup>14</sup>C] ácido acético sembrado en idénticas condiciones (Fig. III.25). La identidad de este compuesto se corroboró por GCG-MS como se detalló en ítem III.B.4 (Fig. III.16).

- *Cuantificación de los VOC radiactivos*: El [<sup>3</sup>H] ácido acético liberado por *B. bassiana*10 crecida durante 48 horas en los viales HSA, fue colectado por arrastre y cuantificado con un contador de centelleo líquido (como se detalla en materiales y métodos). Se observó que la cantidad de [<sup>3</sup>H] volátiles liberados por Bb10 adaptada (FS<sub>2</sub>) fueron muy superiores (1,8 veces superior) a los detectados en la cepa control (Fig. III.25, inserto).

#### III.B.5.3.4. Cuantificación de [<sup>3</sup>H]-vapor de H<sub>2</sub>O producido durante la degradación del [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano

Las cepas Bb10 y Ma6 crecidas en glucosa (FS<sub>0</sub>) se incubaron 48 horas en placas de Petri con medio MM + [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano. En el interior de cada placa se colocó también una trampa conteniendo K(OH) para coleccionar y cuantificar el [<sup>3</sup>H]-vapor de H<sub>2</sub>O producido por el hongo durante su crecimiento (como se detalla en materiales y métodos). En Ma6 se detectó  $1,73 \pm 1,6$  % de la radiactividad incorporada como [<sup>3</sup>H]-vapor de H<sub>2</sub>O (n=16), mientras que en Bb10 se recuperó un  $0,2 \pm 0,1$  % (n=3).

La detección de [<sup>3</sup>H] ácido acético y [<sup>3</sup>H] H<sub>2</sub>O como producto del metabolismo de [<sup>3</sup>H] *n*-octacosano, condujo al planteo de la vía de β-oxidación como posible ruta de degradación de este sustrato en *B. bassiana* y *M. anisopliae*, en analogía a los procesos de oxidación de hidrocarburos de cadenas medianas estudiados en bacterias y levaduras (como se detalla en introducción). En los hongos, particularmente, dicho proceso metabólico ocurre únicamente en los peroxisomas. La catalasa es una enzima marcadora de estas organelas. Con el objetivo de analizar un parámetro marcador de β-oxidación (asociada a la degradación de hidrocarburos) en *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se realizó un estudio preliminar de esta enzima.

Figura III.25: Análisis por radio-HPLC de los [ $^3\text{H}$ ]-VOC producidos por *Beauveria bassiana*

Bb10 crecida en medio con glucosa (FS<sub>0</sub>), repicada e incubada durante 48 horas en un medio con [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano como única fuente de carbono. Inserto: Bb10 adaptada a crecer en hidrocarburos (FS<sub>2</sub>) liberó mayor cantidad de VOC que la cepa control (FS<sub>0</sub>).

### III.B.6. Caracterización preliminar de la enzima catalasa

La actividad de la enzima catalasa, marcadora de proliferación peroxisomal, fue medida en homogenato y pellet de 20,000 xg de *B. bassiana* adaptada (FS<sub>2</sub>) y control (FS<sub>0</sub>) crecidas en medio de cultivo agar o en sustrato sólido (como se detalla en materiales y métodos).

#### A) Actividad de la catalasa en homogenato de *Beauveria bassiana*

##### - *Bb10* incubada en medio de cultivo agar

En homogenato de las colonias FS<sub>0</sub> la actividad específica detectada, fue de  $83 \pm 20$  U/mg, mientras que en las colonias desarrolladas en medios de cultivo con *n*-octacosano (FS<sub>2</sub>) se observó un aumento significativo de la actividad específica de la enzima alcanzando valores de  $149 \pm 23$  U/mg ( $p < 0,0001$ ) (Tabla III.10).

##### - *Bb10* incubada en sustrato sólido (FSS)

Cuando se utilizó el grano de arroz como sustrato sólido, no se observó una diferencia significativa de actividad de catalasa en Bb10 FS<sub>2</sub>, con respecto a los hongos control (FS<sub>0</sub>). La gran cantidad de proteína exógena (arroz) en el homogenato de los hongos producidos por FSS, requirió una etapa de centrifugación posterior (20,000xg) para comparar la actividad enzimática en los hongos adaptados y control.

Cabe destacar que cuando la fuente de carbono utilizada fue un extracto de hidrocarburos cuticulares del insecto huésped (arroz recubierto con HC cuticulares), se observó un incremento altamente significativo de la actividad de la enzima ( $p < 0,0001$ ), siendo 1,24 veces mayor que la detectada en la cepa control (Tabla III.10). En este caso el gran incremento de actividad de la enzima en el hongo, fue fácilmente detectado a pesar de la proteína exógena.

Tabla III.10. Actividad de catalasa en homogenato de *Beauveria bassiana*10.

Medio de cultivo	Fuente de carbono <sup>a</sup>	Actividad específica (U/mg)
Medio agar	Glucosa (FS <sub>0</sub> )	83 ± 19
	<i>n</i> -octacosano (FS <sub>2</sub> )	149 ± 23
FSS <sup>b</sup>	Arroz (FS <sub>0</sub> )	96 ± 40
	Arroz + <i>n</i> -C28 (FS <sub>2</sub> )	119 ± 41
	Arroz + hidrocarburos de insectos (FS <sub>2</sub> )	267 ± 108

<sup>a</sup>FS<sub>0</sub>: cepa crecida 12 días en medio de cultivo completo; FS<sub>2</sub>: cepa crecida durante dos períodos de 12 días cada uno, en medio de cultivo enriquecido con hidrocarburo (como se describe en materiales y métodos)

<sup>b</sup>FSS: fermentación en sustrato sólido

Los datos representan valores promedios de n=10-40 ± desviación estándar

## B) Actividad de la catalasa en el pellet de 20,000xg de *Beauveria bassiana*

- *Bb10* incubada en sustrato sólido (FSS)

Se observó un incremento significativo de actividad en el hongo adaptado FS<sub>2</sub> con respecto a la cepa control (p<0,0001). La actividad de la catalasa en el precipitado de 20,000xg de *Bb10* adaptada fue 6,6 veces mayor, con valores de 139 ± 72 U/mg y 1063 ± 190 U/mg para *Bb10* FS<sub>0</sub> y *Bb10* FS<sub>2</sub> respectivamente (Fig.III.26). Los datos representan valores promedios de n=9-14 ± desviación estándar.

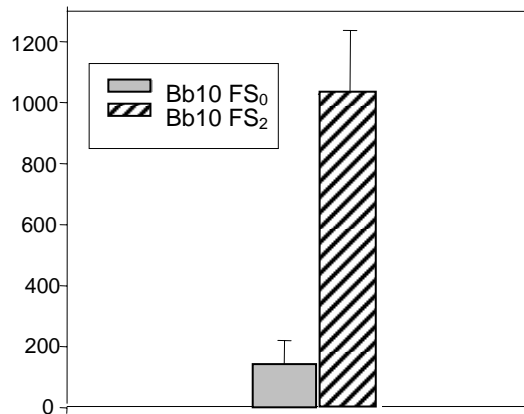


Figura III.26. Actividad específica de catalasa en pellet de 20,000xg de *Beauveria bassiana*10 crecida en sustrato sólido (FS<sub>0</sub>) y en sustrato sólido con *n*-octacosano (FS<sub>2</sub>).

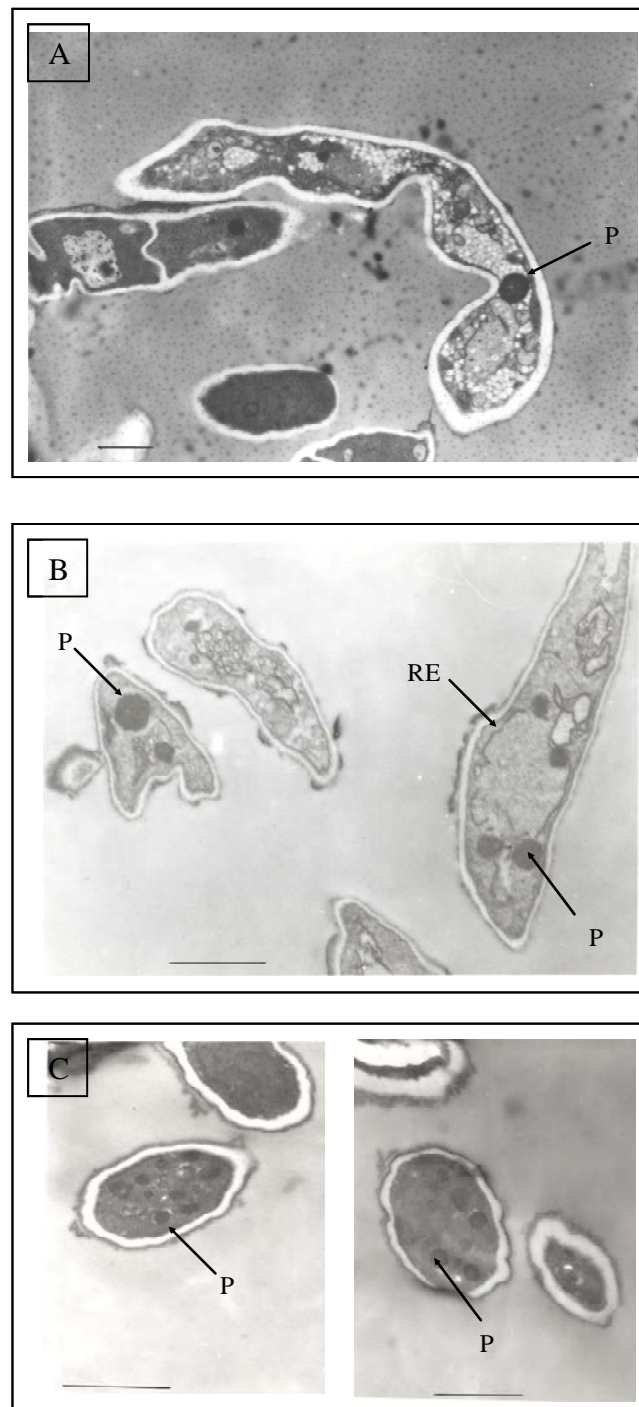
#### - *Bb10* incubada en medio de cultivo agar

Se realizó el fraccionamiento subcelular del homogenato obtenido de Bb10, pero el pellet de 20000xg no pudo ser cuantificado con un número de mediciones estadísticamente representativas debido a que, la mayor parte del material disponible se utilizó en el proceso de puesta a punto del protocolo a utilizar que fue muy difícil debido a inconvenientes técnicos (espectrofotómetros fuera de funcionamiento, entre otros). Una interrupción imprevista en el suministro de la cepa (transferencia a empresa biotecnológica) impidió la finalización de los ensayos.

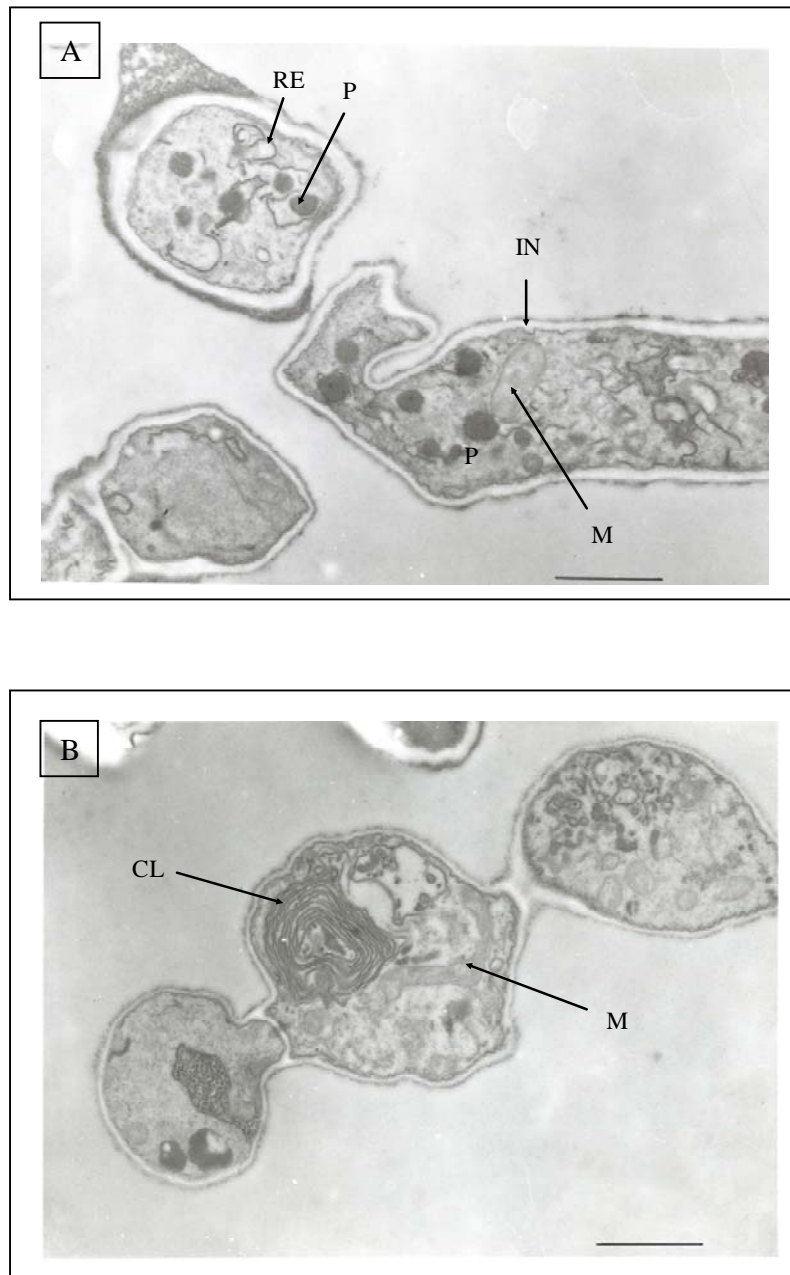
### III.B.7. Ultraestructura de *Beauveria bassiana* crecida en medio de cultivo con glucosa o con hidrocarburos como fuente de carbono

Se observaron cortes sagitales y longitudinales de hifas y conidios crecidos en medio de cultivo agar con glucosa (FS<sub>0</sub>) o con hidrocarburo *n*-octacosano como única fuente de carbono (FS<sub>1</sub> y FS<sub>2</sub>). En los hongos controles (FS<sub>0</sub>) los peroxisomas fueron escasos y de gran tamaño (0,8-1 μm), mientras que en los hongos adaptados (FS<sub>1</sub> y FS<sub>2</sub>), se observó un incremento del número de estas organelas conjuntamente con una disminución en su tamaño (Fig. III.27). Los peroxisomas se observaron como estructuras oscuras y muy densas debido a la tinción citoquímica con DAB, descrita en materiales y métodos. Estos orgánulos se observaron generalmente en las hifas de Bb10

FS<sub>0</sub> y FS<sub>1</sub>, con frecuencia asociados a membranas del retículo endoplasmático (Fig. III.27A-B). En las cepas FS<sub>2</sub>, en cambio, estas organelas fueron detectadas principalmente en los conidios y no asociados a membranas (Fig. III.27 C). En los hongos crecidos en hidrocarburo se observaron además, invaginaciones de la membrana plasmática como proyecciones digitiformes (Fig.III.28 A), así como cuerpos multilaminares que ocupan gran parte del volumen celular. Estas estructuras celulares contienen laminillas dispuestas de manera concéntrica, que asemejan una bicapa lipídica (Fig.III.28 B).

Figura III.27. Ultraestructura de *Beauveria bassiana*

- A) Bb 10 crecida en un medio de cultivo con glucosa (FS<sub>0</sub>). Se observan escasos peroxisomas en las hifas de hongo.
- B) Bb 10 FS<sub>0</sub> repicada en un medio de cultivo con *n*-octacosano e incubada durante 12 días (FS<sub>1</sub>). Se observan varios peroxisomas asociados a sistemas de endomembranas del retículo endoplásmico (RE) en las hifas fungicas.
- C) Bb 10 FS<sub>1</sub> repicada en un medio de cultivo con *n*-octacosano e incubada durante 12 días (FS<sub>2</sub>). Se observan pequeños peroxisomas en los conidios del hongo.
- Los peroxisomas (P) aparecen como estructuras uniformemente teñidas luego del tratamiento con DAB (como se detalla en materiales y métodos). Las barras equivalen a 1µm.

Figura III.28. Ultraestructura de *Beauveria bassiana*

Se observan hifas de Bb10 crecida en *n*-octacosano con gran cantidad de peroxisomas (P) asociados a sistemas de endomembranas del retículo endoplásmico (RE) así como invaginaciones digitiformes de la membrana plasmática (IN) (Fig.A), y cuerpos laminares conteniendo laminillas concéntricas (CL) (Fig.B). Se observan también varias mitocondrias (M). La barra equivale a 1 µm.

## Capítulo IV

### Discusión

### **Los hongos como agentes de control biológico de insectos de interés sanitario.**

El insecto hematófago *Triatoma infestans* es el principal vector de la enfermedad de Chagas en nuestro país. Actualmente la problemática de esta enfermedad está siendo nuevamente abordada con gran preocupación debido a las fallas en el control de la misma. Las intervenciones tradicionales de control del vector con insecticidas químicos, comienzan a estar comprometidas por el desarrollo de resistencia y consideraciones ecológicas, especialmente en la región del peridomicilio, donde son impracticables por su baja actividad, alto costo y compleja operatividad. Los micoinsecticidas tienen un gran potencial como agentes de control biológico de bajo impacto ambiental y en la actualidad se emplean en muchas partes del mundo, principalmente como agentes de control de insectos plaga del agro (Roberts y Hajek, 1992, Estrada y López, 1997, Lomer, 2001). Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplae*, poseen un gran potencial para controlar *T. infestans* debido a la alta susceptibilidad de distintos triatomíneos a dichos microorganismos (Silva y Messias, 1985, Romaña y Fargues, 1992, Luz et al, 1999, Lecuona et al, 2001).

El éxito en el uso de micoinsecticidas dependerá no sólo de la utilización de formulados eficientes, sino también del desarrollo de cepas más virulentas que posean la capacidad de eliminar rápidamente poblaciones de insectos perjudiciales (St. Leger y Screen, 2001). Por lo tanto, resulta esencial utilizar herramientas biotecnológicas para su mejoramiento. Para lograr estos objetivos es imprescindible conocer y caracterizar el insecto huésped, el microorganismo y la interacción entre ambos.

En este trabajo se abordó el estudio de aspectos bioquímicos y metabólicos de la interacción de hongos entomopatógenos con la cutícula de *T. infestans*, un insecto de interés sanitario. Los factores que intervienen en tal interacción, y que resultan de crucial importancia para el inicio y desarrollo de la enfermedad son: la composición fisicoquímica de la cutícula del insecto (Hajek y St. Leger, 1994), la composición fisicoquímica de los hongos (Boucias y Latgé, 1988, Boucias y Pendland, 1991a), y la producción de enzimas fúngicas degradadoras de la cutícula del huésped (St. Leger et al, 1991).

La superficie más externa de la cutícula, la epicutícula, es la zona de contacto inicial del hongo con el insecto, y por lo tanto es la primer barrera de defensa del insecto contra los organismos patógenos. La epicutícula está constituida fundamentalmente por lípidos e hidrocarburos de largas y muy largas cadenas carbonadas (Wigglesworth, 1970,

Blomquist y Dillwith, 1985, Lockey, 1985, Juárez et al. 2001, Juárez y Calderón, 2006, no publicado). Sin embargo, como se demostró en este laboratorio, los principales responsables de este rol de barrera protectora serían los hidrocarburos cuticulares (Juárez, 1994 a,b). En este trabajo se analizó por primera vez la capacidad de hongos filamentosos de crecer en medios de cultivo conteniendo como sustratos nutritivos, hidrocarburos de largas y muy largas cadenas de carbonos, similares a los componentes detectados en la cutícula de *T. infestans*. Es el primer estudio que inicia un análisis detallado de los mecanismos bioquímicos de degradación de estos compuestos de muy baja reactividad y difícil degradación, y permitió dilucidar diversos aspectos del metabolismo fúngico, no abordados hasta este momento.

A partir de los diversos análisis, se demostró que estos compuestos hidrocarbonados constituyen una fuente de carbono exógena utilizable por *B. bassiana* y *M. anisoplae* para su desarrollo. Con el objetivo de evaluar la posibilidad de potenciar la capacidad de los hongos de degradar estos compuestos, se realizaron repiques sucesivos en medios de cultivo con HC como única fuente de carbono. Las cepas fueron incrementando la velocidad y desarrollo fúngico en este medio de cultivo en función del número de repiques realizados. Se observó que los hongos adaptados y los hongos control diferían en el porcentaje y velocidad de germinación. No sólo los ensayos de germinación “*in vitro*”, sino también los ensayos realizados “*in vivo*”, demostraron que los conidios adaptados desarrollan sus hifas más rápidamente que los conidios control cuando son incubados con hidrocarburos (ítems III.A.2 y III.A.3). Estos resultados sugerirían que los hongos adaptados tendrían una mayor capacidad de utilizar estos compuestos como sustratos nutritivos. Los nutrientes cuticulares, sin embargo, no serían el único factor regulador de la germinación, ya que las condiciones ambientales (temperatura, humedad) también constituyen factores importantes de tal regulación. En este trabajo se observó que los conidios de *B. bassiana* incubados en un medio de cultivo líquido sin ningún elemento de nutrición, germinaron rápidamente en las condiciones adecuadas de temperatura y humedad. Si bien el desarrollo fúngico consistió exclusivamente en la formación de pequeños tubos germinales, estos resultados indicarían que dichos factores ambientales podrían ser disparadores de la germinación.

Otros mecanismos que intervienen en la interacción hongo-cutícula de insecto, son los procesos de degradación enzimática de los componentes cuticulares por acción de los microorganismos. Se han realizado análisis bioquímicos de varias enzimas fúngicas extracelulares (proteasas, quitinasas, acetilglucosaminidasas, esterases y lipasas)

involucradas en estos mecanismos de degradación (St. Leger et al., 1986a, St. Leger et al., 1986b, Bidochka y Khachatourians, 1990, St. Leger et al., 1992). Según reportes más recientes, se están realizando numerosos estudios moleculares y se emplean métodos de ingeniería genética para la inserción y/o sobreexpresión de los genes de proteasas y quitinasas relacionadas con los factores de virulencia de estos hongos entomopatógenos (St. Leger y Roberts, 1997, Hu y St. Leger, 2002, Fang et al., 2005). El objetivo final de todos estos estudios es aumentar la capacidad insecticida de los hongos. Sin embargo, cabe destacar, que estas enzimas degradan compuestos internos de la cutícula (procutícula). No existen reportes de enzimas que degraden los hidrocarburos, componentes principales de la capa más externa de la cutícula del insecto.

### **Degradación y utilización de hidrocarburos por acción de hongos entomopatógenos.**

En la etapa de adhesión del conidio al tegumento del insecto, la primer superficie de contacto entre ambos es la epicutícula externa que contiene lípidos e hidrocarburos (como se mencionó previamente). Empleando como insecto huésped a *T. infestans*, trabajos previos en este laboratorio demostraron que los hidrocarburos son los componentes cuticulares preferentemente utilizados por los hongos como fuente de carbono (Napolitano y Juárez, 1997). Los hidrocarburos mayoritarios de *T. infestans* son compuestos lineales de muy largas cadenas de carbonos (*n*-C29, *n*-C31 y *n*-C33) y cadenas ramificadas de mayor longitud (Juárez y Brenner, 1985, Juárez et al., 1993). Sobre la base de esta información se inició este proyecto de tesis. Los hongos fueron incubados en HC sintéticos de muy largas cadenas de carbonos, análogos a los del insecto. En forma comparativa los hongos se incubaron en un hidrocarburo de fácil degradación para estos microorganismos (*n*-hexadecano). Los estudios bioquímicos se basaron principalmente en el análisis de los metabolitos producidos por los hongos crecidos en estas distintas fuentes de carbono y su incorporación a los lípidos fúngicos. Se demostró en forma concluyente una alta capacidad fúngica para degradar hidrocarburos de muy larga cadena carbonada, y transformarlos en diversos metabolitos, parte de los cuales son utilizados para la producción de energía y parte como componentes celulares.

---

*Composición de lípidos totales de B. bassiana.*

La composición y metabolismo de los lípidos se estudió principalmente en los hongos crecidos en glucosa (control) y en los hongos adaptados a crecer en hidrocarburos. *B. bassiana* crecida en glucosa o en *n*-hexadecano, presentó un predominio marcado de los esteroides sobre los fosfoacilglicéridos y ácidos grasos libres (Fig. III.10 y III.11). Sin embargo, la misma cepa crecida en un hidrocarburo de muy larga cadena (*n*-octacosano), presentó una modificación radical de su patrón de lípidos. Los componentes mayoritarios fueron los TG, lípidos utilizados como reserva energética, con un predominio muy marcado sobre el resto de los lípidos (Fig. III.10). Cambios metabólicos similares han sido reportados en otros microorganismos, donde el incremento en la longitud de cadena del sustrato utilizado, se corresponde con un aumento en el contenido de los lípidos de reserva (Valenciano, et al., 1996, Alvarez et al., 1997). Asimismo cantidades importantes de TG se han reportado en las estructuras de resistencia de hongos y en respuesta a distintos factores de stress (Sorkhoh et al., 1990). Otra observación interesante fue que la cepa adaptada, cuando se mantiene a bajas temperaturas, revierte su metabolismo recuperando un patrón lipídico similar al de la cepa control. Estas observaciones indicarían que los hongos adaptados presentarían uno de los comportamientos metabólicos característicos de las células en condiciones de stress. El hongo crecido en un medio de cultivo con un sustrato nutritivo de difícil degradación (*n*-octacosano), sintetizó cantidades elevadas de TG al detectar una situación de stress nutricional. Asimismo es capaz de utilizar esos lípidos de reserva en condiciones ambientales desfavorables para su crecimiento. La etapa de penetración del hongo a través de la cutícula de su huésped podría ser una instancia de stress nutricional, ya que la principal fuente de carbono disponible en la capa más externa de la cutícula, la constituyen los hidrocarburos de muy largas cadenas. Sin embargo el hongo es capaz de atravesar esa barrera y utilizar los HC como fuente de carbono alternativa hasta alcanzar un medio rico en nutrientes fácilmente utilizables (medio interno del huésped). La síntesis aumentada de TG en esta etapa de la infección no sería la única modificación notoria. La fracción de lípidos polares fue también más abundante en los hongos crecidos en HC que en los control (Fig. III.10). Este marcado incremento de los PL, se correspondería con dos procesos que implican un aumento de la superficie de membrana, que son independientes entre sí, pero que podrían estar asociados con una mayor asimilación y transporte de los HC al espacio intracelular. Uno de los

mecanismos de adaptación sería la presencia de estructuras de membrana multilaminares intracitoplasmáticas (Fig. III.28), que podrían corresponderse con estructuras similares descritas en las células pulmonares de mamíferos. En estos organismos superiores, estas estructuras constituyen una fuente de fosfoacilglicéridos, que son liberados a la luz alveolar, donde cumplen el rol de moléculas surfactantes o sustancias tensioactivas (Weiss y Greep, 1982). En levaduras crecidas en HC, se ha reportado un aumento similar de los elementos intracitoplasmáticos, así como un incremento en la superficie de la membrana plasmática (Rattray et al., 1975). La utilización de lípidos polares como moléculas de solubilización de los HC, es uno de los mecanismos propuestos en este trabajo para la incorporación de estos sustratos nutritivos a las células fúngicas, tal como se ha reportado en otros microorganismos (como se detallará posteriormente en incorporación de alcanos). La segunda manifestación adaptativa, sería la formación de gran cantidad de invaginaciones digitiformes en las membranas plasmáticas de los hongos adaptados (Fig. III.28). Estas invaginaciones podrían relacionarse con un proceso de incorporación de HC por endocitosis. Observaciones similares fueron únicamente reportadas en *Candida lipolytica* incubada con hidrocarburos (Ludvik et al., 1968).

#### *Composición de ácidos grasos de B. bassiana.*

La composición cuantitativa de los ácidos grasos mayoritarios de distintas cepas de *B. bassiana*, demostró ser muy variable según la cepa y el sustrato utilizado. Distintas cepas de *B. bassiana* (Bb10 y Bb5500) crecidas en un mismo sustrato (glucosa), presentaron diferencias significativas en las cantidades relativas de sus ácidos grasos mayoritarios (Tabla III.3 y III.4). La composición de los ácidos grasos de una misma cepa incubada con un hidrocarburo de longitud de cadena mediana (*n*-hexadecano), fue cuantitativamente diferente a la cepa crecida en glucosa (cepa control). Los cambios, se observaron únicamente en los ácidos grasos mayoritarios, especialmente por un incremento relativo del ácido palmítico. En la fracción de los ácidos grasos insaturados, se produjo un incremento relativo del ácido linoleico en detrimento del ácido oleico. El resto de los ácidos grasos no mostraron diferencias significativas en su composición. El incremento relativo del ácido palmítico podría justificarse mediante la acción de dos vías metabólicas diferentes, pero que podrían ocurrir de manera simultánea con este sustrato en particular. El ácido palmítico puede sintetizarse por oxidación directa del

sustrato *n*-hexadecano, o bien podría sintetizarse *de novo* a partir de los grupos acetil-CoA generados vía  $\beta$ -oxidación (como se discutirá en detalle posteriormente, Fig. IV.3). Se desconoce aún la contribución de cada una de estas vías en la formación del ácido palmítico.

Asimismo la composición de los ácidos grasos de *B. bassiana* incubada con un hidrocarburo de muy larga cadena (*n*-octacosano), fue cuantitativamente diferente a la de la cepa control. Los cambios consistieron en una disminución en el porcentaje del ácido linoleico, y un incremento en los ácidos palmítico, eicosanoico y heptadecanoico. Estos cambios modificaron la relación de ácidos grasos insaturados/saturados, así como la relación pares/impares, entre los hongos adaptados y controles (Tabla III.3). Cambios composicionales similares han sido reportados en otros microorganismos, aunque no han sido definitivamente interpretados. El aumento relativo del ácido oleico en detrimento del ácido linoleico, podría relacionarse con el rol de aceptor de hidrógenos que cumpliría este último durante los procesos oxidativos (Pupin et al., 2000). Asimismo, los ácidos heptadecanoico y heptadecenoico aparecen con frecuencia en bacterias y levaduras crecidas en alcanos, si bien su función aún se desconoce (Dunlap y Perry, 1968, Hankin y Kolattukudy, 1968, Rattray et al., 1975, Bizzi et al., 1980). Moléculas de longitud de cadena similar presentan actividad antimicrobiana, como son los ácidos 4 metil-7-11-heptadecenoico, 9-heptadecenoico y 6-metil-heptadecenoico (Benyagoub et al., 1996). El incremento relativo de los ácidos grasos saturados, en particular el ácido eicosanoico, generó varios interrogantes sobre las posibles modificaciones en los mecanismos de síntesis de ácidos grasos en los hongos adaptados: ¿inhibición de las desaturasas? ¿liberación selectiva de los ácidos grasos saturados de longitud de cadena menor a la del sustrato durante el proceso de  $\beta$ -oxidación?. Se desconocen las causas del incremento relativo en los compuestos saturados, y los efectos que esta modificación produce en los hongos adaptados, pero es probable que estas cepas presenten una disminución de la fluidez de la membrana, y por consiguiente una modificación en los parámetros de permeabilidad, actividad enzimática y transporte de nutrientes, como ocurre en otros organismos (Goyal y Khuller, 1994). En algunas levaduras sin embargo, una membrana plasmática rígida con una baja relación insaturado/saturados, es esencial para su viabilidad celular (Tuller et al., 1999).

Los resultados obtenidos, por lo tanto, evidenciaron cambios radicales en la composición de los ácidos grasos en función de la longitud de cadena del hidrocarburo utilizado como sustrato. Cuando el sustrato fue un HC fácilmente utilizable, como el *n*-

hexadecano, no se observaron diferencias sustanciales con respecto a los crecidos en glucosa, sólo se observaron variaciones cuantitativas en los tres ácidos grasos principales. En cambio, cuando la fuente de carbono fue un HC de mayor longitud de cadena como el *n*-octacosano, compuesto de mayor complejidad de degradación, análogo a los encontrados en la cutícula de los insectos, el perfil lipídico observado fue notoriamente modificado, con un predominio de ácidos grasos saturados pares e impares de largas cadenas carbonadas. No se ha determinado si estos metabolitos cumplen una función específica en los hongos, pero se podría afirmar a partir de estos resultados, que cuando estos microorganismos se incuban en medios de cultivo con hidrocarburos, será su longitud de cadena lo que determine la vía metabólica a utilizar por la célula, y por lo tanto la composición de sus ácidos grasos.

### **Taxonomía química**

Los ácidos grasos se han empleado como caracteres taxonómicos en varias especies del reino Fungi (Viljoen et al., 1986, Sancholle y Dalpé, 1993). Sin embargo, los reportes en hongos filamentosos y levaduras mencionados previamente (ítem anterior), así como los datos obtenidos en este trabajo, demuestran una gran variabilidad en la composición de ácidos grasos, no sólo entre las distintas cepas y/o especies fúngicas, sino también frente a cualquier modificación realizada en sus condiciones de cultivo. En un análisis exhaustivo de ácidos grasos en numerosas levaduras mutantes, Daum et al. (1999) concluyeron que sólo cambios superiores al 50% representan diferencias significativas en los perfiles lipídicos. Se reportó además, que pequeños cambios en la preparación de los medios de cultivos, en las condiciones de incubación, en la cantidad de conidios inoculados, etc, podían generar diferencias en la composición de los ácidos grasos fúngicos. A partir de estas observaciones se considera que la utilización de estos componentes como caracteres taxonómicos requiere condiciones experimentales cuidadosa y estrictamente estandarizadas.

Cabe destacar que los ácidos grasos son componentes intermediarios de la síntesis de hidrocarburos. Estos últimos, son compuestos muy estables por ser productos terminales de la ruta metabólica. Los hidrocarburos son utilizados como caracteres taxonómicos principalmente en insectos (Haverty et al., 1988, Carlson et al., 1993, Juárez et al., 2000, Calderón Fernández et al, 2005a, Calderón Fernández et al, 2005b). Con el objetivo de utilizar estos compuestos para la tipificación de cepas fúngicas, se analizaron los

hidrocarburos de *M. anisopliae* y *B. bassiana*. Distintas cepas de estas especies, así como una misma cepa crecida en glucosa y en *n*-octacosano, mostraron una prevalencia de hidrocarburos de cadenas lineales de *n*-C15 a *n*-C38. Escasos reportes, con resultados similares, han sido citados en hongos (Kolattukudy et al., 1976, Lecuona et al., 1991). En levaduras, se detectaron asimismo HC monoinsaturados y algunos ramificados (Kolattukudy et al., 1976). Sin embargo, en dichas publicaciones no se menciona la composición de hidrocarburos del medio de cultivo, que podrían contaminar la fracción de hidrocarburos del hongo. El análisis de los hidrocarburos de *Beauveria* y *Metarhizium*, ha resultado una tarea muy dificultosa debido principalmente a la presencia de compuestos contaminantes hidrofóbicos del hongo, aún no identificados (como se detalla en resultados), y a la escasa cantidad de hidrocarburos en estas estructuras fúngicas. Si bien los hidrocarburos tendrían un gran potencial para la tipificación de cepas y podrían utilizarse como huellas dactilares, nuestros resultados indican que, con la metodología de extracción y purificación empleada, estos compuestos no serían una adecuada herramienta taxonómica. Habría que desarrollar una estrategia de purificación previa para la extracción de los contaminantes solubles en hexano, que se presumen de composición proteica, pero que escapa al alcance de la presente tesis.

### **Compuestos orgánicos volátiles**

Los factores responsables de las etapas iniciales del desarrollo fúngico sobre su huésped son extremadamente complejos, con producción de metabolitos volátiles y no volátiles, que posiblemente estén relacionados con la patogenicidad del hongo.

Los compuestos orgánicos volátiles (VOC) representan metabolitos primarios y secundarios, sintetizados por distintas vías metabólicas en los hongos. Los alcoholes volátiles son muy frecuentes en estos microorganismos, pudiendo constituir hasta un 80% de los VOC totales; usualmente el etanol es un compuesto predominante (Börjesson et al., 1989, Börjesson et al., 1990, Börjesson et al., 1992, Jelén y Wasowicz, 1998). La variedad de factores que influyen en la biogénesis de estos compuestos, ha sido objeto de gran interés, principalmente para su aplicación biotecnológica e industrial (Jelén y Wasowicz, 1998; Strobel et al., 2001). Son además, indicadores de contaminación fúngica en granos almacenados u otras mercancías agropecuarias y en

interiores edilicios (viviendas, hospitales) donde la presencia de estos microorganismos puede producir alergias, infecciones, u otras afecciones en la salud humana (Sunesson et al., 1995, Schnürer et al. 1999, Magan y Evans, 2000, Kuske et al., 2005). Si bien algunos hongos filamentosos (*Penicillium*, *Fusarium*) liberan gran cantidad de volátiles y son fácilmente detectados por diversas técnicas (Sunesson et al., 1995, Jelen, 2003, Kuske et al., 2004), *B. bassiana* produce una escasa cantidad de VOC solo detectable con una técnica de alta sensibilidad (SPME-CGC). Previo a este trabajo de tesis, no existe ningún reporte sobre la producción de VOC por hongos entomopatógenos. Cabe destacar además, que es el primer estudio de los VOC emitidos por hongos incubados con hidrocarburos como única fuente de carbono. El análisis de los VOC liberados por *B. bassiana* mostró variaciones de acuerdo al sustrato nutritivo utilizado. En el perfil cromatográfico del hongo crecido en glucosa se detectaron una gran variedad de compuestos sesquiterpenos, etanol, derivados de alquilbencenos y alquilnaftalenos, así como hidrocarburos lineales (Tabla III.6). Cuando el sustrato carbonado fue un hidrocarburo análogo a los componentes cuticulares de su insecto huésped, se observó una notable modificación en la composición de los VOC y un perfil cromatográfico simple, con predominio de un alcano de corta longitud de cadena (Tabla III.6). La síntesis *de novo* de hidrocarburos ocurre por decarboxilación de ácidos grasos que poseen un átomo de carbono más que el hidrocarburo sintetizado, tal como se ha estudiado en algunos sistemas biológicos (plantas e insectos) (Kolattukudy et al., 1976, Blomquist et al., 1993). Al incubar *B. bassiana* con [<sup>3</sup>H]*n*-octacosano se detectó un [<sup>3</sup>H] ácido graso de longitud de cadena equivalente al ácido undecanoico (Fig. III.22), que podría ser el probable precursor del *n*-decano, componente principal en esas condiciones de cultivo. El rol metabólico o biológico del *n*-decano no ha sido interpretado, pero pone claramente de manifiesto la existencia de marcadas modificaciones en los procesos metabólicos de dichos hongos. Asimismo se desconoce el rol de los compuestos derivados de naftalenos detectados mayormente en los hongos crecidos en hidrocarburo, si bien podrían estar relacionados con la patogenicidad de los mismos. Los naftalenos son utilizados comercialmente como antimicrobianos, insecticidas, repelentes de insectos, etc, y se obtienen principalmente de los combustibles fósiles (Bolton y Eaton, 1968, Daisy et al., 2002). Sin embargo, se ha reportado recientemente la presencia de naftalenos en algunas flores y en nidos de termitas subterráneas, que cumplirían una función insecticida (Azuma et al., 1996; Chen et al., 1998).

Las diferencias cualitativas y cuantitativas en los VOC de hongos crecidos en glucosa o en *n*-octacosano, sugerirían la utilización de vías metabólicas distintas frente a ambos sustratos (Fig. IV.1). Los VOC detectados en los hongos crecidos en glucosa, serían productos frecuentes de las vías metabólicas descritas para la mayoría de los microorganismos (Fig. I.12). Los hongos crecidos en hidrocarburos de muy largas cadenas carbonadas, en cambio, utilizarían la vía de  $\beta$ -oxidación como ruta de degradación de los acil-CoA's formados a partir del HC (como se detallará posteriormente) (Fig. IV.2).

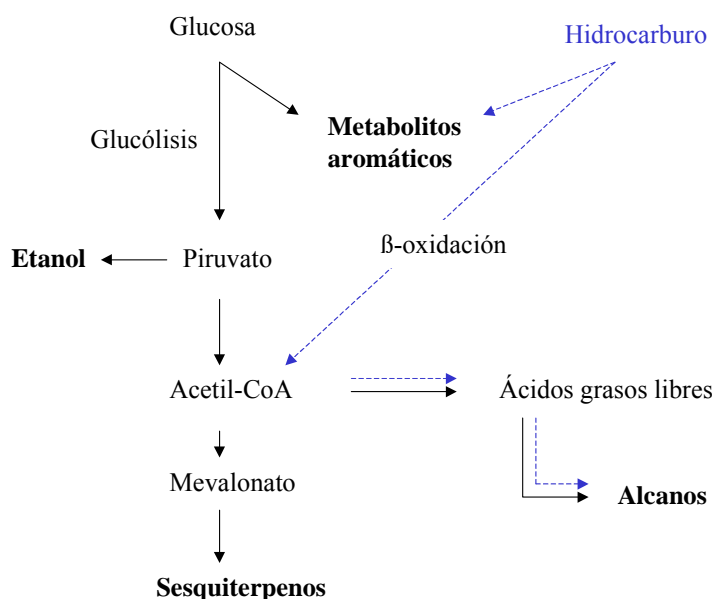


Figura IV.1. Rutas metabólicas propuestas para la síntesis de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) principales liberados por *Beauveria bassiana* crecida en glucosa y en *n*-octacosano. Las flechas punteadas indican la vía metabólica del hidrocarburo; en negrita se indican los VOC detectados por SPME-CGC e identificados por CGC-MS.

Los VOC de los hongos pueden utilizarse como caracteres taxonómicos basados en sus perfiles cromatográficos (obtenidos por CGC ó CGC-MS) específicos o “fingerprints” (Magan y Evans, 2000, Fiedler et al., 2001, Kuske et al., 2005). Si bien excede los objetivos de la presente tesis, sería interesante plantear futuras investigaciones para evaluar la utilización de los VOC de estos hongos como caracteres taxonómicos. Asimismo podría proponerse este método de análisis para caracterizar cepas de interés, así como su utilidad como marcador de patogenicidad.

### Efecto de la fuente de carbono en el metabolismo de lípidos fúngicos

En este trabajo se demostró que *Beauveria* y *Metarhizium* son capaces de metabolizar eficientemente hidrocarburos de distinta longitud de cadena, incorporándolos a sus componentes lipídicos celulares o empleándolos para la producción de energía.

También se demuestra que la capacidad de estos hongos de degradar hidrocarburos, así como de sintetizar lípidos a partir de los productos metabólicos del mismo, varía en función de la longitud de cadena del sustrato utilizado y de la especie fúngica analizada.

Una de las estrategias metodológicas utilizadas para evaluar la degradación de hidrocarburos de muy largas cadenas fue emplear [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano, como marcador metabólico. En base a la cantidad de [ $^3\text{H}$ ] hidrocarburo remanente (no metabolizado por el hongo), *B. bassiana* adaptada demostró mayor capacidad de degradación del HC que las cepas control (Tabla III.9). Correspondientemente la cantidad de metabolitos [ $^3\text{H}$ ]volátiles (productos del catabolismo del [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano) liberados por esta cepa fue 1,8 veces mayor que en la cepa control (Fig. III.25, inserto).

La longitud de cadena del hidrocarburo juega un rol fundamental en la capacidad fúngica para degradarlo. El [ $^{14}\text{C}$ ] *n*-hexadecano fue metabolizado casi en su totalidad por las cepas control (Fig. III.20), mientras que la degradación del [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano no fue completa, en igual período de incubación, ni en las cepas control ni en las cepas adaptadas de dichos hongos (Fig. III.21). Asimismo los lípidos sintetizados fueron cualitativa y cuantitativamente diferentes. Cuando *B. bassiana* fue incubada en [ $^{14}\text{C}$ ] *n*-hexadecano se detectó marcación únicamente en los fosfoacilglicéridos (Fig. III.20), mientras que al ser incubada en [ $^3\text{H}$ ] *n*-octacosano, los metabolitos fueron incorporados principalmente en la fracción de ácidos grasos libres, pero también en triacilglicéridos y fosfoacilglicéridos (Fig. III.20). El principal metabolito detectado en la fracción de ácidos grasos, sería el ácido undecanoico según análisis por radio-HPLC y CGC. En bacterias, se han reportado ácidos grasos de cadena similar (10 y 12 átomos de carbono), frecuentemente hidroxilados y esterificados en glicolípidos con una posible función biosurfactante (Van Dyke et al., 1993). Asimismo se ha reportado en microorganismos, ácido láurico con actividad fungicida y bactericida (Cooney y Proby, 1971). El resto de los ácidos grasos que incorporaron marcación fueron los componentes celulares frecuentes de los lípidos fúngicos, como son el ácido palmítico y el ácido oleico.

En los análisis realizados, no se detectaron ácidos grasos hidroxilados como componentes fúngicos, ni se detectó su formación en ensayos metabólicos. La ausencia de estos productos, esperados en una oxidación subterminal o diterminal (Fig. I.8), sugerirían que el proceso inicial de degradación de los hidrocarburos, ocurriría por vía de una oxidación terminal, posiblemente catalizada por el sistema de la citocromo P450/NADPH reductasa, tal como se describió en introducción (ítem I.C.1.3.2). El ácido graso sintetizado vía oxidación terminal, tendrá por lo tanto, la misma cantidad de átomos de carbonos que poseía el sustrato (Fig. IV.2). Esta ruta fue postulada para

bacterias y levaduras crecidas en *n*-alcanos de mediana y larga longitud de cadena donde se observó una alta proporción de ácidos grasos de longitudes de cadenas similares a los hidrocarburos utilizados como sustrato (Dunlap y Perry, 1968, Yano et al., 1971, Makula y Finnerty, 1972, Jwanny, 1975; Hallas y Vestal, 1978; Ascenzi y Vestal, 1979, Tanaka y Fukui, 1989, Finnerty, 1990, Alvarez et al., 1997, Radwan et al., 1998). De acuerdo a su longitud de cadena el ácido graso sería activado por distintas acil-CoA sintetasas (Ratray et al. 1975, Numa, 1981), y los acil-CoA's formados seguirían diferentes vías metabólicas:

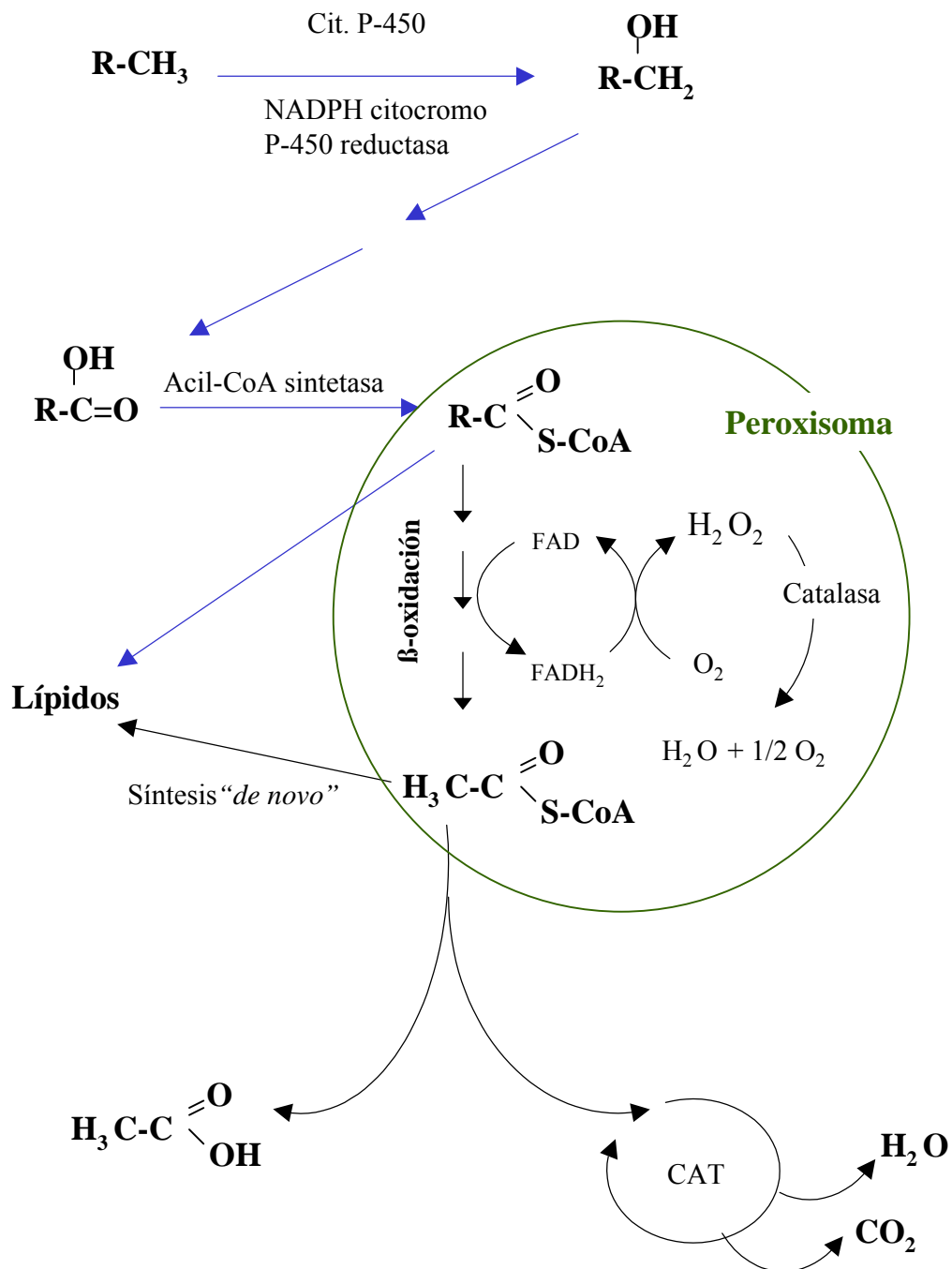
#### A) Degradación vía $\beta$ -oxidación (Fig. IV.2)

Varios resultados indican que la degradación de hidrocarburos ocurriría vía  $\beta$ -oxidación:

- Se detectó acetato como uno de los productos del metabolismo de los hongos incubados en hidrocarburos. Grandes cantidades de acetato producido por *B. bassiana* crecida en *n*-tetracosano fueron detectadas por GCG al liberar los VOC por acidificación. Con este método de extracción de los compuestos volátiles, el acetato fue el VOC predominante (Fig. III.16). Asimismo el acetato fue el componente principal de los [ $^3$ H]VOC detectados por radio-HPLC en los ensayos metabólicos de *B. bassiana* incubada en [ $^3$ H] *n*-octacosano (Fig. III.25), prueba evidente de la producción de acetato a partir del hidrocarburo utilizado como sustrato.

- Se detectó radiactividad incorporada en [ $^3$ H]-vapor de H<sub>2</sub>O producido durante el proceso metabólico de utilización de [ $^3$ H] *n*-octacosano por Bb10 y Ma6. Estas moléculas serían liberadas principalmente durante la oxidación del [ $^3$ H] acetyl-CoA en el ciclo del ácido tricarbóxico mitocondrial (CAT).

Figura IV.2. Ruta metabólica propuesta para la degradación de hidrocarburos



CAT: ciclo del ácido tricarbóxico  
 Esquema basado en Tanaka y Ueda, 1993.

En hongos el proceso de  $\beta$ -oxidación, ocurre exclusivamente en los peroxisomas (Tanaka y Fukui, 1989, Kunau et al., 1996, Valenciano et al., 1996) (ver detalle en la fig. IV.2). Los siguientes resultados obtenidos en este trabajo serían concordantes con dichos reportes:

- Se observó un incremento en el número de peroxisomas en los hongos adaptados. Los peroxisomas observados en los hongos crecidos en hidrocarburos son de menor tamaño pero aparecen en mayor cantidad que en los hongos crecidos en glucosa. Estos datos concuerdan con observaciones realizadas en levaduras donde fuentes alternativas de carbono (metanol, propionato, butirato y otras moléculas de mayor longitud de cadena) inducen el desarrollo de peroxisomas (Osumi et al., 1974, Tanaka y Ueda, 1993; Valenciano et al., 1996). En hongos filamentosos, sin embargo, son muy escasos los estudios citoquímicos sobre modificaciones de los peroxisomas cuando los hongos son incubados en distintos sustratos carbonados (Valenciano et al., 1996).

- En los hongos adaptados se detectó un aumento de la actividad de la catalasa, enzima marcadora de peroxisomas, con respecto a las cepas crecidas en glucosa. El incremento significativo de la actividad de esta enzima se correlaciona con un incremento del número de peroxisomas. Estos datos concuerdan con lo propuesto previamente para otros organismos (Fukui et al., 1975; Osumi et al., 1975; De Craemer et al., 1998). La relación de la actividad de catalasa con el metabolismo de los alcanos fue también sugerida por Teranishi, (1974). Esta enzima inducible de la vía de  $\beta$ -oxidación, es fácilmente detectable y podría utilizarse para evaluar el curso de la adaptación en los hongos.

Las unidades de acetyl-CoA producidas por  $\beta$ -oxidación de los hidrocarburos, pueden ser: a) hidrolizadas generando ácido acético, b) ingresar a mitocondrias y completar su proceso oxidativo, o c) ser utilizados en la síntesis *de novo* de los ácidos grasos contribuyendo a la formación de distintos lípidos (Fig. IV.2).

Si bien estas observaciones son evidencias de  $\beta$ -oxidación, no son pruebas irrefutables de una degradación total del hidrocarburo vía  $\beta$ -oxidación. No puede descartarse una oxidación parcial mediante este mecanismo oxidativo, con liberación de unidades de

acetil-CoA hasta generar ácidos grasos de fácil utilización (ácidos con 16 ó 18 átomos de carbono), como se ha reportado en otros organismos (Kolattukudy y Hankin, 1966; Hankin y Kolattukudy, 1968 ).

#### B) Síntesis de componentes lipídicos: incorporación directa y/o síntesis *de novo*

Los acil-CoA's sintetizados a partir de la oxidación terminal de los hidrocarburos puede seguir vías metabólicas diferentes. En bacterias y levaduras crecidas en hidrocarburos, se ha propuesto la incorporación directa de estos acil-CoA's en lípidos, como se representa en la figura IV.2 (ruta color azul), o la síntesis *de novo* a partir de los productos de la  $\beta$ -oxidación (fig. IV.2, ruta color negro) (Ratray et al. 1975, Mishina et al., 1978, Bizzi et al., 1980, Tanaka y Ueda, 1993). Sin embargo, cabe destacar, que todos estos trabajos emplearon como sustrato hidrocarburos de medianas y/o largas cadenas de carbonos. En este trabajo, se analizaron los lípidos de hongos crecidos en un hidrocarburo de larga cadena, *n*-hexadecano, así como en hidrocarburos de muy larga cadena, *n*-tetracosano y *n*-octacosano.

El *n*-hexadecano fue fácilmente metabolizado por los hongos. Una de las evidencias de este proceso fue que al incubar *B. bassiana* con [ $^{14}\text{C}$ ] *n*-hexadecano, el hongo utilizó prácticamente la totalidad del sustrato para sintetizar fosfoacilglicéridos (Fig. III.20). Asimismo el pequeño porcentaje de [ $^{14}\text{C}$ ] hidrocarburo detectado podría ser o bien el remanente del sustrato no metabolizado, un hidrocarburo sintetizado *de novo* como se observó en un trabajo previo realizado en este laboratorio (Napolitano y Juárez, 1997), o bien una combinación de ambos. Cuando se analizó la composición de los ácidos grasos de los hongos crecidos en *n*-hexadecano, el incremento relativo del ácido palmítico, y la ausencia de ácidos grasos de cadenas impares (Tabla III.4), sugerirían una oxidación terminal e incorporación directa del mismo a los lípidos celulares. Sin embargo, Napolitano y Juárez (1997) detectaron una elevada producción de [ $^{14}\text{C}$ ]  $\text{CO}_2$  en hongos crecidos en [ $^{14}\text{C}$ ] *n*-hexadecano, evidencia contundente de un mecanismo de oxidación total del HC vía  $\beta$ -oxidación. Estos resultados sustentarían la hipótesis de la síntesis *de novo* de los ácidos grasos a partir de los acetil-CoA's producidos vía  $\beta$ -oxidación del *n*-hexadecano. Cabe destacar que la información disponible es contradictoria respecto a este punto. En algunos microorganismos crecidos en ácidos grasos o alcanos de longitud de cadena mediana a larga, se ha reportado la inhibición de las enzimas acetil-CoA

carboxilasa (enzima reguladora de la síntesis *de novo*) y ácido graso sintetasa, por los acil-CoA's sintetizados a partir de dichos compuestos. Sin embargo, se ha reportado asimismo que algunas levaduras crecidas en compuestos similares, no modifican la actividad de tales enzimas (Makula y Finnerty, 1972, Ascenzi y Vestal, 1979, Numa, 1981). En base a los resultados obtenidos en este trabajo, y a la bibliografía consultada, se podría sugerir que la oxidación total de hidrocarburos de largas cadenas de carbono (vía  $\beta$ -oxidación), sería el mecanismo utilizado por el hongo para la obtención de la energía necesaria en los procesos metabólicos celulares. La síntesis *de novo* de ácidos grasos, a partir de los productos de degradación del hidrocarburo, podría ser una ruta de síntesis regulada por la concentración intracelular de sustrato y producto de dicha ruta metabólica.

Cuando se analizaron los lípidos de hongos crecidos en HC de muy largas cadenas (*n*-octacosano o *n*-tetracosano) sólo se detectaron trazas de ácidos grasos de longitud de cadena similar a la del hidrocarburo utilizado como sustrato. Por ende, la incorporación directa de estos ácidos grasos a los lípidos fúngicos, no sería la vía metabólica predominante en este sistema. La síntesis *de novo* a partir de los acetyl-CoA's producidos vía  $\beta$ -oxidación total de estos hidrocarburos, sería la única vía de síntesis de ácidos grasos.

Las observaciones consideradas más relevantes para proponer este proceso metabólico en *Beauveria* y *Metarhizium* fueron las siguientes:

- en los hongos incubados en un medio de cultivo con [ $^3$ H] *n*-octacosano, se detectaron únicamente [ $^3$ H] ácidos grasos de longitud de cadena menor a la del sustrato utilizado. Estos resultados indicarían que estos compuestos se sintetizaron a partir de productos de degradación del [ $^3$ H] hidrocarburo de mayor longitud de cadena.
- en los hongos crecidos en medios de cultivo con un sustrato de número par de átomos de carbono (*n*-octacosano), se detectaron elevadas cantidades de ácidos grasos de cadenas impares de carbonos, observándose que la relación de ácidos grasos pares/impares fue diez veces menor que en la cepa control (Tabla III.3). No se ha reportado ninguna vía de síntesis de ácidos grasos impares a partir de ácidos grasos pares o viceversa. En la vía de síntesis de ácidos grasos impares se utilizarían unidades de propionil-CoA en el inicio de la cadena. Evidencias similares a las observadas en este trabajo, han sido utilizadas para postular el mecanismo de síntesis *de novo* de

ácidos grasos en microorganismos crecidos en hidrocarburos de cadenas impares y su conversión en ácidos grasos de cadenas pares (Yano et al., 1971; Rattray et al., 1975, Mishina et al., 1978, Bizzi et al., 1980, Tanaka y Fukui, 1989).

El acetato fue uno de los metabolitos detectados en la degradación del *n*-octacosano. Con el objetivo de avanzar en el conocimiento del mecanismo utilizado por los hongos entomopatógenos en la síntesis de ácidos grasos a partir de HC de muy largas cadenas, se comparó la incorporación [<sup>14</sup>C] acetato por cepas de *B. bassiana* control y adaptadas a crecer en *n*-octacosano (FS<sub>2</sub>) (Tabla III.8). La disminución aparente en la capacidad de utilización de [<sup>14</sup>C] acetato en los hongos adaptados podría explicarse por una dilución del [<sup>14</sup>C] acetil-CoA exógeno en el pool endógeno del acetil-CoA producido en la degradación total (vía β-oxidación) del hidrocarburo y/o lípidos de reserva. En este caso no se interpretaría como una disminución en la utilización del acetato; sin embargo, no se obtuvieron evidencias concretas, que descarten una inhibición en la incorporación del mismo en presencia de HC, tal como se ha reportado en micobacterias (Ascenzi y Vestal, 1979).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, y con el apoyo de la bibliografía referida a otros microorganismos, se propone que la síntesis de ácidos grasos a partir de la oxidación terminal de hidrocarburos, y la síntesis *de novo* a partir de acetil-CoA, podrían ocurrir simultáneamente dependiendo de la longitud de cadena del sustrato utilizado (Fig. IV.3). El destino metabólico de los ácidos grasos sintetizados por una u otra vía, quedará determinado por la acil-CoA sintetasa que active dichos componentes. Se han reportado distintas acil-CoA sintetasas asociadas a diferentes organelas citoplasmáticas. Estas enzimas serían específicas en función de la longitud de cadena y los acil-CoA's formados serían derivados hacia una vía catabólica (oxidación) o anabólica (síntesis de lípidos). Si bien no se conoce el número exacto de estas enzimas en los microorganismos, se han reportado en levaduras y organismos superiores, al menos cinco acil-CoAs diferentes (Johnson et al., 1994, Coleman et al., 2002). En *Candida lipolytica* se ha demostrado la

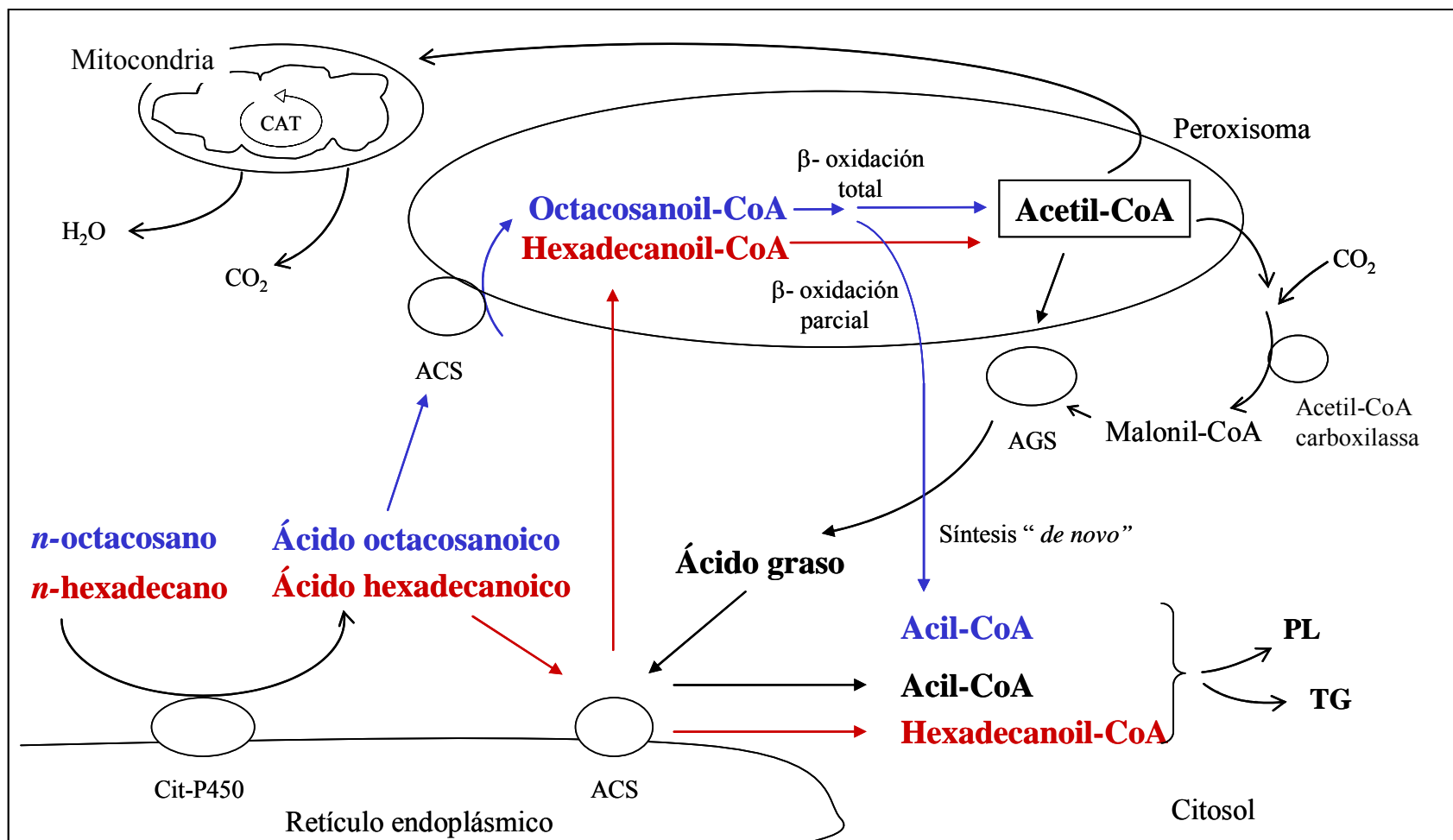


Figura IV.3. Posibles vías de degradación y utilización de hidrocarburos de distintas longitudes de cadena asociadas al metabolismo lipídico de hongos entomopatógenos. El *n*-hexadecano (ruta representada en color rojo), hidrocarburo de fácil degradación sería sustrato de una enzima cit-P450 del retículo endoplasmático y podría ser activado a hexanoil-CoA por otra enzima del mismo orgánulo, una acil-CoA sintetasa (ACS). Este acil-CoA sería utilizado para la síntesis de distintos lípidos, o bien oxidado completamente vía β-oxidación originando unidades de acetil-CoA utilizadas para la síntesis *de novo* de los lípidos fúngicos. El *n*-octacosano (ruta representada en color azul), sería también sustrato de la cit-P450, activado a octacosanoil-CoA por una ACS asociada a peroxisomas, y oxidado vía β-oxidación total o parcial en dichas organelas. Los metabolitos producidos, principalmente el acetil-CoA, serían también utilizados para la síntesis *de novo* de los compuestos lipídicos. Las vías comunes para ambos sustratos se graficaron en color negro. CAT, ciclo del ácido tricarboxílico; AGS, ácido graso sintetasa; TG, triacilglicérido; PL, lípidos polares.

existencia de dos acil-CoA sintetetas distintas que activan ácidos grasos de largas cadenas. La acil-CoA sintetasa I, sintetiza acil-CoA's que son utilizados para la síntesis de los lípidos celulares, y la acil-CoA sintetasa II activa los ácidos grasos destinados a ser degradados por  $\beta$ -oxidación (Numa, 1981). En este trabajo no se ha abordado el estudio de estas enzimas, los estudios de acil-CoA sintetetas activadoras de ácidos grasos de muy largas cadenas no son muy numerosos, sin embargo, se ha reportado la localización peroxisomal de dichas enzimas (Watkins, 1997, Coleman et al., 2002). Con el objetivo de seguir avanzando en el conocimiento de la vía metabólica de este sustrato particular, sería interesante estudiar esta enzima en los hongos adaptados a crecer en HC a fin de determinar si se trata de una enzima específica que destina los acil-CoA's de muy largas cadenas exclusivamente a procesos catabólicos. Cabe destacar que en este trabajo se ha planteado por primera vez la vía de degradación y utilización por microorganismos de un hidrocarburo de 28 átomos de carbono.

### **Incorporación de alcanos**

El modo de incorporación de alcanos a las células, no está aun claramente definido. Sin embargo, se ha propuesto un mecanismo, estudiado principalmente en bacterias y levaduras, que consiste en la solubilización de los hidrocarburos con distintas moléculas que poseen actividad surfactante. Estas moléculas son los fosfoacilglicéridos, ácidos grasos, lipopolisacáridos, y otros compuestos glucosídicos (Siporin y Cooney, 1975, Weete, 1976, Kappeli y Fiechter, 1977, Desai y Banat, 1997, Bouchez-Naitali et al., 1999. Estos compuestos podrían ser secretados al medio extracelular, o bien formar parte de la membrana plasmática. En este trabajo no se realizaron estudios para demostrar la función surfactante de algunas moléculas fúngicas en hongos crecidos en hidrocarburos, pero se observaron varios fenómenos que podrían relacionarse con este mecanismo, como fueron:

- la inusual dificultad de extraer por completo los residuos del hidrocarburo utilizado como sustrato, de la fracción de ácidos grasos libres y fosfoacilglicéridos, a pesar de los sucesivos y numerosos lavados con solventes orgánicos,
- el importante incremento en la síntesis de fosfoacilglicéridos en los hongos adaptados a crecer en hidrocarburos y,
- la presencia de cuerpos multilaminares observados por microscopía electrónica de transmisión (MET) que podrían constituir una fuente de fosfoacilglicéridos con función de surfactantes (Fig. III.28).

Asimismo, en este trabajo se observaron por MET, proyecciones digitiformes de la membrana plasmática que podrían estar asociadas con algún mecanismo de incorporación por endocitosis de estos compuestos al interior celular. La incorporación de HC por endocitosis fue propuesta en *Candida* donde se observaron vesículas intracelulares con hidrocarburos. En estos hongos se reportaron además, poros y canales en la membrana plasmática, que facilitan el ingreso de hidrocarburos a la célula (Meissel et al., 1973, Cooney et al., 1980).

### **Capacidad de los hongos entomopatógenos para degradar hidrocarburos, y su relación con la virulencia.**

La virulencia de los hongos entomopatógenos es un parámetro relativo del grado de enfermedad que el microorganismo produce a su insecto huésped (Lecuona, 1996, Shapiro-Ilan et al., 2005). Se ha reportado que la virulencia puede variar con distintos sustratos nutritivos, presencia de otros microorganismos, factores climáticos, e incluso cuando se realiza el pasaje sobre insectos de distinta susceptibilidad al patógeno, o cuando se multiplican en medios de cultivo sintéticos (Lecuona, 1996). La superficie cuticular de *T. infestans* está recubierta por una delgada capa de lípidos que la protege contra los agentes ambientales (Juárez, 1994a, Juárez, 1995) y representa, por ende, la primera barrera de ataque para los hongos entomopatógenos. Este proyecto se basó en la hipótesis de una posible correlación entre la capacidad de los hongos para degradar los HC del insecto huésped, con su virulencia. Con el objetivo de aportar en la búsqueda de metodologías

alternativas en el control de insectos, se efectuaron ensayos biológicos y bioquímicos en estos microorganismos, para determinar si la posible adaptación en un medio de cultivo conteniendo hidrocarburos análogos a los de insectos, afectaba la capacidad de utilización de los HC cuticulares, y su potencial efecto en los parámetros de virulencia. Los resultados obtenidos mostraron que los hongos adaptados a crecer en medios de cultivo conteniendo *n*-alcanos, presentaron cambios metabólicos contundentes. Estos cambios se observaron asociados a un incremento en la virulencia evaluada mediante la germinación y el tiempo letal mediano. Como parámetro indirecto se utilizó la actividad específica de la catalasa (marcador de proliferación peroxisomal).

La germinación de los conidios es un evento crucial en las primeras etapas del desarrollo de la micosis en el insecto. Un elevado porcentaje de germinación puede incrementar la probabilidad de infección antes que las estructuras infectivas se separen de la cutícula (Altre et al., 1999). La propagación y germinación de los conidios está frecuentemente relacionada con la disponibilidad de nutrientes en la cutícula de su insecto huésped (St. Leger et al., 1994). Usualmente los hongos requieren de una fuente de carbono exógena para su germinación (Roberts, 1989). En este trabajo se observó que los hongos adaptados cuando son incubados en medios de cultivo con hidrocarburos como única fuente de carbono, o cuando se encuentran en contacto con la superficie cuticular, desarrollan colonias más rápidamente que los hongos control. El gran desarrollo de las hifas adaptadas sobre la cutícula, luego de 24 horas de la infección (Fig. III.6), junto con un incremento significativo en el porcentaje de germinación (Fig. III.7), sugerirían que el HC puede ser un factor nutricional disparador de la germinación. Los lípidos cuticulares podrían asimismo, cumplir otros roles importantes para favorecer el desarrollo del hongo y por ende incrementar las probabilidades de la infección. En *Eysiphe graminis*, por ejemplo, la oxidación de gran cantidad de lípidos produce moléculas de agua necesarias para la germinación (McKeen, 1970). Asimismo cabe destacar que, además del proceso infeccioso per se (Fig. I.2), los hongos adaptados utilizan con mayor eficiencia los hidrocarburos componentes de la cutícula del insecto comparados con los hongos control, alterando notablemente las propiedades de la misma. La degradación de las capas más externas de la cutícula implica la destrucción de la barrera protectora del insecto contra los factores

ambientales, principalmente la deshidratación, y contra los microorganismos patógenos que pueden ingresar a su huésped con mayor facilidad.

Las modificaciones observadas en las primeras etapas de la infección con hongos adaptados (aumento del porcentaje de germinación y mayor desarrollo de hifas *in vivo*), fueron acompañadas con una disminución significativa del TLM de los insectos tratados con dichos hongos, con respecto a los insectos infectados con hongos crecidos en glucosa (Tabla III.1). En el control de plagas, las estrategias de biocontrol están fundamentalmente dirigidas a incrementar la virulencia de los hongos. Dentro de las mismas, la reducción del TLM es uno de los objetivos principales de las investigaciones que se están desarrollando actualmente (St. Leger et al., 1996, Valadares-Inglis e Inglis, 1997; Inglis et al., 2000, Fang et al., 2005). Luego de extensas y altamente sofisticadas investigaciones, se ha logrado una reducción del orden del 25% en el TLM en hongos sometidos a modificaciones genéticas, por incorporación de genes codificantes de proteasas específicas de la cutícula de sus insectos huéspedes (St Leger et al., 1996). Un trabajo de publicación reciente del mismo grupo de investigación, ha reportado una disminución en un 50% del TLM de áfidos infectados con una cepa de *B. bassiana* que sobreexpresa una quitinasa, por métodos de ingeniería genética (Fang et al., 2005). Enfocado en las primeras etapas de la interacción hongo-cutícula, en este trabajo de tesis se ha logrado disminuir en un 18,5% el TLM con técnicas simples de incubación y desarrollo del hongo.

El aumento de la virulencia de hongos adaptados se evaluó también en otros insectos, en forma comparativa. Una cepa de *B. bassiana* escasamente patógena de *Acanthoscelides obtectus*, el barrenador del poroto, incubada en un medio de cultivo conteniendo hidrocarburo como única fuente de carbono, incrementó en un 100% el porcentaje de mortalidad de los insectos con respecto a la cepa control (Crespo et al, 2002). Estos resultados suman evidencias de la efectividad del mecanismo de adaptación de los hongos a crecer en hidrocarburos análogos a los cuticulares, como un método sencillo para aumentar la capacidad insecticida de los mismos.

La agresividad de las cepas fúngicas está regulada por numerosos genes (Taborsky, 1992). La posibilidad de inducir genes codificantes de enzimas degradadoras de HC cuticulares mediante la estrategia de adaptación propuesta en este trabajo, sería una herramienta de gran utilidad para detectar genes de virulencia aun no descritos. Estudios

recientes emplean estrategias de expresión de secuencias (EST) para detectar determinantes de patogenicidad (Freimoser et al., 2003). Una de las grandes ventajas de aumentar la virulencia de hongos que afectan naturalmente a los insectos plaga, radica en la posibilidad de modificar la eficiencia del inóculo, e incrementar el número de insectos parasitados en la fase preepizootica de la enfermedad.

La adaptación de los hongos entomopatógenos realizada en este trabajo, podría inducir los mecanismos de degradación de los hidrocarburos cuticulares que ocurren en las primeras etapas de la infección. La proliferación peroxisomal, así como la inducción de las enzimas de la ruta de  $\beta$ -oxidación, han sido reportadas en levaduras y hongos filamentosos crecidos en hidrocarburos de mediana y largas cadenas carbonadas (Fukui y Tanaka, 1979; Tanaka et al., 1982, Valenciano et al., 1996). La actividad de la catalasa analizada en homogenato y en la fracción subcelular conteniendo los peroxisomas (pellet 20000xg), fue utilizada en este trabajo como un parámetro bioquímico indicador de la capacidad de degradación de hidrocarburos, y por ende, de afectar la superficie cuticular. El incremento significativo de la actividad de esta enzima en hongos adaptados a crecer en HC podría correlacionarse con el aumento de la virulencia observada en dichos hongos (Tabla III.1). Un dato de gran interés fue el obtenido en homogenato de hongos crecidos en un medio enriquecido con extracto de hidrocarburos cuticulares de *T. infestans*. En este sistema se detectó el mayor incremento en la actividad de la catalasa. Estos valores superaron en 2,3 veces los obtenidos cuando se utilizó un HC sintético (Tabla III.10). Éstas serían evidencias adicionales de la mayor afinidad de los hongos por los componentes de la cutícula de su huésped. La determinación de la actividad de catalasa es un método rápido y sencillo que podría evaluar la potencialidad de los hongos de metabolizar estos compuestos. La catalasa, ha sido también considerada por Bussink y Oliver (2001), como un parámetro de virulencia en *Cladosporium*, debido a la elevada actividad de la enzima en los conidios de este microorganismo patógeno.

Todos los aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de los hongos, observados en este trabajo, indicarían que las cepas adaptadas a crecer en hidrocarburos tendrían mayor capacidad de incorporar y metabolizar alcanos, en comparación con las cepas crecidas en glucosa. Asimismo este aumento en la capacidad degradadora de los HC cuticulares, podría correlacionarse con un incremento de la virulencia observada en los hongos adaptados.

Este trabajo de Tesis desarrollada en dos géneros representativos de hongos entomopatógenos, abre una puerta en el camino del conocimiento de los mecanismos fúngicos de degradación y asimilación de compuestos fundamentales de la barrera protectora cuticular de insectos, en particular de los vectores de la enfermedad de Chagas. Afortunadamente los resultados obtenidos han sido muy alentadores y se han originado nuevas investigaciones que emplean distintas estrategias bioquímicas y moleculares para comprender en detalle los mecanismos metabólicos involucrados principalmente en las etapas iniciales de la degradación de alcanos, con una futura aplicación en el mejoramiento de la capacidad bioinsecticida de estos microorganismos patógenos.

## CONCLUSIONES

- La caracterización de los componentes lipídicos de los hongos entomopatógenos así como sus cambios metabólicos y composicionales frente al crecimiento en distintas fuentes de carbono, contribuye a una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la degradación cuticular del insecto, y por lo tanto de la interacción parásito- hospedador.
- Los hidrocarburos de estructura similar a los cuticulares de *Triatoma infestans*, son metabolizados eficientemente por dos especies de hongos entomopatógenos.
- Los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* patógenos de *T. infestans*, crecen en medios de cultivo conteniendo hidrocarburos de largas o muy largas cadenas carbonadas como única fuente de carbono. Estos compuestos son degradados por el hongo y los distintos productos metabólicos son utilizados por el mismo para la síntesis de sus componentes celulares y para la producción de la energía metabólica necesaria para su crecimiento.
- La composición de lípidos totales, ácidos grasos, hidrocarburos y compuestos orgánicos volátiles, es variable de acuerdo a la cepa analizada y a la fuente de carbono utilizada.
- Los hongos adaptados a crecer en un medio de cultivo con hidrocarburos análogos a los de insectos como única fuente de carbono, incrementan su capacidad de degradar dichos compuestos.
- La vía de  $\beta$ -oxidación en peroxisomas es uno de los mecanismos oxidativos que intervienen en la degradación de los hidrocarburos de muy largas cadenas.
- El incremento de la actividad catabólica de los hongos adaptados, se correlaciona con un aumento en el número de peroxisomas, y con un aumento de la actividad de la catalasa, enzima marcadora de dichos orgánulos.

- La actividad de la catalasa puede utilizarse como un parámetro bioquímico indicador de la capacidad de degradación de los hidrocarburos vía  $\beta$ -oxidación.
- Es posible incrementar la virulencia de cepas fúngicas por crecimiento del hongo en un medio de cultivo enriquecido con hidrocarburos análogos a los de la superficie cuticular de su insecto huésped.

# Bibliografía

- Alberts, B., Jonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P., *Biología molecular de la célula*. 4ta ed, Editorial Omega, Barcelona, 2004.
- Alconada, T.M. & Juárez, M.P., Acyl-CoA oxidase activity from *Beauveria bassiana*, an entomopathogenic fungus. *J Basic Microbiol.*, 2006. **46**(6) [en prensa].
- Alexopoulos, C., Mims, C.W. & Blackwell, M., *Introductory mycology*. New York: John Wiley & Sons, 1996.
- Allen, J.E., Forney, F.W. & Markovetz A.J., Microbial subterminal oxidation of alkanes and alk-1-enes. *Lipids*, 1971. **6**:448-452.
- Altre, J.A., Vanderberg, J.D. & Cantone, F.A., Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticule. *J. Invertebr.Pathol.*, 1999. **73**:332-338.
- Alvarez, H.M., Kalscheuer, R. & Steinbüchel, A., Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect of inhibitors and polyethylene glycol. *Fett/Lipid*, 1997. **99**(7):239-246.
- Alves, S.B., Fungos entomopatogênicos. En: *Controle microbiano de insetos*, S.B. Alves, editor. São Paulo: Editora Manole, 1986.
- Alves, S.B., Fungos entomopatogênicos. En: Alves, S.B., editor. *Controle microbiano de insetos*. 2a ed. Piracuaba: Fundação de Estudos Arários Luiz de Queiroz, 1998, p. 289-381.
- April, T.M., Foght, J.M. & Currah, R.S., Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can. J. Microbiol.*, 2000. **46**:38-49.
- Arcas, J.D., Díaz, B. & Lecuona, R., Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *J. Biotechnol.*, 1999. **67**:151-158.
- Ascenzi, J.M. & Vestal, J.R., Regulation of fatty acid biosynthesis by hydrocarbon substrates in *Mycobacterium convolutum*. *J. Bacteriol.*, 1979. **137**:384-390.
- Ashraf, W., Mihdhir, A. & Murrell, J.C. Bacterial oxidation of propane. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1994. **122**:1-6.
- Aud, B.A., Mass production, formulation and application of fungi as biocontrol agents. En: Lomer, C.J. & Prior, C., editors. *Biological control of locusts and grasshoppers*. Wallingford, UK: CAB International, 1991, p. 219-229.
- Azuma, H., Toyota, M., Asakawa, Y. & Kawano, S., Naphthalene-constituent of magnolia flowers. *Phytochemistry*, 1996. **42**:999-1004.
- Bachoon, D., Araujo R, Molina M. & Hodson, R.E., Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil-impacted salt marsh sediment microcosms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2001. **27**:72-79.
- Barathi, S. & Vasudevan, N., Bioremediation of crude oil contaminated soil by bioaugmentation of *Pseudomonas fluorescens* NS1. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, 2003. **38**:1857-66.
- Bateman, R.P., Carey, M., Batt, D., Prior, C., Abraham, Y., Moore, D., Jenkins, N. & Fenlon, J.,

- Screening for virulent isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Biocontrol. Sci. Technol.*, 1996. **6**:549-560.
- Bateman, R.P., Delivery systems and protocols for biopesticides. En: Hall, F.R. & Menn J.J., editors. *Biopesticides: use and delivery*, Totowa, NJ: Humana Press, 1998, p. 509-528.
- Benyagoub, M., Willemot, C. & Bélanger, R.R., Influence of a subinhibitory dose of antifungal fatty acids from *Sporothrix flocculosa* on cellular lipid composition in fungi. *Lipids*, 1996. **31**:1077-1082.
- Bidochka, M.J. & Khachatourians, G.G., Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1990. **56**:362-370.
- Bidochka, M.J., St. Leger, R.J., Joshi, L. & Roberts, D.W., The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycol. Res.*, 1995. **99**:403-406.
- Bidochka, M.J., St. Leger, R.J. & Roberts, D.W., Mécanisms of Deuteromycete fungal infections in Grasshoppers and Locusts: an overview. *Memoirs Entomol. Soc. Can.*, 1997. **171**:213-224.
- Bidochka, M.J. & Small, Ch. L. Phylogeography of *Metarhizium anisopliae* and insect pathogenic fungus. En: Vega, F. & Blackwell, M., Eds. *Insect fungal associations, ecology and evolution*, Oxford Univ. Press. N.Y., 2005, p.28-50.
- Bizzi, A., Veneroni, E., Tacconi, M.T., Codegoni, A. M., Pagani, R., Cini, M. & Garattini, S. 1980, Accumulation and metabolism of uneven fatty acids present in single cell protein. *Toxicol. Lett.*, 1980. **5**:227-240.
- Blomquist, G.J. & Dillwith, J.W., Cuticular lipids. En: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I., editors. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Oxford: Pergamon, 1985, p. 117-154.
- Blomquist, G.J., Nelson, D.R. & de Renobales, M., Chemistry, biochemistry, and physiology of insect cuticular lipids. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1987. **6**:227-265.
- Blomquist, G.J., Tillman-Wall, J.A., Guo, L., Quilici, D.R., Gu, P. & Schal, C., Hydrocarbon and hydrocarbon derived sex pheromones in insects: biochemistry and endocrine regulation. En: Stanley-Samuelson, D.W. & Nelson, D.R., editors. *Insect lipids. chemistry, biochemistry and biology*. Lincoln: University of Nebraska Press, 1993, p. 317-351.
- Bohnet, S., Rogers, L., Sasaki, G. & Kolattukudy, P.E., Estradiol induces proliferation of peroxisome-like microbodies and the production of 3-hydroxy fatty acid diesters, the female pheromones, in the uropygial glands of male and female mallards. *J. Biol. Chem.* 1991. **266**:9795-804.
- Bolton, D.M. & Eaton, L.G. En: Stecher, P.G., Windholz, M., Leahy, D.S., Bolton, D.M. & Eaton, L.G., editors. *Merck index*. 8th ed. Rahway NJ: Merck & Co., Inc., 1968, p. 713.
- Bouchez-Naitali, M., Rakatozafy, H., Merchal, R., Leveau, J.Y. & Vandecasteele, J.P. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.* 1999. **86**:421-428.
- Boucias, D.G., Brasaemle, D.L. & Nation, J.L., Lipid composition of the entomopathogenic

- fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1984. **43**:254-258.
- Boucias, D.G. & Latgé, J.P., Non-specific induction of germination of *Coridiobolus obscurus* and *Nomuraea rileyi* host and non-host cuticle extracts. *J. Invertebr. Pathol.*, 1988. **51**:168-171.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C., The fungal cell wall and its involvement in the pathogenic process in insect hosts. En: Latgé, J.P. & Boucias, D.G, editors. *Fungal cell wall and immune response*. Berlin: Springer-Verlag, 1991a, p. 303-316.
- Boucias, D.G. & Pendland, J.C., Attachment of mycopathogens to cuticle. En: Cole, G.T. & Hoch, H.C., editors. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York: Plenum Press, 1991b, p. 101-127.
- Boucias, D.G. & Pendland, J.C., Insect-pathogen relationship. En: Boucias, G.D. & Pendland, J.C., editors. *Principles of insect pathology*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998.
- Boucias, D.G. & Pendland, J.C., Ultrastructural studies on the fungus, *Nomuraea rileyi*, infecting the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1982, **39**:338-345.
- Boulton, C. & Ratledge. C., The physiology of hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.*, 1984. **9**:11-77.
- Börjesson, T., Stollman, U., Adamek, P. & Kaspersson, A., Analysis of volatile compounds for detection of molds in stored cereals. *Cereal Chem.*, 1989. **66**:300-304.
- Börjesson, T., U Stöllman, and J Schnürer, Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. *Appl Environ Microbiol.*, 1990. **56**(12): p. 3705–3710.
- Börjesson, T., Stöllman, U. & Schnürer, J., Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. *Appl Environ Microbiol.*, 1992. **58**:2599–2605.
- Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976. **72**:248-254.
- Britton, L., Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. En: Gibson, D., editor. *Microbial degradation of organic compounds*, New York: Marcel Dekker, 1984, p. 89–129.
- Broadway, N.M., Dickinson. F.M. & Ratledge, C., The enzymology of dicarboxylic acid formation by *Corynebacterium* sp. strain 7E1C grown on n-alkanes. *J. Gen. Microbiol.*, 1993. **130**:1337-1344.
- Burges, H.D., *Formulation of microbial pesticides*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1998.
- Bussink, H.-J. & Oliver, R., Identification of two highly divergent catalase genes in the fungal tomato pathogen, *Cladosporium fulvum*. *Eur. J. Biochem.*, 2001. **268**:15-24.
- Butt, T.M. & Copping, L., Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook*, 2000. **11**:186-191.
- Calderón Fernández, G., Juárez. M.P., Monroy, M.C., Menes, M., Bustamante, D.M. & Mijailovsky, S., Intraspecific variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:Reduviidae)

- populations from Guatemala based on chemical and morphometric analyses. *J. Med. Entomol.*, 2005a. **42**:29-35.
- Calderón Fernández, G., Juárez. M.P., Ramsey, J., Salazar Schettino, P.M., Monroy, M.C., Ordoñez, R. & Cabrera, M., Cuticular hydrocarbon variability among *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Mexico and Guatemala. *J. Med. Entomol.*, 2005b. **42**:780-788.
- Calvo, C., Toledo, F.L. & Gonzalez-Lopez, J., Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *J. Biotechnol.*, 2004. **109**:255-262.
- Cañedo, V. & Ames, T., editors. *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima: Centro Internacional de la Papa, 2004, p. 62.
- Carlson, D.A., Milstrey, S.K. & Narang, S.K., Classification of tsetse flies *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae) by gas chromatographic analysis of cuticular components. *Entomol. Res.*, 1993. **83**:507-515.
- Chakrabarty, A.M., *Microorganisms having multiple compatible degradative energy-generating plasmids and preparation* [en línea]. 1981 March: US Patent 4259444. Disponible en World Wide Web: <http://www.freepatentsonline.com/4259444.html>.
- Charnley, A.K., Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: A speculative review. En: Anderson, J.M., Rayner, A.D.M. & Walton, D.W.H., editors. *Invertebrate-microbial interactions: British Mycology Society Symposium 6*. London: Cambridge University Press, 1984, p. 229-270.
- Chen, J., Henderson, G., Grimm, C.C., Lloyd, S.W. & Laine, R.A., Termites fumigate their nests with naphthalene. *Nature*, 1998. **392**:558-559.
- Coleman, R.A., Lewin, T.M., Van Horn, C.G. & Gonzalez-Baro, M.R., Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr.* 2002. **132**:2123-2126.
- Cooney, J.J. & Proby, C.M., Fatty acid composition of *Cladosporium resinae* grown on glucose and on hydrocarbons. *J. Bacteriol.*, 1971. **108**:777-781.
- Cooney, J., Siporin C. & Smucker RA., Physiological and cytological responses to hydrocarbons by the hydrocarbon-using fungus *Cladosporium resinae*. *Bot. Mar.*, 1980. **23**:227-232.
- Cooper, D.G. & Zajic, J.E., Surface-active compounds from microorganisms, *Adv. Appl. Microbiol.*, 1980. **26**:229-253.
- Crespo, R., Juárez, M.P, Dal Bello, G.M, Padín, S., Calderón, G. & Pedrini, N., Increased mortality of *Acanthoscelides obtectus* by alkane-grown *Beauveria bassiana*. *BioControl*, 2002. **47**:685-696.
- Cubitto M.A., Commendatore M., Chiarello, M.N., Baldini, M.D. & Sineriz, F., Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation*, 2004. **15**:281-287.
- Daisy, B.H., Strobel, G.A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D.K. & Runyon, J.B., Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 2002. **148**:3737-41.

- Dal Bello, G., Padín, S., López Lastra, C. & Fabricio, M., Laboratory evaluation of chemical-biological control of the rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) in stored grains. *J. Stored Prod. Res.*, 2001. **37**:77-84.
- Daum, G., Tuller, G., Nemec, T., Hrastnik, C., Balliano, G., Cattel, L., Milla, P., Rocco, T., Conzelmann, A., Schuller, H-J., Hojad, U., Greiner, E. & Finger, K., Yeast functional analysis reports: systematic analysis of yeast strains with possible defects in lipid metabolism. *Yeast*, 1999. **15**:601-614.
- De Craemer, D., Van den Branden, C., Pauwels, M. & Vamecq, J., Peroxisome-proliferating effects of fenoprofen in mice. *Lipids*, 1998. **33**:539-543.
- Desai, J.D. & Banat, I.M., Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997. **61**:47-64.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M. & McCormick, S.P., Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiol. Rev.*, 1993. **57**:595-604.
- Díaz, A., Rangel, P., Montes de Oca, Y., Lledías, F. & Hansberg, W., Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001. **31**:1323-1333.
- Domnas, A.J. & Warner, S.A., Biochemical activities of entomophagous fungi. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1991. **18**:1-13.
- Dunlap, K.R. & Perry, J.J., Effect of substrate on the fatty acid composition of hydrocarbon-and Ketone-utilizing microorganisms. *J. Bacteriol.*, 1968. **96**:318-321.
- Eilenberg, J., Bresciani, J. & Latgé, J.P., Ultrastructural studies of primary spore formation and discharge in the genus *Entomophthora*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986. **48**:318-324.
- El-Sayed, N.M., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Åslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., Franco da Silveira J., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Faselina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasc, A.C., Rull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louis, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramírez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sánchez, D.O., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Anderson, B., The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 2005. **309**:409-415.
- Enserink, M., Mosquito-killing fungi may join the battle against malaria. *Science*, 2005. **308**:1531-1533.
- Scholte, E.J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaajmans, K., Abdulla, S., Kileen, G.F. & Knols, B.G. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*, 2005. **308**:1641-1642.
- Estrada, J. & López, M.T., Los bioplaguicidas en la agricultura sostenible cubana [en línea]. *Agroecol. Des.* 1997. **11/12**. Disponible en la World Wide Web:

<http://www.clades.cl/revistas/1112/rev11agro4.htm>.

Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Yin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, Y., Yang, X., Zhang, Y. & Pei, Y., Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit 1 and its application to improve fungal strain virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005. **71**:363-370.

Fargues, J., Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. En: Roberts, D.W. & Aist, J.R., editors. *Infection processes of fungi*. New York: Rockefeller Foundation, 1984, p. 90-110.

Feng, M.G., Poprawski, T.J. & Khachatourians, G.G., Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Sci. Technol.*, 1994. **4**:3-34.

Fernandez, S., Groden, E., Vandenberg, J.D. & Furlong, M.J., The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Invertebr. Pathol.*, 2001. **77**: p. 217-226.

Fernández-Larrea Vega, O., La reproducción de los hongos entomopatógenos y antagonistas: experiencia cubana. Capacitación Productos Fitosanitarios No Sintéticos. Proyecto NOQ-CATIE/GTZ, 2001. Disponible en la World Wide Web: <http://www.bioplaguicidas.org/Documentos/gtzcatie/capacitacionesgtz/capacitaciones%202001/resumenes/reproducción%20hongos%20ofernandez.pdf>.

Ferron, P., Fungal control. En: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., editor. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, New York: Academic Press, 1985, p. 313-346.

Fiedler, K., Schütz, E. & Geh, S., Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2001. **204**:111-121.

Finnerty, W.R., Alkane oxidation. En: Lindstrom, M.E., editor. *Methods in enzymology*, New York: Academic Press, 1990, p. 176-179.

Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G.H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226:497-509.

Freimoser, F.M., Screen, S., Bagga, S., Hu, G. & St. Leger, R.J., Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*, 2003. **149**:239-247.

Fukui, S., Tanaka A., Kawamoto, S., Yasuhara, S., Teranishi, Y. & Osumi, M., Ultrastructure of methanol-utilizing yeast cells: appearance of microbodies in relation to high catalase activity. *J. Bacteriol*, 1975. **123**:317-328.

Fukui, S. & Tanaka, A., Peroxisomes of alkane- and methanol-grown yeasts. *J. Appl. Biochem.*, 1979. **1**:171-201.

Furlong, M.J. & Pell, J.K., Interactions between Entomopathogenic Fungi and Arthropod Natural Enemies. En: Vega, F. & Blackwell, M., Eds. *Insect fungal associations, ecology and evolution*, Oxford Univ. Press. N.Y., 2005, p. 51-73.

Gallo, M., Bertrand, J.S., Roche, B., & Azoulay, E., Alkane oxidation in *Candida tropicalis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973. **296**:624-638.

Gaspar, M.L., *Bioquímica de lípidos en micorrizas vesículo-arbusculares* [tesis doctoral]. La

- Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, 1995.
- Goettel, M.S., St.Leger, R.J., Rizzo, N.W., Staples, R.C. & Roberts, D.W., Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. Gen. Microbiol.*, 1989. **135**:2233-2239.
- Goettel, M.S., Johnson, D.L. & Inglis, G.D., The role of fungi in the control of grasshoppers. *Can. J. Bot.*, 1995. **73**:S71-S75.
- Goyal, S. & Khuller, G.K., Structural and functional role of lipids in yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Lipids*, 1994. **29**:793-797.
- Gregory, E.M. & Fridovich, I., Visualization of catalase on acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1974. **58**:57-62.
- Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Lauricella, M.A., Petersen, R.M., Chuit, R., Segura, E.L. & Cohen, J.E., Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural Northwestern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2005. **73**:95-103.
- Hajek, A.E., St. Leger, R.J., Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.*, 1994. **39**:293-322.
- Hajek, A.E., Ecology of terrestrial fungal entomopathogens. *Advances in Microbial Ecology*, 1997. **15**:193-249.
- Hallas, L.E., Vestal, J.R., The growth of *Mycobacterium convolutum* on solid n-alkanes substrates: effect on cellular lipid composition. *Can. J. Microbiol.*, 1978. **24**:1197-1203.
- Hankin, L., Kolattukudy, P.E., Metabolism of a plant wax paraffin (n-nonacosane) by a soil bacterium (*Micrococcus cerificans*). *J. Gen. Microbiol.*, 1968. **51**:457-463.
- Harris, J. & Dent, D.R., *Priorities in biopesticide research and development in developing countries*. Ascot, UK: CABI Bioscience. 2000, 80 p. (Biopesticides series; n° 2).
- Haverty, M.I., Page, M., Nelson, L.J. & Blomquist, G.J., Cuticular hydrocarbons of dampwood termites *Zootermopsis*: intra and intercolony variation and potential as taxonomic characters. *J. Chem. Ecol.*, 1988. **14**:1035-1057.
- Hedlund, K., Bengtsson, G. & Rundgren, S., Fungal odour discrimination in two sympatric species of fungivorous collembolans. *Funct. Ecol.*, 1995. **9**:869-875.
- Hodge, K. Clavicipitaceous anamorphs En: White, J.F., Bacon, C.W., Hywel-Jones, N.L., Spatafora, J.W., Eds. *Clavicipitalean Fungi: evolutionary , biology, chemistry , biocontrol and cultural impacts*, Marcel Dekker N.Y., 2003, p. 75- 123.
- Hoppert, M., Gentsch, C. & Schorgendorfer, K., Structure and localization of cyclosporin synthetase, the key enzyme of cyclosporin biosynthesis in *Tolypocladium inflatum*. *Arch. Microbiol.*, 2001. **176**:285-293.
- Howard, D. & Miller, JD, Human and animal relationships. En: Esser, K. & Lemke, P.A., editors. *The mycota: a comprehensive treatise of fungi as experimental systems for basic and applied research*. Berlin: Springer Verlag, 1996, v. 6.

- Hu, G., St. Leger, R.J., Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002. **68**:6383-6387.
- Inakollu, S.H., Hung, H.-C. & Shreve G.S, Biosurfactant enhancement of microbial degradation of various structural classes of hydrocarbon in mixed waste systems. *Environ. Eng. Sci.*, 2004. **21**:463-469.
- Inglis, P.W., Aragão, F.J.L., Frazão, B.P., Magalhães, M.C. & Valadares-Inglis, M.C., Biolistic co-transformation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* strain CG423 with green fluorescent protein and resistance to glufosinate ammonium. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000. **191**:249-254.
- Jabaji-Hare, S., Lipid and fatty acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: contribution to taxonomy. *Mycología*, 1998. **80**:622-629.
- Jelen, H., Latus-Zietkiewicz, D., Wasowicz, E. & Kaminski, E., Trichodiene as a volatile marker for trichothecenes biosynthesis. *J. Microbiol. Methods*, 1997. **31**:45-49.
- Jelen, H. & Wasowicz, E., Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. *Food Rev. Int.*, 1998. **14**:391-426.
- Jenkins, N.E. & Goettel, G., Methods for mass-production of microbial control agents of grasshopper and locusts. En: Goettel, M.S. & Johnson, D.L., editors. *Microbial control of grasshoppers and locusts. Memoirs Entomol. Soc. Can.*, 1997. **171**:37-48.
- Jenkins, N.E., Heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. & Lomer, C., Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News Inf.*, 1998. **19**:21N-31N.
- Johnson, D.L., Goettel, M.S., Bradley, C., Bradley, van der Paauw, H. & Maiga, B. Field tests of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against grasshoppers in Mali, West Africa, July, 1990. En: Lomer, C., & Prior, C., editors. *Biological control of locusts and grasshoppers*. Wallingford, UK: CAB International, 1992, p. 296-310
- Johnson, D.R., Knoll, L.J., Levin, D.E. & Gordon, J.L., *Saccharomyces cerevisiae* contains four fatty acid activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. *J Cell Biol*, 1994. **127**:751-762.
- Juárez, M.P., Brenner, R.R., Labayén, I.L. & Gros, E.G., Bioquímica del ciclo evolutivo del *Triatoma infestans*. VII. Composición de los lípidos de la superficie de la cutícula extraíbles con hexano. *Acta Physiol. Pharm. Latinoam.*, 1984. **35**:223-236.
- Juárez, M.P. & Brenner, R.R., The epicuticular lipids of *Triatoma infestans*-II. Hydrocarbon dynamics. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985. **82B**:793-803.
- Juárez, M.P., Blomquist, G.J. & Schofield, C.J., Cuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans* and *Triatoma mazzottii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1993. **106B**:667-674.
- Juárez, M.P., Inhibition of cuticular lipid synthesis and its effect on insect survival. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 1994a. **25**:177-191.
- Juárez, M.P., Hydrocarbon biosynthesis in *Triatoma infestans* eggs. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1994b. **25**, 193-206.
- Juárez, M.P., The effect of sublethal doses of insecticides on *Triatoma infestans* lipid synthesis.

*Pest. Biochem. Physiol.*, 1995. **52**:81-89.

Juárez, M.P., Fernández, R., Schofield, C.J. & Dujardin, J.P., Intergeneric comparison of epicuticular hydrocarbons in Triatominae. *Res. Rev. Parasitol.*, 2000. **60**:121-127.

Juárez, M.P., Blomquist, G.J. & Schofield, C.J., Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a Chagas disease vector. *Comp. Biochem. Physiol.*, 2001. **129B**:733-746.

Jwanny, E.W., Lipid components of the hydrocarbon assimilating yeast *Candida lipolytica* (strain 10). *Z. Allg. Mikrobiol.*, 1975. **15**:423-439.

Kaaya, G.P., *Glossina morsitans morsitans*: mortalities host in adults by experimental infection with entomopathogenic fungi. *Acta Trop.*, 1989. **46**:107-114.

Kaaya, G.P. & Munyinyi, D.M., Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *J. Invertebr. Pathol.*, 1995. **66**:237-241.

Kamisaka, Y., Noda, N., Sakai, T. & Kawasaki, K., Lipid bodies and lipid body formation in an oleaginous fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1438**:185-198.

Kappeli, O. & Fiechter, A., Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. *J. Bacteriol.*, 1977. **131**:917-921.

Kawasaki, L. & Aguirre, J., Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.*, 2001. **183**:1434-1440.

Kerwin, J.L., Fatty acids and fungal development: Structure-activity relationships. En: Fuller G. & Nes W.D., editors. *Ecology and metabolism of plant lipids*. Washington DC: American Chemical Society, 1987, p. 329-342 (American Chemical Society Symposium series n° 325).

Klaric M.S & Pepeljnjak, S., Bovericin: kemizam, bioloski aspekti I rasirenost [Beauvericin: chemical and biological aspects and occurrence] *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 2005. **56**:343-350.

Kolattukudy, P.E., Hankin, L., Metabolism of a plant wax paraffin (n-nonacosane) in the rat. *J. Nutr.*, 1966. **90**:167-174.

Kolattukudy, P.E., Croteau, R. & Bruckner, J.S., Algal and fungal waxes. En: Kolattukudy, P.E., editor. *Chemistry and biochemistry of natural waxes*, Amsterdam: Elsevier, 1976, p. 349-418.

Kunau, W.-H., Buhne, S., de la Garza, M., Kionka, C., Mateblowski, M., Schultz-Borchard, U. & Thieringer, R., Comparative enzymology of beta-oxidation. *Biochem. Soc. Trans.*, 1988. **16**:418-420.

Kunau, W.-H., Dommes, V. & Schulz, H.  $\beta$ -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lip. Res.*, 1996. **34**:267-342.

Kuske, M., Romain, A.C. & Nicolas, J., Microbial volatile organic compounds as indicators of fungi. Can an electronic nose detect fungi in indoor environments? *Build. Environ.*, 2005. **40**:824-831.

Latge, J.P., Monsigny, M. & Prevost, M.C. Visualization of exocellular lectins in the

- entomopathogenic fungus *Conidiobolus obscurus*. *J. Histochem. Cytochem.*, 1988. **36**:1419-1424.
- Latge, J. & Moletta, R., Biotechnology. En: Sampson R.A., Evans, H.C., Latge, J.P., editors. *Atlas of entomopathogenic fungi*, Berlin: Springer Verlag, 1988.
- Lazarow, P.B. & Fujiki, Y. Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 1985. **1**:489-530.
- Leahy, J.G. & Colwell, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, 1990. **54**:305-315.
- Lecuona, R. Rôle des lipides épicuticulaires des insectes dans la pathogénèse des hyphomycètes. Francia: Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. 1989. Tesis doctoral.
- Lecuona, R., Riba, G., Cassier, P. & Clement, J.L., Alterations of insect epicuticular hydrocarbons during infection with *Beauveria bassiana* or *B. brongniartii*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1991. **58**:10-18.
- Lecuona, R.E., Hongos entomopatógenos. En: Lecuona, R.E., editor. *Microorganismos patógenos empleados en el control de insectos plaga*, Buenos Aires: M.Mas, 1996, p. 143-150.
- Lecuona, R.E., Clement, J-L., Riba, G., Joulie, C. & Juárez, M.P., Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. *J. Econ. Entomol.*, 1997. **89**:119-123.
- Lecuona, R.E. & Díaz, B.M., Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a los hongos entomopatógenos *Nomuraea rileyi*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. *RIA*, INTA, Argentina, 2001. **30(1)**: 25-42.
- Lecuona, R.E., Edelstein, J.D., Berretta, M.F., La Rossa, F.R. & Arcas, J.A., Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potencial agents of control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.*, 2001. **38**:172-179.
- Lecuona, R.E., Turica, M., Tarocco, F. & Crespo, D.C., Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. *J. Med. Entomol.*, 2005. **42**:332-336.
- Lindley, N.D., Hydrocarbon-degrading yeasts and filamentous fungi of biotechnological importance. En: Arora, D.K., Elander, R.P., Mukerji, K.G., editors. *Handbook of applied mycology*. New York: Marcel Kecker, 1992, v. 4, p. 905-929.
- Lockey, K.H., Insect cuticular lipids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1985. **81B**:263-273.
- Lockey, K.H., Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988. **89B**:595-645.
- Lomer, C.J., Prior, C., Kooyman, C., Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts. En: Goettel, M.S. & Johnson, D.L. editors. *Memoirs Entomol. Soc. Can.*, 1997. **171**:265-286.
- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J. & Thomas, M., Biological control of locust and grasshoppers. *Annu. Rev. Entomol.*, 2001. **46**:667-702.
- López Lastra, C.C., Hongos entomopatógenos para control biológico de insectos de interés sanitario: estado de avance. *Rev. Soc. Ent. Argen.*, 1999. **58**:312-315.

- López Lastra, C.C. & Scorsetti, A.C., Hongos Entomophthorales patógenos de insectos de la República Argentina. *Rev. Biol. Trop.*, 2002.
- Ludvik, J., Munk, V. & Dostalek, M., Ultrastructural changes in the yeast *Candida lipolytica* caused by penetration of hydrocarbons into the cell. *Experientia*, 1968. **24**:1066-1068.
- Luna Rodríguez, J.A. & Lecuona, R.E., Selección de cepas de hongos entomopatógenos nativos para el control de la tucura *Rhammatocerus pictus* (Bruner) (Orthoptera: Acrididae). *RIA*, 2002. **31**:67-84.
- Luz, C., Tigano, M.S., Silva, I.G., Cordeiro, C.M.T. & Aljanabi, S.M., Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. O. Cruz*, 1998. **93**:839-846.
- Luz, C., Silva, I.G. Magalhaes, B.P., Cordeiro, C.M.T. & Tigano, M.S., Control of *Triatoma infestans* (Klug) (Reduviidae: Triatominae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.:Preliminary assays on formulation and application in the field. *Ann. Soc. Entomol. Brasil*, 1999. **28**:101-110.
- Luz, C., Fargues, J. & Romaña, C., Influence of starvation and blood meal-induced moult on the susceptibility of nymphs of *Rhodnius prolixus* Stål (Hem., Triatominae) to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. infection. *J. Appl. Entomol.*, 2003. **127**:153.
- Luz, C., Rocha, L.F.N., Nery, G.V., Magalhaes, B.P. & Tigano, M.S., Activity of oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in peridomestic areas in Central Brazil. *Mem. Inst. O. Cruz*, 2004. **99**:211-218.
- Maeng, J.H., Sakai, Y., Tani, Y. & Kato, N., Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Bacteriol.*, 1996. **178**:3695-3700.
- Magan, N. & Evans, P., Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *J Stored Prod Res*, 2000. **36**:319-340.
- Makula, R.A. & Finnerty, W.R., Microbial assimilation of hydrocarbons: cellular distribution of fatty acids. *J Bacteriol*, 1972. **112**:398-407.
- Margesin, R., Walder, G. & Schinner, F., The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnol.*, 2000. **20**:313-333.
- Margesin, R., Labbé, D., Schinner, F., Greer, C.W. & Whyte, L.G., Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003. **69**:3085-3092.
- Marti, G.A., Scorsetti, A.C., Siri, A. & López Lastra, C.C., Isolation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina:Hyphomycetes) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina. *Mycopathologia*, 2004. **00**:1-3.
- May, S.W. & Katoposis, A.G., Hydrocarbon monooxygenase system of *Pseudomonas oleovorans*. *Methods in enzymology*, 1990. **188**:3-9.
- McCauley, V.J.E., Zacharuk, R.Y. & Tinline, R.D., Histopathology of green muscardine in larvae of four species of *Elateridae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1968. **12**: p. 444-459.

- McKeen, W.E., Lipid in *Erysiphe graminis hordei* and its possible role during germination. *Can J Microbiol*, 1970. **16**(11): p. 1041-4.
- Meissel, M., Medvedeva, G.A., Kozlova, T.M., Pomoshnikova, H.A., Zaikina, A.I. & Fedoseeva, G.E. Regularities of penetration into yeast cells of higher fatty acids and hydrocarbons. En: *Proceedings of the 3rd Intetermational Symposium of Yeast*. Otaniemi, Helsinki., 1973.
- Menezes Bento, F., de Oliveira Camargo, F.A., Okeke, B.C. & Frankenberger, W.T. Jr., Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol Res*, 2005. **160**:249-255.
- Michán, S., Lledías, F., Baldwin, J. D., Natvig, D. O. & Hansberg, W., Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002. **33**:521-532.
- Mikami, Y., Fukushima, K., Arai, T., Abe, F., Shibuya, H. & Ommura, Y., Leucinostatins, peptide mycotoxins produced by *Paecilomyces lilacinus* and their possible roles in fungal infection. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, 1984. **257**:275-83.
- Mishina, M., Kamiryo, T., Tashiro, S., Hagihara, T., Tanaka, A., Fukui, S., Osumi, M. & Numa S., Subcellular localization of two long-chain acyl-coenzyme-A synthetases in *Candida lipolytica*. *Eur J Biochem*, 1978. **89**:321-8.
- Mishra, S., Sarma, P.M. & Lal, B., Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosm. *FEMS Microbiol Lett*, 2004. **235**:323-331.
- Monzon, A., Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas, 2001. **63**:95-103.
- Moore, D., Bateman, R.P., Carey, M. & Prior, C. Long-term storage of *Metarhizium flavoviridae conidia* in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Biocontrol Sci. Technol.*, 1995. **5**:193-199.
- Moran, A.C., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J.L. & Sineriz, F., Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation*, 2000. **11**(1):65-71.
- Muller-Kogler, E. & Samsinakova, A., Zur Massenkultur des Insektenpathogenen Pilzes *Beauveria bassiana*. *Experientia*, 1970. **26**:1400.
- Müller, E. & Loeffler, W., *Micología*. Barcelona: Ediciones Omega, 1976, p. 345.
- Napolitano, R. & Juárez, M.P., Entomopatogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997. **344**: p. 208-214.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. *Lehninger principles of biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed. New York: W H Freeman & Co, 2004.
- Neujahr, H.Y., Yeast in biodegradation and biodeterioration processes. En: Verachtert, H. & De Mot, R., editors. *Yeast: biotechnology and biocatalysis*, New York: Marcel Dekker, 1990.
- Nielsen, K., Nicholson, R.L., Carver, T.L.W., Kunoh, H. & Oliver, R.P., First touch: an immediate response to surface recognition in conidia of *Blumeria graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2000. **56**:63-70.

- Numa, S., Two long chain acyl-CoA synthases: Their different roles in fatty acid metabolism and its regulation. *Trends Biochem.Sci.*, 1981. **6**:113-115.
- Okada, H., Ueda, M & Tanaka A., Purification of peroxisomal malate synthase from alkane-grown *Candida tropicalis* and some properties of the purified enzyme. *Arch. Microbiol.*, 1986. **144**:137-141.
- Okada, H., Ueda, M., Sugaya, T., Atomi, H., Mozaffar, S., Hishida, T., Teranishi, Y., Okazaki, K., Takechi, T., Kamiryo, T. & Tanaka, A., Catalase gene of the yeast *Candida tropicalis*. *Eur. J. Biochem.*, 1987. **170**:105-110.
- Osumi, M., Miwa, N., Teranishi, Y., Tanaka, A. & Fukui, S., Ultrastructure of *Candida* yeasts grown on n-alkanes: appearance of microbodies and its relationship to high catalase activity. *Arch Microbiol*, 1974. **99**:181-201.
- Osumi, M., Fukuzumi, F., Teranishi, Y., Tanaka, A. & Fukui, F., Development of microbodies in *Candida tropicalis* during incubation in a n-alkane medium. *Arch Microbiol*, 1975. **103**:I-II.
- Palau, M.P., Relación hospedero-parásito *Trypanosoma cruzi*. *MVZ-Cordoba*, 2000. **5**:33-37.
- Paris, S., Debeaupuis, J.P., Crameri, R., Carey, M., Charles, F., Prevost, M.C., Schmitt, C., Philippe, B., Latge, J.P., Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*, 2003. **69**:1581-1588.
- Peeters, H., Matha, V. & Roberts, D.W. Enzymes involved in the synthesis of fungal toxins. *Proc. Int. Conf. Biopesticides: theory and practice*. 1989. Czechoslovakia.
- Pereira, R.M. & Roberts, D.W., Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1990. **56**:39-46.
- Pérez Consuegra, N., *Manejo ecológico de plagas*. La Habana: Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural, 2004. p. 296.
- Picollo, M.I., Vassena, C., Orihuela, P.S., Barrios, S., Zaidemberg, M. & Zerba, E., High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* from Northern Argentina. *J. Med. Entomol.*, 2005. **42**:637-642.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, DA, *Microbiology*. 4ta ed, Boston: McGraw-Hill, 1999, p. 962.
- Prior, C., Bateman, R.P. & Moore, D., *Entomopathogenic sprays*. 1995, UK Patent GB2255018B, 36 p.
- Pupin, A.M., Messias, C.L., Piedrabuena, A.G. & Roberts, D.W., Total lipids and fatty acids of strain of *Metarhizium anisopliae*. *Braz. J. Microbiol.*, 2000. **31**:121-128.
- Quesada-Moraga, E. & Vey, A., Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol Res*, 2004. **108**:441-452.
- Radwan, S.S., Sorkhoh, N.A., Felzmann, H. & El-Desouky, A.F., Uptake and utilization of n-octacosane and n-nonacosane by *Arthrobacter nicotianae* KCC B35. *J. Appl. Bacteriol.*, 1996. **80**:370-4.

- Radwan, S.S., Barabas, G., Sorkhoh, N.A., Damjanovich S., Szabo, I., Szollosi, J., Matko, J., Penyige, A., Hirano, T., Szabo, I.M., Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998. **169**(1):87-94.
- Ratault, C. & Vey, A., Production d'estérasas et de N-acetyl-beta-D-glucosaminidase dans le tégument du coléoptère *Oryctes rhinoceros* par le champignon entomopathogène *Metarrhizium anisopliae*. *Entomophaga*, 1977. **22**:289-294.
- Ratledge, C., Microbial oils and fats, an overview. En: Ratledge C. & Ratray, J., editors, *Biotechnology for the oils and fats industry*. Champaign IL: American Oil Chemists' Society, 1984, p. 119-127.
- Ratray, J.B.M., Schibeci, A., Kidby, D.K., Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.*, 1975. **39**:197-231.
- Rehner, S.A.. Phylogenetic of the insect pathogenic *Beauveria*. En: Vega, F. & Blackwell, M., Eds. *Insect fungal associations, ecology and evolution*. Oxford Univ. Press. N.Y., 2005, p. 3-28.
- Roberts, D.W & Humber, R.A., Entomogenous fungi. En: Cole, G.T. & Kendrick, B.C., editors. *Biology of conidial fungi*, New York: Academic Press, 1981, p. 201-236.
- Roberts, D.W., World picture of biological control of insects by fungi. *Mem. Inst. O. Cruz*, 1989. **84**:89-100.
- Roberts, D.W. & Hajek, A.E., Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. En: Leatham, G.J., editor. *Frontiers in industrial mycology*. New York: Chapman & Hall, 1992, p. 145-159.
- Roberts, D.W., Gupta, S., St. Leger, R.J., Metabolite production by entomopathogenic fungi. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 1992. **27**:325-47.
- Roling, W.F., Head, I.M. & Larter, S.R., The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Res. Microbiol.*, 2003. **154**:321-328.
- Romaña, C.A. & Fargues, J., Sensibilidad de las larvas de l'hémiptero hématófago *Rhodnius prolixus* aux hifomicetes entomopatogénes. *Entomophaga*, 1987. **32**:363-368.
- Romaña, C.A. & Fargues, J., Relative susceptibility of different stages of *Rhodnius prolixus* to the entomopathogenic hifomicete *Beauveria bassiana*. *Mem. Inst. O. Cruz*, 1992. **87**:363-368.
- Romero, C.M., Gatti, M.E., Córdoba, S., Cazau, C.M. & Arambarri, A.M., Physiological and morphological characteristics of yeasts isolated from waste oil effluents. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2000. **16**:683-686.
- Romero, C.M., Salvioli, M.L., Cazau, C.M. & Arambarri, A.M., Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. *Environ. Pollut.*, 2002. **117**:159-163.
- Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E. & Pell, J.K. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 2006. **51**: 331- 357.
- Samson, R.A., Latge, J.P. & Evans, H.C., editors. *Atlas of entomopathogenic fungi*, New York: Springer-Verlag, 1993.
- Sancholle, M. & Dalpé, Y., *Mycotaxon*, 1993. **49**:187-193.

- Scheller, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F. & Schunck, W.-H., Oxygenation cascade in conversion of n-alkanes to  $\alpha,\omega$ -dioic acids catalized by cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.*, 1998. **273**:32528-32534.
- Schnürer, J., Olsson, J. & Börjesson, Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genet. Biol.*, 1999. **27**:209-217.
- Shapiro-Ilan, D.I., Fuxa, J.R., Lacey, L.A., Onstad, D.W. & Kaya, H.K., Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *J. Invertebr. Pathol.*, 2005. **88**:1-7.
- Silva, J. & Messias CL., Virulência de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* a *Rhodnius prolixus*. *Cienc. Cult.*, 1985. **7**:37-40.
- Siporin, C. & Cooney, J.J., Extracellular lipids of *Cladosporium (Amorphotheca) resinae* grown on glucose or on n-alkanes. *Appl. Microbiol.*, 1975. **29**:604-609.
- Smith, R.J. & Grula, A., Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1981. **37**:222-230.
- Sorkhoh, N.A., Ghannoum, M.A., Ibrahim, A.S., Stretton, R.J. & Radwan, S.S., Growth of *Candida albicans* on hydrocarbons, lipids and sterols. *Microbios*, 1990. **64**:159-171.
- Sosa-Gómez, D.R., Boucias, D.G. & Nation, J.L., Attachment of *Metarhizium anisopliae* to de southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J. Invertebr. Pathol.*, 1997. **69**:31-39.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M. & Charnley, A.K., Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986a. **47**:167-177.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M., Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986b. **48**:85-95.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M. & Charnley, A.K., Utilization of alkanes by entomopathogenic fungi. *J. Invertebr. Pathol.*, 1988. **52**:356-359.
- St. Leger, R.J., Goettel, M., Roberts, D.W. & Staples, R.C., Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 1991. **58**:168-179.
- St Leger, R.J., Frank, D.C., Roberts, D.W. & Staples, R.C., Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Eur. J. Biochem.*, 1992. **204**:991-1001.
- St. Leger, R.J., Bidochka, M.J. & Roberts, D.W., Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. *Microbiology*, 1994. **140**:1651-1660.
- St. Leger, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J. & Roberts, D.W., Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. **93**:6349-6354.
- St. Leger, R.J. & Roberts, D.W., Engineering improved mycoinsecticides. *Trends Biotechnol.*, 1997. **15**:83-85.
- St. Leger, R.J. & Screen, S., Prospects for strain improvement of fungal pathogens of insects

- and weeds. En: Butt, T.M., Jackson, C. & Morgan, N., editors, *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford UK: CAB International, 2001, p. 219-238.
- Strasser, H., Vey, A. & Butt, T. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Sci. Technol.*, 2000. **10**: p. 717–735.
- Strobel, G.A., Dirkse, E., Sears, J. & Markworth, C., Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 2001. **147**:2943-2950.
- Subramani, S., Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev*, 1998. **78**:171-88.
- Sunesson, A.-L., Vaes, W.H.J., Nilsson, C-A, Blomquist, G., Andersson, B. & Carlson, R., Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995. **61**:2911-2918.
- Szafranek, B., Maliński, E., Nawrot, J., Sosnowska, D., Ruskowska, M., Pihlaja, K., Trumpakaj, Z., Szafranek, J., In vitro effects of cuticular lipids of the aphids *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* and *Brevicoryne brassicae* on growth and sporulation of the *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. *Arkivoc*, 2001. **(iii)**:81-84.
- Taborsky, V., Standardization of products in small-scale processing of microbial pesticides. *FAO Agricul. Serv. Bull.*, 1992, no. 96.
- Tanada, Y., Kaya, H.K., Fungal infections. En: *Insect pathology*. San Diego: Academic Press, 1993, p. 666.
- Tanaka, A., Osumi, M. & Fukui, S., Peroxisomes of alkane-grown yeast: fundamental and practical aspects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1982. **386**:183-199.
- Tanaka, A. & Fukui, S., Metabolism of n-alkanes. En: Tanaka, A. & Fukui, S., editors. *The yeast*, New York: Academic Press, 1989, p. 261-287.
- Tanaka, A. & Ueda, M., Assimilation of alkanes by yeasts: functions and biogenesis of peroxisomes. *Mycol. Res.*, 1993. **97**:1025-1044.
- Teranishi, Y., Tanaka, A., Osumi, M. & Fukui, S., Catalase activities of hydrocarbon-utilizing *Candida* yeasts. *Agr. Biol. Chem.*, 1974. **38**:1213-1220.
- Tuller, G., Nemeč, T., Hraštnik, C. & Daum, G., Yeast functional analysis reports: lipid composition of subcellular membranes of a FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeasts*, 1999. **15**:1555-1564.
- Ueda, M., Tanaka, A. & Fukui, S., Characterization of peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases purified from alkane-grown *Candida tropicalis*. *Eur J Biochem*, 1984. **138**:445-449.
- Ueda, M. & Tanaka, A., Long-chain alcohol dehydrogenase of *Candida* yeast. En: Lidstrom, M.E., editor. *Methods in enzymology*, Academic Press: New York, 1990.
- Valadares-Inglis, M.C. & Inglis, P.W., Transformation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* strain CG423 to benomyl resistance. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997. **155**:199-202.

- Valenciano, S., De Lucas, J.R., Pedregosa, A., Monistrol, I.F. & Laborda, F., Induction of  $\beta$ -oxidation enzymes and microbody proliferation in *Aspergillus niger*. *Arch. Microbiol.*, 1996. **166**:336-341.
- van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M. & Witholt, B., Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol.*, 2003. **58**:427-440.
- van Dyke, M.I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H. & Trevors, J.T., *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants. *Can. J. Microbiol.*, 1993. **39**:1071-1078.
- Vassena, C., Picollo, M.I. & Zerba, E., Situación actual de la resistencia a deltametrina en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) de la Argentina y Bolivia. En: VIII Simposio Internacional sobre Control Epidemiológico de Vectores, Buenos Aires, 2005.
- Veenhuis, M., Salomons, F.A. & Van Der Klei, I.J., Peroxisome biogenesis and degradation in yeast: a structure/function analysis. *Microsc Res Tech*, 2000. **51**:584-600.
- Vey A, Hoagland, R.E. & Butt, T.M., Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En: Butt TM, Jackson, C. & Magan N., editors, *Fungi as biocontrol agents*. Wallingford UK: CAB International, 2001, p. 311-346.
- Viljoen, B.C., Kock, J.L. & Lategan, P.M., Long-chain fatty acid composition of selected genera of yeasts belonging to the endomycetales. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1986. **52**:45-51.
- Walker, J.D. & Cooney, J.J., Pathway of n-alkane oxidation in *Cladosporium resinae*. *J. Bacteriol.*, 1973. **115**:635-639.
- Wang, C. & St. Leger, R.J., A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2006. **103**:6647-6652.
- Watkins, P.A., Fatty acid activation. *Prog. Lipid Res.*, 1997. **36**:55-83.
- Watkinson, R.J. & Morgan, P., Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, 1990. **1**:79-92.
- Weete, J.D., Algal and fungal waxes. En: Kolattukudy, P.E., editor, *Chemistry and biochemistry of natural waxes*, Amsterdam: Elsevier, 1976, p. 290-334.
- Weiss, L. & Greep, R.O., *Histología*. 4a ed. Barcelona: El Ateneo, 1982, p. 307.
- World Health Organization. Tropical disease research. Progress 1995-96. *Thirteenth programme report: UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*. Geneva: World Health Organization; 1997, p. 112-123.
- Whyte, L.G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonnière, L., Inniss, W.E. & Greer, C.W., Biodegradation of variable chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotropic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998. **64**:2578-2584.
- Whyte, L.G., Smits, T., Labbé, D., Witholt, B., Greer, C.W. & van Beilen, J., Cloning and characterization of multiple alkane hydroxylases in *Rhodococcus* spp. strain Q15 and 1631. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002. **68**:5933-5942.
- Wigglesworth, V.B., Structural lipids in the insect cuticle and the function of the oenocytes. *Tissue Cell*, 1970. **2**:155-179.

- Wigglesworth, V.B., The incorporation of lipid into the epicuticle of *Rhodnius* (Hemiptera). *J. Cell Sci.*, 1975. **19**:459-485.
- Woodbridge, B., Finley, K.F. & Seager, S.T., An investigation of the swainson's hawk in Argentina. *J. Raptor Res.*, 1995. **29**:202-204.
- Wösten, H.A.B., Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001. **55**:625-646.
- Xu, Q., Some problems about study and application of *Beauveria bassiana* against agricultural and forest pest in China. En: Li, Y.W., Li, Z.Z., Lian, Z.Q., Wu, J.W., Wu, Z.K. & Xu, Q.F., editors. *Study and application of entomogenous fungi in China*, Beijing: Academic Periodical Press, 1988, v. 1, p. 1-9.
- Yamada, T., Nawa, H., Kawamoto, S., Tanaka, A. & Fukui, S., Subcellular localization of long-chain alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase in n-alkane-grown *Candida tropicalis*. *Arch Microbiol*, 1980. **128**:145-151.
- Yano, I., Furukawa, Y. & Kusunose, M., Fatty-acid composition of *Arthrobacter simplex* grown on hydrocarbons. *Eur. J. Biochem.*, 1971. **23**:220-228.
- Yi, Z.H. & Rehm, H.J., Metabolic formation of dodecanedioic acid from n-dodecane by a mutant of *Candida tropicalis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1982. **14**:254-258.
- Zerba, E. ¿Tenemos las herramientas necesarias para el manejo de los insectos vectores? En: *VIII Simposio Internacional sobre Control Epidemiológico de Vectores*. Buenos Aires, 2005.
- Zeringue, H.J., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E., C(15)H(24) Volatile compounds unique to aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Appl Environ. Microbiol*, 1993. **59**(7): p. 2264-2270.
- Zobell, C.E., Assimilation of hydrocarbons by microorganisms. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, 1950. **10**:443-486.