

Revista de la Sociedad Mexicana de

Biotecnología y Bioingeniería A.C.

Año 2025 Volumen 29, Número 1
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería



Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotecnología
y Bioingeniería A.C.

MESA DIRECTIVA

2024 – 2026

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Presidente

Dr. Francisco José Fernández Perrino
Vicepresidente

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez
Secretario

Dra. Neith Aracely Pacheco López
Tesorero

Dra. Andrea Sabido Ramos
Subsecretario

Dra. Carolina Peña Montes
Subtesorero

M.C. Oscar Ulises García Flores
Vocal estudiante

EDITORIA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
UNAM

Co-editor

Dr. Jorge Gracida
UAQ

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Isadora Martínez Arellano
Dra. Georgina Sandoval
Dra. Elda Patricia Segura Cenicerós
Dra. María Eugenia de la Torre
Dra. Virginia Villacruz
Dra. Beatriz Ruiz Villafán
M. en C. Vanessa Hernández Rodríguez

Formación y edición

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx.

Índice

Instrucciones para los autores	4
--------------------------------	---

Artículos

Review of the potential of *Beauveria bassiana* as a biological controller of pathogens in agricultural crops

Raúl Alberto Cuervo-Mulet, Ramón Arturo Reyes-Silva*, Sabdi Berzabet Velázquez-Santizo, Maira Julieth Borja, Claudia Asceneth Castañeda	8
---	---

Cultivo celular tridimensional: protocolos y métodos emergentes

Dayana Fausto	24
---------------	----

Empleo de detergentes homólogos a Tritón X-100 en la purificación de cuerpos de inclusión

Lázaro Guerra, Yinet Cartaya, Lourdes Zumalacárregui, Dayana Soler, Dunia González, Daniela Rivero, Thalia Lambert, Analeydis García	29
--	----

Agua de laguna eutrofizada: una alternativa de medio de cultivo para la producción de microalgas

Sheila Genoveva Pérez Bravo, Ana Anzures Mendoza, Mónica Fabiola Briones Baez, María del Refugio Castañeda Chávez, Luciano Aguilera Vázquez	36
---	----

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.

Instrucciones para los autores

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra *italica* Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras *italicas*.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: "Martínez & García (1999) han demostrado que...", o bien, "Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...". Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: "Gutiérrez et al. (2003), han demostrado..." O bien: "Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado..."

Instrucciones para los autores

Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor correspondiente. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y marisol.cordova@icat.unam.mx.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.

Review of the potential of *Beauveria bassiana* as a biological controller of pathogens in agricultural crops

Raúl Alberto Cuervo-Mulet¹, Ramón Arturo Reyes-Silva^{2*}, Sabdi Berzabet Velázquez-Santizo²,
Maira Julieth Borja³, Claudia Asceneth Castañeda⁴
Universidad de San Buenaventura Cali¹
Licenciatura en Biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas²
Ingeniería Agroindustrial. Universidad de San Buenaventura Cali³
Institución Universitaria Antonio José Camacho⁴
*e-mail: ramon.reyess@e.unicach.mx

Resumen

Los hongos entomopatógenos, a menudo considerados únicamente como patógenos de insectos, desempeñan funciones adicionales en la naturaleza, incluidos el endofitismo, el antagonismo de las enfermedades de las plantas y la promoción del crecimiento de las plantas. Estos roles permiten brindar oportunidades para el uso múltiple de estos hongos en estrategias de manejo integrado de plagas (MIP). Este artículo revisa los avances más recientes en el uso del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, su control en insectos plaga y en la colonización endofítica de diferentes plantas hospedantes. También aborda los posibles mecanismos de protección conferidos por *Beauveria bassiana* como hongo entomopatógeno y como hongo endófito y explora el uso potencial del mismo en el control biológico dual. Finalmente, se resumen las limitaciones actuales y las direcciones que debería tener las investigaciones futuras con respecto a *Beauveria* spp. como agente de control biológico dual.

Palabras Claves: Hongos endófitos, Hongos entomopatógenos, Plagas, Biocontrolador, PGP, *Beauveria bassiana*.

Abstract

Entomopathogenic fungi, often considered only as insect pathogens, perform additional functions in nature, including endophytism, antagonism of plant diseases and promotion of plant growth. These roles allow opportunities for the multiple use of these fungi in integrated pest management (IPM) strategies. This article reviews the literature currently available on the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, its control in insect pests and in the endophytic colonization of different host plants. It also addresses the possible protection mechanisms conferred by *Beauveria bassiana* as an entomopathogenic fungus and as an endophytic fungus and explores its potential use in dual biological control. Finally, we summarize the current limitations and directions that future research should have regarded *Beauveria* spp. as a dual biological control agent.

Key Words: Endophyte fungus, Entomopathogenic fungus, Pests, Biocontroller, PGP, *Beauveria bassiana*.

Introduction

The applications of *B. bassiana* are broad in Integrated Pest Management (IPM), as they can encompass fields ranging from agriculture (Ranesi et al., 2024; Afandhi et al., 2023; Iida et al., 2023), food production (Amobonye et al., 2022; Gutiérrez-Román et al., 2022) and even the field of medicine, through the control of vector insects that transmit diseases to the population (Pirmohammadi et al., 2023; Tawidian et al., 2023; Vivekanandhan et al., 2022).

Many species of the genus *Beauveria* are morphologically similar, leading to the formation of complexes such as the *B. bassiana* complex and the *B. subscarabaeidicola* complex, which are composed of species such as *B. subscarabaeidicola*, *B. songmingensis*, *B. polyrhachicola*, *B. caledonica*, *B. blattidicola*, among others (Wang et al., 2022), the most notable advantages these fungi offer to plants are protection against endophytic pathogens such as bacteria and phytopathogenic fungi, such as *Fusarium*, *Epicoccum* sp., *Alternaria burnsii*, (Pachoute et al., 2024), *Botrytis cinerea* (Sui et al., 2023), etc. *B. bassiana* it is a generalist entomopathogenic fungus that initiates its cycle by penetrating the hard chitinous cuticle of insects, producing secondary metabolites directly in the hemocoel, which causes the death of the insect (Pedrini, 2022).

Aspects such as host compatibility and severe environmental variations can lead to a loss in the viability of fungal conidia (Quesada-Moraga et al., 2024); this is why it is necessary to standardize the processes for the mass production of entomopathogenic fungi as biocontrol agents (Jaronski, 2023).

Entomopathogenic fungi like *B. bassiana* research has been mainly directed to develop them as biological control agents for insects, the great potential of this fungus in pest control has been widely demonstrated (Swathy et al., 2024; Liu et al., 2023; Pirmohammadi et al., 2023; Tawidian et al., 2023; Wakil et al., 2023; Chouikhi et al., 2022; Idrees et al., 2022; Vivekanandhan et al., 2022; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2022), even though it is effective on its own, it has been found that symbiosis with bacteria such as

Pseudomonas spp., promotes the vegetative growth of the fungus, accelerating the mortality of infected insects (Liu et al., 2023).

Although its most common use is as a biopesticide (Pedrini et al., 2024), it is considered a potential source of research from the metabolomics and transcriptomics perspective, which will allow the identification of metabolites synthesized by the fungus, potentially useful in numerous aspects across various fields of knowledge (Fei et al., 2024).

This article reviews the available literature on the potential of the entomopathogenic fungal *Beauveria* spp. as biological pest insect controller and its endophytic colonization in different plants. The European Commission has recently published a report on the impact of the Community's agricultural policy on the Mediterranean. In addition, it describes the control mechanisms used by fungal entomopathogen as pest insect controller and diseases of agricultural plants and discusses the interactions of *Beauveria* spp. as endophyte with other endophytes. Finally, current research and future research direction to potentially use *Beauveria* spp. as a dual biological control agent are discussed and concluded. For this reason, a review divided by item is presented below about the *Beauveria* spp. as a dual biological control agent in agricultural crops.

***Beauveria* spp. and biological pest control insects**

The cosmopolitan species of *Beauveria* are particularly suitable as possible biological control agents for insect pests, this is because its range of hosts is extremely diverse, can be produced in mass easily and has an extraordinary mechanism in the process of pest insect infection (Blond et al., 2018).

Among the research known is the colonization of *B. bassiana* allowed the reduction of damage caused by trappers and lepidoptera stems in corn (Bruck & Lewis, 2002), Banana Gorgon (Luo et al., 2015; Akello et al., 2008), the fruit worm of the tomato *Helicoverpa zea* (Abdul et al., 2015), the cutting ant *Atta cephalotes* (López & Orduz, 2002), the corn stalk sweeper *Sesamia nonagrioides* (Verma,

2014), the onion thrips, the cotton worm (Castillo & Sword, 2015), among others. Additionally, the control exerted on insect species that damage tea crops has been demonstrated (Bhattacharyya et al., 2023). To prevent resistance to insecticides, it has been opted to use a combination of insecticide doses with *B. bassiana* doses in both field and laboratory conditions. As mentioned by Wakil et al. (2022), they used concentrations of fipronil with *B. bassiana* to test its insecticidal effect on beetles such as *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium castaneum*, *Sitophilus granaries*, and *Trogoderma granarium*, obtaining higher mortality in formulations with fipronil and *B. bassiana*, temperature influenced the results, as the highest mortality was reached at 30°C, with *R. dominica* being the most susceptible. On the other hand, *B. brongniartii* has also been tested for the control of two hemipterans, *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion miscanthi*, which damage wheat crops in China, causing high mortality starting from day three in both larvae and adults (Tian et al., 2024).

Coffee (*Coffea arabica*) has been threatened by diseases such as coffee berry borer caused by the beetle *Hypothenemus hampei*, in which infected fruits were treated with *B. bassiana*, achieving 100% mortality (Krutmuang et al., 2023). The potato (*Solanum tuberosum*) crop is also affected by pest insects, with the most important being *Phthorimaea operculella*, a moth that feeds inside the plants, making its control difficult. Good results have been obtained in controlling this insect using potato

plants infected with *B. bassiana* (Eltair et al., 2024; Zhang et al., 2023a; Zhang et al 2022). From a different perspective, highlighting the entomopathogenic characteristic previously mentioned of the fungus, the mycoproteins of *B. bassiana* can be derived from a substrate composed of insects such as *Eurysacca melanocampta* and *H. hampei*, transforming them into more proteins for utilization in the food industry (Gutiérrez-Román et al., 2022).

There are studies that test the larvicidal activity using the metabolites directly produced by *B. bassiana*. An example is the metabolites extracted from the fungus against *Tuta absoluta*, causing 80% mortality at 24 and 48 hours after treatment with these compounds (Vivekanandhan et al., 2024). It has been shown that the metabolites α -solanine, 5-O-caffeoylshikimic acid, clerodendrin A, and peucedanin have insecticidal activity, as plants infected with *B. bassiana* overexpress these metabolites, providing protection to tomato plants against *Bemisia tabaci* (Wang et al., 2023).

Mechanism of action

The development of *Beauveria* disease towards the insect pest is divided into three phases: (1) adhesion and germination of the spore of the entomopathogenic fungus in the cuticle of the insect, (2) hemocoel penetration and (3) hemocoel replication (Jaber & Alananbeh, 2018; Guesmi-jouini et al., 2014; Krasno et al., 2014) (Figure 1).

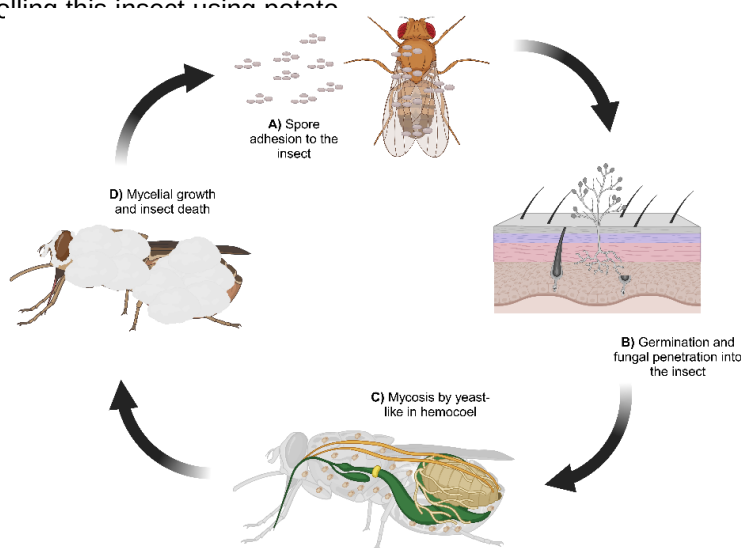


Figure 1. Development of *B. bassiana* in insects. (Jaber & Alananbeh, 2018; Guesmi-jouini et al., 2014; Krasno et al., 2014).

Created in BioRender. Reyes-Silva, R. (2024) <https://BioRender.com/s58x425>.

(1) Adhesion and germination of the spore

After the spores have been dispersed by biotic or abiotic factors, they can enter the insect through the mouth, spiracles, anus, or its surface. Once attached, a set of enzymes is released to infiltrate the insect. (Altinok et al., 2019). Germination (Figure 1) is a process by which a spore emits one or more small germinative tubes that, as they grow and lengthen, give rise to hyphae, this process depends on the conditions of humidity and ambient temperature. The success of germination and penetration does not depend on the percentage of germination but on the time of the duration of germination, the mode, aggressiveness of the fungus, type of spore and host susceptibility (Guesmi-jouini et al., 2014).

(2) Penetration into the hemocoel

The penetration process is possible thanks to a combination of physical and chemical mechanisms. The physical mechanism is given by the pressure exerted by the haustory which first deforms the cuticular layer then breaking up the sclerosed and membranous areas of the cuticle (Figure 1). The chemical mechanism consists, on the other hand, in the enzymatic action mainly of hydrolytic activities such as protease, lipase and chitinase, which degrade the tissue in the area of penetration facilitating the entrance of the fungus; another mechanism used by fungal entomopathogens such as *Beauveria* to penetrate the hemocoel is the oral cavity, spiracles and other external openings of the insect. (Jaber & Alananbeh, 2018).

(3) Replication in the hemocoel

When the spores of entomopathogenic fungi reach the hemocoel, most of them make a dimorphic transition from mycelium to yeast. Mycosis induces abnormal physiological symptoms in the insect such as convulsions, lack of coordination, altered behaviors and paralysis. Death occurs due to a combination of effects including physical tissue damage, toxicosis, dehydration of cells by loss of fluid and nutrient consumption (Quiroz et al., 2008). Also, it has been observed that to prevent the attack of the insect's immune system, fungi often do without cell wall formation and develop as protoplasts, avoiding recognition by circulating hemocytes in the hemocoel, when the nutrients from the insect, particularly

the nitrogen sources, become depleted, the yeast-like phases resume their mycelial growth (Figure 1) (Krasno et al., 2014).

Beauveria and its function as a beneficial endophyte

The term endophyte refers to microorganisms that colonize the interior of plant tissues without causing apparent damage to host plants. Endophyte fungi have been found in all types of plants, from those living in the arctic to the tropics, as well as in agricultural fields (Sánchez-Fernández et al., 2013). One of the main investigations on the introduction of the entomopathogenic fungus *Beauveria* is presented by Lewis and Cossentine in 1986; where *B. bassiana* was established as an endophyte after aqueous application to the maize plants *Zea mays* L. (Poaceae), for the suppression of the European corn sweeper *Ostrinia hubialis* (Hübner) (Lepidoptera: pyralidae) throughout the season (Verma, 2014).

B. bassiana has been extensively studied for the symbiosis it forms when infecting hosts of agro-industrial importance, thus improving their performance. An example of this is the increased size of tomatoes (*Solanum lycopersicum*), which are larger in plants colonized with *B. bassiana* than in plants without the fungus (Sui et al., 2023). Similarly, it has been tested in melon (*Cucumis melo*) and strawberry (*Fragaria sp.*) crops, even achieving infection rates of 100% in tissues of both pot and field crops, providing resistance against pests such as moths, mites, hemipterans, among others (Mantzoukas et al., 2022). Other investigations where *B. bassiana* has been reported as endophyte are that of (Guesmi-jouini et al., 2014) where it was shown that ten days were sufficient to confirm that *B. bassiana* could be established endophytically in the artichoke *Cynara scolymus*. In sugarcane, *B. bassiana* was shown to endophytically colonize this agricultural plant and improve root establishment (Kasambala et al., 2018).

Beauveria spp. has also been shown to have dual biological control in the bean, naturally occurring in soil and plant; allowing the control of the insect *Piezodorus guildinii* and as a natural endophyte of the common bean plant *Phaseolus vulgaris* (Ramos et al., 2017). On

the other hand, (Castle & Sword, 2015) provided evidence that *B. bassiana* and *Metharizum brunneum* can effectively inhibit the growth of several *Fusarium* species that cause root rot in cotton plants and (Greenfield et al., 2016) demonstrated that *B. bassiana* and *M. anisopliae* can control the disease causing whitefly *Aleurotrachelus socialis* and the same in the yucca plant, obtaining that *B. bassiana* has the highest levels of colonization in plants and exerts a better control on the diseases of the same (84% control).

The dual effect of *B. bassiana* has been demonstrated in both promoting growth in plants and providing protection against pests in crops (Figure 2), such as melon (*C. melo*),

strawberry (*Fragaria sp.*) (Mantzoukas et al., 2022), tomato (*S. lycopersicum*) (Sui et al., 2023; Zheng et al., 2023), sugar beet (*Beta vulgaris L*) (Darsouei et al., 2024); it has been tested against the Asian corn borer *O. furnacalis*, achieving good results in biomass and protection against the borer (Sui et al., 2024b). Similarly, the resistance to abiotic stress in plants with *B. bassiana* has been tested, improving drought tolerance in tomato plants (Guo et al., 2024). It also induces resistance in potato plants against salt stress, showing higher tolerance when infected with *B. bassiana* compared to the controls (Tomilova et al., 2023).

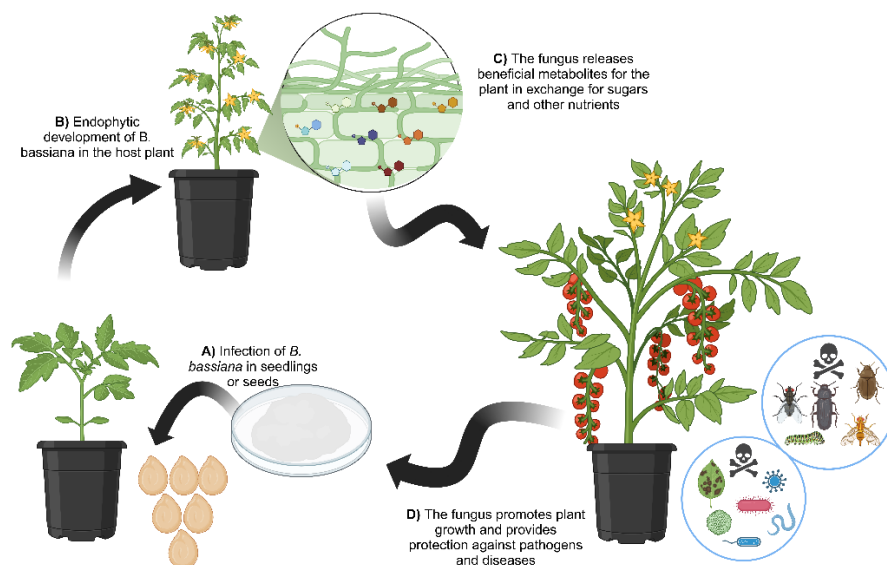


Figure 2. Dual effect of *B. bassiana* on plants (Swathy et al., 2024; Tawidian et al., 2023; Idrees et al., 2022; Zhang et al., 2022). Created in BioRender. Reyes-Silva, R. (2024) <https://BioRender.com/s58x425>.

Other research shows that *Beauveria spp.* has been the most studied entomopathogenic fungus as endophyte for disease control in plants demonstrating its good response in agricultural crops of tobacco (*Nicotiana tabacum*) (Taylor et al., 2014), pumpkin (*Curcubita sp.*) (Jaber & Salem, 2014), millet (*Panicum miliaceum*) (Reddy et al., 2009), tomato (*S. lycopersicum*) (Abdul et al., 2015), sweet pepper (*Capsicum annuum*) (Kumar et al., 2016), banana (*Musa paradisiaca L*) (Akello et al., 2008) coffee (*C. arabica*) (Vega et al., 2010), among others.

Promotion of host plant immunity by *Beauveria*

Crops are always exposed to biotic factors, which is why it was necessary to develop a defense system against threats such as bacteria, viruses, fungi, insects, herbivores, among others, which can represent potential diseases leading to death (Ngou et al., 2022a). The immune system in plants is based on Pattern Recognition Receptors (PRRs), which are extracellular, and Nucleotide Binding Leucine-Rich Receptors (NLRs), which are intracellular. The activation of these receptors triggers an immune response that in turn produces metabolites such as phytohormones and reactive oxygen species (ROS) to defend

against infection or damage (Ngou et al., 2022b). In the search for the role of *B. bassiana* in improving the immune system of host plants, it was found that they directly act on the production and control of reactive oxygen species (ROS).

The symbiosis between endophytic fungi and plants leads to a significant improvement in defense against endophytic pathogens, enhancing the plant's immune system. It has been shown that the colonization of *B. bassiana* in tomato plants increases the production of reactive oxygen species (ROS) (Gupta et al., 2022). Similarly, infections by the pathogen *B. cinerea* in tomato plants also increase ROS production and, consequently, oxidative stress in the plant. Plants colonized with *B. bassiana* show higher production of SOD-type enzymes that reduce oxidative stress caused by ROS (Proietti et al., 2023).

***Beauveria* control mechanism in agricultural plant diseases**

The function of endophytic fungi in host plants is well known, as they not only protect against insects but also against pathogenic microorganisms that can cause diseases. Its effect has been tested against *B. cinerea*, inhibiting the growth of the pathogen (Sui et al., 2022), as well as against *F. oxysporum* (Nchu et al., 2022), fungi that cause significant diseases in crops such as tomatoes (*S. lycopersicum*) and grapes (*Vitis vinifera*). It has also been tested in ornamental and food crops like sunflower against the disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, significantly suppressing this pest (Sui et al., 2024a). The following outlines the role of *B. bassiana* in phytopathological diseases.

(1) Direct suppression of plant pathogens

Entomopathogenic fungi such as *Beauveria* when acting as endophytes can directly suppress plant pathogens through mycoparasitism. Mycoparasitism is mainly characterized by forming hyphae wrapped around the host fungus's hyphae (Quiroz et al., 2008). The colonization of *Beauveria* occurs through plant tissues involving host recognition, spore germination, the penetration of the plant surface and the colonization of tissues (Mendiola-soto & Heil, 2014). Once *Beauveria* as endophyte colonizes the plant, it occupies a niche by depleting the nutritional resources of the plant

without leaving any available for the plant pathogen. Moreover, antibiosis is produced by secondary metabolites; these confer protection against plant pathogens that cause diseases and insect pests (Ownley et al., 2010).

In vivo inoculations of *B. bassiana* in plants have been conducted to test its antiparasitic effect. Sui et al. (2023) found that in tomato plants grown in pots and in the field, once inoculated with *B. bassiana* and exposed to *B. cinerea*, the plants that showed the smallest lesions on their leaves were the experimental plants, both in pots and in the field. The effect of *B. bassiana* against the cucumber mosaic virus in cucumber plants has also been studied, observing that the virus can alter the plant's metabolites to enhance its infection. The use of the fungus mitigates the negative effect on the plant and inhibits the virus (Shaalán et al., 2022).

Some viruses, such as the beet yellowing virus, appear to not be inhibited by *B. bassiana*, but it somewhat reduces the viral load and protects against the aphid *Myzus persicae*, the main vector of the virus (Dessauvages et al., 2024). Studies have been conducted on the effect of *B. bassiana* with beneficial soil bacteria and some that are symbiotic with the fungus, showing compatibility with bacteria such as *Bacillus subtilis* (Kramski et al., 2023). However, it has also been shown to have a bactericidal effect against *Xanthomonas euvesicatoria* (Gupta et al., 2022). Positive results have also been obtained against *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescence*, *X. campestris* and *Clavibacter michiganensis* (Camele et al., 2023).

(2) Induction of systemic plant resistance.

Induced systemic resistance is an important plant defense mechanism against a wide range of plant pathogens and insect pests (Pieterse et al., 2014). This defense mechanism allows to reduce the symptoms of the disease in parts of the plant away from the site where the inducer is active. Systemic resistance induced has been demonstrated in cotton seedlings inoculated with strain 11-98 of *B. bassiana* which was soaked in the plant root and followed by folia attack of *Xanthomonas* sp., 13 days later. Significant reduction in disease was obtained for plants

not inoculated with *B. bassiana* (Ownley et al., 2010; Griffin, 2007). Suppression or delay in the development of symptoms is also considered a mechanism of SRI, this was evidenced in zucchini (*C. pepo*) plants colonized by several strains of *B. bassiana* (Jaber & Salem, 2014) where plants inoculated with the entomopathogen presented a low rate of viral multiplication compared to those that were not inoculated.

Systemic resistance in plants induced by *Beauveria* spp. has been demonstrated in multiple studies (Eltair et al., 2024; Sui et al., 2023; Tomilova et al., 2023; Bhattacharyya et al., 2023; Tomilova et al., 2023; Zhang et al., 2023a; Mantzoukas et al., 2022; Zhang et al., 2022), this resistance provides an advantage to the host plants, as they exhibit greater resistance to biotic (Dessauvages et al., 2024; Kramski et al., 2023; Shaalan et al., 2022) and abiotic factors (Guo et al., 2024; Tomilova et al., 2023) when infected with *B. bassiana* compared to those that are not (Sui et al., 2024a), demonstrating its potential as a beneficial endophyte in integrated pest, vector, and disease management in plants (Abd El-Wahab et al., 2023; de Oliveira et al., 2023; Yasin et al., 2022; Zamora-Áviles et al., 2022; Chouikhi et al., 2022).

(3) Promotion of plant growth

Another mechanism used by fungal entomopathogens as endophytes is the protection of their host plant through improved plant growth (Gana et al., 2022). Fungal entomopathogens have been shown to promote plant growth after endophyte establishment thus avoiding abiotic and biotic stress (Liu et al., 2022). Example of promoting plant growth is found in pumpkin (*Curcubita* sp.) plants colonized with *B. bassiana* against ZYMV (Kesh & Yadab, 2023; Jaber & Salem, 2014) which not only reduced the disease but also proved more vigorous and developed faster. The same has been demonstrated with plants exposed to *F. solani* (Deng et al., 2018) showed healthy growth and lower disease rates compared to plants not colonized.

It should also be noted that the inoculation of plants with fungal entomopathogens has induced proteins related to photosynthesis and energy metabolism, which leads to increased plant growth and disease resistance (Gómez-Vidal, 2009). The improved growth

can also be attributed to the production of phytohormones as in the case of *B. bassiana* which produces siderophores under iron depletion culture conditions (Jirakkakul et al., 2014; Krasno et al., 2014). Finally, it should be noted that the ability of several species of fungal entomopathogens such as *B. bassiana*, *B. brongniartii* and *M. brunneum* depend on the method used for inoculating plants with the strains of fungi or the combination thereof.

Similarly, the promotion of plant growth produced by *B. bassiana* can explain the resistance to various types of abiotic stress, such as salinity, as it can stimulate the production of phytohormones, antioxidants, flavonoids, photosynthetic pigments, among others (Abdelhameed et al., 2024; Papantzikos et al., 2024; Akter et al., 2023). Furthermore, this fungus can be leveraged to increase yields in vegetable crops such as tomatoes (*S. lycopersicum*), onions (*Allium cepa*), potatoes (*C. tuberosum*), corn (*Z. mays*), cucumbers (*C. sativus*), peppers (*Capsicum* spp.), among others (Eltair et al., 2024; Mohammed et al., 2024; Russo et al., 2023; Saragih, 2023; Zhang et al., 2023a; Gana et al., 2022; Liu et al., 2022; Shaalan et al., 2022; Zhang et al., 2022).

Current limitations and future studies

Although there are not many studies, some resistance presented by insects against *B. bassiana* has been found. Gao et al. (2022) discovered that young larvae of *Spodoptera frugiperda* produce protective and detoxifying enzymes against *B. bassiana* infections, which are characteristic of the early larval stages, potentially conferring resistance to the larvae against the fungus's infection mechanisms. Also, *S. frugiperda* produces antimicrobial peptides such as lepidopterin, which can inhibit *B. bassiana* spores (Qi et al., 2024). Some insects, like the beetle *T. castaneum*, secrete defensive compounds against pathogens, allowing them to inhibit the development of *B. bassiana* (Davyt-Colo et al., 2022).

The efficacy of metabolites extracted from *Beauveria* spp. has been tested, proving to be more stable than the fungi themselves, making it a promising tool against resistance developed by some insects to the fungus, as

these insects depend on environmental conditions for development (temperature, humidity, UV light) (Kramski et al., 2023). Good results have been obtained using extracts of *Achyrocline satureioides* and *B. bassiana* against *Rhipicephalus microplus*, causing high mortality in both larvae and adults. However, when the extracts were used together with *B. bassiana*, 100% mortality was achieved (Fantatto et al., 2022). Kim et al. (2024) extracted and identified 8 metabolites (bassianin, bassianolide, beauvericin, beauveriolide I, enniatin A, A1, and B, and tenellin) present in the infection of *Tenebrio molitor* by *B. bassiana* using UPLC-Q-Orbitrap MS, with the main ones being bassianolide and beauvericin, which are promising for biopesticide development. Metabolites from *B. bassiana* have also been obtained through fermentation, including oosporein, which was able to inhibit spores of *Gibberella moniliformis* (Ávila-Hernández et al., 2022).

In the same way, it may occur that some crops are not compatible with the plant, despite the search for sustainable alternatives like inoculation with *B. bassiana*. An example is the search for pest resistance in the canola crop, *Brassica napus*, infected with *B. bassiana*, which resulted in longer germination times compared to the controls. However, it stimulated the production of flavonoids (Muola et al., 2024).

Future studies on the metabolism of *B. bassiana* that will focus on omics sciences (genomics, metabolomics, proteomics, transcriptomics, etc.) (Biswas et al., 2024; Wei et al., 2024; Hou et al., 2023; Mannino et al., 2023; Li et al., 2023a; Li et al., 2023b; Litwin et al., 2023; Sun et al., 2023; Zhang et al., 2023b; Guan et al., 2022; Li, 2022; Lin et al., 2022) will be key in understanding the genes and proteins involved in host infection, pathogen and disease protection, plant growth promotion, and the search for biotechnological metabolites of interest for the production of bioformulations that replace agrochemical products used in integrated pest management, which cause severe damage to the ecosystem and human health.

Conclusions

Entomopathogenic fungi are a unique and highly specialized group in pest insect control. Although there are more than 700 species of

fungal entomopathogens (Angelone & Bidochka, 2018), most of the mushrooms sold are concentrated in the *Beauveria* species, *Metarthizium*, *Isaria* and *Lecanicillium*. In the case of *Beauveria*, the species on which the research is concentrated are *B. bassiana* and *B. brongniartii* (Vega et al., 2009). This leads to the conclusion that a better understanding of the ecology of this species would allow for the expansion of the development and uptake of dual biological control in conventional agriculture. Being *B. bassiana* a cosmopolitan species, it exhibits great genetic diversity (Li et al., 2023a; Li et al., 2022), which in turn facilitates the acquisition of strains through isolates from infected insects from various regions, with different adaptations to various pathogens and plant pests (Tian et al., 2024; Ranesi et al., 2024; Sun et al., 2023; Idrees et al., 2022).

Entomopathogens like endophytes are becoming a potential group of microbial biological control as could be observed in the collection of some studies carried out in this review. The use of *Beauveria* as a treatment for seeds introduced at an early stage of plant development allows to obtain a higher result in dual biological control, overcoming several inherent problems such as damage from UV radiation, reduced humidity and excessive precipitation (Pachoute et al., 2024; Muola et al., 2024; Akter et al., 2023; Posada & Vega, 2006).

The extent and persistence of endophytic fungal colonization within plants can be improved by repeated application of the microbial agent through foliar spraying or soaking in the soil. The European Commission (Eltair et al., 2024; Mantzoukas et al., 2022; Jaber & Ownley, 2018). Finally, the challenge as researchers is to pave the way for the full potential of fungal entomopathogens as endophytes for integrated multiple pest management. However, several problems must be addressed mainly related to the consistency of plant colonization (Muola et al., 2024), subsequent endophytic protection (Guo et al., 2024; Eltair et al., 2024; Muola et al., 2024; Bhattacharyya et al., 2023), the resistance of some insects to *Beauveria* spp. (Qi et al., 2024; Davyt-Colo et al., 2022; Gao et al., 2022), the compatibility of host plants with the fungus (Muola et al., 2024), the symbiosis with endophytic and beneficial soil

bacteria (Muola et al., 2024; Kramski et al., 2023; Liu et al., 2023); along with the development of new tools in the field of omics sciences, will provide a better understanding of the genes that regulate the proteins involved in the fungus metabolism, enabling the acquisition of biotechnologically relevant metabolites (Biswas et al., 2024; Litwin et al., 2023; Guan et al., 2022; Li, 2022).

References

Abd El-Wahab, A. S. E. D., Nada, M. S., El-Shazly, M. A., Galal, A., & Amin, H. A. (2023). Effect of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* inhibiting whitefly transmission of squash leaf curl virus infecting squash. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 33(1), 64.

Abdul, M., Wakil, W., Jalal, M., Talib, S., & Dunlap, C. A. (2015). Infection of *Helicoverpa armigera* by endophytic *Beauveria bassiana* colonizing tomato plants. *Biological control*, 90, 200–207.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.005>.

Afandhi, A., Rachmawati, R., Syib'li, M. A., & Zain, H. A. U. (2023). Performance and virulence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* grown in media derived from biodegradable agricultural wastes enriched with cricket powder. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 45(2), 261–270.

Akello, J., Dubois, T., Coyne, D., & Kyamanywa, S. (2008). Endophytic *Beauveria bassiana* in banana (*Musa spp.*) reduces banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) fitness and damage. *Crop Protection*, 27(11), 1437–1441.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.07.003>.

Akter, T., Mimma, A. A., Haque, M. A., Hossain, M. M., Ghosh, T. K., Zinan, N., & Islam, S. M. N. (2023). Seed priming with *Beauveria bassiana* improves growth and salt stress response in rice. *Environmental and Experimental Botany*, 213, 105427.

Alarcón, A., Encarnación, M., & Hernández, L. (2008). Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan el cultivo de ajo. *Revista Mexicana de Micología*, 26 (January

2008), 27–34.

Altinok, H. H., Altinok, M. A., & Koca, A. S. (2019). Modes of action of entomopathogenic fungi. *Current Trends in Natural Sciences*, 8(16), 117–124.

Amobonye, A., Bhagwat, P., Ruzengwe, F. M., Singh, S., & Pillai, S. (2022). Pear juice clarification using polygalacturonase from *Beauveria bassiana*: Effects on rheological, antioxidant and quality properties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 72(1), 57–67.

Angelone, S., & Bidochka, M. J. (2018). Diversity and abundance of entomopathogenic fungi at ant colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 156 (July), 73–76.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.009>.

Ávila-Hernández, J. G., Aguilar-Zárate, P., Carrillo-Inungaray, M. L., Michel, M. R., Wong-Paz, J. E., Muñiz-Márquez, D. B., ... & Martínez-Ávila, G. C. G. (2022). The secondary metabolites from *Beauveria bassiana* PQ2 inhibit the growth and spore germination of *Gibberella moniliformis* LIA. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(1), 143–152.

Bhattacharyya, P. N., Sarmah, S. R., Roy, S., Sarma, B., Nath, B. C., & Bhattacharyya, L. H. (2023). Perspectives of *Beauveria bassiana*, an entomopathogenic fungus for the control of insect-pests in tea (*Camellia sinensis* L.) O. Kuntze]: opportunities and challenges. *International Journal of Tropical Insect Science*, 43(1), 1–19.

Biswas, C., Dey, P., Ramesh Babu, V., Alam, N. M., & Mandal, A. K. (2024). Transcriptome analysis revealed endophytic *Beauveria bassiana* triggered methyl jasmonate pathway associated with resistance against stem weevil (*Apion corchori*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 57(8), 588–602.

Blond, C. L. H., Ridgway, H. J., Brownbridge, M., Chapman, R. B., Condron, L. M., Saville, D. J., & Glare, T. R. (2018). Non-host larvae negatively impact persistence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 156 (July),

19–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.07.001>.

Bruck, D. J., & Lewis, L. C. (2002). Rainfall and crop residue effects on soil dispersion and *Beauveria bassiana* spread to corn, 20, 183–190.

Camele, I., Sadeek, S. A., Racioppi, R., & Elshafie, H. S. (2023). Antimicrobial activity of diffusible and volatile metabolites emitted by *Beauveria bassiana*: Chemical profile of volatile organic compounds (VOCs) Using SPME-GC/MS analysis. *Plants*, 12(15), 2854.

Castillo, D., & Sword, G. A. (2015). The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89, 53–60.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.010>.

Chouikhi, S., Assadi, B. H., Lebdi, K. G., & Belkadhi, M. S. (2022). Efficacy of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium muscarium* against two main pests, *Bemisia tabaci* (Genn.) and *Tetranychus urticae* (Koch), under geothermal greenhouses of Southern Tunisia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 125.

Darsouei, R., Karimi, J., & Stelinski, L. L. (2024). Endophytic colonization of sugar beet by *Beauveria varroae* and *Beauveria bassiana* reduces performance and host preference in army worm, *Spodoptera littoralis*. *Crop Protection*, 175, 106441.

Davyt-Colo, B., Girotti, J. R., González, A., & Pedrini, N. (2022). Secretion and detection of defensive compounds by the red flour beetle *Tribolium castaneum* interacting with the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Pathogens*, 11(5), 487.

de Oliveira Barbosa Bitencourt, R., Corrêa, T. A., Santos-Mallet, J., Santos, H. A., Lowenberger, C., Moreira, H. V. S., & da Costa Angelo, I. (2023). *Beauveria bassiana* interacts with gut and hemocytes to manipulate *Aedes aegypti*

immunity. *Parasites & vectors*, 16(1), 17.

Deng, J. J., Huang, W. Q., Li, Z. W., Lu, D. L., Zhang, Y., & Luo, X. chun. (2018). Biocontrol activity of recombinant aspartic protease from *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 112 (February), 35–42.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.02.002>.

Eltair, A. S., Abd-El Rahman, I. E., & Ibrahim, A. A. (2024). Efficacy of certain entomopathogenic fungi for controlling the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) under field conditions in Beheira Governorate, Egypt. *Egyptian Journal of Plant Protection Research Institute*, 7(2), 188-198.

Fantatto, R. R., Gainza, Y. A., Figueiredo, A., Sorrechia, R., Chagas, A. C. D. S., & Pietro, R. C. L. R. (2022). The association of extracts of *Achyrocline satureioides* and the fungus *Beauveria bassiana* against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, 87(4), 351-363.

Fei, H., Cui, J., Zhu, S., Xia, Y., Xing, Y., Gao, Y., & Shi, S. (2024). Integrative Analyses of Transcriptomics and Metabolomics in Immune Response of *Leguminivora glycinivorella* Mats to *Beauveria bassiana* Infection. *Insects*, 15(2), 126.

Gana, L. P., Etsassala, N. G., & Nchu, F. (2022). Interactive Effects of Water Deficiency and Endophytic *Beauveria bassiana* on Plant Growth, Nutrient Uptake, Secondary Metabolite Contents, and Antioxidant Activity of *Allium cepa* L. *Journal of Fungi*, 8(8), 874.

Gao, Y. P., Luo, M., Wang, X. Y., He, X. Z., Lu, W., & Zheng, X. L. (2022). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* PfBb and immune responses of a non-target host, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 13(10), 914.

Gómez-Vidal, S. (2009). Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 2996–3005.
<https://doi.org/10.1002/elps.200900192>.
 Greenfield, M., Gómez-jiménez, M. I., Ortiz,

- V., Vega, F. E., Kramer, M., & Parsa, S. (2016). *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biological Control*, 95, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.002>.
- Griffin, M. R. (2007). *Beauveria bassiana*, A Cotton Endophyte With Biocontrol Activity Against Seedling Disease.
- Guan, Y., Wang, D., Lin, X., Li, X., Lv, C., Wang, D., & Zhang, L. (2022). Unveiling a novel role of Cdc42 in pyruvate metabolism pathway to mediate insecticidal activity of *Beauveria bassiana*. *Journal of Fungi*, 8(4), 394.
- Guesmi-jouini, J., Garrido-jurado, I., López-díaz, C., Halima-kamel, M. Ben, & Quesada-moraga, E. (2014). Establishment of fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Bionectria ochroleuca* (Ascomycota : Hypocreales) as endophytes on artichoke *Cynara scolymus*. *Journal of invertebrate pathology*, 119, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.03.004>.
- Guo, W., Lu, Y., Du, S., Li, Q., Zou, X., Zhang, Z., & Sui, L. (2024). Endophytic Colonization of *Beauveria bassiana* Enhances Drought Stress Tolerance in Tomato via “Water Spender” Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 11949.
- Gupta, R., Keppanan, R., Leibman-Markus, M., Rav-David, D., Elad, Y., Ment, D., & Bar, M. (2022). The entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* promote systemic immunity and confer resistance to a broad range of pests and pathogens in tomato. *Phytopathology*®, 112(4), 784–793.
- Gutiérrez Román, A. I., Laynes Zela, P. F., Acuña Payano, R. K., Nolasco Cárdenas, O. P., Santa-Cruz Carpio, C. M., & Leiva Eriksson, N. R. (2022). Production of Sustainable Proteins Through the Conversion of Insects to Proteins Using *Beauveria bassiana* Cultures. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 760274.
- Hou, J., Zhang, H., Ding, J. L., Feng, M. G., & Ying, S. H. (2023). Transcriptomic investigation reveals a physiological mechanism for *Beauveria bassiana* to survive under linoleic acid stress. *Isience*, 26(4).
- Idrees, A., Afzal, A., Qadir, Z. A., & Li, J. (2022). Bioassays of *Beauveria bassiana* isolates against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Fungi*, 8(7), 717.
- Iida, Y., Higashi, Y., Nishi, O., Kouda, M., Maeda, K., Yoshida, K., & Kubota, M. (2023). Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*-based bioinsecticide suppresses severity of powdery mildews of vegetables by inducing the plant defense responses. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1211825.
- Jaber, L. R., & Alananbeh, K. M. (2018). Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biological Control*, 126 (May), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.007>.
- Jaber, L. R., & Ownley, B. H. (2018). Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens? *Biological Control*, 116, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.01.018>.
- Jaber, L. R., & Salem, N. M. (2014). Endophytic colonisation of squash by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota : Hypocreales) for managing Zucchini yellow mosaic virus in cucurbits. *Biocontrol Science and Technology*, (December 2014), 37–41. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.923379>.
- Jaronski, S. T. (2023). Mass production of entomopathogenic fungi—state of the art. *Mass production of beneficial organisms*, 317–357.
- Jirakkakul, J., Cheevadhanarak, S., Punya, J., Chutrakul, C., Senachak, J., Buajarern, T., Amnuaykanjanasin, A. (2014). Tenellin acts as an iron chelator to prevent iron-generated reactive oxygen species toxicity in the

entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, 1–19.

Kesh, H., & Yadav, S. (2023). Recent advances in genetics and breeding of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 98(2), 141-158.

Kim, J. C., Hwang, I. M., Kim, H. M., Kim, S., Shin, T. S., Woo, S. D., & Park, H. W. (2024). Rapid analysis of insecticidal metabolites from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* 331R using UPLC-Q-Orbitrap MS. *Mycotoxin Research*, 40(1), 123-132.

Kramski, D. J., Nowinski, D., Kowalczyk, K., Kruszyński, P., Radzimska, J., & Greb-Markiewicz, B. (2023). *Beauveria bassiana* water extracts' effect on the growth of wheat. *Plants*, 12(2), 326.

Krasno, S. B., Keresztes, I., Donzelli, B. G. G., & Gibson, D. M. (2014). Metachelins, Mannosylated and N - Oxidized Coprogen-Type Siderophores from *Metarhizium robertsii*, 2–9.

Kumar, C. M. S., Jacob, T. K., Devasahayam, S., Silva, S. D., & Nandeesh, P. G. (2016). Characterization and virulence of *Beauveria bassiana* associated with auger beetle (*Sinoxylon anale*) infesting allspice (*Pimenta dioica*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.016>.

Li, J. X. (2022). *Genomic and transcriptomic signatures of virulence and UV resistance in Beauveria bassiana* (Doctoral dissertation, University of British Columbia).

Li, J. X., Fernandez, K. X., Ritland, C., Jancsik, S., Engelhardt, D. B., Coombe, L., & Birol, I. (2023a). Genomic virulence features of *Beauveria bassiana* as a biocontrol agent for the mountain pine beetle population. *BMC genomics*, 24(1), 390.

Li, Y. H., Chang, J. C., Yen, M. R., Huang, Y. F., Chen, T. H., Chen, L. H., & Nai, Y. S. (2023b). Whole-genome DNA methylome analysis of different developmental stages of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* NCHU-157 by nanopore sequencing. *Frontiers in Genetics*, 14,

1085631.

Litwin, A., Mironenka, J., Bernat, P., Soboń, A., & Różalska, S. (2023). Accumulation of pyrethroids induces changes in metabolism of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*—Proteomic and lipidomic background. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114418.

Liu, M., Ding, J., & Lu, M. (2023). Influence of symbiotic bacteria on the susceptibility of *Plagioderma versicolora* to *Beauveria bassiana* infection. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1290925.

Liu, Y., Yang, Y., & Wang, B. (2022). Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter. *Scientific reports*, 12(1), 15706.

López Arismendy, E., & Orduz Peralata, S. (2002). *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* controlan colonias de *Atta cephalotes* en campo mejor que un insecticida químico. *Rev. Colomb. Biotechnol.*, 4(574), 71–78.

Luo, F., Wang, Q., Yin, C., Ge, Y., Hu, F., Huang, B., Li, Z. (2015). Differential metabolic responses of *Beauveria bassiana* cultured in pupae extracts , root exudates and its interactions with insect and plant. *Journal of invertebrate pathology*, 130, 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.01.003>.

Mannino, M. C., Davyt-Colo, B., Huarte-Bonnet, C., Diambra, L., & Pedrini, N. (2023). Transcriptomic landscape of the interaction between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and its tolerant host *Tribolium castaneum* revealed by dual RNA-seq. *Scientific Reports*, 13(1), 16506.

Mantzoukas, S., Daskalaki, E., Kitsiou, F., Papantzikos, V., Servis, D., Bitivanos, S., & Eliopoulos, P. A. (2022). Dual action of *Beauveria bassiana* (Hypocreales; Cordycipitaceae) endophytic stains as biocontrol agents against sucking pests and plant growth biostimulants on melon and strawberry field plants. *Microorganisms*, 10(11), 2306.

Mendiola-soto, J. & Heil, M. (2014). from resistance induction to disease facilitation.

<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12454>.

Mohammed, V. G., Matrood, A. A., Rhouma, A., & Hajji-Hedfi, L. O. B. N. A. (2024). Efficacy Of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma viride* against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) on tomato plants. *Journal of Biological Control*, 179-185.

Muola, A., Birge, T., Helander, M., Mathew, S., Harazinova, V., Saikkonen, K., & Fuchs, B. (2024). Endophytic *Beauveria bassiana* induces biosynthesis of flavonoids in oilseed rape following both seed inoculation and natural colonization. *Pest Management Science*, 80(5), 2461-2470.

Nchu, F., Macuphe, N., Rhoda, I., Niekerk, L. A., Basson, G., Keyster, M., & Etsassala, N. G. (2022). Endophytic *Beauveria bassiana* induces oxidative stress and enhances the growth of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Plants*, 11(22), 3182.

Ngou, B. P. M., Ding, P., & Jones, J. D. (2022a). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *The Plant Cell*, 34(5), 1447-1478.

Ngou, B. P. M., Jones, J. D., & Ding, P. (2022b). Plant immune networks. *Trends in plant science*, 27(3), 255-273.

Ownley, B. H., Gwinn, K. D., & Vega, F. E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens : ecology and evolution, 113–128. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9241-x>.

Pachoute, J., dos Santos, G. R., & de Souza, D. J. (2024). Antagonistic effects of *Beauveria bassiana* on seed-borne fungi of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Biologia*, 1-9.

Papantzikos, V., Mantzoukas, S., Eliopoulos, P. A., Servis, D., Bitivanos, S., & Patakioutas, G. (2024). Evaluation of Various Inoculation Methods on the Effect of *Beauveria bassiana* on the Plant Growth of Kiwi and on *Halyomorpha halys* Infestation: A Two-Year Field Study. *Biology*, 13(7), 470.

Pedrini, N. (2022). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* shows its toxic side within insects: Expression of genes encoding secondary metabolites during

pathogenesis. *Journal of Fungi*, 8(5), 488.

Pedrini, N., Fernandes, É. K., & Dubovskiy, I. M. (2024). Multifaceted *Beauveria bassiana* and Other Insect-Related Fungi. *Journal of Fungi*, 10(2), 142.

Pieterse, M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Wees, S. C. M. Van, & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>.

Pirmohammadi, M., Talaei-Hassanloui, R., Moosa-Kazemi, S. H., Rassi, Y., Rahimi, S., Fatemi, M., & Vatandoost, H. (2023). Evaluation of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* on Different Stages of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae), Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 17(3), 257.

Posada, F., & Vega, F. E. (2006). Inoculation and colonization of coffee seedlings (*Coffea arabica* L.) with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota : Hypocreales). *Mycoscience*, 47(5), 284–289. <https://doi.org/10.1007/S10267-006-0308-6>.

Proietti, S., Falconieri, G. S., Bertini, L., Pascale, A., Bizzarri, E., Morales-Sanfrutos, J., & Caruso, C. (2023). *Beauveria bassiana* rewires molecular mechanisms related to growth and defense in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 74(14), 4225-4243.

Qi, W. X., Liu, F., Liu, F. F., Ren, H. Y., Zhang, B. X., Yu, X. Q., & Rao, X. J. (2024). Discovery and characterization of a novel Lepidoptera-specific antimicrobial peptide from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science*.

Quesada-Moraga, E., González-Mas, N., Yousef-Yousef, M., Garrido-Jurado, I., & Fernández-Bravo, M. (2024). Key role of environmental competence in successful use of entomopathogenic fungi in microbial pest control. *Journal of Pest Science*, 97(1), 1-15.

Quiroz Sarmiento, V. F., Ferrera Cerrato, RonaldQuiroz Sarmiento, V. F., Ferrera Cerrato, R., Alarcón, A., Encarnación, M., & Hernández, L. (2008). Antagonismo in vitro de

cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan el cultivo de ajo. *Revista Mexicana*, 27–34.

Ramos, Y., Portal, O., Lysøe, E., Meyling, N. V., & Klinge, I. (2017). Diversity and abundance of *Beauveria bassiana* in soils, stink bugs and plant tissues of common bean from organic and conventional fields. *Journal of Invertebrate Pathology*, 150 (October), 114–120.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.10.003>.

Ranesi, M., Vitale, S., Staropoli, A., Di Lelio, I., Izzo, L. G., De Luca, M. G., & Turrà, D. (2024). Field isolates of *Beauveria bassiana* exhibit biological heterogeneity in multitrophic interactions of agricultural importance. *Microbiological Research*, 286, 127819.

Reddy, N. P., Ali, A. P., Devi, U. K., Sharma, H. C., & Reineke, A. (2009). Entomology Treatment of millet crop plant (*Sorghum bicolor*) with the entomopathogenic fungus (*Beauveria bassiana*) to combat infestation by the stem borer, *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera : Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 12(4), 221–226.
<https://doi.org/10.1016/j.aspen.2009.06.001>.

Russo, A., Winkler, J. B., Ghirardo, A., Monti, M. M., Pollastri, S., Ruocco, M., & Loreto, F. (2023). Interaction with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* influences tomato phenome and promotes resistance to *Botrytis cinerea* infection. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1309747.

Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-ortiz, B. L., Sandoval-espinosa, Y. K. M., Ulloa-benítez, Á., Armendáriz-guillén, B., Claudia, M., & Martha, G. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132–146.
[https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9).

Saragih, M. (2023). Potency of entomopathogen *Beauveria bassiana* fungus as biofertilizer and biostimulant to increase the plant growth of Cayenne pepper (*Capsicum frutescens* L.). In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 1160,

No. 1, p. 012005). IOP Publishing.

Shaalán, R., Ibrahim, L., As-Sadi, F., & El Kayal, W. (2022). Impact of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the Metabolic Interactions between Cucumber (*Cucumis sativus* L.) and Cucumber Mosaic Virus (CMV). *Horticulturae*, 8(12), 1182.

Sui, L., Lu, Y., Yang, H., Liu, Z., Wang, L., Zou, X., & Zhang, Z. (2024a). Endophytic *Beauveria bassiana* promotes sunflower growth and confers resistance against sclerotinia disease. *BioControl*, 1-12.

Sui, L., Lu, Y., Zhou, L., Li, N., Li, Q., & Zhang, Z. (2023). Endophytic *Beauveria bassiana* promotes plant biomass growth and suppresses pathogen damage by directional recruitment. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1227269.

Sui, L., Lu, Y., Zhu, H., Wan, T., Li, Q., & Zhang, Z. (2022). Endophytic blastospores of *Beauveria bassiana* provide high resistance against plant disease caused by *Botrytis cinerea*. *Fungal Biology*, 126(8), 528-533.

Sui, L., Zhu, H., Wang, D., Zhang, Z., Bidochka, M. J., Barelli, L., & Li, Q. (2024b). Tripartite interactions of an endophytic entomopathogenic fungus, Asian corn borer, and host maize under elevated carbon dioxide. *Pest Management Science*.

Sun, Y. X., Zhang, B. X., Zhang, W. T., Wang, Q., Toufeeq, S., & Rao, X. J. (2023). UV-induced mutagenesis of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) yields two hypervirulent isolates with different transcriptomic profiles. *Pest Management Science*, 79(8), 2762-2779.

Swathy, K., Parmar, M. K., & Vivekanandhan, P. (2024). Biocontrol efficacy of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* conidia against agricultural insect pests. *Environmental Quality Management*, 34(1), e22174.

Tawidian, P., Kang, Q., & Michel, K. (2023). The potential of a new *Beauveria bassiana* isolate for mosquito larval control. *Journal of Medical Entomology*, 60(1), 131-147.

Taylor, P., Ascomycota, B., & Scorsetti, C.

(2014). Endophytic colonization of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). *Biocontrol Science and Technology*, (November), 37–41. <https://doi.org/10.1080/09583157.2014.982511>.

Tian, X., Zhu, S., Ran, X., Li, X., Li, X., Zhang, Y., & Zhu, X. (2024). Unveiling the Efficacy of a Novel Strain of *Beauveria Brongniartii* To Manage *Sitobion Miscanthi* (Takahashi) and *Rhopalosiphum Padi* (Linnaeus)(Both Hemiptera: Aphididae) in China. *Available at SSRN 4681451*.

Tomilova, O. G., Kryukova, N. A., Efimova, M. V., Kolomeichuk, L. V., Kovtun, I. S., & Glupov, V. V. (2023). The endophytic entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* alleviates adverse effects of salt stress in potato plants. *Horticulturae*, 9(10), 1140.

Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., & Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>.

Vega, F. E., Simpkins, A., Aime, M. C., Posada, F., Peterson, S. W., Rehner, S. A., & Arnold, A. E. (2010). Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology*, 3(3), 122–138. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.07.002>.

Verma, Vijay C. (Central of Experimental Medicine) Springer, A. C. (School of biological sciences). (2014). *Advances in endophytic research* (Springer). Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=Ili9BA-AAQBAJ&printsec=frontcover>.

Vivekanandhan, P., Swathy, K., Alahmadi, T. A., & Ansari, M. J. (2024). Biocontrol effects of chemical molecules derived from *Beauveria bassiana* against larvae of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae). *Frontiers in Microbiology*, 15, 1336334.

Vivekanandhan, P., Swathy, K., Murugan, A. C., & Krutmuang, P. (2022). Insecticidal efficacy of *Metarhizium anisopliae* derived

chemical constituents against disease-vector mosquitoes. *Journal of fungi*, 8(3), 300.

Wakil, W., Kavallieratos, N. G., Nika, E. P., Qayyum, M. A., Yaseen, T., Ghazanfar, M. U., & Yasin, M. (2023). Combinations of *Beauveria bassiana* and spinetoram for the management of four important stored-product pests: Laboratory and field trials. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(10), 27698-27715.

Wang, X., Yan, G., Liu, W., Chen, H., Yuan, Q., Wang, Z., & Liu, H. (2023). Endophytic *Beauveria bassiana* of Tomato resisted the damage from Whitefly *Bemisia tabaci* by mediating the accumulation of plant-specialized metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(36), 13244-13254.

Wang, Y., Fan, Q., Wang, D., Zou, W. Q., Tang, D. X., Hongthong, P., & Yu, H. (2022). Species diversity and virulence potential of the *Beauveria bassiana* complex and *Beauveria scarabaeidicola* complex. *Frontiers in Microbiology*, 13, 841604.

Wei, K., Ding, J. L., Xu, H. R., Feng, M. G., & Ying, S. H. (2024). Exploring secretory signal sequences useful in excreting recombinant proteins in *Beauveria bassiana* as biocontrol fungus. *Archives of Microbiology*, 206(12), 1-9.

Yasin, M., Khan, A. A., Rubab, S., & Maqsood, S. (2022). Effect of the Combined Use of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and Diatomaceous Earth for the Control of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Trogoderma granarium* Everts.

Zamora-Avilés, N., Orozco-Flores, A. A., Gomez-Flores, R., Domínguez-Gámez, M., Rodríguez-Pérez, M. A., & Tamez-Guerra, P. (2022). Increased attraction and stability of *Beauveria bassiana*-formulated microgranules for *Aedes aegypti* Biocontrol. *Journal of Fungi*, 8(8), 828.

Zhang, C., Teng, B., Liu, H., Wu, C., Wang, L., & Jin, S. (2023b). Impact of *Beauveria bassiana* on antioxidant enzyme activities and metabolomic profiles of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 198, 107929.

Zhang, M. D., Wu, S. Y., Yan, J. J., Li, J., Ali, A., & Gao, Y. L. (2022). Endophytic *Beauveria bassiana* inhibits the performance of *Phthorimaea operculella* and enhances potato plant growth. *Entomologia Generalis*, 42(6).

Zhang, M. D., Wu, S. Y., Yan, J. J., Reitz, S., & Gao, Y. L. (2023a). Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in potato plants and its virulence against potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Insect Science*, 30(1), 197-207.

Zhang, Y., Zhang, X., Tian, Q., Ali, S., Tang, L., & Wu, J. (2022). Toxicological and biochemical description of synergism of *Beauveria bassiana* and Emamectin Benzoate against *Megalurothrips usitatus* (Bagrall). *Journal of Fungi*, 8(9), 916.

Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, J., Liu, X., Ju, Z., Shi, H., & Zhou, W. (2023). Dual role of endophytic entomopathogenic fungi: induce plant growth and control tomato leafminer *Phthorimaea absoluta*. *Pest Management Science*, 79(11), 4557-4568.

Cultivo celular tridimensional: protocolos y métodos emergentes

Dayana Fausto .¹

Ingeniería en nanotecnología, División de ciencias básicas y aplicadas, Centro Universitario de Tonalá, Universidad de Guadalajara.

Resumen

El presente artículo tiene como objetivo recopilar distintos métodos para la obtención de esferoides, destacando de manera concisa sus ventajas en comparación con los cultivos celulares tradicionales. Los métodos presentan diversas técnicas de elaboración, cuyas implicaciones prácticas permiten seleccionar el enfoque más adecuado según los objetivos de investigación. El método de cultivo en pellet se caracteriza por su simplicidad y eficacia, logrando una alta reproducibilidad en las propiedades de los esferoides. Sin embargo, controlar el microambiente puede presentar cierta complejidad. Por otro lado, el método de gota colgante facilita el mantenimiento de condiciones estandarizadas, aunque requiere especial atención para prevenir la evaporación del medio. Finalmente, el cultivo por agitación es ideal para la producción a gran escala de esferoides, siempre que se utilicen células con suficiente cohesión, de lo contrario, existe el riesgo de apoptosis celular.

Palabras Claves: Esferoide, cultivo celular 3D, cultivo tradicional, caracterización

Introducción

Las áreas de investigación médica, biomédica y preclínica están en constante crecimiento y deben enfrentar diversos desafíos, entre ellos el uso de cultivos celulares para obtener datos precisos que impulsen avances científicos. El cultivo celular es una técnica *in vitro* en la cual se realiza el procesamiento de una muestra de tejido con la finalidad de extraer las células que lo conforman, para conseguir un ambiente óptimo en el que las células puedan sobrevivir se requiere agregar un medio que les proporcione nutrientes para posteriormente dividirse. Este proceso de división usualmente ocurre por mitosis (Morales et al., 2019). En el campo de la investigación científica se han obtenido extensos y novedosos métodos para realizar cultivo celular, debido a que con esta técnica es posible el estudio del metabolismo y la fisiología humana, facilitando la evaluación de respuestas ante determinados estímulos de sustancias químicas en condiciones controladas. Al emplear esta técnica es posible investigar el comportamiento de tipos celulares individuales sin la influencia de variaciones sistémicas que podrían surgir durante la homeostasis normal *in vivo* y

conseguir información respecto a la citotoxicidad, genotoxicidad, mutagénesis y carcinogénesis en tipos específicos de células. Otra de sus aplicaciones es el uso en el análisis de los mecanismos de infección de virus y bacterias o para buscar posibles agentes antivirales y antibacterianos al fungir como hospederos (Morales et al., 2019; Philippeos et al. 2012).

Establecer un cultivo celular se logra a partir de suspensiones celulares que posteriormente se transferirán a una superficie sólida, normalmente se puede utilizar la base de una placa o frasco de plástico, con la finalidad de crecer y multiplicar las células (Chen et al., 2020). Este tipo de cultivo se conoce como cultivo celular 2D, las células se adhieren a la base y se encuentran dividiéndose de manera horizontal, formando una capa en dos dimensiones.

Esta técnica es ampliamente utilizada para ensayos de investigación biomédica y preclínica, sin embargo, el crecimiento en diversas áreas tales como nanomedicina, terapia génica, genómica y proteómica, ha significado un aumento en el empleo de

cultivos celulares, de este modo se evidencian nuevos y más complejos requisitos los que se deben evaluar, por lo tanto ha surgido la necesidad de superar las limitaciones de los cultivos celulares tradicionales y desarrollar modelos que permitan obtener una simulación más precisa del ambiente en el que se encuentran las células. Uno de los principales obstáculos que se presentan al emplear el cultivo celular 2D es la pérdida de heterogeneidad celular de partida, esto se debe a que la población celular crece de manera uniforme y homogénea, además se desaparece la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular (Baust et al., 2017; García S., 2013). El cultivo celular tridimensional es el resultado de estos nuevos requisitos, consiste en mimetizar el microambiente en el que se encuentran las células, replicando la morfología y las propiedades bioquímicas que se encuentran en las células en su emplazamiento en el organismo vivo. Al utilizar esta técnica tridimensional se logran conseguir condiciones altamente similares a aquellas en las que se encuentran las células de un organismo vivo. Los modelos en tres dimensiones se denominan esferoides, esferas líquidas, organoides, matrices 3D, cultivos en andamios etcétera (García S., 2013; Meseguer et. al., 2015).

Explorar las técnicas que se encuentran a la vanguardia permite obtener un panorama en el que se conozcan los procedimientos que se ven implicados en cada metodología, facilitando a su vez la elección a emplear. Este resumen describe una serie de métodos para la creación de cultivos celulares tridimensionales enfocados en esferoides.

Esferoides

En una suspensión de cultivo celular, las células muestran una tendencia a agregarse y a atravesar un proceso de auto-ensamblaje. Este mecanismo de formación de esferoides se ve influenciado por diversos factores como gradientes de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento en el medio de cultivo celular, así como factores paracrinológicos celulares. El medio de cultivo celular accede al interior de los esferoides mediante un mecanismo de difusión, el gradiente de difusión ocurre al aumentar el tamaño de los esferoides durante el cultivo, de manera que entre mayor sea el tamaño de los esferoides, se vuelve más

complejo para el medio alcanzar el núcleo (Ryu et al., 2019). Los esferoides son un diseño de cultivo celular tridimensional en el cual se emplea esta tendencia natural de las suspensiones celulares de agregarse para de este modo generar masas multicelulares que presentan una forma esferoidal. En óptimas condiciones es posible cultivar esferoides de cualquier tipo de célula (Meseguer et. al., 2015). Además, tienen aplicación en modelos de tumores, ingeniería de tejidos, investigación científica, terapia de trasplante, entre otros. Actualmente hay distintas técnicas para conseguir el cultivo de esferoides, por ejemplo; cultivo en pellet, superficie líquida, gota colgante, cultivo en agitador, vaso de pared rotatoria, microfluidos y levitación magnética (Ryu et al., 2019).

Métodos de obtención de esferoides.

Método de cultivo en pellet.

El primer paso para realizar esta técnica es iniciar un vial de una línea celular, el cual debe cultivarse con la metodología tradicional o 2D para obtener la cantidad deseada de células. Una vez obtenidas, estas se transfieren a un tubo Falcon.

El objetivo de este método es crear esferoides mediante la concentración de células en un tubo que se somete a centrifugación. Esto facilita el contacto célula-célula, ya que las células interactúan en el fondo del tubo, generando una autoorganización en un microambiente que se asemeja más a las condiciones in vivo. Posteriormente, se retira el sobrenadante y el pellet de células se resuspende añadiendo medio de cultivo celular.

Después, se deben realizar los cálculos necesarios para distribuir la suspensión celular adecuadamente en cada pozo de una placa de 96 pozos, ajustando la concentración celular a una densidad óptima para la formación de esferoides (generalmente entre 10,000 y 1 millón de células por pozo, dependiendo del tamaño deseado de los esferoides y del tipo celular). En cada pozo se formará un esferoide.

Una vez distribuida la suspensión celular en la placa de 96 pozos, esta se coloca en una incubadora a 37°C con un 5% de CO₂. El

proceso de incubación debe durar entre 7 y 14 días, dependiendo de las características que se deseen alcanzar en el cultivo de los esferoides. Es importante mencionar que las células deben ser mantenidas añadiendo nuevo medio de cultivo cada 24-72 horas para proporcionarles los nutrientes necesarios, lo que favorece la interacción continua y promueve la compactación y formación de los esferoides. Durante este tiempo, las células reorganizan su arquitectura para formar un esferoide más definido y funcional, que puede simular mejor las características fisiológicas de los tejidos in vivo.

Los esferoides formados pueden permanecer en la placa para estudios de viabilidad, proliferación o respuesta a fármacos, o bien ser recolectados mediante micropipetas para transferirlos a otras condiciones de cultivo, o para su procesamiento en estudios de microscopía, citometría de flujo o análisis moleculares.

El método de cultivo en pellet es sencillo y eficaz para generar esferoides homogéneos

de tamaños variables según la cantidad de células iniciales. Una ventaja clave es la capacidad de generar esferoides con relativa rapidez y alta reproducibilidad en términos de tamaño y compactación. Además, permite trabajar con un amplio rango de densidades celulares y es aplicable a diferentes tipos de células, incluidas células madre, células cancerosas y fibroblastos.

Sin embargo, algunas limitaciones incluyen la falta de control sobre el microambiente local, ya que los esferoides pueden variar en su exposición a nutrientes y oxígeno a medida que crecen. Este gradiente de oxígeno y nutrientes puede llevar a la formación de zonas de necrosis en el centro de esferoides grandes, similar a lo que ocurre en tumores sólidos in vivo, lo que puede afectar los resultados en estudios de viabilidad o respuesta a fármacos. Además, la manipulación de los esferoides tras su formación puede ser delicada, ya que su estructura compacta puede desagregarse fácilmente si no se manejan con cuidado.



Figura 1. Protocolo de preparación de esferoides por el método de cultivo en pellet.

Método de la gota colgante

En la formación de esferoides, una de las técnicas más utilizadas es la de "gota colgante". Este enfoque facilita que las células individuales se agreguen y formen esferoides en forma de gotas. Los esferoides obtenidos mediante este método pueden ajustarse a características definidas, como el tamaño, debido al control en el volumen de la gota o en la densidad de la suspensión celular. Esta técnica permite formar esferoides circulares con una distribución de tamaño estrecha, con un coeficiente de variación del 10% al 15%, mientras que los esferoides cultivados en superficies no adherentes presentan un coeficiente de variación del 40% al 60% (Ryu et al., 2019).

El proceso para iniciar esta técnica consiste en partir de un cultivo tradicional. Luego, las células se preparan en suspensión y se diluyen con medio de cultivo para alcanzar la densidad celular deseada. Posteriormente, la suspensión celular se transfiere a los pozos de una bandeja o placa de cultivo, a la cual se le coloca una tapa para luego invertirla boca abajo. Cada gota, de aproximadamente 20-50 μL , contiene un número definido de células suspendidas en medio de cultivo. De esta manera, las gotas de suspensión celular se mantienen adheridas a la superficie debido a la tensión superficial, mientras que la gravedad contribuye a formar la estructura en forma de gota (Ryu et al., 2019). La placa con las gotas colgantes se incuba en un ambiente controlado a 37°C con un 5% de CO_2 .

Artículos

Una vez alcanzado el tamaño o el estado de compactación deseado, los esferoides se pueden recolectar cuidadosamente utilizando micropipetas, evitando dañar su estructura celular.

El método de gota colgante ofrece varias ventajas, entre ellas: la simplicidad del procedimiento, la homogeneidad en el tamaño de los esferoides producidos, y la capacidad de mantener condiciones estandarizadas sin necesidad de aditivos o

materiales complejos. No obstante, es importante controlar cuidadosamente las condiciones de incubación y el volumen de las gotas, ya que una evaporación significativa del medio puede afectar la viabilidad y el desarrollo de los esferoides. Además, esta técnica es más adecuada para experimentos a pequeña escala, debido a la limitada cantidad de esferoides que se pueden generar simultáneamente en una placa estándar.

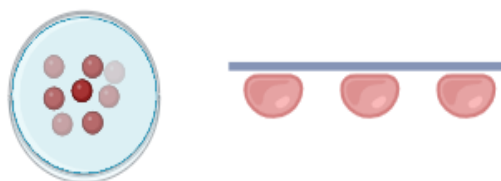


Figura 2. Del lado izquierdo, perspectiva superior de la tapadera de un disco Petri con gotas colgantes de esferoides. Del lado derecho, perspectiva lateral de las gotas colgantes de esferoides.

Método de cultivo celular por agitación.

El método de cultivo en agitación consiste en formar esferoides utilizando frascos biorreactores de agitación. El principio es evitar que las células que se encuentran en suspensión se asienten, esto se logra al mantener una agitación constante que causará colisiones entre las células (Achilli et al., 2012). Al iniciar esta técnica de cultivo se requiere añadir una suspensión uniforme de células en el frasco biorreactor, el entorno fluido y la transferencia de masa en el matraz se controlan mediante fuerzas convectivas generadas por un impulsor o una barra de agitación magnética. Mantener una agitación constante es importante, sin embargo, es necesario señalar que si se aplica una

agitación a alta velocidad se provocará daño celular en los esferoides, pero si se aplica una baja velocidad de agitación, esto causará que los esferoides se asienten. El tamaño de los esferoides resultantes se encuentra influenciado por el tamaño del contenedor del biorreactor (Ryu et al., 2019). Este método permite la producción de grandes cantidades de esferoides, además se ha utilizado en una variedad de células primarias, líneas celulares y mezcla de dos tipos celulares, generando esferoides heterotípicos. No obstante, debido a las fuerzas convectivas, el uso de este método puede no resultar óptimo para células que manifiestan baja cohesión o células adherentes que pueden sufrir apoptosis al encontrarse en suspensión (Achilli et al., 2012).



Figura 3. Método de cultivo celular por agitación en un matraz agitador.

Conclusiones

Este artículo ha recopilado diversas metodologías para la producción de esferoides, destacando las ventajas que ofrecen los cultivos celulares 3D frente a los tradicionales, principalmente en su capacidad para imitar microambientes similares a los de un organismo vivo. Los resultados indican que, aunque el cultivo en pellet es relativamente sencillo y reproduce de forma eficiente las propiedades de los esferoides, presenta desafíos en el control del microambiente local. Esto se debe a que los gradientes de oxígeno y nutrientes no siempre alcanzan todas las zonas internas del esferoide, lo que puede ocasionar necrosis.

El método de gota colgante, por su parte, garantiza una mayor homogeneidad en el tamaño de los esferoides y no requiere aditivos o materiales complejos, sin embargo, las condiciones de incubación son más rigurosas, ya que la evaporación del medio puede comprometer la viabilidad celular, lo que lo hace más adecuado para la producción a pequeña escala. En cuanto al cultivo por agitación, este se perfila como una opción prometedora para la producción a gran escala, siempre que las células empleadas mantengan una cohesión adecuada para evitar la apoptosis.

A pesar de que cada uno de estos métodos presenta ciertas limitaciones, su optimización puede mejorar significativamente el desarrollo de modelos celulares tridimensionales, con aplicaciones en diversas áreas científicas. Futuras investigaciones podrían enfocarse en superar las limitaciones asociadas con el control del microambiente, la reproducibilidad y la escalabilidad de estos sistemas. En conclusión, este trabajo proporciona una base para la selección de metodologías adecuadas en estudios que requieran esferoides, lo que podría tener un impacto en la investigación biomédica y en el desarrollo de terapias innovadoras.

Referencias

- Morales-Sánchez J., Ulloa-Fernández A., Castro-Piedra, S., Centeno-Cerdas, C., & Calvo-Castro, L. A. (2019). Cultivo Celular e Ingeniería de Tejidos: Aplicaciones en Biomedicina. *Revista Tecnología En Marcha*, 32(9), Pág 56–65. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4628>
- Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A., & Mitry, R. R. (2012). Introduction to cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 806, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_1
- Chen, Q., & Wang, Y. (2020). The application of three-dimensional cell culture in clinical medicine. *Biotechnology Letters*, 42(11), 2071-2082.
- Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, Price P, Reid YA, Simione F. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2017 Sep;53(8):669-672. doi: 10.1007/s11626-017-0177-7. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28808859.
- García, S. C. (2013). Cultivo de células en 3D: la nueva dimensión de los cultivos celulares. *Cuadernos del Tomás*, (5), 215-232.
- Meseguer, J., Esteban Abad, M. D. L. Á., Mulero Méndez, V. F., Cuesta Peñafiel, A., & Sepulcre Cortés, M. P. (2015). Esferoides y esferas líquidas. Cultivos celulares en 3D para mimetizar el ambiente de las células en el organismo. *Eubacteria*, nº34, 2015.
- Ryu, N. E., Lee, S. H., & Park, H. (2019). Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. *Cells*, 8(12), 1620.
- Štampar, M., Žabkar, S., Filipič, M., & Žegura, B. (2022). HepG2 spheroids as a biosensor-like cell-based system for (geno) toxicity assessment. *Chemosphere*, 291, 132805.
- Achilli, T. M., Meyer, J., & Morgan, J. R. (2012). Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert opinion on biological therapy*, 12(10), 1347-1360.

Figuras creadas en <https://BioRender.com>

Empleo de detergentes homólogos a Tritón X-100 en la purificación de cuerpos de inclusión

Lázaro Guerra ^{1*}, Yinet Cartaya ¹, Lourdes Zumalacárregui ², Dayana Soler ¹,
Dunia González ¹, Daniela Rivero¹, Thalia Lambert¹, Analeidy García ¹

¹ Centro de Ingeniería genética y Biotecnología, C.P. 11600

² Universidad Tecnológica de La Habana José Antonio Echeverría, C.P. 19390

* lazaroguerracabezas@gmail.com

Resumen

La Agencia Europea de Sustancias Químicas, como parte del Parlamento Europeo y del Consejo, estableció el Reglamento de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Productos Químicos (REACH), para garantizar un alto nivel de protección de la salud humana y el medio ambiente. El detergente Tritón X-100 se incluyó en la lista de sustancias candidatas extremadamente preocupantes debido a las propiedades de alteración endocrina del producto de degradación. En este trabajo se estudió la influencia del empleo de los detergentes Ecosurf™ EH-9, Ecosurf™ SA-9 y Tergitol™ 15-S-9 como sustitutos del Tritón X-100 en la purificación de los cuerpos de inclusión en el proceso de purificación de una proteína modelo basada en la cápside del virus del dengue. Para ello se realizó un diseño de experimentos multifactorial categórico evaluando los tensoactivos en dos estrategias de purificación de los cuerpos de inclusión con las variables de respuesta pureza y recobrado del precipitado de lavado y pureza del sobrenadante de solubilización. Los resultados indican que es posible sustituir Tritón X-100 por Ecosurf EH-9™, obteniendo además resultados positivos en cuanto al recobrado de la etapa, con valores superiores 1,12 veces a los obtenidos con el empleo de Tritón X-100 sin afectar la pureza de la proteína solubilizada.

Palabras Claves: Tritón X-100, detergentes sustitutos, purificación, cuerpos de inclusión.

Abstract

The European Chemicals Agency, as part of the European Parliament and Council, established the Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals (REACH) Regulation to ensure a high level of protection for human health and the environment. The detergent Triton X-100 was included in the list of substances of very high concern due to the endocrine-disrupting properties of its degradation product. This study examines the influence of using Ecosurf™ EH-9, Ecosurf™ SA-9, and Tergitol™ 15-S-9 as substitutes for Triton X-100 in the purification of inclusion bodies during the purification process of a model protein based on the dengue virus capsid. A categorical multifactorial experimental design was carried out, evaluating the surfactants in two purification strategies for inclusion bodies, using purity and recovery of the wash precipitate and purity of the solubilization supernatant as response variables. The results indicate that Ecosurf™ EH-9 can replace Triton X-100, also yielding positive results in terms of recovery, with values 1.12 times higher than those obtained with Triton X-100, without affecting the purity of the solubilized protein.

Key Words: Triton X-100, substitute detergents, purification, inclusion bodies.

Introducción

La Agencia Europea de Sustancias Químicas, como parte del Parlamento Europeo y del Consejo, estableció el Reglamento de Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Productos Químicos (REACH), Reglamento (CE) nº 1907/2006, para garantizar un alto nivel de protección de la salud humana y el medio ambiente. Tritón X-100 se incluyó en la lista de sustancias candidatas extremadamente preocupantes según el marco reglamentario, el 19 de diciembre de 2012 (McNamara L, 2022) y desde el 4 de enero de 2021 se prohibió su uso en la Unión Europea con algunas excepciones (Marques et al., 2024). Tritón X-100 es un tensioactivo no iónico (<https://echa.europa.eu/candidate-list-table/-/dislist/details/Ob0236e18db570>) ampliamente utilizado como parte del proceso de producción de proteínas terapéuticas (Yadav et al., 2024), sin embargo, estudios ecológicos recientes han indicado que sus productos de descomposición pueden comportarse potencialmente como disruptores endocrinos en organismos acuáticos (Conley et al., 2017). Hoy en día, la mayoría de las empresas farmacéuticas que desarrollan nuevos productos y procesos evitan su uso (McNamara L, 2022) y, en cambio, buscan alternativas ecológicas (Feroz et al., 2022). Se han realizados estudios empleando detergentes ecológicos en procesos de separación de fases (7), lisis celular (Marques et al., 2024) e inactivación viral (Conley et al., 2017; Feroz et al., 2022; Yadav et al., 2024). El siguiente trabajo tiene como objetivo analizar la influencia del empleo de los detergentes Ecosurf EH-9™, Ecosurf SA-9™ y Tergitol 15-S-9™ como sustitutos de Tritón X-100 en la purificación de los cuerpos de inclusión (CI) del proceso de purificación de una proteína modelo basada en la cápside del virus del dengue. Estos son tensioactivos no iónicos, compuestos de alcoholes, y son una alternativa más sostenible porque son biodegradables, no tóxicos y no bioacumulativos. Además, tienen propiedades tensioactivas similares a las de Tritón X-100, lo que los convierte en sustitutos prácticos (<https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/ecosurf-eh-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9778>; <https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/ecosurf-sa-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9779>; <https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/t>

[ergitol-15-s-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9780](#)).

Materiales y Métodos

Material biológico

La proteína de interés fue expresada en células de *E. coli* y producida en un biorreactor de tanque agitado de volumen total 50 L (Sartorius, Alemania) en modo discontinuo. Se empleó una de las cosechas obtenidas, la que presentó una viabilidad celular de $9,55 \times 10^9$ superior al criterio de aceptación ($> 10^6$), una estabilidad plasmídica de 95 % por encima del criterio de aceptación (> 85 %) y una expresión de 11 %; por lo que se consideró el proceso de fermentación como estable y consistente. La fermentación se centrifugó a 10 000 rpm, durante 30 min a 4°C, luego se almacenó a -20°C para su posterior procesamiento.

Metodología para el diseño experimental

Se partió de 10 g de la biomasa proveniente de la etapa de fermentación que se homogeneizaron en NaCl 150 mmol/L, tris (tris(hidroximetil)aminometano) 20 mmol/L, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 1 mmol/L, pH 8 a razón de 100 g/L con el empleo de un homogenizador de cuchillas verticales (IKA, Alemania). Posteriormente se realizaron tres ciclos de ruptura celular con empleo de un homogenizador de alta presión tipo prensa francesa (Ohtake works, Japón) manteniendo una presión entre 60 y 80 MPa, incubando en hielo 10 minutos luego de cada ciclo. El material roto se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min, 20°C, el sobrenadante se desechó y el precipitado se volvió a resuspender en NaCl 150 mmol/L, tris 20 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8 a razón de 100 g/L y se alicuotó 3 mL en viales. Los viales se centrifugaron a 10 000 rpm durante 30 min, 20°C y se desechó el sobrenadante, el precipitado constituyó el material de partida de los experimentos.

Con el empleo de STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.1.11 se realizó un diseño de experimentos multifactorial categórico estudiando los factores experimentales tensoactivo: Tritón X-100 (Merck KGaA, Alemania), Ecosurf EH-9™, Tergitol 15-S-9™, Ecosurf SA-9™ (neoFroxx, Alemania) y estrategia de

purificación de los CI; se realizaron dos réplicas para un total de 24 corridas. La metodología consistió en resuspender el precipitado de ruptura a razón de 100 g/L en el tampón de lavado 1 (Estrategia A: urea 2 mol/L, NaCl 200 mmol/L, tris 20 mmol/L y tensoactivo 1 %, pH 8; Estrategia B: Na₂HPO₄ 100 mmol/L, tensoactivo 2 %, pH 11,2). Los viales se incubaron 1 h con agitación lenta a 4°C, posteriormente se centrifugaron a las condiciones antes mencionadas, se tomaron muestras, el sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en tampón de lavado 2 (Estrategia A: urea 2 mol/L, NaCl 200 mmol/L, tris 20 mmol/L, pH 8; Estrategia B: tris 20 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, pH 8), para eliminar el exceso de detergente y a continuación se centrifugó. Para lograr la solubilización de los CI se homogenizó el precipitado en urea 8 mol/L, tris 20 mmol/L, NaCl 250 mmol/L, Tween 20 1 %, pH 8, incubando durante 16 h con agitación lenta a 4°C. Luego de la centrifugación la proteína de interés se encuentra en el sobrenadante. Las muestras tomadas en cada una de las corridas experimentales fueron analizadas por Microcoomassie y Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las variables analizadas fueron pureza del precipitado de lavado y sobrenadante de solubilización. Se empleó el *software* ImageJ y el recobrado de lavado que se determinó a partir de la ecuación 1.

$$\text{Recobrado (\%)} = \frac{m(PL)}{m(PR)} * 100 \quad (1)$$

Donde:

m(PL): masa en miligramos de proteína de interés en el precipitado de lavado

m(PR): masa en miligramos de proteína de interés en el precipitado de ruptura celular

La masa de proteína de interés se determinó a partir de la ecuación 2.

$$\text{masa (mg)} = c \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) * \text{Pureza (\%)} \quad (2)$$

Resultados

Los CI son agregados altamente específicos y están compuestos fundamentalmente por la proteína recombinante de interés, por lo que su aislamiento y purificación, previo a la solubilización, contribuye significativamente al incremento del grado de pureza de la proteína (Palmer y Wingfield, 2024). Los CI recuperados de lisados celulares están altamente contaminados con componentes de la pared celular y la membrana externa de *E. coli*; estos se eliminan en gran medida por extracción selectiva con detergentes y bajas concentraciones de urea (Falero-Morejón et al., 2015). También hay reportes de que los CI pueden solubilizarse con métodos más suaves como el uso de pH alcalinos (Brito-Molina et al., 2015). La concentración de urea y detergente en el tampón de lavado puede variar. Se reporta que la concentración de urea suele estar entre 1 y 4 mol/L y la concentración habitual de detergente está entre el 0,5 % y el 5 % (Falero-Morejón et al., 2015).

En la estrategia de lavado A se empleó una concentración de urea de 2 mol/L y de detergente de 1 %, mientras que en la estrategia B se optó por una concentración de detergente de 2 % y el empleo de pH básico para favorecer la solubilización de proteínas contaminantes.

En la figura 1 se muestra una electroforesis correspondiente a los pasos de lavado y solubilización de una de las réplicas del diseño experimental.

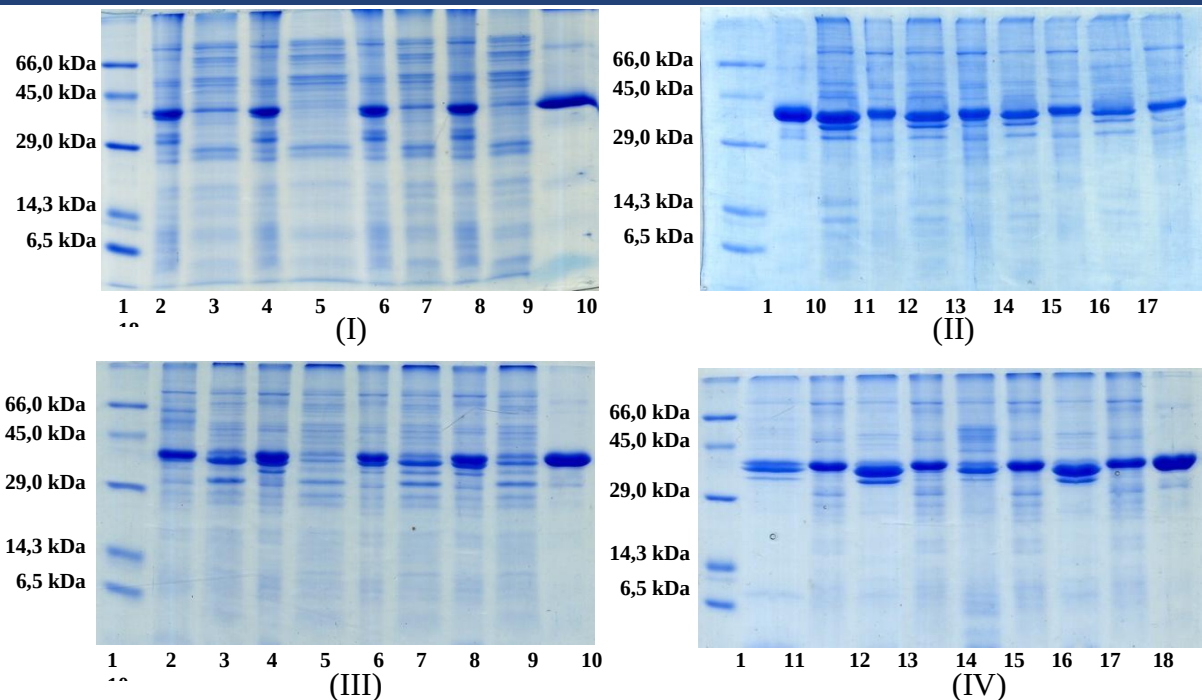


Figura 1. Electroforesis SDS-Page en poliacrilamida al 15 % en condiciones reductoras de una de las réplicas del diseño experimental. (I) Lavado según estrategia A. (II) Solubilización de los CI a partir de la estrategia A. (III) Lavado con estrategia B. (IV) Solubilización de los CI a partir de la estrategia B. En la figura: 1- patrón de masa molar, 2- precipitado de lavado 1 Tritón X-100, 3- sobrenadante de lavado 1 Tritón X-100, 4- precipitado de lavado 1 Ecosurf EH-9TM, 5- sobrenadante de lavado 1 Ecosurf EH-9TM, 6- precipitado de lavado 1 Tergitol 15-S-9TM, 7- sobrenadante de lavado 1 Tergitol 15-S-9TM, 8- precipitado de lavado 1 Ecosurf SA-9TM, 9- sobrenadante de lavado 1 Ecosurf SA-9TM, 10- Control positivo de la proteína de interés, 11- precipitado de solubilización a partir del lavado con Tritón X-100, 12- sobrenadante de solubilización a partir del lavado con Tritón X-100, 13- precipitado de solubilización a partir del lavado con Ecosurf EH-9TM, 14- sobrenadante de solubilización a partir del lavado con Ecosurf EH-9TM, 15- precipitado de solubilización a partir del lavado con Tergitol 15-S-9TM, 16- sobrenadante de solubilización a partir del lavado con Tergitol 15-S-9TM, 17- precipitado de solubilización a partir del lavado con Ecosurf SA-9TM, 18- sobrenadante de solubilización a partir del lavado con Ecosurf SA-9TM.

La proteína se encuentra insoluble formando CI, por lo que el objetivo es que se encuentre en el precipitado de lavado hasta el paso de solubilización o extracción de los mismos. En los carriles 3, 7 y 9 (Fig. 1A), que constituyen las fracciones solubles de los lavados con los detergentes Tritón X-100, Tergitol 15-S-9TM y Ecosurf SA-9TM con la estrategia A respectivamente, se observa una banda que migra a la misma altura que la proteína de interés evidenciándose una pérdida de la misma en las fracciones solubles, no mostrándose este comportamiento al realizar el lavado empleando Ecosurf EH-9TM. Sin embargo, al emplear la estrategia B de purificación de los CI (Fig. 1B) se observa la presencia de una banda a la misma altura que la proteína de interés en todas las fracciones solubles, comportamiento presente en todas las réplicas.

A partir del diseño de experimentos se obtiene para las variables de respuesta analizadas el

diagrama de interacciones entre la estrategia de purificación de los CI y tensoactivo empleado.

Como se muestra en la figura 2A la media de los mayores valores de pureza del precipitado de lavado se obtienen al emplear Ecosurf EH-9TM en la estrategia uno y Tritón X-100 en la estrategia dos, con una pureza media de 36,6 % y 37,6 % respectivamente. Por otra parte los valores de recobrado de la proteína de interés en el precipitado de lavado y pureza en el sobrenadante de solubilización con ambas estrategias describen una curva similar (Fig. 2B y 2C), obteniéndose el mayor recobrado del precipitado de lavado al emplear Ecosurf EH-9TM en la estrategia A (75,7 %) y una media de la pureza de la solubilización de los CI aproximada de 56 % al emplear Tritón X-100 y Ecosurf EH-9TM indistintamente con la estrategia dos.

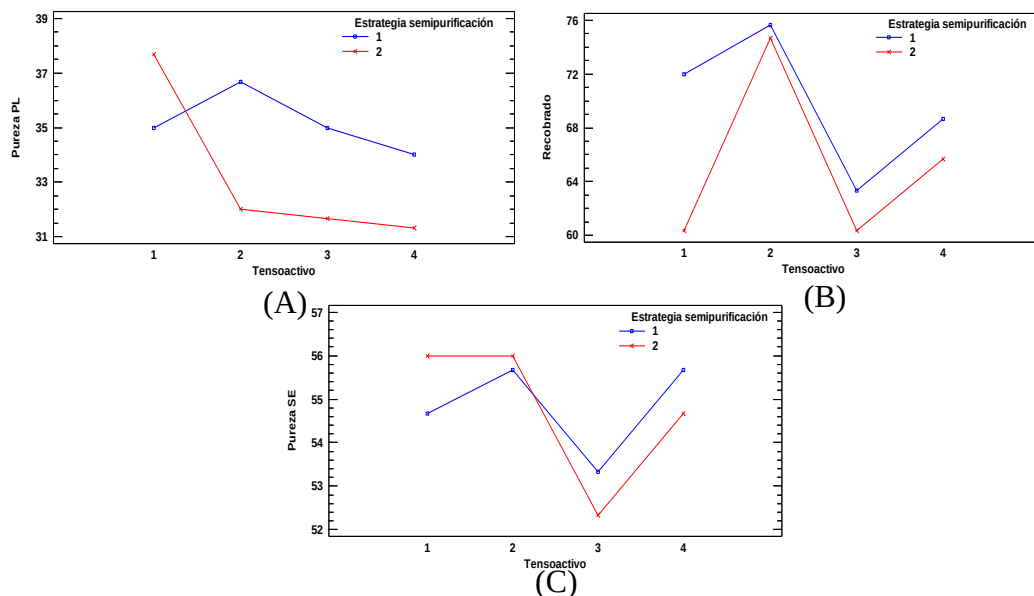


Figura 2. Gráficos de interacciones para las variables de respuesta analizadas. En la figura (A) Pureza del precipitado de lavado 1, (B) Recobrado del precipitado de lavado 1, (C) Pureza del sobrenadante de solubilización. 1- Tritón X-100, 2- Ecosurf EH-9™, 3- Tergitol 15-S-9™, 4- Ecosurf SA-9™.

Por otra parte al realizar una comparación de las medias obtenidas con el empleo de cada tensoactivo para las variables de respuestas analizadas (Fig. 3), se observan mayores porcentajes de pureza del precipitado de lavado con el empleo de Tritón X-100 con una media de $36,3 \pm 0,68$ %, mientras que el mayor recobrado se obtiene con el empleo de Ecosurf

EH-9™ con un valor medio de $75,17 \pm 2,26$ %. Al analizar las medias para las variables respuesta pureza del sobrenadante de solubilización se obtienen valores similares pues no existe diferencia estadísticamente significativa ($p=0,4876$) con el empleo indistinto de los aditivos.

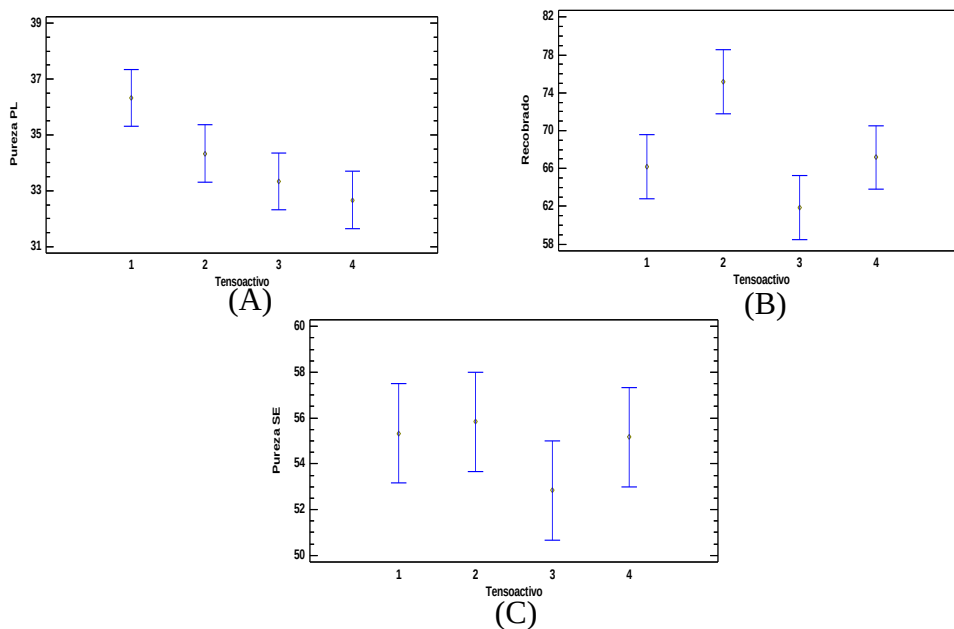


Figura 3. Gráficos de medias de los tensoactivos respecto a las variables de respuestas analizadas. En la figura (A) Pureza del precipitado de lavado 1, (B) Recobrado de la proteína de interés en el lavado 1, (C) Pureza del sobrenadante de solubilización.

Los mayores valores de pureza y recobrados obtenidos en la purificación de los CI se obtuvieron con la estrategia A. Por otra parte, el estudio de los diferentes detergentes mostró que el empleo de Tritón X-100 favorece la eliminación de proteínas contaminantes al alcanzarse una pureza 1,1 veces mayor que la alcanzada con Ecosurf EH-9™. Sin embargo, el mayor recobrado se obtuvo al emplear este último siendo 1,12 veces mayor que con Tritón X-100. Mientras, no existió una diferencia estadísticamente significativa en la etapa de solubilización a partir de los lavados con los diferentes tensoactivos. Por lo cual se puede inferir que es posible sustituir Ecosurf EH-9™ por Tritón X-100 en el lavado de los CI en el proceso de purificación en cuestión. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kiesewetter al lograr resultados similares con el empleo de Ecosurf EH-9™ y Tritón X-100 en la eliminación de lipopolisacáridos (Kiesewetter et al., 2023).

Conclusiones

El estudio de detergentes homólogos al Tritón X-100 permitió obtener como sustituto al Ecosurf EH-9™ en la purificación de los CI de una proteína modelo basada en la cápside del núcleo del virus del dengue, que además de ser un detergente biodegradable que cumple con las normas del REACH, permite obtener un recobrado 1,12 veces superior, sin afectar la pureza de la proteína solubilizada.

Referencias

Brito-Molina SM, Falero-Morejón A, González-Acevedo-Forte D, Beltran-Lisabet JF, Serrano-Rivero Y, Aldama-Paz G, Pimienta-Rodríguez E & Marrero-Domínguez K (2015) Estudio preliminar de diferentes métodos de solubilización de la proteína L1 del virus del papiloma humano tipo 16 obtenida en *Escherichia coli*. Revista CENIC Ciencias Biológicas 46, 349-352.
https://www.researchgate.net/publication/282251339_Estudio_preliminar_de_diferentes_métodos_de_solubilización_de_la_proteína_L1_del_virus_del_papiloma_humano_tipo_16_obtenida_en_Escherichia_coli
[Preliminary study of different methods of solubilization](https://www.researchgate.net/publication/282251339_Estudio_preliminar_de_diferentes_métodos_de_solubilización_de_la_proteína_L1_del_virus_del_papiloma_humano_tipo_16_obtenida_en_Escherichia_coli)

Conley L, Tao Y, Henry A, Koepf E, Cecchini D, Pieracci J, Ghose S (2017) Evaluation of eco-friendly zwitterionic detergents for enveloped virus inactivation. Biotechnol Bioeng

114(4):813-820. doi: 10.1002/bit.26209.
ECHA, Substance information.
<https://echa.europa.eu/candidate-listtable/-/dislist/details/Ob0236e18db570>

Falero-Morejón A, Brito-Molina S, González-Acevedo-Forte D, Serrano-Rivero Y, Aldama-Paz G, Pimienta-Rodríguez E & Domínguez KM (2015) Purificación de los cuerpos de inclusión que contienen la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano 16 producidos en la cepa Rosetta de *Escherichia coli*. Revista CENIC Ciencias Biológicas 46, 344-348.
https://www.researchgate.net/publication/282326443_Purificación_de_los_cuerpos_de_inclusión_que_contienen_a_la_proteína_L1_del_Virus_del_Papiloma_Humano_16_producidos_en_la_cepa_Rosetta_de_Escherichia_coli
[Purification of inclusion bodies of Human Pap](https://www.researchgate.net/publication/282326443_Purificación_de_los_cuerpos_de_inclusión_que_contienen_a_la_proteína_L1_del_Virus_del_Papiloma_Humano_16_producidos_en_la_cepa_Rosetta_de_Escherichia_coli)

Feroz H, Chennamsetty N, Byers S, Holstein M, Li ZJ, Ghose S (2022) Assessing detergent-mediated virus inactivation, protein stability, and impurity clearance in biologics downstream processes. Biotechnol Bioeng 119(4):1091-1104. doi: 10.1002/bit.28034.

Glembin P, Racheva R, Kerner M & Smirnova I Micelle mediated extraction of fatty acids from microalgae cultures: Implementation for outdoor cultivation. Separation and purification technology 135, 127-134.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.07.057>.

ITW Reagents, ECOSURF™ EH-9 (alternativa al Triton X-100) (2024)
<https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/ecosurf-eh-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9778>

ITW Reagents, ECOSURF™ SA-9 (alternativa al Triton X-100) (2024)
<https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/ecosurf-sa-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9779>

ITW Reagents, TERGITOL™ 15-S-9 (alternativa al Triton X-100) (2024)
<https://www.itwreagents.com/iberia/es/product/tergitol-15-s-9-alternativa-al-triton-x-100-/A9780>

Kiesewetter A, Gupta A, Heinen-Kreuzig A, Greenhalgh T & Stein A (2023) Improved endotoxin removal using ecofriendly detergents for intensified plasmid capture. *Biotechnology progress* 39(6), e3375.
<https://doi.org/10.1002/btpr.3375>

Marques LP, McQuillan K, Bajaj K, Broilo M, Malys B, Mir M & Haltli B (2024) Sustainable compendial grade GMP detergent substitutes for Triton™ X-100 in bioprocessing applications.

McNamara L (2022) Regulations in the European Union for the Use of Triton X-100 in the Pharmaceutical Industry. BDO URL:
https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Regulations+in+the+European+Union+for+the+Use+of+Triton+X-100+in+the+Pharmaceutical+Industry&btnG

Palmer I, Wingfield PT (2004) Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 6:6.3.1-6.3.18. doi: 10.1002/0471140864.ps0603s38.

Yadav V, Lunson M, Shore H, Aucamp J (2025) Systematic Development of a Detergent Toolbox as an Alternative to Triton X-100.

Agua de laguna eutrofizada: una alternativa de medio de cultivo para la producción de microalgas

Eutrophicated lagoon water: an alternative growing medium for microalgae production

Sheila Genoveva Pérez Bravo^{1*}, Ana Anzures Mendoza¹, Mónica Fabiola Briones Baez¹,
María del Refugio Castañeda Chávez², Luciano Aguilera Vázquez¹,

¹ Instituto Tecnológico de Ciudad Madero, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Av. 1 ° de Mayo esq. Sor Juana Inés de la Cruz s/n, Col. Los Mangos, Cd. Madero, 89440, Tamaulipas, México.

² Instituto Tecnológico de Boca del Río, Departamento de Posgrado e Investigación, Carretera Veracruz-Córdoba, km 12, Boca del Río, 94290, Veracruz, México.
sheila.pb@cdmadero.tecnm.mx

Resumen

Las microalgas almacenan metabolitos de interés como las proteínas, pigmentos, carbohidratos y lípidos, para lograr su explotación industrial es necesario reducir los costos de producción de biomasa. El costo de los medios de cultivo artificiales y su esterilización es una gran desventaja. Debido a que las aguas eutrofizadas de cuerpos de agua naturales no han sido empleadas en el cultivo de microalgas. Esta investigación tiene el objetivo de evaluar tres métodos de desinfección de agua de laguna eutrofizada como alternativa de bajo costo para cultivar microalgas. El método de tratamiento térmico en autoclave a 120 °C, 15 psi durante 5 min demostró ser eficaz en la eliminación de microorganismos, lo cual se comprobó mediante sembrado en estrías en placas de agar Czapek y Dextrosa Sabouraud. Por lo tanto, el agua de laguna eutrofizada tratada con el método propuesto puede sustituir a los medios de cultivo artificiales que se esterilizan antes de la inoculación.

Palabras Claves: medio de cultivo, microalgas, agua eutrofizada, biorremediación

Abstract

Microalgae store metabolites of interest such as proteins, pigments, carbohydrates and lipids. In order to achieve their industrial exploitation, it is necessary to reduce biomass production costs. The cost of artificial culture media and their sterilization is a major disadvantage. Because the eutrophicated waters of natural water bodies have not been used for microalgae cultivation. This research aims to evaluate three methods of disinfection of eutrophicated lagoon water as a low-cost alternative to cultivate microalgae. The autoclave heat treatment method at 120 °C, 15 psi for 5 min proved to be effective in eliminating microorganisms, which was verified by culture media on Czapek and Dextrose Sabouraud agar plates. Therefore, eutrophicated lagoon water treated with the proposed method can replace artificial culture media that are sterilized prior to inoculation.

Key Words: culture medium, microalgae, eutrophicated water, bioremediation

Introducción

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que se desarrollan a partir de materia orgánica, y requieren algunos elementos inorgánicos: el carbono, hidrógeno y oxígeno pueden provenir del agua y del aire, los demás elementos del medio de cultivo (Enamala *et al.*, 2018). Los elementos inorgánicos como el nitrógeno, fósforo, hierro, potasio y silicio deben ser proporcionados por el medio de cultivo (Alam, Mobin and Chowdhury, 2015). Entre los metabolitos sintetizados por las microalgas se encuentran los aminoácidos, ácidos grasos, carotenoides, y sacáridos (Marinho *et al.*, 2022). Útiles en la industria alimenticia y producción de biocombustibles, sin embargo, el 75% del costo de producción de la biomasa microalgal se atribuye al medio de cultivo (Medina Villadiego, Mauricio; Ospino Roa, Yesid; Tejeda Benitez, 2015), motivo por el cual es necesario la investigación de medios de cultivo alternativos de bajo costo.

Los factores que influyen el crecimiento microalgal son la disponibilidad de nutrientes, relación C:N, penetración de luz, fuente de carbono, pH, salinidad y temperatura (Shah *et al.*, 2016). En las Tablas 1 y 2 se resumen los medios de cultivo artificiales que se han utilizado para el crecimiento de microalgas bajo metabolismos fototrófico y mixotrófico respectivamente.

En las Tablas 1 y 2, se observa la preferencia por los medios de cultivo BG-11, BBM y su modificación en la concentración de nitrato BBM-3N, entre otros medios de cultivo artificiales como el TAP, Bristol, enfocados en el crecimiento celular, productividad de biomasa y lípidos. En la Tabla 2 se observa la suplementación de los medios de cultivo artificiales con residuos orgánicos de la industria alimenticia, compuestos nitrogenados y urea, como nutrientes alternativos.

Tabla 1. Medios de cultivo sintéticos empleados en el cultivo de microalgas bajo metabolismo fototrófico

Medio de cultivo	Microalga	Condiciones de cultivo	Productos	Referencia
BG-11	<i>Chlorella vulgaris</i>	150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 16:8 L:O, 20 $\pm$ 2 °C	Clorofila a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	(Chia, Lombardi and Melão, 2013)
BG-11	<i>Scenedesmus</i> sp.	400 - 1200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 16:8 L:O	29% lípidos	(Guldhe <i>et al.</i> , 2014)
BG-11	<i>Scenedesmus</i> sp.	28 $\pm$ 5 °C, 12:12 L:O, 3000 lux	279.1 $\pm$ 49.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteínas 173.3 $\pm$ 13.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ carbohidratos 116.2 $\pm$ 7.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lípidos	(Anand <i>et al.</i> , 2020)
BG-11	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 16:8 L:O, 25 $\pm$ 2 °C	26 $\pm$ 1.3 mg/L/d lípidos	(Sharma and Chauhan, 2016)
BG-11	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	14:10 L:O, 1500 lux	3.12 g/L biomasa 1.04 g/L lípidos	(Zhang, Wu and Zhong, 2021)
BG11	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 12:12 L:O, 25 °C	23.25 $\pm$ 0.02 mg/L/d biomasa, 5.48 $\pm$ 0.02 mg/L/d lípidos, 17 $\pm$ 0.1 % lípidos	(Ogbonna <i>et al.</i> , 2024)
BG-11	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 16:8 L:O, 25 $\pm$ 2 °C	14 $\pm$ 0.7 mg/L/d lípidos	(Sharma and Chauhan, 2016)
BG-11	<i>Scenedesmus</i> sp.	132 - 148 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 24 $\pm$ 1 °C	27.4 $\times$ 10 ⁶ cel/mL, 49.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ clorofila a, 24.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ caroteno	(Durvasula <i>et al.</i> , 2015)
TAP	<i>Scenedesmus</i> sp.	132 - 148 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 24 $\pm$ 1 °C	0.96 $\times$ 10 ⁶ cel/mL, 2.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ clorofila a, 1.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ caroteno	(Durvasula <i>et al.</i> , 2015)
BBM	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 16:8 L:O	96.44 mg/L/d biomasa, 29.62 % proteína	(Manzoor <i>et al.</i> , 2019)
LC Oligo	<i>Chlorella vulgaris</i>	150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 16:8 L:O, 20 $\pm$ 2 °C	2.74 $\times$ 10 ⁶ cel/ mL Clorofila a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	(Chia, Lombardi and Melão, 2013)
Konvey	<i>Chlorella vulgaris</i>	2000 lux, 12:12 L:O,	0.298 g biomasa 31% lípidos	(Xaaldi Kalhor <i>et al.</i> , 2016)

Artículos

		25 °C		
Borowitzka	<i>Dunaliella salina</i>	47 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, 26-35 °C, 12 días	6.90 x 10 ⁶ cel/mL 1.19 g/mL biomasa	(Mayorga and Manso, 2017)
CHU	<i>Scenedesmus</i> sp.	80 $\mu\text{mol/m}^2$ 12:12 L:O, 25 $\pm$ 2 °C	34.6 mg/ L/d biomasa	(De Souza <i>et al.</i> , 2021)

Tabla 2. Medios de cultivo artificiales suplementados empleados en el cultivo de microalgas bajo metabolismo mixotrófico.

Medio de cultivo	Microalga	Condiciones de cultivo	Productos	Referencia
BG-11 + Hidrolizado de orujo de manzana 2% P/V + CO ₂	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	12:12 L:O	140.37 mg/L/día biomasa	(Laraib <i>et al.</i> , 2021)
BG-11 + CO ₂	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	12:12 L:O	96.55 mg/L/día biomasa	(Laraib <i>et al.</i> , 2021)
BG-11 + Urea	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	2500 – 3000 lux, 16:8 L:O, 25 °C	1.523 mg/L/día 34 % lípidos	(Chandra, Goswami and Biotech, 2011)
BG-11 + Urea	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	2500 – 3000 lux, 16:8 L:O, 25 °C	1.266 mg/L/día 31 % lípidos	(Chandra, Goswami and Biotech, 2011)
BG-11 + NaNO ₃ (9mM)	<i>Tetrademus bernardii</i>	300 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, CO ₂ (1 %)	5.83 g/L biomasa	(Gao <i>et al.</i> , 2019)
BG-11 + NaNO ₃ (18 mM) + glucosa (30 g/L)	<i>Tetrademus bernardii</i>	300 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, CO ₂ (1 %)	10.82 g/L biomasa 54.74 % lípidos	(Gao <i>et al.</i> , 2019)
BG11 + glucosa (0.2 %)	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	40 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, 12:12 L:O, 25 °C	83.88 $\pm$ 0.05 mg/L/d biomasa, 17.11 $\pm$ 0.04 mg/L/d lípidos, 20.40 $\pm$ 0.04 % lípidos	(Ogbonna <i>et al.</i> , 2024)
BBM + Hidrolizado de bagazo de caña 5 g/L + aire 11 L/min	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	120 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, 16:8 L:O	119.25 mg/L/día biomasa, 34.09% proteína	(Manzoor <i>et al.</i> , 2019)
BBM + Hidrolizado de bagazo de caña 10 g/L + aire 11 L/min	<i>Scenedesmus dimorphus</i>		105.92 mg/L/día biomasa, 34.82% proteína	
3N-BBM + CO ₂	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	CO ₂ 5% 0.1 L/min, 12:12 L:O, 12 días	-	(Avula, Belovich and Xu, 2017)
BBM + CO ₂ (fermentación alcohólica)	<i>Scenedesmus</i> sp.	12:12 L:O, 2500 lux, pH 7.5	73.20x10 ⁶ cel. /mL	(Hernández-Rojo, Jiménez-Islas and Venegas-Sánchez, 2017)
BBM + aire	<i>Scenedesmus</i> sp.		48.6 x10 ⁶ cel. /mL	
BBM + CO ₂ (fermentación alcohólica)	<i>Chlorella protothecoides</i>	12:12 L:O, 2500 lux, pH 7.5	90.0x10 ⁶ cel. /mL	(Hernández-Rojo, Jiménez-Islas and Venegas-Sánchez, 2017) (Hernández-Rojo, Jiménez-Islas and Venegas-Sánchez, 2017)
BBM + aire	<i>Chlorella protothecoides</i>		25.83x10 ⁶ cel. /mL	
Bristol	<i>Chlorella vulgaris</i>	8.59 $\mu\text{E/m}^2/\text{s}$, 22 $\pm$ 2.3 °C, aire 0.45 L/min	4122 $\pm$ 112 x10 ⁴ cel./ mL	(Silveira-Font <i>et al.</i> , 2018)
Conway + agua de mar	<i>Chlorella</i> sp.	350 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, 12:12 L:O, 21 $\pm$ 1 °C	6.43x10 ⁶ cell/mL	(Paes <i>et al.</i> , 2016)
Conway + agua de mar	<i>Nannochloropsis oculata</i>	350 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, 12:12 L:O, 21 $\pm$ 1 °C	6.96x10 ⁷ cell/mL	(Paes <i>et al.</i> , 2016)

El uso de aguas residuales que contienen nitrógeno y fósforo, dos de los nutrientes esenciales para el crecimiento microalgal en

el cultivo de microalgas tiene la ventaja de la purificación del agua, reduciendo así la contaminación ambiental (Zhou *et al.*, 2017).

También se ha reportado que reducen el contenido de nitratos, fosfatos y amonio de las aguas residuales, además de descomponer moléculas de hidrocarburos, antibióticos y compuestos clorados (Mondal *et al.*, 2019), incluso han sido utilizadas para la remediación de aguas residuales de la industria textil (Fazal *et al.*, 2018). Sin embargo, no se ha explorado el uso de aguas naturales eutrofizadas como medios de cultivo en la producción de biomasa.

Los medios de cultivo artificiales son elaborados en laboratorio y se esterilizan previamente a la inoculación, lo que conlleva un gran consumo energético en la producción de biomasa. Esta investigación tiene el propósito de determinar el método óptimo de desinfección de agua de laguna eutrofizada para poder ser utilizada como medio de cultivo de microalgas.

Materiales y Métodos

Muestras de agua

La laguna El Conejo se ubica en las coordenadas, latitud: 22.41881 y longitud: -97.87649, en el municipio de Altamira, Tamaulipas, México, ha sido clasificada como contaminada (Secretaría de Gobierno, 2016). Presenta las especies acuáticas *Eichhornia crassipes* y *Pistia stratiotes*, conocidas como lirio y lechuga de agua respectivamente, ambas plantas acuáticas son indicadores de un alto contenido de nitratos (Amado Álvarez, Jesús Pilar; Pérez Cutillas, edro; Ramírez Valle, Orlando; Alarcón Cabañero, 2016). El agua se recolecta en recipientes de polipropileno de 19 L y se mantuvo a temperatura ambiente.

Métodos de desinfección

Se evalúan tres diferentes tratamientos. Método 1: tratamiento térmico en autoclave a 5 psi y 107 °C durante 5 min seguido de enfriamiento a temperatura ambiente. Método 2: desinfección por exposición a luz ultravioleta de 9 W durante 20 min. Método 3: tratamiento térmico en autoclave a 15 psi y 120 °C durante 5 min. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Prueba de desinfección

Debido a que en ambientes acuáticos naturales existe la presencia de bacterias y/o hongos saprófitos, que se encargan de la degradación de material orgánico (Laezza, Salbitani and Carfagna, 2022). Se verificó la ausencia de bacterias y/o hongos saprófitos contenidas en el agua de laguna mediante sembrado en estrías en placas Petri con Agar Czapek y Agar Dextrosa Sabraud (BD Bioxon) en incubadora FE-145 marca Felisa durante 5 días. Uno de los principales problemas en los cultivos de microalgas es la contaminación biológica (Di Caprio, 2020). La cual puede ser ocasionada por hongos y bacterias, provocando competencia por los nutrientes, disminución de la productividad de biomasa, daños repentinos y la muerte celular (Wang *et al.*, 2013).

Prueba de crecimiento microalgal

La cepa *Tetrademus dimorphus*, proporcionada por el laboratorio de ficología de la Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa, se sembró en agua de laguna eutrofizada sometida al tratamiento número 3, por duplicado. Se utilizó 20% de inóculo, 80% de medio de cultivo, fotoperiodo natural 13.5:10.5 luz: oscuridad, condiciones naturales de radiación y temperatura, volumen de trabajo 375 mL, durante 10 días. El crecimiento de biomasa se determinó con una curva de calibración que relaciona la absorbancia a 685 nm con la concentración en peso seco (mg/mL), $R^2 = 0.9768$ y la Ecuación 1. Las microalgas contienen clorofila en sus cloroplastos, las clorofilas A y B se leen en el rango de 652 a 750 nm (Fernández-Linares *et al.*, 2017), la clorofila A tiene una banda centrada alrededor de 685 nm in vivo (Lehmuskero, Skogen Chauton and Boström, 2018).

$$y = 3.3239x - 0.0685 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Al finalizar el cultivo, se realizó la microfiltración al vacío y secado de la biomasa en horno a 60 °C durante 24 h.

Resultados

En la Figura 1 y 2, se observan unidades formadoras de colonias (UFC), es decir, crecimiento de bacterias y/o hongos saprófitos contenidas en el agua de laguna, que no se identificaron en las placas sembradas con aguas tratadas correspondiente a los métodos de tratamiento 1 y 2. En consecuencia se considera que estos métodos no son eficaces en la eliminación de bacterias y/o hongos saprófitos, por lo tanto, el método 3; el

tratamiento en autoclave a 15 psi, 120 °C, durante 5 min es el apropiado para la desinfección del agua de laguna eutrofizada, en la Figura 3 se muestra la ausencia de UFC en ambas placas Petri. El método 3 es una mejor alternativa a la esterilización de medios a 121 °C durante 1 h que ha sido utilizado para tratar agua de mar antes de adicionarla con medio artificial Conway para cultivar *Chlorella sp* y *Nannochloropsis oculata* (Paes et al., 2016)

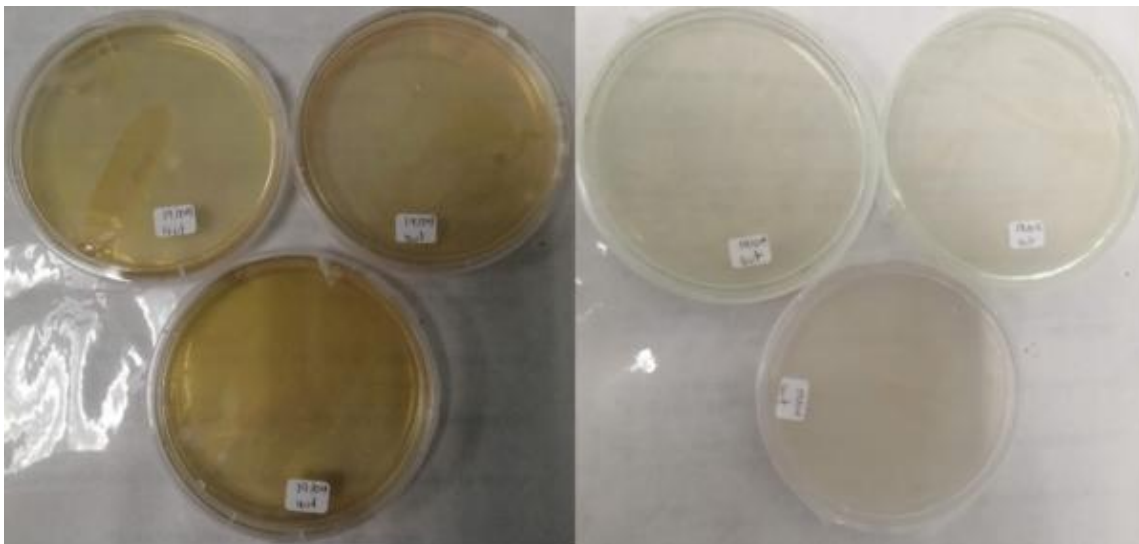


Figura 1. Placas de Agar Dextrosa Sabouraud y Czapek inoculadas con agua de laguna eutrofizada previamente tratada con el método 1.

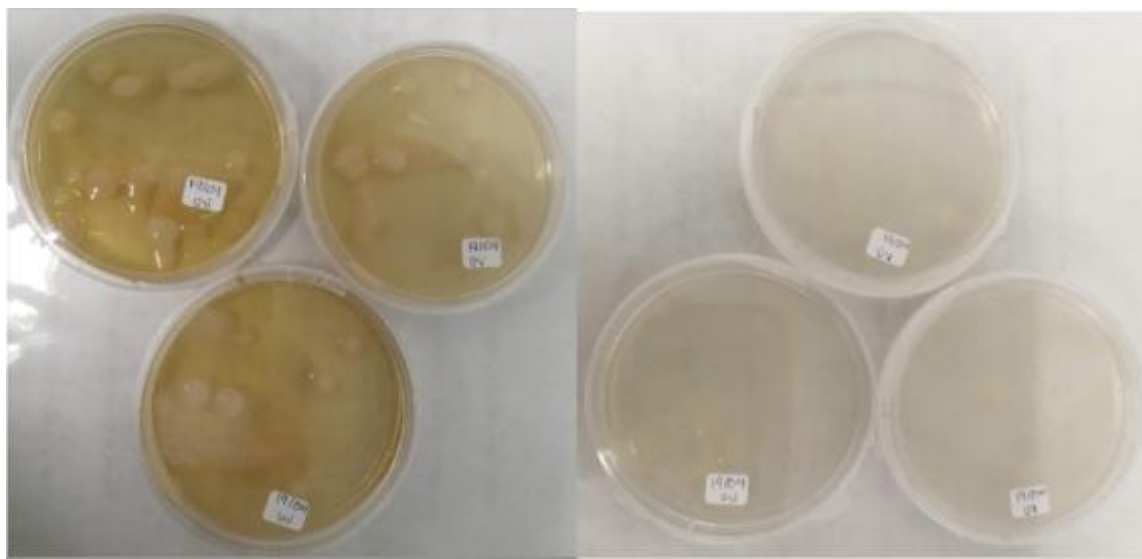


Figura 2. Placas de Agar Dextrosa Sabouraud y Czapek inoculadas con agua de laguna eutrofizada previamente tratada con el método 2.

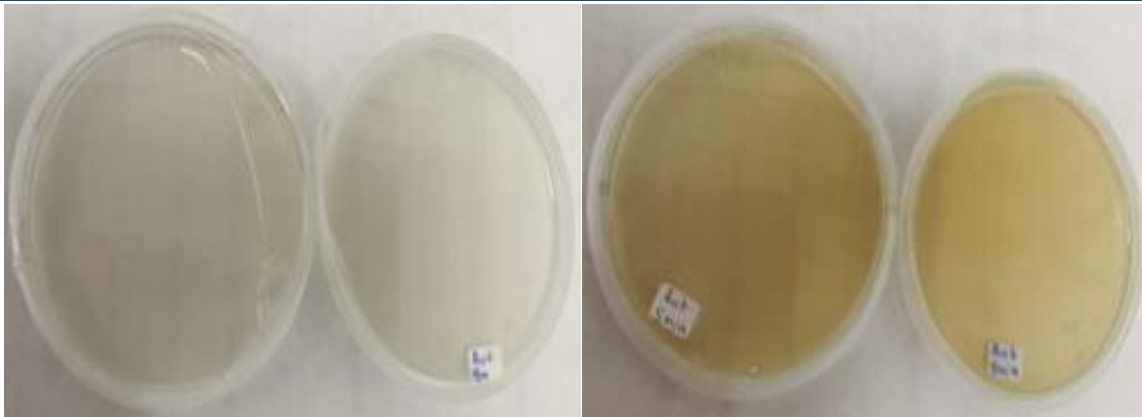


Figura 3. Placas de Agar Dextrosa Sabouraud y Czapek inoculadas con agua de laguna eutrofizada previamente tratada con el método 3.

En las pruebas de crecimiento microalgal, se comprobó que es posible el crecimiento de *Tetradismus dimorphus* utilizando como medio de cultivo el agua de la laguna El Conejo previamente desinfectada con el método 3. Los experimentos se observan en la Figura 4. Por otro lado, las concentraciones obtenidas de biomasa con la Ecuación 1,

fueron 0.168 y 0.189 mg/mL en los experimentos 1 y 2 respectivamente. La Figura 5 muestra la biomasa húmeda obtenida por filtración al vacío en papel filtro de 1.5 μm de 10 cm de diámetro, marca Ahlstrom Muncksjö, mientras que en la Figura 6 se aprecia la biomasa deshidratada.



Figura 4. Cultivo de *Tetradismus dimorphus* en agua de laguna El Conejo desinfectada con el método 3.



Figura 5. Biomasa húmeda de *Tetradismus dimorphus* cultivada en agua de laguna El Conejo desinfectada con el método 3.

Artículos

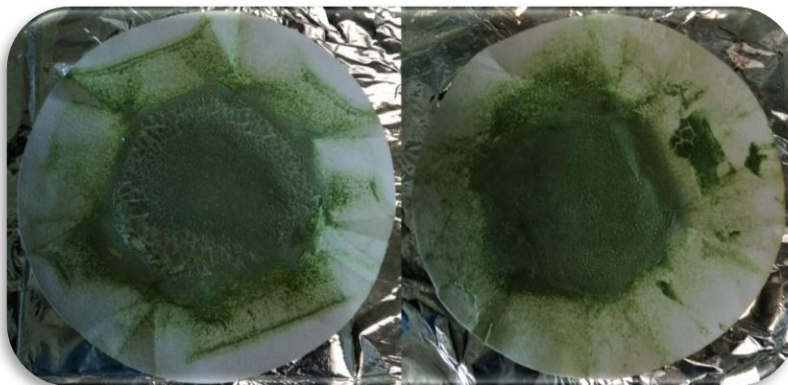


Figura 6. Biomasa deshidratada de *Tetrademus dimorphus* cultivada en agua de laguna El Conejo desinfectada con el método 3

En la Tabla 3 se observan los medios de cultivo alternativos que han sido utilizados para el cultivo de microalgas, principalmente aguas residuales domésticas e industriales. El uso de aguas residuales minimiza la necesidad de agua dulce y nutrientes, reduciendo el costo de producción, el crecimiento de microalgas está relacionado con la eficiencia de remoción de nutrientes. Se

observa que los tratamientos aplicados a aguas residuales utilizadas como medios de cultivo son nulos o sencillos para el cultivo de microalgas ya que el objetivo principal es aprovechar los nutrientes presentes en dicha agua, sin embargo, sin un proceso de desinfección puede haber competencia entre microorganismos presentes en las aguas residuales.

Tabla 3. Medios de cultivo no artificiales empleados en el cultivo de microalgas bajo metabolismo mixotrófico.

Medio de cultivo	Microalga	Condiciones de cultivo	Productos	Remoción	Referencia
Agua residual de lechería	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	10 W/m ² , 12:12 L:O, 25 °C	6.8 g/L biomasa	80-85% P, 60-80% N	(Kothari <i>et al.</i> , 2012)
Agua residual cruda de PTAR	<i>Chlorella vulgaris</i>	37 klx, 12:12 L:O, 25 ± 5 °C	69.8 mg/L/d	66 % Nitratos, 65.2 % DQO	(Sacristán-de Alva <i>et al.</i> , 2014)
Agua contaminada con petróleo crudo (10g/L)	<i>Chlorella vulgaris</i>	2000 lux, 12:12 L:O, 25 °C	0.335 g biomasa 37.33 % lípidos	-	(Xaaldi Kalhor <i>et al.</i> , 2016)
Agua contaminada con petróleo crudo (20g/L)	<i>Chlorella vulgaris</i>	2000 lux, 12:12 L:O, 25 °C	0.413 g biomasa 37.16 % lípidos	-	(Xaaldi Kalhor <i>et al.</i> , 2016)
Agua residual de reactor biológico	<i>Chlorella vulgaris</i>	180 µmol/m ² /s, 12:12 L:O, 24 ± 1 °C	1.167 g/L biomasa, 300 mg/L lípidos, 325 mg/L proteínas, 7.49 mg/L pigmentos	100% NH ₄ , 100% DQO	(Fernández-Linares <i>et al.</i> , 2017)
Agua residual de reactor biológico + Bayfolan (1 mL/L)	<i>Chlorella vulgaris</i>	180 µmol/m ² /s, 12:12 L:O, 24 ± 1 °C	2.250 g/L biomasa, 258 mg/L lípidos, 1070 mg/L proteínas, 61.20 mg/L pigmentos	99.92% NH ₄ , 49.9% NH ₃ , 8.05% PO ₄ -3, 100% DQO	(Fernández-Linares <i>et al.</i> , 2017)
Agua residual municipal C:N=4	<i>Chlorella vulgaris</i>	70 µmol/m ² /s 28±1 °C, aeration, 200 mL/min	1.080 ± 0.026 g/L biomasa		(Ayatollahi, Esmaeilzadeh and Mowla, 2020)

Artículos

Agua residual cruda de PTAR	<i>Scenedesmus acutus</i>	37 klx, 12:12 L:O, 25 ± 5 °C	61.5 mg/L/d	70.8 % Nitratos, 77.2 % DQO	(Sacristán-de Alva <i>et al.</i> , 2014)
Agua residual domestica + CO ₂ (2.5 %)	<i>Scenedesmus sp.</i>	60 µmol/m ² /s, 14:10 L:O, 25 ± 2 °C	196 ± 5.1 mg/L/d biomasa	98.3% NH ₄ , 70.2% NO ₃ ⁻ , 78.9% PO ₄ ³⁻ , 95.9% DQO	(Nayak, Karemore and Sen, 2016)
Agua residual municipal	<i>Scenedesmus dimorphus</i> y <i>Scenedesmus minutum</i>	150 µmol/m ² , 16:8 L:O, 22 ± 2 °C	Biomasa con 35% lípidos	79% N-NH ₃ , 93.7% PT	(Kudahettige, Pickova and Gentili, 2018)
Agua residual con ácido láctico + 0.8 g/L NaNO ₃ + 4 mg/L H ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	14:10 L:O, 1500 lux	4.51 g/L biomasa 1.15 g/L lípidos	-	(Zhang, Wu and Zhong, 2021)
Agua residual con ácido láctico	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	14:10 L:O, 1500 lux	2.5 g/L biomasa 1 g/L lípidos	-	(Zhang, Wu and Zhong, 2021)
Agua residual de ác. láctico + 0.8 g/L NaNO ₃ + 10 mg/L H ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	14:10 L:O, 1500 lux	4.30 g/L biomasa	-	(Zhang, Wu and Zhong, 2021)
Lixiviado de vertedero sanitario (80 %)	<i>Scenedesmus sp.</i>	80 µmol/m ² 12:12 L:O, 25 ± 2 °C	421.9 mg/ L/d	87.4 % PO ₄ ³⁻ , 24 % NO ₃ ⁻ , 65.4 % NO ₂ ⁻	(De Souza <i>et al.</i> , 2021)

Entre los pretratamientos de aguas residuales previo a la inoculación, se reporta la filtración con un filtro Whatman No.1 para eliminar sólidos grandes seguido de esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 min como medio de cultivo (Nayak, Karemore and Sen, 2016). También la doble filtración con papel de celulosa a una velocidad de 1.3 L/cm²/min sólo para la eliminación de partículas grandes (Kudahettige, Pickova and Gentili, 2018), en otra investigación dónde utilizan aguas residuales de una granja de cerdo, rica en estiércol, se realiza la filtración y dilución con agua potable (Xu, Shen and Chen, 2015). Sacristán *et al.* (Sacristán-de Alva *et al.*, 2014) sólo realizaron el cribado y sedimentación del agua residual de una planta de tratamiento de aguas residuales, mientras que Fernández *et al.* (Fernández-Linares *et al.*, 2017) aclaran que el agua residual proveniente del reactor biológico se utilizó sin esterilizar, Paladino *et al.* (Paladino and Neviani, 2021) utilizaron agua residual del lavado de biodiésel, rica en glicerol sin tratamiento previo al cultivo.

Las microalgas tienen gran potencial en el tratamiento de aguas con producción de biomasa y eliminación de nutrientes, las tasas de eliminación varían mucho entre especies y los regímenes de luz (Fan *et al.*, 2020). Los cultivos mixotróficos presentan mayor producción de biomasa, además de un aumento en el contenido de lípidos y

pigmentos en las células (Uma Devi, Swapna and Suneetha, 2014).

En otra investigación se comprobó la efectividad del agua de laguna El Conejo como medio de cultivo, se obtuvo una productividad de biomasa de 0.016 ± 0.002 g/Ld, remoción de 23.6 ± 3.90 % nitratos y 7.2 ± 0.51 % DQO cuando se cultivó *Tetradasmus dimorphus* en un fotobiorreactor de placa plana con sedimentador de 12 L durante 15 días en condiciones naturales de radiación y temperatura (Pérez Bravo, Sheila Genoveva; Castañeda Chávez, María del Refugio; Aguilera Vázquez, 2024). Por otro lado, también se utilizó como medio de cultivo cuando se cultivó la misma cepa bajo un fotoperiodo de 10.5:13.5 L:O, con iluminación LED 18W, a 25 °C en un fotobiorreactor de 1.25 L durante 33 días, donde se obtuvo una productividad de 0.053 ± 0.0015 g/Ld y una remoción de 95.6 ± 1.36 % DQO (Pérez Bravo *et al.*, 2023). Cabe destacar que la productividad de biomasa está influenciada por las condiciones de cultivo.

Conclusiones

El agua de laguna eutrofizada es una alternativa a los medios de cultivo artificiales y convencionales utilizados en el cultivo de microalgas, pretratarla en autoclave a 120 °C y 15 psi durante 5 min es un método óptimo para desinfectarla y prevenir la competencia

entre microorganismos, este proceso de desinfección requiere menor energía y tiempo que la esterilización de medios de cultivo artificiales, además de tener un costo nulo.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías CONAHCYT por las becas nacionales 729401, 692130 y 749907 otorgadas al primer autor, primer y segundo coautor respectivamente para realizar estudios de Doctorado. en Ciencias de la Ingeniería en el Tecnológico Nacional de México campus Instituto Tecnológico de Ciudad Madero.

Referencias

Alam, F., Mobin, S., & Chowdhury, H. (2015). 'Third generation biofuel from Algae', *Procedia Engineering*, 105, pp. 763–768. doi: 10.1016/j.proeng.2015.05.068.

Amado Álvarez, Jesús Pilar, Pérez Cutillas, Pedro, Ramírez Valle, Orlando, & Alarcón Cabañero, J. J. (2016). 'Análisis de la calidad del agua en las lagunas de Bustillos Y de los Mexicanos (Chihuahua, México). Water quality analysis in the Bustillos and Los Mexicanos Lagoons (Chihuahua, México)', *Papeles de Geografía*, (62), pp. 107–118. doi: 10.6018/geografia/2016/255811.

Anand, V. *et al.* (2020) 'Spectroscopic insights exploring triacylglyceride accumulation in *Scenedesmus sp.* via biomolecular transitions', *Bioresource Technology Reports*, 12(October), p. 100593. doi: 10.1016/j.biteb.2020.100593.

Avula, S. G. C., Belovich, J. M., & Xu, Y. (2017). 'Determination of fatty acid methyl esters derived from algae *Scenedesmus dimorphus* biomass by GC–MS with one-step esterification of free fatty acids and transesterification of glycerolipids', *Journal of Separation Science*, 40(10), pp. 2214–2227. doi: 10.1002/jssc.201601336.

Ayatollahi, S. Z., Esmaeilzadeh, F., & Mowla, D. (2020). 'Integrated CO₂ capture, nutrients removal and biodiesel production using *Chlorella vulgaris*', *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), p. 104763. doi: 10.1016/j.jece.2020.104763.

Chandra, R., & Goswami, D. (2011). '*Scenedesmus dimorphus* and *Scenedesmus quadricauda* two potent indigenous microalgae strains for biomass production and CO₂ mitigation', *J. Algal Biomass Utiln.*, 2(4), pp. 42–49. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/9874/6c87fce372e744d9ba4071fb23867f6abd7d.pdf>.

Chia, M., Lombardi, A. T., & Melão, M. D. G. (2013). 'Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media.', *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(4), pp. 1427–38. doi: 10.1590/0001-3765201393312.

Di Caprio, F. (2020). Methods to quantify biological contaminants in microalgae cultures. *Algal Research*, 49(March), 101943. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101943>.

Durvasula, R. *et al.* (2015). 'Culture, growth, pigments and lipid content of *Scenedesmus* species, an extremophile microalga from Soda Dam, New Mexico in wastewater', *Algal Research*, 10, pp. 128–133. doi: 10.1016/j.algal.2015.04.003.

Enamala, M. K. *et al.* (2018). 'Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94(May 2017), pp. 49–68. doi: 10.1016/j.rser.2018.05.012.

Fan, H. *et al.* (2020). 'A comparative study on growth characters and nutrients removal from wastewater by two microalgae under optimized light regimes', *Environmental Technology and Innovation*, 19(5), p. 100849. doi: 10.1016/j.eti.2020.100849.

Fazal, T. *et al.* (2018). 'Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, pp. 3107–3126. doi: 10.1016/j.rser.2017.10.029.

Fernández-Linares, L. C. *et al.* (2017). 'Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium', *Bioresource Technology*, 244, pp. 400–406. doi: 10.1016/j.biortech.2017.07.141.

Gao, B. *et al.* (2019). 'Bilateral and simultaneous accumulation of lipid and biomass in the novel oleaginous green

microalga *Tetrademus bernardii* under mixotrophic growth', *Algal Research*, 37(November 2018), pp. 64–73. doi: 10.1016/j.algal.2018.11.012.

Guldhe, A. et al. (2014). 'Synthesis of biodiesel from *Scenedesmus sp* by microwave and ultrasound assisted *in situ* transesterification using tungstated zirconia as a solid acid catalyst', *Chemical Engineering Research and Design*, 92(14), pp. 1503–1511. doi: 10.1016/j.cherd.2014.05.012.

Hernández-Rojas, A., Jiménez-Islas, D. & Venegas-Sánchez, J. A. (2017). 'Comparación de la producción de biodiesel de *Chlorella Protothecoides* y *Scenedesmus sp* mediante la adición de CO₂ de la fermentación alcohólica', *Revista de Sistemas Experimentales*, 4(12), pp. 11–17. Available at: http://www.ecorfan.org/bolivia/researchjournal/s/Sistemas_Experimentales/vol4num12/Revisita_de_Sistemas_Experimentales_V4_N12_2.pdf.

Kothari, R. et al. (2012). 'Experimental study for growth potential of unicellular alga *Chlorella pyrenoidosa* on dairy waste water: An integrated approach for treatment and biofuel production', *Bioresource Technology*, 116, pp. 466–470. doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.121.

Kudahettige, N. P., Pickova, J. & Gentili, F. G. (2018). 'Stressing algae for biofuel production: Biomass and biochemical composition of *Scenedesmus dimorphus* and *Selenastrum minutum* grown in municipal untreated wastewater', *Frontiers in Energy Research*, 6(DEC), pp. 1–10. doi: 10.3389/fenrg.2018.00132.

Laezza, C., Salbitani, G., & Carfagna, S. (2022). Fungal Contamination in Microalgal Cultivation: Biological and Biotechnological Aspects of Fungi-Microalgae Interaction. *Journal of Fungi*, 8(10), 48–54. <https://doi.org/10.3390/jof8101099>.

Laraib, N. et al. (2021). 'Mixotrophic Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* for Enhancing Biomass Productivity and Lipid Yield', *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 45(2), pp. 397–403. doi: 10.1007/s40995-020-01055-3.

Lehmuskero, A., Skogen Chauton, M., & Boström, T. (2018). Light and photosynthetic

microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*, 168, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2018.09.002>.

Manzoor, M. et al. (2019). 'Mixotrophic cultivation of *Scenedesmus dimorphus* in sugarcane bagasse hydrolysate', *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 39(2), pp. 1–9. doi: 10.1002/ep.13334.

Marinho, Y. F. et al. (2022). 'Usage of Moringa oleifera residual seeds promotes efficient flocculation of *Tetrademus dimorphus* biomass', *Biomass Conversion and Biorefinery*, (0123456789). doi: 10.1007/s13399-022-02789-3.

Mayorga, C. & Manso, L. (2017) 'Crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* en un cultivador Raceway en condiciones de laboratorio Growth of the *Dunaliella salina* microalga in a Raceway cultivator in laboratory conditions', *Revista de Iniciación Científica*, 3(1), pp. 85–91.

Medina Villadiego, Mauricio, Ospino Roa, Yesid, & Tejeda Benitez, L. (2015). 'Esterificación y Transesterificación de aceites residuales para obtener biodiésel', *Luna Azul*, enero-juni(40), pp. 25–34. doi: 10.17151/luaz.2015.40.3.

Mondal, M. et al. (2019). 'Bioremediation of Organic and Inorganic Pollutants Using Microalgae', in *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V., pp. 223–235. doi: 10.1016/b978-0-444-63504-4.00017-7.

Nayak, M., Karemore, A. & Sen, R. (2016). 'Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application', *Algal Research*, 16, pp. 216–223. doi: 10.1016/j.algal.2016.03.020.

Ogbonna, K. E. et al. (2024). 'Effect of organic carbon sources on growth, lipid production and fatty acid profile in mixotrophic culture of *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing', *The Microbe*, 3, p. 100064. doi: 10.1016/j.microb.2024.100064.

Paes, C. R. P. S. et al. (2016). 'Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation', *Lat. Am. J. Aquat.*

Res., 44, pp. 275–292. doi: 10.3856/vol44-issue2-fulltext-9.

Paladino, O. & Neviani, M. (2021). 'Airlift photo-bioreactors for *Chlorella vulgaris* cultivation in closed-loop zero waste biorefineries', *Biomass and Bioenergy*, 144(January 2020), p. 105926. doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105926.

Pérez Bravo, Sheila Genoveva, Castañeda Chávez, María del Refugio, & Aguilera Vázquez, L. (2024) 'Prototype flat photobioreactor with a settler for the cultivation of *Tetrademus dimorphus* under mixotrophic metabolism under ambient conditions', *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 23(3), p. 24287.

Pérez Bravo, S. G. *et al.* (2023). 'Evaluation of *Scenedesmus dimorphus* under Different Photoperiods with Eutrophicated Lagoon Water', *Resources*, 12(12). doi: 10.3390/resources12120140.

Sacristán-de Alva, M. *et al.* (2014). 'Producción de biodiésel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivadas en diferentes calidades de agua', *Agrociencia*, 48(3), pp. 271–284.

Secretaría de Gobierno (2016). 'Programa municipal de ordenamiento territorial y desarrollo urbano de Altamira, tamaulipas', *Periodico Oficial del Estado de Tamaulipas*, (Plan 2012), p. 218.

Shah, S. H. *et al.* (2016). 'Improvement in lipids extraction processes for biodiesel production from wet microalgal pellets grown on diammonium phosphate and sodium bicarbonate combinations', *Bioresource Technology*, 214, pp. 199–209. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.036.

Sharma, T. & Chauhan, R. S. (2016). 'Comparative transcriptomics reveals molecular components associated with differential lipid accumulation between microalgal sp., *Scenedesmus dimorphus* and *Scenedesmus quadricauda*', *Algal Research*, 19, pp. 109–122. doi: 10.1016/j.algal.2016.07.020.

Silveira-Font, Y. *et al.* (2018). 'Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático', *Revista Cubana de Química*, 30(1), pp. 55–67.

De Souza, L. *et al.* (2021). 'Biopolishing sanitary landfill leachate via cultivation of lipid-rich *Scenedesmus microalgae*', *Journal of Cleaner Production*, 303. doi: 10.1016/j.jclepro.2021.127094.

Uma Devi, K., Swapna, G. & Suneetha, S. (2014) 'Microalgae in Bioremediation: Sequestration of Greenhouse Gases, Clearout of Fugitive Nutrient Minerals, and Subtraction of Toxic Elements from Waters', in *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier Inc., pp. 436–456. doi: 10.1016/B978-0-12-800021-2.00019-4.

Wang, H., Zhang, W., Chen, L., Wang, J., & Liu, T. (2013). The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. *Bioresource Technology*, 128, 745–750.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.158>

Xaaldi Kalhor, A. *et al.* (2016). 'Biodiesel production in crude oil contaminated environment using *Chlorella vulgaris*', *Bioresource Technology*, 222, pp. 190–194. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.110.

Xu, X., Shen, Y. & Chen, J. (2015). 'Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* for C/N/P removal and lipid production', *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(1), pp. 46–50. doi: 10.1016/j.ejbt.2014.12.003.

Zhang, C., Wu, D. J. & Zhong, C. Q. (2021). 'Cultivating *Scenedesmus dimorphus* in lactic acid wastewater for cost-effective biodiesel production', *Science of the Total Environment*, 792, p. 148428. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148428.

Zhou, D. *et al.* (2017). 'Continuous production of biodiesel from microalgae by extraction coupling with transesterification under supercritical conditions', *Bioresource Technology*, 238, pp. 609–615. doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.097.



www.smbb.com.mx