



UNIVERSIDAD LAICA "ELOY ALFARO" DE MANABÍ

Extensión El Carmen

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Creada Ley No 10 – Registro Oficial 313 de noviembre 13 de 1985

PROYECTO DE INVESTIGACION

**TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
AGROPECUARIA**

**INFLUENCIA DE SUSTRATOS ORGANICOS LIQUIDOS EN LA
MULTIPLICACION DE *BEAUVERIA BASSIANA* BAJO CONDICIONES DE
LABORATORIO**

AUTOR:

Orbes Dueñas Daniel Alexander

TUTOR:

Ing. Ricardo Paúl González Dávila, M.C

EL Carmen - Manabí – Ecuador 2026

	NOMBRE DEL DOCUMENTO: CERTIFICADO DE TUTOR(A)	CÓDIGO: PAT-04-F-010
	PROCEDIMIENTO: TITULACIÓN DE ESTUDIANTES DE GRADO BAJO LA UNIDAD DE INTEGRACION CURRICULAR	REVISIÓN: 1 Página 1 de 1

CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutor de la Extensión de El Carmen de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, CERTIFICO:

Haber dirigido y revisado el trabajo de integración curricular, bajo la autoría del estudiante **Orbes Dueñas Daniel Alexander** legalmente matriculado en la carrera de Ingeniería Agropecuaria, período académico 2026 (1), cumpliendo el total de 384 horas, bajo la opción de titulación, cuyo tema del proyecto de investigación es **“Influencia de sustratos orgánicos líquidos en la multiplicación de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de laboratorio”**

La presente investigación ha sido desarrollada en apego al cumplimiento de los requisitos académicos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico y en concordancia con los lineamientos internos de la opción de titulación en mención, reuniendo y cumpliendo con los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometida a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

El Carmen, 03 de agosto del 2026.

Lo certifico,



Ing. Ricardo Paul González Dávila, M.C

Docente Tutor

Área: Agricultura/ Silvicultura, Pesca y Veterinaria

UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ
EXTENSIÓN EL CARMEN

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

TÍTULO:

Influencia de sustratos orgánicos líquidos en la multiplicación de *Beauveria*
bassiana bajo condiciones de laboratorio

AUTOR: Orbes Dueñas Daniel Alexander

TUTOR: Ing. González Dávila Ricardo Paúl, *M.C*

TRABAJO EXPERIMENTAL PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGROPECUARIO

TRIBUNAL DE TITULACIÓN



Mg. Kleber Fernando Mejía Chanaluiza



Mg. Marco Vinicio De La Cruz Chicaiza



PhD. Francel Xavier López Mejía

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, **Daniel Alexander Orbes Dueñas** con cédula de ciudadanía **220033370-2**, estudiante de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, Extensión el Carmen, de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria, declaro que soy autor de la tesis titulada **“Influencia de sustratos orgánicos líquidos en la multiplicación de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de laboratorio”**, esta obra es original y no infringe derechos de propiedad intelectual. Asumo la responsabilidad total en su contenido y afirmo que todos los conceptos, ideas, textos y resultados que no son de mi autoría están debidamente citados y referenciados.

Atentamente,



Daniel Alexander Orbes Dueñas

DEDICATORIA

En primer lugar, dedico este logro a Dios, por ser mi guía, mi fortaleza y el sustento de mi fe durante cada etapa de este camino. Gracias por concederme salud, sabiduría, perseverancia y la oportunidad de culminar esta importante meta. En los momentos de incertidumbre y dificultad, su presencia me permitió mantener la esperanza y encontrar la fuerza necesaria para continuar hasta alcanzar este sueño.

A mi madre, Melina Dueñas por su amor incondicional y por el inmenso apoyo emocional, afectivo y económico que me ha brindado a lo largo de todos estos años. Su esfuerzo, sacrificio y confianza en mí han sido fundamentales para superar cada obstáculo que se presentó durante mi formación académica. Este logro también es suyo, porque sin su respaldo constante no habría sido posible llegar hasta aquí.

A mis queridos abuelos paternos, Félix Orbes y Lourdes Eugenio quienes, con su cariño, sus consejos y su apoyo incondicional han sido un pilar fundamental en mi vida. Gracias por acompañarme durante este largo proceso, por creer siempre en mí y por enseñarme, con su ejemplo, el valor del trabajo, la humildad y la perseverancia. Este logro también les pertenece, como reconocimiento a todo lo que han hecho por mi bienestar y crecimiento personal.

A mi amada esposa, Nieve Marcillo, por caminar a mi lado durante esta etapa de mi vida, brindándome su amor, comprensión y apoyo emocional en los momentos más exigentes de mi formación universitaria. Gracias por creer en mis capacidades, motivarme cuando las dificultades parecían insuperables y celebrar conmigo cada pequeño avance. Tu compañía y confianza fueron una fuente constante de fortaleza para alcanzar esta meta.

A mis hermanos mayores, quienes han sido una fuente de inspiración por su ejemplo, esfuerzo y dedicación. Sus experiencias y enseñanzas me motivaron a creer que con disciplina, compromiso y perseverancia es posible alcanzar los objetivos propuestos. Gracias por demostrarme, con sus acciones, la importancia de luchar por los sueños.

También, dedico este logro a mis hermanas menores, quienes representan una de mis mayores motivaciones para seguir creciendo como persona y profesional. Deseo que este logro les sirva como ejemplo de que, con esfuerzo, constancia y determinación, es posible superar cualquier desafío. Espero inspirarlos a perseguir sus propias metas y nunca dejar de creer en sus capacidades.

A mis amigos y compañeros, quienes compartieron conmigo esta etapa de formación académica, les dedico este logro con profundo aprecio. Gracias por los momentos de aprendizaje, las experiencias vividas, el compañerismo, el apoyo mutuo y las palabras de aliento en los momentos de mayor dificultad. Cada conversación, cada trabajo realizado en equipo y cada desafío superado contribuyeron a hacer de este camino una experiencia enriquecedora. Me llevo no solo conocimientos, sino también valiosas amistades y recuerdos que permanecerán conmigo a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a Dios, por ser mi guía y fortaleza durante cada etapa de este camino. Gracias por bendecirme con salud, sabiduría y perseverancia para afrontar cada desafío y permitirme culminar una de las metas más importantes de mi vida. Sin su gracia y compañía, este logro no habría sido posible.

A mi madre Melina Dueñas, expreso mi eterna gratitud por su amor incondicional, su apoyo emocional, económico y afectivo, y por cada sacrificio realizado para verme alcanzar este sueño. Gracias por creer en mí incluso cuando el camino parecía difícil, por brindarme siempre una palabra de aliento y por enseñarme que el esfuerzo y la perseverancia son la base para alcanzar cualquier objetivo. Este logro también refleja todo lo que has hecho por mí.

A mis queridos abuelos paternos, Félix Orbes y Lourdes Eugenio, les agradezco de corazón por el cariño, los consejos y el apoyo que me brindaron durante todos estos años. Su confianza, sus enseñanzas y los valores que me inculcaron han sido fundamentales en mi formación como persona y futuro profesional. Gracias por estar siempre presentes y acompañarme en cada paso de este proceso.

A mi esposa, Nieve Marcillo, gracias por ser mi compañera incondicional durante esta etapa de mi vida. Tu amor, comprensión, paciencia y apoyo emocional fueron el impulso que necesité para seguir adelante en los momentos de mayor exigencia. Gracias por confiar en mí, por celebrar cada avance y por recordarme que ningún sueño es imposible cuando se lucha con determinación.

De manera muy especial, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis compañeros de tesis, Josué Sevillano y Samantha Calle, por su compromiso, responsabilidad y colaboración durante el desarrollo de esta investigación. Gracias por el esfuerzo compartido, las largas jornadas de trabajo, el intercambio de ideas y el apoyo brindado en cada etapa del estudio. La dedicación y el trabajo en equipo que demostramos hicieron posible superar cada desafío y

alcanzar con éxito este importante objetivo académico. Ha sido un privilegio compartir este proceso con ustedes.

A mi tutor Ing. Paúl González, *M.C*, expreso mi más sincero agradecimiento por su valiosa orientación, dedicación y compromiso durante el desarrollo de esta investigación. Gracias por compartir sus conocimientos, brindar sus acertadas observaciones y acompañarme con paciencia y profesionalismo en cada etapa de este proceso. Sus consejos, experiencia y exigencia académica fueron fundamentales para fortalecer este trabajo y contribuir a mi formación como profesional. Le agradezco profundamente el tiempo, la confianza y el apoyo brindados para alcanzar con éxito la culminación de esta tesis.

INDICE

DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VII
INDICE DE TABLA	XIII
INDICE DE FIGURAS.....	XIV
INDICE DE ANEXOS	XV
RESUMEN	XVI
ABSTRATC.....	XVII
Introducción	18
Objetivos	22
Objetivo General.....	22
Objetivos específicos	22
Hipótesis	22
CAPITULO I	1
1. Marco teórico	1
1.1 <i>Beauveria bassiana</i> : Características biológicas y ecológicas	1
1.2. Unidades Formadoras de colonias (UFC)	2
1.3. Cámara de Neubauer	2
1.4. Fermentación sumergida en cultivos de hongos entomopatógenos	3
1.5. Sustrato líquido para el cultivo de <i>Beauveria bassiana</i>	4
1.6. Cuantificación Celular Mediante Cámara de Neubauer.....	6
1.7. Factores que influyen en la multiplicación y viabilidad de <i>Beauveria bassiana</i> en cultivos líquidos.	7

1.8.	Factores ambientales	7
1.9.	Factores nutricionales.....	8
1.10.	Aplicaciones de <i>Beauveria bassiana</i> en controles biológicos.....	8
1.11.	Mecanismo de acción como controlador biológico	9
1.12.	Aplicaciones en Ecuador	9
1.13.	Ventajas del uso de <i>Beauveria bassiana</i> como biocontrolador	10
1.14.	Influencia de sustratos líquidos en la producción de <i>Beauveria bassiana</i>	11
CAPITULO II		13
2	Estado del arte.....	13
CAPITULO III.....		15
3.	Diagnostico o estudio de campo	15
3.1.	Ubicación del ensayo.....	15
3.2.	Características climatológicas de la zona.....	15
3.3.	Materiales y Herramientas	16
3.3.1.	Equipos de Laboratorio.....	16
3.3.2.	Materiales.....	16
3.3.3.	Insumos (sustratos)	16
3.3.4.	Construcción del cuarto de aislamiento “laboratorio”	16
3.3.5.	Medios de Cultivo y Reactivos	17
3.4.	Enfoque y tipo de investigación	17
3.5.	Material biológico	17
4.	Métodos	17
4.1.	Preparación de sustratos líquidos	17
4.2.	Medición de pH de los respectivos tratamientos	18

4.3.	Inoculación de <i>Beauveria bassiana</i>	19
4.4.	Manejo del ensayo.....	20
4.4.1.	Limpieza y desinfección del área de trabajo.....	20
4.4.2.	Preparación de los sustratos líquidos	20
4.4.3.	Esterilización de los sustratos y materiales.....	20
4.4.4.	Preparación del inóculo.....	20
4.4.5.	Inoculación de los sustratos líquidos	20
4.4.6.	Incubación de las cepas.....	20
4.4.7.	Toma de datos.....	21
4.5.8.	Tabulación, análisis e interpretación de resultados.....	21
5.	Unidad experimental	21
5.1.	Modelo experimental	21
6.1.	Método experimental	22
6.1.	Método observacional	22
6.2.	Método descriptivo.....	22
6.3.	Análisis experimental.....	22
7.	Diseño del área experimental	23
8.	Manejo de los experimentos.....	24
9.	Variables dependientes.....	26
10.	Variables independientes.....	26
CAPITULO IV		27
4.	Resultados	27
4.1.	Producción de UFC de <i>Beauveria bassiana</i> en los tratamientos evaluados..	27
4.2.	Resumen estadístico	28

4.3. Comparación de medias de Tukey	28
4.4. Descripción del comportamiento de los tratamientos	29
4.5. Interpretación del gráfico de barras.....	29
CONCLUSIONES	XXX
RECOMENDACIONES.....	XXXI
BIBLIOGRAFÍA	XXXII
ANEXOS	XXXVIII

INDICE DE TABLA

Tabla 1: Características climatológicas	15
Tabla 2: Preparación de sustratos líquidos	17
Tabla 3 Cuadro del nivel de pH	19
Tabla 4 Prueba de ANOVA / ADEVA con la ayuda del software estadístico INFOSTAT versión 2020.....	21
Tabla 6 Comparación de medias de la concentración de <i>Beauveria bassiana</i> (UFC/mL) entre tratamientos según la prueba de Tukey.	28

INDICE DE FIGURAS

<i>Ilustración 1. Esquema estructural de la cámara de Neubauer o hemacitometro</i>	<i>3</i>
<i>Ilustración 2. Conteo de Células en Cámaras de Neubauer (improved)</i>	<i>6</i>
<i>Ilustración 3. Ubicación del laboratorio agrícola en la Granja Experimental Río Suma</i>	<i>15</i>
<i>Ilustración 4. Potenciómetro.....</i>	<i>19</i>
<i>Ilustración 5. Modelo 3D de laboratorio agrícola de la granja experimental-ULEAM</i>	<i>23</i>
<i>Ilustración 6. Concentración de UFC de Beauveria bassiana, según la influencia de sustratos sólidos bajo condiciones de laboratorio.....</i>	<i>27</i>

INDICE DE ANEXOS

<i>Anexos 1. Implementación de la cámara de aislamiento</i>	<i>XXXVIII</i>
<i>Anexos 2 Elaboración de tratamientos experimentales</i>	<i>XXXVIII</i>
<i>Anexos 3 Mediciones de PH de los diferentes tratamientos</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Anexos 4 Inoculación de Beauveria Bassiana</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Anexos 5 Toma de muestra de los sustratos para el conteo en cámara de Neubauer</i>	<i>¡Error!</i>
<i>Marcador no definido.</i>	
<i>Anexos 6 Toma de datos.....</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<i>Anexos 7 Análisis UFC</i>	<i>XLI</i>

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo determinar la influencia de diferentes sustratos líquidos en la multiplicación de *Beauveria bassiana* bajo condiciones controladas de laboratorio en la Granja Experimental Río Suma de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, Extensión El Carmen. El estudio se justificó por la importancia de este hongo entomopatógeno como agente de control biológico y por la necesidad de optimizar su producción mediante fermentación líquida para obtener biopreparados más eficientes y escalables. Se empleó un enfoque cuantitativo experimental bajo un Diseño Completamente al Azar, con 5 tratamientos y 4 repeticiones, totalizando 20 unidades experimentales. Los tratamientos consistieron en combinaciones de melaza como fuente de carbono con distintas fuentes de nitrógeno, incluyendo harina de pescado, extracto de papa, harina de soja y levadura. La multiplicación fúngica se evaluó mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), y los datos fueron analizados mediante ANOVA y la prueba de Tukey al 5,0 %. Los resultados evidenciaron un adecuado ajuste estadístico del modelo ($R^2 = 0,96$) y un coeficiente de variación de 6,87 %, indicando alta precisión experimental. Se observaron diferencias significativas entre tratamientos, destacándose el tratamiento 2 (melaza, extracto de papa y levadura), que alcanzó la mayor producción con 146,5 millones de UFC/mL ($1,465 \times 10^8$ UFC/mL), mientras que el tratamiento 1 registró el menor rendimiento con 59,81 millones de UFC/mL ($5,98125 \times 10^7$ UFC/mL). Se concluyó que la composición del sustrato líquido influye significativamente en la multiplicación de *B. bassiana*, identificándose el tratamiento 2 como la formulación más eficiente para su producción en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, sustratos líquidos control biológico, multiplicación fúngica

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the influence of different liquid substrates on the growth of *Beauveria bassiana* under controlled laboratory conditions at the Río Suma Experimental Farm of the Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, El Carmen Extension. The study was justified by the importance of this entomopathogenic fungus as a biological control agent and the need to optimize its production through liquid fermentation to obtain more efficient and scalable biopreparations. A quantitative experimental approach was employed under a Completely Randomized Design, with 5 treatments and 4 replicates, totaling 20 experimental units. The treatments consisted of combinations of molasses as a carbon source with different nitrogen sources, including fish meal, potato extract, soybean meal, and yeast. Fungal growth was assessed by counting Colony-Forming Units (CFU), and data were analyzed using ANOVA and Tukey’s test at 5.0%. The results showed an adequate model fit ($R^2 = 0.96$) and a coefficient of variation of 6.87%, indicating high experimental precision. Significant differences were observed among treatments, with Treatment 2 (molasses, potato extract, and yeast) standing out by achieving the highest production at 1.465×10^8 CFU/mL, whereas Treatment 1 recorded the lowest yield at 5.98125×10^7 CFU/mL. It is concluded that liquid substrate composition significantly influences the growth of *B. bassiana*, and Treatment 2 was identified as the most efficient formulation for its production under laboratory conditions.

Key Words: *Beauveria bassiana*, liquid substrates, biological control, fungal growth

Introducción

En un contexto donde la sostenibilidad agrícola es cada vez más prioritaria, el control biológico se posiciona como alternativa frente al uso intensivo de agroquímicos, y *Beauveria bassiana* destaca como uno de los agentes de biocontrol más prometedores, se trata de un hongo entomopatógeno capaz de infectar y controlar más de 700 especies de insectos sin afectar a organismos no objetivo, lo que lo convierte en una herramienta eficaz y ecológica para el manejo integrado de plagas; sin embargo, potenciar su aplicación en campo depende de optimizar su producción masiva, especialmente mediante fermentación en sustratos líquidos, ya que los métodos tradicionales en sustratos sólidos presentan limitaciones de escalabilidad y estandarización (Wahjono, 2024).

Beauveria bassiana es uno de los hongos entomopatógenos más importantes a nivel mundial y lidera el mercado de los micropesticidas registrados. Según (Jiang, 2023), este éxito se debe al desarrollo de cepas altamente virulentas y a la mejora de los métodos de producción y formulación. Actualmente, la investigación se centra en optimizar la fermentación líquida o sumergida para producir blastosporas con mejores características biológicas. (Coleman., 2023) señala que el estrés osmótico durante este proceso influye en la producción, morfología y viabilidad de las blastosporas. Estos hallazgos demuestran que el control de las condiciones de cultivo puede incrementar la eficiencia y calidad de los biopesticidas elaborados con *B. bassiana*.

Las aplicaciones de *Beauveria bassiana* abarcan diversas plagas de importancia agrícola, destacándose su eficacia contra el barrenador del maíz, el gusano cogollero y la mosca blanca (Bhadani, 2021). También se han desarrollado estrategias innovadoras como la encapsulación de conidios para controlar larvas de *Aedes aegypti* y la colonización endofítica de plantas para brindar protección sistémica contra insectos. Gracias a su amplia versatilidad y efectividad, *B. bassiana* se ha consolidado como una herramienta clave dentro de los programas de manejo integrado de plagas, contribuyendo a disminuir el uso de insecticidas químicos (González, 2021).

En Ecuador, *Beauveria bassiana* ha cobrado importancia como agente de control biológico en diversos cultivos de interés económico. Estudios recientes han evaluado su eficacia

contra el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en maíz de la provincia de Los Ríos y contra el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*) en la región andina (Gaíbor Fernández, 2023). Asimismo, se ha utilizado para el manejo del picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus*). Estos resultados demuestran su potencial y adaptabilidad para fortalecer los sistemas de producción agrícola sostenibles en el país (Chancusig Espin, 2024).

En Ecuador, destaca la investigación sobre la cepa nativa INIAP L3B3 de *Beauveria bassiana* para el control de la garrapata del ganado (*Rhipicephalus microplus*), demostrando su potencial no solo en la agricultura, sino también en la producción pecuaria (Hidalgo, 2025). Asimismo, se han impulsado estudios orientados al fortalecimiento de la producción local de hongos entomopatógenos. En este contexto, (Merino Peñafiel y Tinoco Gómez, 2016) evaluaron distintos suplementos nutritivos en sustratos sólidos para la producción masiva de cepas nativas de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, contribuyendo al desarrollo de alternativas sostenibles para el control biológico de plagas.

La producción de *Beauveria bassiana* mediante fermentación líquida constituye una alternativa prometedora para la elaboración de bioplaguicidas, ya que permite un mayor control de las condiciones de cultivo, facilita la automatización y favorece la obtención de blastosporas con características específicas. En Ecuador, (Lucero M. L., 2024) comparó los métodos de fermentación líquida y sólida para la producción de este hongo, destacando su importancia para el desarrollo de tecnologías locales. Estos avances contribuyen a reducir la dependencia de productos importados y a generar biopesticidas adaptados a las condiciones agroecológicas del país.

El metabolismo del carbono y nitrógeno es fundamental para la multiplicación y desarrollo de *Beauveria bassiana*, por lo que la formulación adecuada de los medios de cultivo resulta clave para optimizar su producción (Filippou, 2021). La disponibilidad de estos nutrientes influye en la cantidad, calidad y virulencia de las estructuras fúngicas obtenidas. Además, estudios recientes indican que el estrés osmótico del medio de cultivo puede afectar la producción y viabilidad de las blastosporas, permitiendo mejorar el rendimiento del hongo mediante ajustes específicos en

la composición del sustrato (Mascarin, Kobori y Coleman., 2023).

La investigación sobre la influencia de sustratos líquidos en la multiplicación de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de laboratorio representa una necesidad imperativa para el desarrollo agrícola sostenible del cantón El Carmen en la provincia de Manabí, Ecuador. Este estudio adquiere particular relevancia considerando las características agroecológicas de la región y los desafíos fitosanitarios que enfrentan sus sistemas productivos predominantes.

El Carmen, en la provincia de Manabí, es una zona de gran importancia agrícola donde los cultivos de banano y plátano tienen una destacada participación en la producción nacional. No obstante, estos cultivos enfrentan problemas fitosanitarios relevantes, especialmente por la presencia del picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus*), una plaga que reduce considerablemente los rendimientos. (González Dávila R. V., 2022) reportó resultados favorables en el control biológico de esta plaga mediante el uso de *Beauveria bassiana* en plantaciones de *Musa* AAB de El Carmen. Sin embargo, la limitada disponibilidad de biopreparados de calidad sigue siendo una barrera para su adopción a gran escala por parte de los productores locales.

La optimización de la producción de *B. bassiana* mediante fermentación en sustratos líquidos podría transformar significativamente esta situación, permitiendo una producción más estandarizada, escalable y costo-efectiva, como señalan (Lucero J. M., 2024), en su reciente investigación sobre "Producción de *Beauveria bassiana* para la formulación de bioplaguicidas" realizada en Ecuador, existen ventajas comparativas en los métodos de fermentación líquida frente a los sistemas tradicionales de fermentación sólida, los cultivos líquidos facilitan un mayor control sobre las variables de producción, permiten la automatización de procesos y posibilitan la obtención de blastosporas con características potencialmente superiores en términos de viabilidad, patogenicidad y vida de anaquel.

El contexto ambiental y socioeconómico de la región refuerza la necesidad de esta investigación. La provincia de Manabí ha experimentado un incremento en la conciencia sobre los impactos negativos de los plaguicidas químicos, tanto en la salud humana como en los ecosistemas locales. Un ejemplo ilustrativo es el estudio de (Peña Haro, 2024), sobre el control biológico de *Prodidiplosis longifila* en cultivos de tomate en Manabí utilizando insecticidas orgánicos, que refleja esta tendencia hacia métodos más sostenibles; el desarrollo de tecnologías locales para la producción eficiente de *B. bassiana* se alinea perfectamente con esta transición hacia una agricultura de menor impacto ambiental.

Además, las investigaciones previas en Ecuador sobre optimización de la producción de hongos entomopatógenos proporcionan una base sólida para este estudio (Merino Peñafiel, 2016), evalúan suplementos nutritivos sobre sustratos sólidos para la producción masiva de cepas nativas de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, demostrando el interés científico por desarrollar tecnologías adaptadas a las condiciones locales, extender estas investigaciones hacia sustratos líquidos representa una evolución natural y necesaria en este campo.

Un aspecto particularmente relevante es el potencial para utilizar cepas nativas en esta investigación. El estudio de (Arias-Hidalgo, 2025), sobre la cepa ecuatoriana INIAP L3B3 de *B. bassiana* para el control de la garrapata del ganado (*Rhipicephalus microplus*) demuestra que las cepas locales pueden ofrecer ventajas significativas debido a su adaptación a las condiciones ambientales específicas. Identificar y optimizar el crecimiento de cepas nativas de El Carmen en sustratos líquidos podría maximizar la eficacia de los biopreparados resultantes, asegurando un mejor desempeño en campo.

La combinación de estos factores presencia documentada de plagas susceptibles al control con *B. bassiana* en El Carmen, experiencias previas exitosas de biocontrol en la región, tendencia creciente hacia la agricultura sostenible, potencial económico para los productores locales, y base científica existente en Ecuador justifica plenamente la inversión en investigación sobre sustratos líquidos para la optimización del crecimiento de este hongo entomopatógeno. Los resultados de este estudio podrían catalizar el desarrollo de capacidades locales para la producción de

bioinsumos, contribuyendo significativamente a la sostenibilidad ambiental y económica de los sistemas agrícolas en El Carmen y, potencialmente, en otras regiones de Ecuador con desafíos similares.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la influencia de sustratos orgánicos líquidos en la multiplicación de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de laboratorio.

Objetivos específicos

- Evaluar el comportamiento del hongo en diferentes sustratos líquidos.
- Establecer cuál de los sustratos permite una mayor multiplicación de *Beauveria bassiana*.
- Identificar el sustrato líquido más eficiente para la producción de *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio.

Hipótesis

- Hipótesis general (H_i): Los diferentes sustratos líquidos influyen significativamente en la multiplicación de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de laboratorio.
- Hipótesis nula (H_0): No existen diferencias significativas en la multiplicación de *Beauveria bassiana* entre los diferentes sustratos líquidos evaluados.
- Hipótesis alternativa (H_1): Al menos uno de los sustratos líquidos produce una multiplicación significativamente mayor de *Beauveria bassiana* respecto a los demás tratamientos.

CAPITULO I

1. Marco teórico

1.1 *Beauveria bassiana*: Características biológicas y ecológicas

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno cosmopolita perteneciente al phylum Ascomycota, clasificado dentro de los hongos clavicipitáceos y relacionado filogenéticamente con el género *Cordyceps*, se caracteriza por su capacidad natural para parasitar e infectar a más de 700 especies de insectos de diferentes órdenes, lo que lo convierte en uno de los agentes de control biológico más importantes a nivel mundial. En su estado natural, este hongo habita en el suelo, donde puede sobrevivir como saprófito, pero su relevancia ecológica proviene principalmente de su función como regulador de poblaciones de insectos (Martínez, 2020).

Los análisis moleculares basados en secuencias de ADN ribosómico (ITS) y del factor de elongación 1-alfa han revelado una considerable diversidad críptica dentro de la especie, evidenciando la existencia de múltiples linajes genéticos con características potencialmente diferentes en cuanto a virulencia, especificidad y adaptación ambiental (Rehner, 2005), esta diversidad genética tiene implicaciones directas para la selección de cepas en programas de control biológico, ya que diferentes aislamientos pueden mostrar variabilidad en su patogenicidad contra plagas específicas.

El ciclo infectivo de *B. bassiana* inicia con la adhesión de los conidios (esporas) a la cutícula del insecto hospedero, seguida por la germinación y penetración a través del tegumento mediante una combinación de presión mecánica y acción enzimática (principalmente proteasas, lipasas y quitinasas); una vez en el hemocele, el hongo se desarrolla y coloniza los tejidos internos, produciendo metabolitos secundarios (principalmente beauvericina y basianólidos) que contribuyen a la muerte del insecto (Lucero M. L., 2024). Finalmente, bajo condiciones favorables de humedad, el micelio emerge del cadáver y produce nuevos conidios, completando así su ciclo y permitiendo la dispersión a nuevos hospederos (Mero, 2023).

La secuenciación del genoma de *B. bassiana* ha proporcionado información valiosa sobre la base genética de su patogenicidad, revelando un amplio repertorio de genes que codifican para enzimas degradadoras de la cutícula, metabolitos secundarios y proteínas implicadas en la evasión del sistema inmune del insecto (Xiao, 2012), estos estudios genómicos han contribuido significativamente a comprender la evolución de la entomopatogenicidad en este hongo y han abierto nuevas perspectivas para la mejora genética de cepas con fines de biocontrol.

1.2. Unidades Formadoras de colonias (UFC)

UFC (Unidad Formadoras de colonias) y en inglés CFU (Colony Forming Units), en la microbiología es un indicador de los microorganismos vivos que existen en la parte líquida; describe el número de células de un organismo en el agua, estos en la microbiología, describen las colonias que se pueden multiplicar en un cultivo celular. Tomando en cuenta que se necesita tomar por un periodo de tiempo las medidas de UFC, ya que, una sola bacteria se puede convertir en una gran colonia.

Según (Yael, 2020), se utiliza para reportar la cuenta de las colonias en placa, las cuales se puede sugerir de una célula o varias de ellas, esta técnica se basa en contar los gramos o miligramos que hay en una muestra con una temperatura adecuada. Para que las colonias se puedan controlar de una manera confiable, se debe realizar diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de colocar en la muestra del cultivo.

1.3. Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es un instrumento cuyo origen se remonta al siglo XIX, cuando el médico alemán Karl Neubauer la diseñó con el objetivo de perfeccionar la exactitud en los procesos de cuantificación celular. Antes de que este dispositivo existiera, el conteo de células resultaba impreciso, dado que los resultados dependían en gran medida de las habilidades individuales de cada investigador. Con el paso del tiempo, la cámara se consolidó como una herramienta fundamental para satisfacer distintas necesidades tanto en el ámbito científico como en el clínico. Desde el punto de vista estructural, el dispositivo está fabricado en vidrio y cuenta

en su superficie con una serie de cuadrículas reticulares que permiten identificar y cuantificar células o partículas de forma más eficiente y ordenada. Asimismo, la cámara dispone de dos zonas principales destinadas a recibir la muestra, las cuales fueron concebidas para garantizar que el líquido se extienda de manera homogénea sobre toda la superficie reticular (Cislab, 2023).

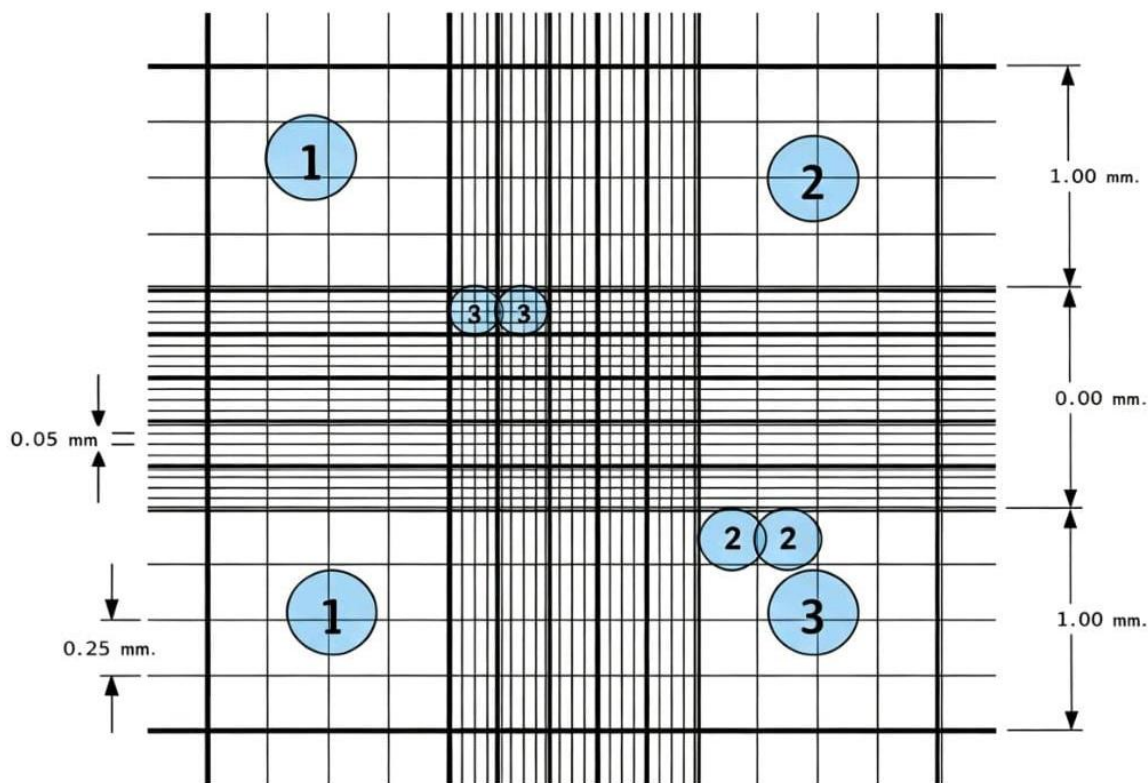


Ilustración 1 Esquema estructural de la cámara de Neubauer o hemacitometro

1.4. Fermentación sumergida en cultivos de hongos entomopatógenos

La producción masiva de *B. bassiana* con fines de biocontrol se realiza mediante dos métodos principales: la fermentación en estado sólido (FES) y la fermentación sumergida o cultivo líquido (FS), mientras que la FES ha sido tradicionalmente el método más utilizado para la producción comercial, generando principalmente conidios aéreos, la fermentación sumergida presenta ventajas significativas en términos de escalabilidad, control de proceso y rendimiento la fermentación sumergida consiste en el cultivo del hongo en un medio líquido que contiene los

nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción. Este sistema permite un control preciso de parámetros como temperatura, pH, agitación y aireación, facilitando la optimización del proceso y la estandarización del producto final (Coleman., 2023). Además, la automatización es más factible en este tipo de fermentación, lo que reduce la mano de obra y los riesgos de contaminación (Mata Astorga, 2008).

En cultivo líquido, *B. bassiana* produce principalmente dos tipos de propágulos: blastosporas y conidios sumergidos, las blastosporas son células fúngicas unicelulares producidas asexualmente por gemación durante el crecimiento vegetativo en medio líquido, estos propágulos se caracterizan por su rápida germinación y, en consecuencia, por su potencial para causar infección más rápidamente que los conidios aéreos tradicionales; sin embargo, presentan como desventaja su menor resistencia a condiciones ambientales adversas, lo que puede limitar su vida útil en formulaciones comerciales (CEBA., 2019).

La producción de blastosporas mediante fermentación sumergida ha sido objeto de numerosas investigaciones orientadas a optimizar su rendimiento, viabilidad y eficacia como agentes de biocontrol, estudios recientes han demostrado que, mediante la manipulación adecuada de las condiciones de cultivo y la formulación, es posible mejorar significativamente la tolerancia de las blastosporas al secado y al almacenamiento, superando así una de sus principales limitaciones (Lucero J. , 2024).

1.5. Sustrato líquido para el cultivo de *Beauveria bassiana*

La selección de sustratos líquidos adecuados constituye un factor determinante en la producción eficiente y económicamente viable de *B. bassiana*, los medios de cultivo líquidos para la fermentación sumergida deben proporcionar todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la esporulación del hongo, siendo particularmente importantes las fuentes de carbono y nitrógeno (Lucero J. , 2024).

Las fuentes de carbono comúnmente utilizadas incluyen glucosa, sacarosa, maltosa y dextrosa, siendo la glucosa la más empleada por su fácil asimilación, por otro lado, las fuentes de nitrógeno pueden ser orgánicas (levadura, harina de soja) proporcionan, además de nitrógeno, vitaminas y otros factores de crecimiento (Coleman., 2023)

Investigaciones recientes han explorado la utilización de subproductos agroindustriales como sustratos alternativos para la producción de *B. bassiana*, buscando reducir costos y contribuir a la economía circular. Entre estos subproductos destacan la melaza de caña, residuos de cervecería, suero de leche y extractos de origen vegetal, un estudio publicado en Ecuador por (Lucero J. , 2024), evaluó diversos medios para la producción de *B. bassiana*, encontrando que aquellos formulados con subproductos agroindustriales pueden ofrecer rendimientos competitivos a un costo significativamente menor.

La composición del medio de cultivo no solo afecta el rendimiento en términos de biomasa y concentración de propágulos, sino también características críticas como la virulencia, la tolerancia a factores de estrés y la vida útil del producto final. Por ejemplo, se ha demostrado que medios ricos en proteínas pueden mejorar la actividad enzimática y la patogenicidad de las blastosporas, mientras que la adición de osmolitos (como glicerol o trehalosa) puede incrementar su tolerancia a la desecación (Coleman., 2023).

La relación C: N (carbono: nitrógeno) del medio es otro parámetro crucial que influye en el metabolismo del hongo y, por tanto, en el tipo y cantidad de propágulos producidos. Medios con alta relación C: N favorecen generalmente la esporulación, mientras que relaciones más bajas tienden a promover el crecimiento micelial (Mata Astorga, 2008), la optimización de esta relación debe considerar el objetivo específico del proceso: producción de biomasa, blastosporas o metabolitos secundarios con actividad insecticida.

1.6. Cuantificación Celular Mediante Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer es un instrumento de laboratorio ampliamente utilizado cuyo objetivo fundamental es determinar la concentración de células o partículas presentes en un volumen específico de solución líquida. Sus aplicaciones principales se desarrollan en dos áreas del conocimiento biológico: por un lado, en el campo de la biología celular y la microbiología, donde se emplea para estimar la densidad de células mantenidas en suspensión dentro de cultivos; por otro lado, en el área microbiológica específica, donde resulta de gran utilidad para cuantificar microorganismos tales como bacterias y levaduras presentes en soluciones determinadas.

En cuanto a su procedimiento operativo, la técnica consiste en depositar una alícuota previamente diluida de la muestra líquida sobre la superficie de la cámara, para posteriormente proceder a su examen bajo el microscopio óptico. Durante la observación, las células presentes son contabilizadas de forma manual dentro de una o varias cuadrículas del retículo, información que posteriormente es procesada matemáticamente para estimar con precisión la concentración celular real existente en la muestra original (Bhembibre, 2010).

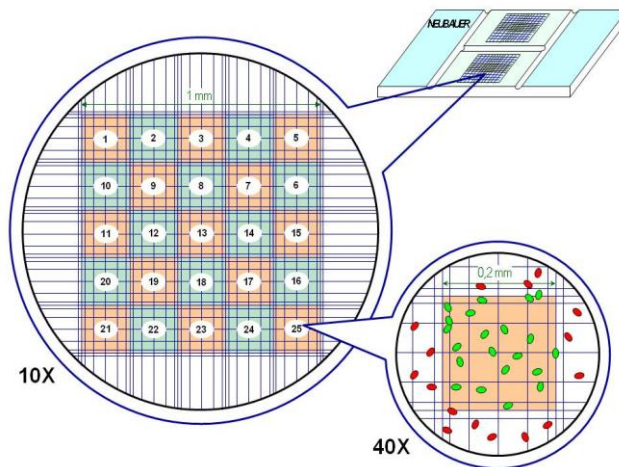


Ilustración 2 Conteo de Células en Cámaras de Neubauer (insilico)

1.7. Factores que influyen en la multiplicación y viabilidad de *Beauveria bassiana* en cultivos líquidos.

El éxito del cultivo de *B. bassiana* en sustratos líquidos depende de múltiples factores ambientales y nutricionales que deben ser cuidadosamente controlados para maximizar la producción y mantener la viabilidad y virulencia de los propágulos obtenidos.

1.8. Factores ambientales

La temperatura es uno de los factores más influyentes en la multiplicación de *B. bassiana*. Estudios realizados por varios investigadores coinciden en que el rango óptimo para el desarrollo de este hongo se encuentra entre 25 y 28°C, temperaturas inferiores a 20°C ralentizan significativamente la multiplicación, mientras que valores superiores a 30°C pueden inhibirlo por completo o incluso causar la muerte del organismo. Además, se ha observado que fluctuaciones térmicas durante el proceso de fermentación pueden afectar negativamente la calidad de los propágulos producidos (Mero, 2023)

El pH del medio es otro factor crítico que influye tanto en la multiplicación como en la esporulación de *B. bassiana*. El rango óptimo de pH para este hongo se sitúa generalmente entre 5.5 y 7.0, con valores cercanos a 6.0 favoreciendo particularmente la producción de blastosporas (Guapi, 2013). El pH no solo afecta directamente al metabolismo fúngico, sino también a la disponibilidad de nutrientes en el medio, por ejemplo, valores extremadamente ácidos o alcalinos pueden limitar la solubilidad de ciertos minerales esenciales o desnaturalizar enzimas extracelulares importantes para la nutrición del hongo (Mata Astorga, 2008)

La aireación y agitación del cultivo son factores determinantes en fermentación sumergida, ya que *B. bassiana*, como la mayoría de los hongos, es un organismo aerobio estricto. Una adecuada transferencia de oxígeno es esencial para mantener un metabolismo óptimo y favorecer la producción de blastosporas. Típicamente, en cultivos en matraz se emplean velocidades de agitación entre 150 y 250 rpm, mientras que en biorreactores se mantienen tasas de aireación de 0.5-1.0 vvm (volumen de aire por volumen de medio por minuto) (Mata Astorga,

2008). Sin embargo, niveles excesivos de agitación pueden causar daño por estrés mecánico a las estructuras fúngicas.

1.9. Factores nutricionales

La fuente y concentración de carbono constituyen un factor determinante en el cultivo de *B. bassiana*. La glucosa es generalmente la fuente preferida por su fácil asimilación, aunque otras como sacarosa, maltosa y almidón también son utilizadas. Concentraciones típicas oscilan entre 20 y 40 g/L, dependiendo del objetivo del cultivo (Coleman., 2023). Concentraciones excesivas pueden causar represión catabólica o generar estrés osmótico, afectando negativamente a la multiplicación y la esporulación.

La fuente y concentración de nitrógeno representan otro factor crítico, considerándose a menudo el elemento más costoso en la formulación de medios de cultivo. Las fuentes orgánicas complejas como extracto de levadura, peptona o harina de soja son frecuentemente preferidas por aportar, además de nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento. Las concentraciones óptimas suelen situarse entre 5 y 20 g/L. La naturaleza y concentración de la fuente nitrogenada pueden influir significativamente en la producción de enzimas y metabolitos secundarios con actividad insecticida (Lucero J. , 2024).

La relación C: N del medio influye decisivamente en la fisiología del cultivo. Relaciones elevadas favorecen generalmente la esporulación, mientras que relaciones más bajas tienden a promover el crecimiento vegetativo (Coleman., 2023). La optimización de este parámetro debe considerar el objetivo específico del proceso de fermentación (producción de biomasa, blastosporas o metabolitos secundarios).

1.10. Aplicaciones de *Beauveria bassiana* en controles biológicos.

Beauveria bassiana representa uno de los agentes de control biológico más utilizados a nivel mundial debido a su amplio rango de hospederos y a su demostrada eficacia contra numerosas plagas agrícolas. En el contexto ecuatoriano, este hongo entomopatógeno ha cobrado

especial relevancia como alternativa sostenible a los plaguicidas químicos en diversos sistemas agrícolas de importancia económica.

1.11. Mecanismo de acción como controlador biológico

El proceso infectivo de *B. bassiana* sobre insectos plaga se desarrolla en varias etapas secuenciales. Inicialmente, los conidios o blastosporas se adhieren a la cutícula del insecto mediante interacciones hidrofóbicas y la producción de mucílago. Posteriormente, bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura, germina el propágulo y desarrolla un tubo germinativo que, mediante una combinación de presión mecánica y acción enzimática (principalmente proteasas, lipasas y quitinasas), penetra el tegumento del insecto (Lucero J. , 2024).

Una vez en el hemocele, el hongo prolifera como cuerpos hifales (blastosporas) que se diseminan a través de la hemolinfa, invadiendo tejidos y órganos. Durante este proceso, *B. bassiana* produce diversos metabolitos secundarios con actividad insecticida, principalmente beauvericina, basianólidos y oosporeína, que contribuyen significativamente a la (Lucero J. , 2024), la muerte del insecto ocurre generalmente entre 3 y 10 días después de la infección, dependiendo de factores como la cepa del hongo, la especie y estado de desarrollo del insecto, y las condiciones ambientales. Bajo condiciones favorables de humedad (>70%), el hongo emerge del cadáver, esporula sobre la superficie y produce nuevos conidios que pueden infectar a otros individuos, generando un efecto multiplicador del control (Mero, 2023)

1.12. Aplicaciones en Ecuador

En Ecuador, *B. bassiana* ha sido utilizado exitosamente para el control de diversas plagas en cultivos de importancia económica. Estudios realizados por (Mero, 2023), documentan su efectividad contra el gorgojo acuático del arroz (*Lissorhoptrus oryzophilus*) en la zona de Las Gilces-Crucita, provincia de Manabí, logrando reducciones significativas en las poblaciones de la plaga y el consecuente incremento en los rendimientos del cultivo.

Otro ejemplo relevante es el control del picudo negro del banano (*Cosmopolites sordidus*) en plantaciones de musáceas en El Carmen, Manabí, donde (González Dávila R. P., 2022), demostraron la eficacia de *B. bassiana* aplicado en trampas y formulaciones granuladas, alcanzando tasas de mortalidad superiores al 80% en condiciones de campo.

Investigaciones desarrolladas por (Chancusig-Espin, 2024) han evaluado también la efectividad de este hongo contra el gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*), una plaga que afecta significativamente la producción de este tubérculo en la región andina ecuatoriana, con resultados prometedores que sugieren su potencial integración en programas de manejo integrado.

Un desarrollo particularmente notable en el contexto ecuatoriano es la investigación sobre el uso de la cepa nativa INIAP L3B3 de *B. bassiana* para el control de la garrapata del ganado (*Rhipicephalus microplus*), como documentan (Arias Hidalgo, 2025), este trabajo representa una expansión del uso de este hongo más allá del ámbito estrictamente agrícola, evidenciando su potencial en la salud y productividad pecuaria.

1.13. Ventajas del uso de *Beauveria bassiana* como biocontrolador

La implementación de *B. bassiana* en programas de manejo integrado de plagas ofrece numerosas ventajas en comparación con los plaguicidas químicos convencionales. Entre los beneficios más relevantes destacan.

Especificidad relativa: Aunque *B. bassiana* puede infectar a un amplio rango de insectos, su impacto sobre organismos no objetivo es significativamente menor que el de la mayoría de los insecticidas químicos de amplio espectro (Viera, 2020).

Ausencia de residuos tóxicos: Al ser un organismo natural, no genera residuos químicos en los productos agrícolas, lo que contribuye a la seguridad alimentaria y facilita el acceso a mercados con restricciones sobre niveles de residuos de plaguicidas (Martínez, 2020)

Reducción del riesgo de resistencia: El complejo mecanismo de acción multimodal de *B. bassiana*, que involucra tanto acción mecánica como múltiples enzimas y toxinas, dificulta el desarrollo de resistencia por parte de las plagas, a diferencia de muchos plaguicidas químicos con modos de acción específicos (Mero, 2023)

Compatibilidad con otros métodos de control: Puede integrarse eficazmente en estrategias de manejo integrado de plagas, combinándose con otros agentes de control biológico, prácticas culturales e incluso con algunos plaguicidas químicos selectivos (Viera, 2020)

Efecto residual: Bajo condiciones favorables, el hongo puede establecerse y persistir en el agroecosistema, proporcionando control a largo plazo y reduciendo la necesidad de aplicaciones frecuentes (Mero, 2023)

1.14. Influencia de sustratos líquidos en la producción de *Beauveria bassiana*.

La optimización de sustratos líquidos para el cultivo de *B. bassiana* representa un área de investigación fundamental para mejorar la eficiencia y rentabilidad en la producción de este agente de biocontrol. La composición del medio de cultivo no solo afecta significativamente los rendimientos en términos de biomasa y concentración de propágulos, sino también características críticas como la virulencia, tolerancia a factores de estrés y vida útil del producto final (Coleman., 2023)

Estudios comparativos entre diferentes medios líquidos han demostrado que el tipo y concentración de sus componentes pueden influir notablemente en la morfología, tamaño, velocidad de germinación e incluso en la expresión de genes relacionados con la patogenicidad de las blastosporas producidas. Por ejemplo, medios con alto contenido proteico pueden favorecer la producción de enzimas degradadoras de la cutícula, mientras que la inclusión de ciertos micronutrientes puede potenciar la síntesis de metabolitos secundarios con actividad insecticida (Mascarín, Kobori y Coleman., 2023)

La fermentación sumergida, aunque técnicamente más compleja que la fermentación en sustrato sólido, ofrece ventajas significativas para la producción industrial, como mayor homogeneidad, facilidad de escalamiento y posibilidad de monitoreo y control en tiempo real. Estas características la convierten en una opción atractiva para la producción masiva de *B. bassiana*, especialmente considerando la creciente demanda de bioplaguicidas en el marco de la agricultura sostenible. (Lucero J. , 2024)

En el contexto específico de Ecuador, donde existe una demanda creciente de soluciones biológicas para el manejo de plagas agrícolas, la optimización de sustratos líquidos para la producción local de *B. bassiana* podría contribuir significativamente a la disponibilidad y asequibilidad de este biocontrolador. El desarrollo de formulaciones basadas en recursos disponibles localmente no solo reduciría la dependencia de productos importados, sino que también podría resultar en cepas mejor adaptadas a las condiciones agroecológicas específicas del país (Martínez, 2020)

La investigación sobre la influencia de diferentes sustratos líquidos en la multiplicación y viabilidad de *B. bassiana* se alinea perfectamente con los objetivos de desarrollo sostenible al promover alternativas biológicas a los plaguicidas químicos, contribuyendo así a la reducción de impactos ambientales negativos, a la producción de alimentos más seguros y a la mejora de la rentabilidad para los productores agrícolas ecuatorianos.

CAPITULO II

2 Estado del arte

El interés por mejorar la producción de *Beauveria bassiana* como agente de control biológico ha motivado diversas investigaciones enfocadas en la búsqueda de sustratos líquidos que favorezcan su crecimiento y esporulación en condiciones controladas. Este hongo entomopatógeno es ampliamente utilizado por su capacidad para controlar insectos plaga de importancia agrícola, lo que ha impulsado el desarrollo de técnicas de producción masiva que aseguren una alta cantidad de estructuras viables para su aplicación en campo. Entre estas técnicas, la fermentación líquida destaca por permitir un mejor control de las condiciones de cultivo y una producción más uniforme. Según (Mascarin, 2015), este método permite obtener rápidamente altas concentraciones de blastosporas estables y eficaces, evidenciando el potencial de los sustratos líquidos para optimizar la producción de *B. bassiana*.

Diversas investigaciones han evaluado el efecto del tipo de sustrato sobre variables clave del desarrollo fúngico, tales como la velocidad de crecimiento micelial, el diámetro de colonia y la concentración de unidades reproductivas. Los resultados obtenidos en estos estudios han demostrado consistentemente que la composición nutricional del sustrato líquido ejerce una influencia directa y significativa sobre la capacidad de *B. bassiana* para proliferar y esporular eficientemente. En este sentido, investigaciones realizadas en repositorios universitarios latinoamericanos han concluido que existe un efecto estadísticamente significativo del tipo de sustrato sobre la velocidad de crecimiento y la concentración de conidias producidas. Tal como lo establece la Universidad Nacional del Centro del Perú (PAITAN YANCE, 2024), "hay efecto significativo del tipo de sustrato en la velocidad de crecimiento, crecimiento radial y concentración de conidias de *Beauveria bassiana*" (p. 1), lo que subraya la importancia de seleccionar adecuadamente los componentes del medio de cultivo para maximizar el rendimiento productivo del hongo.

La producción de blastosporas en medios líquidos ha sido objeto de atención particular por parte de la comunidad científica, debido a que estas estructuras representan una forma infectiva del hongo con propiedades de rápida acción sobre el hospedero. Sin embargo, su

principal limitación radica en su menor estabilidad en comparación con los conidios aéreos, lo que plantea desafíos tecnológicos en cuanto a su formulación y almacenamiento. Estudios realizados en Ecuador han destacado esta problemática, señalando que "las blastosporas son inestables durante el secado post-fermentación debido a su pared fina, mientras que las conidiosporas son mucho más resistentes" (Núñez, 2019). Este hallazgo ha motivado el diseño y evaluación de medios líquidos especializados que, mediante la incorporación de fuentes de carbono y nitrógeno específicas, permitan obtener blastosporas con mayor estabilidad y potencial infectivo, lo cual resulta fundamental para la viabilidad comercial del bioinsecticida.

Desde una perspectiva comparativa, estudios recientes han confrontado los métodos de producción en sustrato sólido versus sustrato líquido para *B. bassiana*, encontrando ventajas y limitaciones en ambos sistemas. La fermentación en medio líquido destaca por su rapidez de crecimiento y su adaptabilidad a una amplia variedad de sustratos con composición química adecuada, mientras que los métodos sólidos ofrecen mayor facilidad de manejo y menores costos operativos en pequeña escala. (Chuquin, 2021), confirma que "el hongo en cultivos líquidos es de rápido crecimiento y se adapta a gran cantidad de sustratos, siempre y cuando posean una adecuada composición nutricional" (p. 12), lo que posiciona a la fermentación líquida como una estrategia prometedora para la producción eficiente de *B. bassiana* bajo condiciones controladas de laboratorio, con miras a su escalamiento para uso agrícola como bioplaguicida sostenible.

CAPITULO III

3. Diagnostico o estudio de campo

3.1. Ubicación del ensayo

El proyecto de investigación se realizó en la Granja Experimental “Río Suma”, la misma que se encuentra en las coordenadas, Latitud: 675194.26 m E, longitud 9971643.77 m S, altitud 276 msnm



Ilustración 3 Ubicación del laboratorio agrícola en la Granja Experimental Río Suma

3.2. Características climatológicas de la zona

Tabla 1: Características climatológicas

Características	El Carmen
Clima	Trópico Húmedo
Temperatura (°C)	20,4°C – 29, 2°C
Humedad Relativa (%)	87,45%
Precipitación media anual (mm)	233,83
Altitud (msnm)	260

Fuente: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI, 2026)

3.3. Materiales y Herramientas

3.3.1. Equipos de Laboratorio

- Microscopio óptico
- Balanza analítica
- Potenciómetro

3.3.2. Materiales

- Matraces Erlenmeyer (250 mL, 500 mL)
- Pipetas estériles
- Gasa estéril
- Envases de 5L
- Envases de 500 mL
- Manguera flexible de 13mm
- Silicona en fría
- Cinta de embalaje
- Fundas negras
- Mascarillas
- Guantes

3.3.3. Insumos (sustratos)

- Harina de pescado
- Harina de soja
- Extracto de papa
- Levadura
- Melaza

3.3.4. Construcción del cuarto de aislamiento “laboratorio”

- Placas de aluminio
- Vidrio

3.3.5. Medios de Cultivo y Reactivos

- Componentes para sustratos líquidos:
- Agua destilada estéril
- Alcohol etílico
- Cal viva

3.4.Enfoque y tipo de investigación

La investigación fue de enfoque cuantitativo, de tipo experimental, debido a que se evaluó el efecto de diferentes sustratos líquidos sobre la multiplicación de *Beauveria bassiana* en condiciones controladas de laboratorio. El diseño permitió comparar el desempeño del hongo en distintos medios de cultivo y determinar cuál favorece mejor su desarrollo.

3.5.Material biológico

Se utilizó una formulación comercial de *Beauveria bassiana*, adquirida a un proveedor autorizado y almacenada de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para preservar su viabilidad. Antes de iniciar el experimento, se verificó el estado del producto y se preparó el inóculo siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de garantizar una concentración uniforme y condiciones adecuadas para su aplicación durante el desarrollo del ensayo.

4. Métodos

4.1. Preparación de sustratos líquidos

Preparar los diferentes sustratos líquidos según los siguientes tratamientos:

Tabla 2: Preparación de sustratos líquidos

Tratamientos	Composición
Tratamiento 1	Melaza (200 g) + Harina de pescado (60 g) + Levadura (60 g)
Tratamiento 2	Melaza (200 g) + Extracto de papa (400 mL) + Levadura (60 g)
Tratamiento 3	Melaza (200 g) + Harina de soja (60 g) + Levadura (60 g)

Tratamiento 4	Melaza (200 g) + Harina de soja (60 g) + Extracto de papa (400 mL)
Tratamiento 5	Melaza (200 g) + Harina de soja (60 g) + Extracto de papa (400 mL) + Harina de pescado (60 g) + Levadura (60 g)

4.2. Medición de pH de los respectivos tratamientos

- **T1:** En las cuatro repeticiones se registraron niveles de pH iniciales cercanos a 3,5/4,5. Para corregir la acidez se añadieron de dos a tres cucharadas de hidróxido de calcio, logrando estabilizar el pH en un valor neutral de 6,5. No se observó ningún signo de contaminación.
- **T2:** Las cuatro repeticiones mostraron un pH inicial aproximado de 3,2/4,0. Con la incorporación de dos a tres cucharadas de hidróxido de calcio se logró neutralizar la acidez, alcanzando un pH de 6,5. No se detectó contaminación en ninguna de las muestras.
- **T3:** En este tratamiento, las cuatro repeticiones presentaron un pH cercano a 3,5. La adición de dos a tres cucharadas de hidróxido de calcio permitió elevar el pH hasta un nivel neutral de 6,5, sin registrarse presencia de contaminación.
- **T4:** Se determinó que las cuatro repeticiones tenían un pH inicial de entre 3,5 y 4,0 aproximadamente. Al agregar de dos a tres cucharadas de hidróxido de calcio se consiguió reducir la acidez y llegar a un pH neutral de 6,5. No hubo evidencia de contaminación.
- **T5:** El pH registrado en las cuatro repeticiones osciló entre 3,5 y 5,0 aproximadamente. Mediante la adición de dos a tres cucharadas de hidróxido de calcio se logró neutralizar la acidez, obteniendo un pH final de 6,5, sin presencia de contaminación en ninguna muestra.

Para aplicar *Beauveria bassiana* como agente biológico solubilizador de fósforo, se dejaron reposar todos los tratamientos durante un día, con el fin de evitar inconvenientes al momento de su incorporación.

Tabla 3 Cuadro del nivel de pH

Tratamientos	R1	R2	R3	R4
T1	6,5	6,5	6,5	6,5
T2	6,5	6,5	6,5	6,5
T3	6,5	6,5	6,5	6,5
T4	6,5	6,5	6,5	6,5



Ilustración 4. Potenciómetro

4.3. Inoculación de *Beauveria bassiana*

Una vez ya pasado un día, se desinfectó correctamente el lugar donde se está realizando la investigación con cloro. Realizado la respectiva limpieza, se niveló el pH, en cada uno de los tratamientos se inoculó el microorganismo, con la gramera se pesaron 10gr de *Beauveria bassiana* Inoculante biológico solubilizador de Fósforo.

En cada uno de los tratamientos se abrieron y se volvieron a cerrar correctamente, poniendo alrededor nuevamente silicona fría y se pusieron en las fundas negras.

4.4. Manejo del ensayo

4.4.1. Limpieza y desinfección del área de trabajo

Antes de iniciar el experimento, se realizó la limpieza y desinfección de las superficies de trabajo, equipos y materiales de laboratorio utilizando alcohol etílico u otro desinfectante apropiado, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación.

4.4.2. Preparación de los sustratos líquidos

Se elaboraron los diferentes sustratos líquidos que serán evaluados en el experimento, siguiendo las formulaciones previamente establecidas para cada tratamiento. Posteriormente, se ajustará el volumen y el pH cuando sea necesario.

4.4.3. Esterilización de los sustratos y materiales

Los sustratos líquidos y el material de vidrio fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 15 a 20 minutos para asegurar condiciones asépticas antes de la inoculación.

4.4.4. Preparación del inóculo

Se utilizó una formulación comercial de *Beauveria bassiana* como fuente de inóculo. El producto fue preparado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante para obtener una suspensión homogénea que fue utilizada en todos los tratamientos.

4.4.5. Inoculación de los sustratos líquidos

Cada sustrato líquido fue inoculado con un volumen uniforme de la suspensión de *Beauveria bassiana* bajo condiciones asépticas, con el fin de garantizar la uniformidad experimental entre tratamientos.

4.4.6. Incubación de las cepas

Los tratamientos inoculados permanecieron en incubación bajo condiciones controladas de temperatura, tiempo y, de ser necesario, agitación constante, favoreciendo el desarrollo del hongo durante el período experimental.

4.4.7. Toma de datos

Los datos correspondientes a las variables de concentración celular (UFC) fueron registrados de acuerdo con el cronograma establecido para cada tratamiento, utilizando instrumentos y procedimientos estandarizados que garanticen la precisión de las mediciones.

4.5.8. Tabulación, análisis e interpretación de resultados

La información obtenida se organizó en tablas y gráficos para facilitar su análisis. Posteriormente, se aplicaron los análisis estadísticos correspondientes para determinar la influencia de los diferentes sustratos de estudio.

5. Unidad experimental

5.1. Modelo experimental

Para el desarrollo de la presente investigación se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA), representado con 5 tratamientos y 4 repeticiones, con un total de 20 unidades experimentales. El análisis de varianza se realizó, tal como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4 Prueba de ANOVA / ADEVA con la ayuda del software estadístico INFOSTAT versión 2020

Fuente de Variación	Grados de libertad
Total	19
Tratamientos	4
Repeticiones	3
Error Experimental	12

6. Características de la unidad experimental

6.1.Método experimental

Se utilizó un método experimental para evaluar la influencia de diferentes sustratos líquidos en la multiplicación de *Beauveria bassiana*. Como material inicial se empleó un producto comercial a base de este hongo, preparado siguiendo las recomendaciones del fabricante. La suspensión obtenida fue incorporada a cada uno de los sustratos líquidos evaluados, manteniendo constantes las condiciones de incubación, tales como temperatura, pH, tiempo y agitación. Esto permitió determinar el efecto de cada tratamiento sobre el desarrollo y la multiplicación del hongo.

6.1.Método observacional

Se aplicó el método observacional diario mediante el seguimiento periódico de la multiplicación de *Beauveria bassiana* en los diferentes sustratos líquidos.

6.2. Método descriptivo

El método descriptivo permitió caracterizar y comparar el comportamiento de *Beauveria bassiana* en cada uno de los sustratos líquidos evaluados. La información obtenida se organizó en tablas y gráficos, utilizando medidas de tendencia central y dispersión para describir las diferencias observadas entre los tratamientos.

6.3. Análisis experimental

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente para determinar la influencia de los sustratos líquidos sobre la multiplicación de *Beauveria bassiana*. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y, cuando existan diferencias significativas, se aplicó una prueba de comparación de medias, como Tukey, para identificar los tratamientos con mejor desempeño. El procesamiento y análisis de los datos se efectuó mediante un software estadístico apropiado.

7. Diseño del área experimental

El área experimental fue acondicionada con un espacio específico destinado al aislamiento y la multiplicación del hongo, siguiendo una distribución funcional que favorece un flujo de trabajo eficiente dentro del laboratorio agrícola, tal como se presenta en la Ilustración 5. Esta infraestructura se implementó en la Granja Experimental Río Suma, donde existen áreas destinadas al desarrollo de investigaciones que contribuyen al fortalecimiento de la formación académica y científica.

El espacio fue diseñado para garantizar condiciones adecuadas de bioseguridad durante la manipulación de microorganismos, permitiendo un control riguroso de las actividades experimentales. Asimismo, la zona de aislamiento se destinó exclusivamente al manejo de muestras que requieren condiciones controladas, con el propósito de minimizar el riesgo de contaminación cruzada y asegurar la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos durante los procesos de aislamiento, cultivo y multiplicación biológica del hongo.



Ilustración 5 Modelo 3D de laboratorio agrícola de la granja experimental-ULEAM

8. Manejo de los experimentos

El desarrollo de esta investigación requirió la aplicación de procedimientos técnicos y protocolos estandarizados para garantizar la confiabilidad de los resultados y evitar posibles contaminaciones. Todas las etapas experimentales, desde la preparación del área de trabajo hasta la cuantificación de las unidades formadoras de colonias de *Beauveria bassiana*, se realizaron bajo condiciones controladas. Esta rigurosidad metodológica permitió que las diferencias observadas en la multiplicación del hongo estuvieran relacionadas únicamente con los sustratos líquidos evaluados. De acuerdo con (Cañedo, 2004), la asepsia y la higiene del laboratorio, incluyendo la desinfección de las superficies con alcohol al 70 %, son medidas fundamentales para prevenir problemas de contaminación durante los procedimientos microbiológicos.

8.1. Control de Asepsia

La asepsia fue un aspecto esencial durante el desarrollo del experimento, ya que la presencia de microorganismos contaminantes podría afectar la pureza de los cultivos de *Beauveria bassiana* y alterar los resultados obtenidos. Por esta razón, el área de trabajo se desinfectó antes y después de cada procedimiento utilizando alcohol al 70 %, reconocido por su eficacia en la eliminación de microorganismos presentes en superficies. Además, las actividades de siembra y manipulación del hongo se realizaron en condiciones estériles, empleando una cámara de flujo laminar para reducir el riesgo de contaminación cruzada. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2005), el alcohol al 70 % es uno de los desinfectantes más recomendados para las superficies de trabajo en laboratorios microbiológicos debido a su alta efectividad.

8.2. Conteo de las UFC (Unidades Formadoras de Colonias)

La cuantificación de *Beauveria bassiana* en los diferentes tratamientos se realizó mediante el método de recuento directo utilizando la cámara de Neubauer, técnica ampliamente empleada para determinar la concentración celular en un volumen conocido. Antes del conteo, las muestras fueron homogenizadas para garantizar una distribución uniforme de las células y

posteriormente sometidas a diluciones seriadas decimales en solución salina estéril al 0,85 % de NaCl o agua destilada estéril. Este procedimiento permitió obtener concentraciones adecuadas para la observación microscópica y lograr recuentos más precisos. Según (Arana, 2010), las diluciones seriadas facilitan la obtención de resultados confiables al disminuir progresivamente la concentración de microorganismos en una muestra. Finalmente, se colocaron 0,25 µL de cada dilución en la cámara de Neubauer, se cubrieron con un cubreobjetos estéril y se dejaron reposar entre 1 y 2 minutos antes de realizar la observación microscópica (Brugger, 2012).

El conteo celular se efectuó mediante observación en microscopio óptico con objetivo de 40X, registrando las células presentes en los cuadros grandes de la retícula central de la cámara de Neubauer y aplicando los criterios establecidos para la inclusión y exclusión de bordes. Para cada muestra se contabilizaron al menos cinco cuadros, obteniéndose un promedio representativo por tratamiento (Dodge, 2023). La concentración microbiana se calculó considerando el volumen conocido de la cámara, con una profundidad de 0,1 mm, y el factor de dilución correspondiente, expresando los resultados en células por mililitro o unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Aunque esta técnica permite obtener una estimación rápida de la concentración celular, no diferencia entre células viables y no viables (Corral, 2012). Asimismo (Ramírez, 2017), señala que el margen de error aumenta cuando las muestras presentan altas concentraciones celulares, por lo que la aplicación adecuada de diluciones seriadas fue fundamental para garantizar la precisión de los recuentos.

8.3. Manejo del Inóculo

El manejo adecuado del inóculo de *B. bassiana* fue considerado un aspecto crítico para garantizar la viabilidad y pureza de la cepa a lo largo de todo el experimento. La manipulación del hongo se realizó en todo momento con el uso obligatorio de equipos de protección personal, incluyendo guantes, mascarilla y bata de laboratorio, medidas que responden tanto a la protección del investigador como a la preservación de la integridad microbiológica del material fúngico. Estas disposiciones se encuentran respaldadas por protocolos internacionales de manejo de hongos entomopatógenos, los cuales establecen que "para el proceso de inoculación se deben seguir recomendaciones estrictas de bioseguridad para reducir el riesgo de contaminación del inóculo y

garantizar la seguridad del personal de laboratorio" (OIEA, 2019).

8.4. Manejo de los Tratamientos

Con el propósito de evitar la contaminación cruzada entre los tratamientos evaluados, cada unidad experimental fue ubicada en estanterías independientes y debidamente separadas entre sí. Las unidades experimentales fueron mantenidas en condiciones de oscuridad durante todo el período de incubación, condición que favorece el desarrollo óptimo de *B. bassiana* al eliminar la influencia de la radiación lumínica sobre el crecimiento fúngico. Esta consideración resulta relevante dado que, como señala (Itagri., 2020)), "*Beauveria bassiana* debe aplicarse y mantenerse bajo condiciones propicias para su desarrollo, donde factores ambientales como la luz, la temperatura y la humedad ejercen una influencia directa sobre su viabilidad y capacidad infectiva" (párr. 4), por lo que el control de estas variables durante el experimento contribuyó a la homogeneidad de las condiciones de cultivo entre tratamientos.

8.5. Bioseguridad

Durante la totalidad del proceso experimental se cumplieron rigurosamente los protocolos de manejo de hongos entomopatógenos recomendados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y los lineamientos establecidos por el laboratorio agrícola donde se desarrolló el estudio. La observancia de estas normativas garantizó no solo la seguridad del personal involucrado en la investigación, sino también la calidad y reproducibilidad de los procedimientos ejecutados. El Manual de Producción y Uso de Hongos Entomopatógenos del SENASA respalda esta práctica al indicar que "el cumplimiento de los protocolos de bioseguridad en el laboratorio es indispensable para la correcta manipulación de microorganismos entomopatógenos, asegurando tanto la protección del personal como la integridad de los cultivos" (Ramírez, 2017).

9. Variables dependientes

- Concentración celular (células/mL: UFC)
- Rendimiento de propagación de *Beauveria bassiana* en cada tratamiento.

10. Variables independientes

- Tipo de sustrato líquido.

CAPITULO IV

4. Resultados

4.1. Producción de UFC de *Beauveria bassiana* en los tratamientos evaluados

En la presente investigación se evaluó el efecto de cinco sustratos líquidos sobre la producción de UFC de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de laboratorio. La variable analizada fue el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), con un total de 20 observaciones distribuidas en cinco tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento. Los datos obtenidos permitieron evidenciar variaciones entre los medios evaluados, lo que sugiere una respuesta diferencial del hongo frente a la composición de cada sustrato.

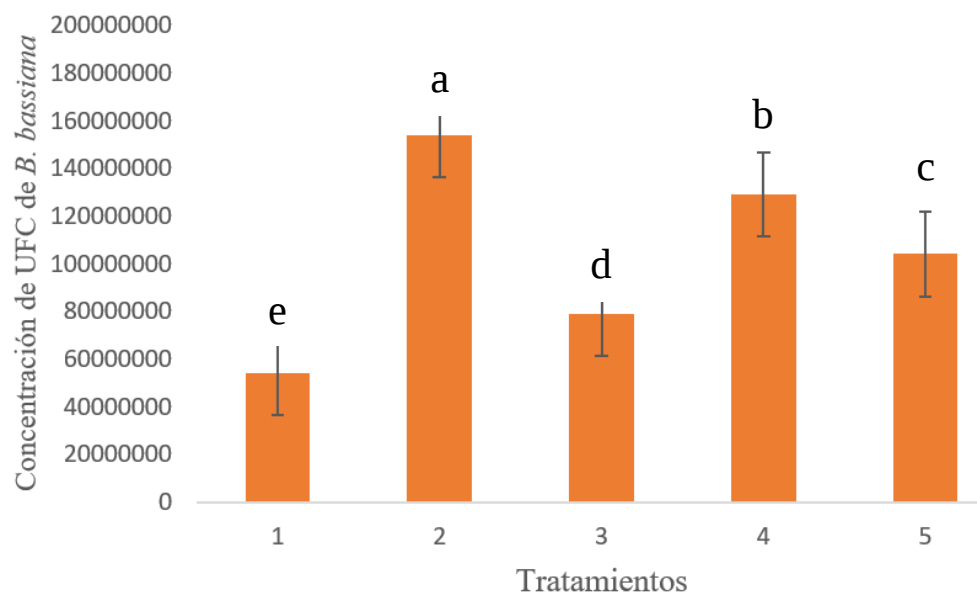


Ilustración 6. Concentración de UFC de *Beauveria bassiana*, según la influencia de sustratos sólidos bajo condiciones de laboratorio.

4.2. Resumen estadístico

El bajo CV obtenido indica que la variabilidad dentro de cada tratamiento fue reducida, lo cual fortalece la confiabilidad de los resultados. De manera general, el modelo estadístico ajustó bien a los datos y permitió detectar diferencias entre tratamientos con alto nivel de precisión.

4.3. Comparación de medias de Tukey

Una vez comprobada la significancia global mediante ANOVA, se aplicó la prueba de Tukey al 5% para identificar cuáles tratamientos diferían entre sí. La diferencia mínima significativa fue de 14.168.135,68 UFC, lo que permitió separar los tratamientos en grupos estadísticos distintos.

Tabla 5 Comparación de medias de la concentración de *Beauveria bassiana* (UFC/mL) entre tratamientos según la prueba de Tukey.

Tratamiento	Promedio UFC/ml	Grupo estadístico
T2	146.500.000	A
T4	103.437.500	B
T5	83.562.500	C
T3	79.175.000	C
T1	59.812.500	D

Los resultados de Tukey muestran que el tratamiento 2 formó un grupo propio y fue estadísticamente superior a los demás tratamientos. El tratamiento 4 ocupó el segundo lugar y también presentó diferencias significativas respecto a los otros grupos. Los tratamientos 5 y 3

compartieron el mismo grupo estadístico, lo que indica que no existen diferencias significativas entre ellos. Finalmente, el tratamiento 1 quedó en el grupo D, siendo significativamente inferior a todos los demás tratamientos.

4.4. Descripción del comportamiento de los tratamientos

El tratamiento 2 presentó la mayor multiplicación de *Beauveria bassiana*, alcanzando un promedio de 146.500.000 UFC/ml. Este resultado demuestra que su composición favoreció de manera óptima la producción del hongo en condiciones de laboratorio. En contraste, el tratamiento 1 registró el menor promedio, con 59.812.500 UFC/ml, evidenciando una menor capacidad de estimulación de la multiplicación fúngica.

El tratamiento 4 mostró un desempeño intermedio-alto, con 103.437.500 UFC/ml, lo que confirma que también proporcionó condiciones favorables para el desarrollo del microorganismo, aunque en menor medida que el tratamiento 2. Por su parte, los tratamientos 5 y 3 presentaron valores similares, por lo que estadísticamente no difirieron entre sí.

4.5. Interpretación del gráfico de barras

El gráfico de barras correspondiente a los promedios de UFC mostró el siguiente orden de mayor a menor multiplicación: tratamiento 2, tratamiento 4, tratamiento 5, tratamiento 3 y tratamiento 1. Las barras de error reflejaron una baja variabilidad entre repeticiones, lo que coincide con el bajo coeficiente de variación obtenido en el análisis estadístico.

Esta consistencia entre las repeticiones respalda la solidez de los resultados y confirma que las diferencias observadas entre tratamientos fueron suficientemente claras como para ser detectadas por el ANOVA y confirmadas por Tukey.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados demostraron que los sustratos líquidos evaluados sí influyeron significativamente en la producción de UFC de *Beauveria bassiana* bajo condiciones de laboratorio. El tratamiento 2 fue el más eficiente, al presentar la mayor multiplicación y diferenciarse estadísticamente de los demás tratamientos, mientras que el tratamiento 1 obtuvo el menor rendimiento. Los tratamientos 4, 5 y 3 mostraron valores intermedios, con una respuesta favorable pero menor que T2. El análisis de varianza confirmó que las diferencias entre tratamientos fueron significativas, y la prueba de Tukey permitió identificar claramente cuáles presentaron mayor y menor desempeño. En consecuencia, se concluye que el objetivo general y los objetivos específicos de la investigación fueron cumplidos, y que la formulación del sustrato líquido tiene un efecto directo sobre el desarrollo del hongo

RECOMENDACIONES

En recomendación, sugiero continuar la investigación evaluando el tratamiento 2 en condiciones más amplias y con un mayor número de repeticiones, a fin de confirmar su comportamiento y fortalecer la validez de los resultados. También sería conveniente analizar otros factores que podrían influir en la multiplicación de *Beauveria bassiana*, como el tiempo de incubación, la temperatura, la aireación y la relación carbono-nitrógeno del sustrato, para identificar posibles mejoras en la producción de UFC. Asimismo, se recomienda complementar este estudio con pruebas de viabilidad y patogenicidad, de modo que no solo se determine cuál sustrato produce más multiplicación, sino también cuál genera propágulos de mejor calidad biológica para su futura aplicación en control biológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Arana, I. (2010). Métodos básicos de enumeración de microorganismos. *Univercidad del País Vasco*,
https://ocw.ehu.eus/file.php/48/Tema_2._Metodos_basicos_de_enumeracion_de_microorganismos.pdf.
- Arias Hidalgo, D. R. (2025). Research advances in Ecuador on use of entomopathogenic fungi for control of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*: the case of *Beauveria bassiana* sensu lato strain INIAP L3B3. *Frontiers*.
- Arias-Hidalgo, D. R. (2025). Avances de investigación en Ecuador sobre el uso de hongos entomopatógenos para el control de la garrapata del ganado.
<https://doi.org/10.3389/ffunb.2025.1492395>.
- Bhadani, R. G. (2021). Metabolómica de compuestos extracelulares y enzimas parasitarias de *Beauveria bassiana*. . <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021>.
- Bhembibre, C. (2010). *Cámara de Neubauer: Definición, características y usos en microbiología. Definición ABC*. <https://www.definicionabc.com/ciencia/camara-de-neubauer.php>.
- Brugger, S. D. (2012). Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. *PLOS ONE* 7(3), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033695>.
- Cañedo, V. &. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. *Centro Internacional de la Papa (CIP)*., <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>.
- CEBA. (2019). Producción de *Beauveria* spp. con fines agrícolas. Biorrefinería, .
<https://cebaecuador.org/wp-content/uploads/2021/06/Biorrefinería-02-2019-VERSION->

COMPLETA-16-25.pdf.

Chancusig Espin, C. y.-c. (2024). Neutrosophic Analysis in the Evaluation of the Use of Beauveria Bassiana against the Potato Grub. Neutrosophic Sets and Systems. En Chancusig-Espin. <https://doi.org/10.5281/zenodo.12752965>.

Chancusig-Espin, C. P.-c. (2024). Análisis neutrosófico en la evaluación del uso de Beauveria Bassiana contra el gusano de la papa. Conjuntos y sistemas neutrosóficos. <https://doi.org/10.5281/zenodo.12752965>.

Chuquin, D. H. (2021). Comparación de dos métodos de producción de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae [Tesis de grado, Universidad Zamorano]. *Biblioteca Digital Zamorano.*, <https://bdigital.zamorano.edu/bitstreams/da7400ed-ecac-4136-825f-ac4c8072f429/download>.

Cislab. (2023). *Cámara de Neubauer: Qué es, para qué sirve y cómo usarla.* . El Blog del Químico: <https://www.cislab.com.mx/blog/el-blog-del-quimico-1/camara-de-neubauer-que-es-para-que-sirve-y-como-usarla-180>.

Coleman., M. -K. (2023). Impacto del estrés osmótico en la producción, morfología y aptitud de las blastosporas de Beauveria bassiana. Microbiología Aplicada y Biotecnología. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12631-z>.

Corral, O. G. (2012). Control de calidad microbiológico de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico. *Agrosavia.*, <https://repository.agrosavia.co/bitstreams/0469ef52-635e-468d-b530-a4e9aa50b936/download>.

Dodge, R. &. (2023). Standardized cell counting methods for microbial quantification. . *Journal of Microbiological Methods*.

Filippou, C. D. (2021). El aumento del crecimiento mediado por polimicovirus del hongo

- entomopatógeno *Beauveria bassiana* depende del metabolismo del carbono y el nitrógeno. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.606366>.
- Gaibor Fernández, R. &. (2023). Variación en el tiempo del efecto de los bioinsecticidas sobre la incidencia de *Spodoptera frugiperda* en maíz (*Zea mays*).
- González Dávila, R. P. (2022). Biocontrol de *Cosmopolites sordidus* (Germar) en plantaciones de Musa AAB del Carmen, Manabí, Ecuador. *RECIAMUC*,. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(4\).octubre.2022.129](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(4).octubre.2022.129).
- González Dávila, R. V. (2022). Biocontrol de *Cosmopolites sordidus* (Germar) en plantaciones de Musa AAB del Carmen, Manabí, Ecuador. *RECIAMUC*. [https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(4\).octubre.2022.129-135](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(4).octubre.2022.129-135).
- González, N. G.-S.-O. (2021). La colonización endofítica por el hongo entomopatógeno *Beauveria Bassiana*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.660460>.
- Guapi, A. (2013). Evaluación de la eficacia del bioformulado de *Beauveria bassiana*, y tipos de aplicación para el control de broca. <https://www.cabi.org/wp-content/uploads/Guapi-2013-Efficacy-of-Beauveria.pdf> .
- Guzmán, V. A. (s.f.).
- Hidalgo, D. R. (2025). Avances de investigación en Ecuador sobre el uso de hongos entomopatógenos para el control de la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*. INAMHI. (2017). *ANUARIO METEOROLÓGICO*. Ecuador: http://www.serviciometeorologico.gob.ec/docum_institucion/anuarios/meteorologicos/Am_2013.pdf.
- insilico. (s.f.). Manejo de la cámara de recuento celular Neubauer improved. *insilico*, http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer_improved.php.

- Itagri. (2020). Beauveria bassiana en el control biológico de patógenos.
<https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/beauveria-bassiana-en-el-control-biologico-de-patogenos>.
- Jiang, Y. y. (2023). Situación del registro y uso de micopesticidas en el mundo. Journal of Fungi.
<https://doi.org/10.3390/jof9090940>.
- Lucero, J. (2024). Producción de Beauveria bassiana para la formulación de bioplaguicidas.
<https://doi.org/10.17163/lgr.n40.2024.08>.
- Lucero, J. M. (2024). Producción de beauveria bassiana para la formulación de bioplaguicidas.
La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. <https://doi.org/10.17163/lgr.n40.2024.08>.
- Lucero, M. L. (2024). Producción de beauveria bassiana para la formulación de bioplaguicidas.
La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. <https://doi.org/10.17163/lgr.n40.2024.08>.
- Martínez, V. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agrícola sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. Revista de la Biosfera Selva Andina,, 8(2), 128-149.
- Mascarin, G. M. (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of Beauveria bassiana and Isaria fumosorosea strains. *ournal of Invertebrate Pathology*, , 127, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.001>.
- Mascarin, Kabori y Coleman. (2023). Impact of osmotic stress on production, morphology, and fitness of Beauveria bassiana blastospores. Applied Microbiology and Biotechnology. En Mascarin. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12631-z>.
- Mata Astorga, M. (2008). Evaluación de la fermentación sumergida de Beauveria bassiana para la producción de blastosporas con actividad biológica contra Hypothenemus hampei. Repositorio TEC. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/544/>.

- Merino Peñafiel y Tinoco Gómez, O. (2016). Evaluación de los suplementos nutritivos sobre sustratos sólidos para la producción en masa de *Beauveria bassiana*.
- Merino Peñafiel, C. O. (2016). Evaluación de los suplementos nutritivos sobre sustratos sólidos para la producción en masa de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium*.
- Mero, D. &. (2023). Uso del hongo *Beauveria* (*B. bassiana*) como biocontrolador de plagas en el cultivo de arroz (*O. sativa* L.), Las Gilces-Crucita. Repositorio UNESUM. .
<https://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/3901/1/> .
- Núñez, P. R. (2019). Producción de *Beauveria* spp. con fines agrícolas . *Revista Biorrefinería*,
<https://cebaecuador.org/wp-content/uploads/2021/06/Biorrefineri%CC%81a-02-2019-VERSION-COMPLETA-16-25.pdf>.
- OIEA, O. I. (2019). Uso de hongos entomopatógenos para el control de moscas de la fruta. *IAEA*,
https://www.iaea.org/sites/default/files/21/05/2019_ipc_use_of_entomopathogenic_fungi_esp.pdf.
- OMS, O. M. (2005). Manual de bioseguridad en el laboratorio (3.^a ed.).
<https://medicina.udd.cl/files/2013/07/3.-Manual-de-Bioseguridad-OMS.pdf>.
- PAITAN YANCE, A. J. (2024). PROPAGACIÓN DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO (*Beauveria*. *UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CENTRO DEL PERÚ*,
<https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstreams/4f65ae6d-f97d-493d-8b75-eb3ba8846e36/download>.
- Peña Haro, C. M.-C. (2024). Aplicación de insecticidas orgánicos en el control biológico de *negrita* en el cultivo de tomate, . <https://doi.org/10.25127/riagrop.20241.965>.
- Ramírez, H. G. (2017). Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. *SENASA*,
<https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2017/09/Manual-de->

Producción y Uso de Hongos Entomopatógenos.

- Rehner, S. A. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, . <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.84>.
- Viera, T. T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable,. <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200128>.
- Wahjono, T. Y. (2024). *Beauveria Bassiana*: Insecto patógeno y productor de biopesticidas como una alternativa eficaz y ecológica para el control biológico. *AgriTECH*. <https://doi.org/10.36728/afp.v24i1.2885>.
- Xiao, G. Y. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, . <https://doi.org/10.1038/srep00483> .
- Yael. (2020).
- Yepez, O. E. (2014). Uso y partes de la cámara de Neubauer. *SCRIBD*, <https://es.scribd.com/doc/246712102/Que-Es-La-Camara-Neubauer>.

ANEXOS

Anexos 1. Implementación de la cámara de aislamiento



Anexos 2. Elaboración de tratamientos experimentales



Anexos 3. Mediciones de PH de los diferentes tratamientos



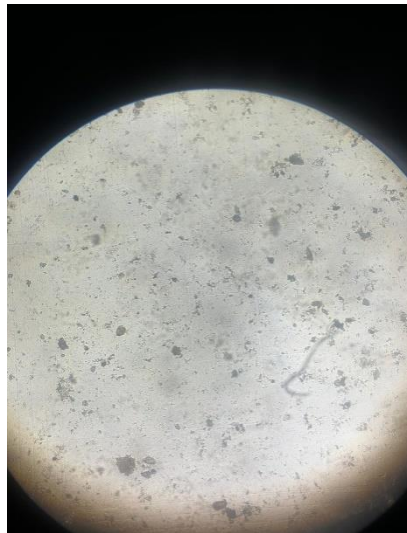
Anexos 4. Inoculación de Beauveria Bassiana



Anexos 5. Toma de muestra de los sustratos para el conteo en cámara de Neubauer.



Anexos 6. Toma de datos.



Anexos 7. Análisis de varianza de las UFC.

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
UFC	20	0,96	0,96	6,87	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1736634425000000,00	4	4341586062500000,00	103,12	<0,0001
Tratamiento	1736634425000000,00	4	4341586062500000,00	103,12	<0,0001
Error	631558125000000,00	15	42103875000000,00		
Total	1799790237500000,00	19			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=14168135,68259

Error: 42103875000000,0000 gl: 15

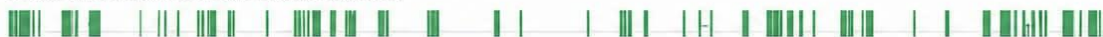
Tratamiento	Medias	n	E.E.	
2	146500000,00	4	3244374,94	A
4	103437500,00	4	3244374,94	B
5	83562500,00	4	3244374,94	C
3	79175000,00	4	3244374,94	C
1	59812500,00	4	3244374,94	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



Resumen (sección 1/2)

Localización de los textos sospechosos en el documento :



9%
Textos sospechosos

Incluido en el porcentaje de textos sospechosos :



Similitudes

Pasajes con similitudes a fuentes encontradas en diferentes colecciones.



6%

Detección de IA

Textos estilísticamente próximos a un texto generado por una IA.

Este índice es un indicador y no una prueba. Compruébelo con el autor si domina los conocimientos mencionados en el documento.



18%

Idiomas no reconocidos

Pasajes en los que parte del vocabulario utilizado no forma parte del diccionario de la lengua. Puede tratarse de un intento del autor de modificar el texto para evitar ser detectado.



4%

Textos entre comillas

Pasajes entre comillas, a menudo indicativos de una cita.



1%

No incluido en el porcentaje de textos sospechosos :

Pasajes en los que parte del vocabulario utilizado no forma parte del diccionario de la lengua. Puede tratarse de un intento del autor de modificar el texto para evitar ser detectado.



1%


Ing. Paul González M.C.
1103586762.