

Hongos entomopatógenos: de la agricultura a la conservación del patrimonio histórico

Eva Crespo Martín, Luis Miguel Gallego Sánchez, Samuel Gámez Arcas, Marta Mozo Mulero, María Patricia Nevado Berzosa, Inmaculada Pérez Camacho, Jesús José Soriano Bermúdez, Elan Alexis Téllez Pueblos | alumnos de la asignatura "Tecnología Enzimática", Máster de Genética Molecular y Biotecnología 2016-2017, Escuela Internacional de Postgrado, Universidad de Sevilla

Fernando P. Molina-Heredia, Mercedes Roncel, José R. Pérez-Castiñeira | Dpto.de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Biología, U. de Sevilla

URL de la contribución <www.iaph.es/revistaph/index.php/revistaph/article/view/4204>

RESUMEN

Los métodos tradicionales utilizados en la conservación del patrimonio histórico incluyen principalmente el uso de insecticidas sintéticos, que presentan las desventajas de su toxicidad y de su falta de inocuidad sobre el sustrato a tratar. En este artículo se presenta una alternativa a estos métodos basada en el empleo de sustancias biocidas extraídas o provenientes de hongos entomopatógenos, como son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. La presente propuesta incluye dos variantes no excluyentes como son el uso de conidios y la aplicación de geles con enzimas y toxinas provenientes de dichas especies. Esta metodología aporta ventajas con respecto a los métodos tradicionales, como la no toxicidad para el manipulador, la aplicabilidad a diferentes sustratos independientemente de su tamaño y localización, y su prácticamente nula reactividad frente al sustrato.

Palabras clave

Conidio | Conservación | Enzimas | Hongos entomopatógenos | Insecticidas | Micoinsecticidas | Patrimonio histórico | Toxinas |



Insecto *Tenebrio molitor* adulto (plaga en sitios de almacenamiento de cereales) infectado con *Beauveria bassiana* | fuente ROBLEDO Y MONTERRUBIO, 2011

ANTECEDENTES E INTRODUCCIÓN

Las actividades de restauración y conservación del patrimonio histórico se remontan a los inicios de la humanidad. Durante la Edad Media y el Renacimiento, estas labores se encomendaron a los artesanos y no fue hasta el siglo XIX cuando comenzaron a surgir especialistas en la conservación, mantenimiento y reconstrucción de objetos del pasado. Ya en esa época, algunos científicos, como Michael Faraday y Luis Pasteur, realizaron estudios sobre los efectos nocivos del medio ambiente en la integridad de las obras de arte (STONER, 2005).

En el año 1888, en Alemania, se dio un importante impulso al desarrollo de la conservación del patrimonio, cuando Friedrich Rathgen se convirtió en el primer químico empleado en un museo. Esto condujo al desarrollo de un nuevo enfoque científico para el cuidado de los objetos de las colecciones (GILBERG, 1987). Desde entonces, la ciencia ha ido adquiriendo conocimientos físicos, químicos, biológicos y geológicos sobre los materiales y el entorno en el que se encuentran los bienes culturales, para así poder identificar las causas del deterioro y los mecanismos de degradación y, por tanto, proponer métodos para la conservación y protección de los bienes.

En la actualidad gran parte de los problemas de origen biológico a los que se enfrentan los científicos en el mantenimiento y conservación del patrimonio suelen estar provocados por hongos, bacterias e insectos, que penetran dentro de las obras y proliferan en su interior causando su deterioro. Para detener la acción de estos agentes causantes del daño se realizan diferentes tratamientos, entre los cuales destaca la desinsectación por gases inertes, basada en la generación de un ambiente anóxico para matar a los insectos en todas las fases de su desarrollo biológico (KOESTLER; MATHEWS, 1994).

El principal inconveniente de este método es el modo de aplicación, ya que las condiciones de anoxia se generan en un espacio reducido, introduciendo la pieza a desinsectar en una bolsa sellada. Esto supone un problema en el tratamiento de grandes piezas o esculturas al aire libre, al igual que en obras de difícil acceso, como ocurre con los retablos (VALENTÍN, 2003). Otra opción es el uso de biocidas sintéticos que, en su gran mayoría, contienen compuestos químicos organoclorados y fenólicos (REY; LEE; CARBO, 2011) que además de poder deteriorar la propia obra de interés histórico artístico pueden afectar por su toxicidad al medioambiente y al manipulador (MORALES; BLANCO; LALANA et ál., 2013).

Esta problemática hace que en este trabajo se proponga la utilización de métodos alternativos que permitan un tratamiento eficaz e inocuo para las obras y el personal que las manipula y, además, cuyo modo de aplicación sea menos restrictivo.

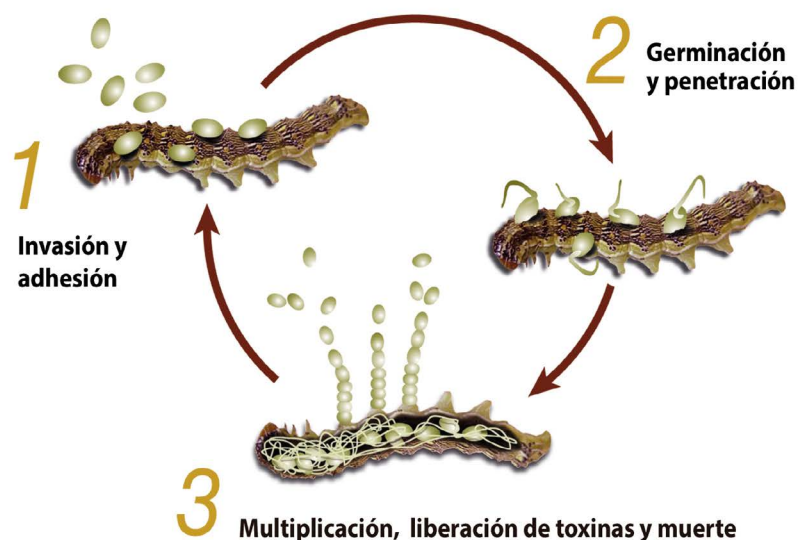
PRESENTACIÓN DE LA PROPUESTA

Una situación a la que se enfrentan hoy día los organismos destinados a la conservación y mantenimiento del patrimonio histórico es el deterioro causado por los insectos en obras de arte, en concreto en materiales orgánicos como la madera. El daño que producen los insectos no es específico del arte, sino que también afecta a otros sectores en el que cabe destacar el agrícola. Este sector lidia de manera eficaz contra ellos a través del desarrollo de distintos métodos o estrategias que no afectan a la salud de las personas, ni dañan a los cultivos (como es el uso de pesticidas). El incremento continuo de conciencia ecológica ha favorecido el desarrollo de estrategias basadas en el uso de compuestos naturales provenientes de los mecanismos de defensa que presentan los seres vivos en la naturaleza (RETNAKARAN; KRELL; FENG et ál., 2003). Uno de los avances metodológicos para combatir los insectos surge de la búsqueda de sustancias tóxicas naturales que presentan los hongos; es decir, utilizar estrategias ya establecidas de desarrollo de biocidas naturales capaces de combatir insectos y otros hongos y, a su vez, proteger los sustratos tratados frente a nuevos ataques (WITTMER; BADER; SCHEIDEGGER et ál., 2010). Nuestra propuesta consiste en la extrapolación de estos métodos utilizados en la agricultura a la conservación de obras de patrimonio histórico realizadas en materiales orgánicos como la madera.

HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

En la actualidad, se está implementando el uso de estos biocidas naturales para el control de plagas en el sector agrario. Uno de estos métodos consiste en el uso de hongos parásitos de insectos, denominados “hongos entomopatógenos”, como insecticida para eliminar dichas plagas. Estos microorganismos son antagonistas naturales de los insectos a los que colonizan para alimentarse de ellos. Para eso, al entrar en contacto con la cutícula de los insectos, segregan una batería de enzimas y toxinas que degradan principalmente el exterior del insecto y facilitan la penetración en él, extendiéndose por todo su cuerpo y provocando la muerte del mismo (FRANCO; RODRÍGUEZ; CERVANTES et ál., 2011).

Los hongos entomopatógenos presentan un ciclo de vida marcado por una fase latente en forma de esporas de origen asexual conocidas como conidios o conidiosporas, en la que se mantienen hasta encontrar una presa. Tras el contacto con éste, estos conidios germinan y penetran en el interior del insecto gracias a las enzimas que aceleran las reacciones de degradación de la cutícula, capa más externa del insecto. Una vez dentro, vierten las sustancias tóxicas a la vez que se alimentan y se multiplican rápidamente, provocando la muerte del insecto y la nueva formación de conidios (ver imagen página siguiente) (PUCHETA; FLORES; RODRÍGUEZ et ál., 2006).



Ciclo de vida de un hongo entomopatógeno. Etapa 1: En primer lugar, los conidios se adhieren al cuerpo de los insectos. Etapa 2: A continuación, se produce la germinación de las esporas y comienza la degradación de la cutícula del insecto. Etapa 3: Por último, una vez dentro, los hongos producen toxinas que atacan al sistema nervioso del insecto provocando su muerte y volviendo a generar conidios | fuente Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Centro Regional de Investigación INIA Quilamapu, Chile

La aplicación de los hongos entomopatógenos está muy contrastada en la agricultura, destacando dos especies por su gran eficacia y amplio espectro de acción: *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Estas especies no presentan actividad celulolítica y, por tanto, no producen daños en la madera, sustrato muy común en las obras de patrimonio histórico (JOOP; VILCINSKAS, 2016). Estas características permiten pensar en la posibilidad de usar estos hongos como un arma limpia e inocua para combatir los insectos y plagas que atacan y deterioran la madera de las obras de arte (ver imagen página siguiente).

El desarrollo, germinación, patogenicidad, esporulación e infección de estos organismos se afectan por una serie de factores como son la humedad relativa, la temperatura y el pH, pudiendo variar entre las distintas especies de hongos (HAJEK; CARRUTHERS; SOPER, 1990). La temperatura óptima para la germinación de las especies *M. anisopliae* y *B. bassiana* oscila entre 27 °C y 32 °C (BERLANGA-PADILLA; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, 2002) aunque, sorprendentemente, los mejores resultados de mortalidad de los insectos infectados por ambas especies se presentan a una temperatura de unos 26 °C, debido a que a esta temperatura el proceso de infección se da de forma más eficiente (JOHNSON; GOETTEL; BRADLEY et ál., 1992).

Por otro lado, el proceso de infección se favorece a niveles de humedad relativa superiores al 91% en periodos de 3 a 10 horas durante varios días (EKESI; MANIANIA; AMPONG-NYARKO et ál., 1999). En último lugar, el pH recomendado para el cultivo de estos entomopatógenos es ligeramente ácido, alrededor de 6,6 (DELGADO BLANDÓN; LÓPEZ FORERO; GIRALDO CARDOZO, 2001).



Insectos infectados por *M. anisopliae* | foto Amanda Mararuai (National Agricultural Research Institute, Lae, Papua New Guinea)

OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN

A partir de los datos expuestos anteriormente, en este trabajo se propone la utilización de hongos entomopatógenos como una herramienta biológica efectiva contra insectos, capaz de suplir las deficiencias de los métodos que actualmente se usan en este campo como son su toxicidad o la degradación que producen sobre ciertos sustratos.

Los hongos entomopatógenos tienen unas cualidades excepcionales para su uso en la restauración de obras de arte realizadas en maderas, aunque es necesaria la realización de controles que aseguren su inocuidad para el mismo. Se plantean dos tipos de estrategias para su uso como insecticida en patrimonio histórico: (1) la producción de conidios naturales en condiciones controladas de laboratorio y su posterior aplicación sobre la obra; (2) la generación de kits específicos mediante técnicas de ingeniería genética. El contenido de estos kits estaría basado en una batería de enzimas degradativas, moléculas que aceleran las reacciones que median los procesos de degradación de compuestos específicos, y en una serie de compuestos tóxicos que de forma natural utilizan los hongos entomopatógenos contra los insectos.

La propuesta que se hace es importante para avanzar en la obtención de recursos no tóxicos en restauración de obras de arte. Sin embargo, antes de aplicar cualquier nuevo tratamiento a los bienes culturales, debe estar garantizada su eficacia y su inocuidad para los materiales constitutivos de los bienes. Por tanto, la aplicación de estas soluciones que se proponen no se llevaría a cabo hasta que no se hubieran realizado ensayos de labo-

ratorio y se hubiesen obtenido resultados fiables. Hay que tener en cuenta que esto implica garantizar que estos tratamientos no puedan tener efectos secundarios en los materiales constitutivos de los bienes culturales que son materiales diversos y en muchos casos heterogéneos. Habría que analizar cómo afectaría estos tratamientos a una madera policromada sabiendo que la policromía se compone de varios estratos. Por otro lado habría que asegurarse de que los productos extraídos de los hongos no puedan provocar otras infestaciones o alteraciones. Además, convendría tener en cuenta si la aplicación de los insecticidas propuestos es válida para interiores y exteriores. No es lo mismo tratar un bien mueble en condiciones ambientales controladas que un material expuesto a variaciones ambientales extremas.

Dentro de las posibles justificaciones de esta propuesta, la más destacada es la ausencia de compuestos insecticidas sintéticos que puedan frenar la propagación de los insectos dentro de un sustrato afectado sin generar toxicidad, tanto para quien lo manipule como para el medio ambiente. Compuestos como el hexaflumurón, usado en la actualidad contra termitas, suponen un riesgo importante de contaminación de acuíferos, así como un riesgo para el personal que lo maneja, ya que causa irritación de la piel y ojos e intoxicación aguda en caso de inhalación excesiva (véase la hoja de especificaciones).

PROPUESTAS DE UTILIZACIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Obtención de conidios

Gracias al uso extendido de los conidios en el sector agrícola, es posible encontrar una extensa bibliografía acerca los procesos llevados a cabo para su obtención de organismos como *M. anisopliae* y *B. bassiana* (SEEMA; NEERAJ; KRISHAN, 2013; MOSLIM; HISHAM; BASRI et ál. 2005; MASCARIN; JARONSKI, 2016). En el ámbito del patrimonio histórico se propone una serie de métodos sencillos y de bajo coste económico, que servirán como estrategia previa para su uso contra las distintas plagas a tratar. Entre estos métodos, destaca el llevado a cabo por el Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Ecuador (GÓMEZ PEREIRA; MENDOZA, 2004). Este método permite la obtención de conidios naturales de *M. anisopliae* de una forma sencilla y barata e integra una metodología útil para la germinación y pureza de los conidios, factores indispensables que determinarán, en parte, la posterior eficacia tras su aplicación. El conjunto de procedimientos llevados a cabo por este método se esquematizan en la imagen de la página siguiente.

Respecto a la obtención de conidios procedentes de *B. bassiana*, los métodos empleados son similares a los utilizados para *M. anisopliae*. El método

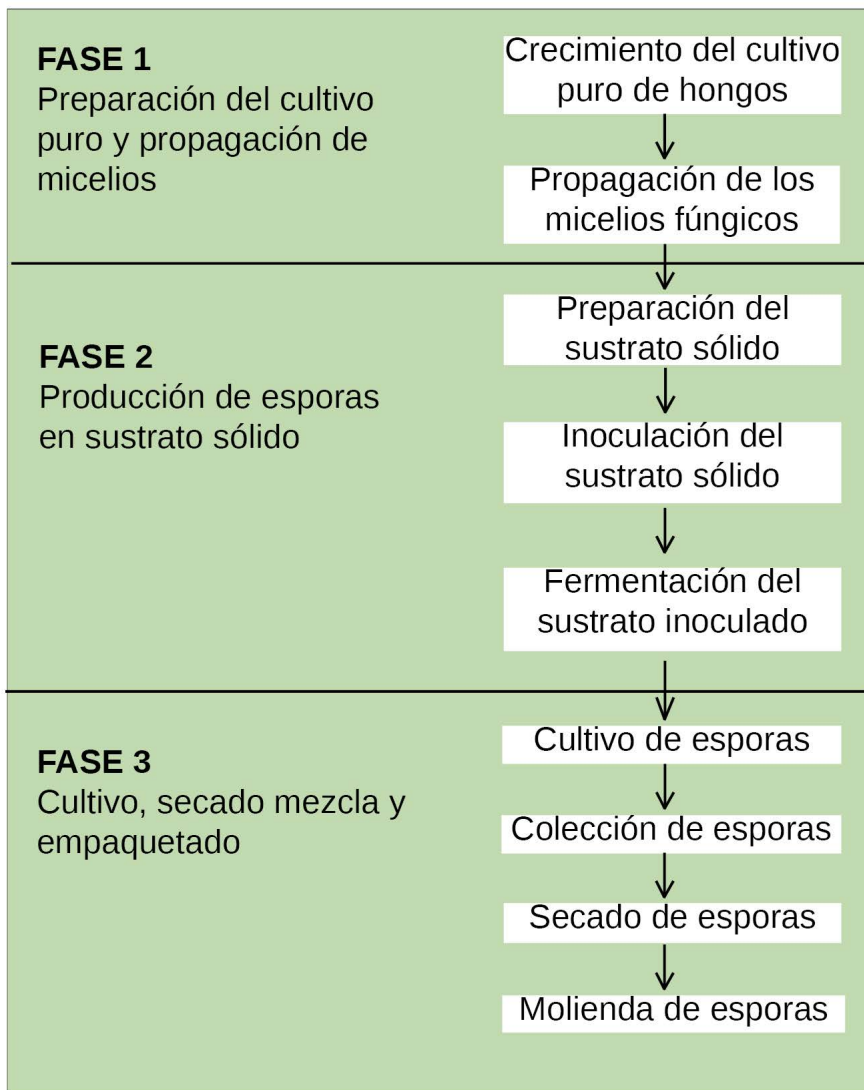


Diagrama de flujo del proceso a seguir para producir las esporas de *M. anisopliae* | diagrama adaptado de MOSLIM; HISHAM; BASRI, et ál., 2005

recomendado para la obtención de conidios de esta especie sería el llevado a cabo por el Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé) en Caldas, Colombia, que utiliza la fermentación bifásica (líquido-sólido) en bolsas de plástico para producir y cosechar polvos de esporas (POSADA-FLÓREZ, 2008).

La obtención conjunta de conidios de ambas especies, para ahorrar tiempo y recursos, se puede llevar a cabo por el método propuesto por Seema, Neeraj y Krishan (2013) que permite la producción en masa mediante un protocolo de fermentación bifásica (BURGES; HUSSEY, 1981). Para ello, se añade una muestra de conidios a un cultivo líquido con levadura, sacarosa y agua; una vez producido el inóculo (mezcla del medio líquido y conidios), se trans-

fiere a un sustrato sólido, como el arroz entero, para la obtención final de polvos de conidios tras su secado.

Además, previamente a su obtención, se pueden ensayar distintas preparaciones de conidios comerciales procedentes de distintas empresas y que son utilizados para su aplicación en campos de cultivo. Entre estos productos destacan Metarril®, para *M. anisopliae*, y BotaniGard®, para *B. bassiana*, los cuales poseen buenas reseñas en artículos científicos destacados (CAMARGO; MARCIANO; SÁ et ál., 2014; WEEKS MACHTINGER; GEZAN et ál., 2017).

Obtención de kits enzimáticos

La utilización de kits enzimáticos es una opción alternativa a la utilización de conidios naturales en la conservación del patrimonio histórico. Para su producción se utilizarían técnicas de ingeniería genética y tendría como principales componentes enzimas y toxinas producidas por *B. bassiana* y *M. anisopliae* de forma natural con carácter patogénico contra insectos (PEREIRA; ROBERTS, 1990).

Las dos especies a utilizar producen diferentes enzimas, tales como proteasas, quitinasas, glucosidasas y lipasas, las cuales degradan el tejido del insecto en la zona de penetración y facilitan la entrada del hongo (MONZÓN, 2001; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Estudios realizados in vitro indican que la acción conjunta de lipasas, proteasas y quitinasas produce la digestión del integumento, que es la cobertura natural de un organismo o de un órgano, como piel, corteza, concha o cáscara (TANADA, KAYA, 1993). Concretamente, las proteasas son capaces de romper los enlaces peptídicos de las proteínas, los cuales mantienen su estructura funcional (BANIĆ; CREMONESI; LA CHAPELLE et ál., 2003). La proteasa Pr1, que actúa de forma conjunta con la proteasa Pr2 (AVALOS DE LEÓN, 2011), es un importante factor de virulencia en ambas especies fúngicas, ya que acelera el proceso de muerte del insecto aproximadamente en un 25 % (FAN; FANG; GUO et ál., 2007); esta proteasa permite la penetración en el hemocele del insecto, cavidad en la que se acumulan los fluidos del sistema circulatorio, produciendo la invasión al sistema nervioso y generando a largo plazo una septicemia. Otra proteasa importante es la Pr4 que provoca fallos en el sistema nervioso de los insectos (JORDAN, 2003). Además, junto a las proteasas, las lipasas facilitan y provocan una mayor degeneración de la cutícula, permitiendo la penetración del hongo gracias a la degradación conjunta de proteínas y lípidos, respectivamente (DELGADO BLANDÓN; LÓPEZ FORERO; GIRALDO CARDOZO, 2001). Las quitinasas actúan como mecanismo de deterioro de la quitina, que constituye el elemento estructural del integumento de los insectos, así como de la tráquea, el aparato reproductor y la membrana peritrófica que protege de daño mecánico al epitelio intestinal

(BARBOZA-CORONA; ESCUDERO-ABARCA, 2002). De este modo, se facilita la acción de los demás componentes involucrados en los kits enzimáticos con el fin de eliminar al insecto (VALLEJOS SIRPA; ESPINAL CHURATA; MOLLINEDO et ál., 2014). El último componente enzimático de estos kits serían las glucosidasas, entre las cuales destaca la trehalasa ácida secretada por *M. anisopliae*. Este enzima degrada la trehalosa, que es el azúcar predominante en la hemolinfa de los insectos (JIN; PENG; LIU et ál., 2015).

Volviendo al modo de acción de los hongos, es posible observar estrategias defensivas e inmunosupresoras, como la producción de toxinas o cambios estructurales en su pared celular para resistir el ataque de las defensas de los insectos (TÉLLEZ-JURADO; CRUZ RAMÍREZ; MERCADO-FLORES et ál. 2009; GILLESPIE; CLAYDON, 1989). En referencia a *B. bassiana* y *M. anisopliae*, podemos destacar como toxinas principales la beauvericina y las destruxinas. La beauvericina aumenta la permeabilidad de las membranas (RUÍZ HERRERA, 2013) provocando como consecuencia la deshidratación de los tejidos y, por tanto, la muerte del insecto. Además, tiene la capacidad de producir alteraciones en los procesos de muda y metamorfosis, e incluso de fecundación (TORRES; ORTEGA; ALCÁZAR et ál., 1993). Por otro lado, el método de acción de las destruxinas se basa en la inhibición de la síntesis de ADN, ARN y de proteínas en las células de los insectos (QUIOT; VEY; VAGO, 1985), así como la generación de deformaciones que impiden a los insectos sobrevivir en sus hábitats naturales (AMIRI; IBRAHIM; BUTT, 1999). Por tanto, sería posible mejorar la actividad enzimática de los kits por la adición a su formulación de estas sustancias, principalmente estas dos toxinas y ácidos orgánicos como el ácido oxálico (ASAFF; CERDA-GARCÍA-ROJAS; TORRE et ál., 2005).

Para producir estos kits, se propone el uso de técnicas de ingeniería genética. Se trataría de aislar el gen que produce la proteína o el péptido de interés, en nuestro caso una enzima o toxina, e introducirlo en un organismo fácil de ser manipulado genéticamente y que pueda ser cultivado en el laboratorio en condiciones controladas. Así se altera el material genético de este último de forma dirigida, así como sus características hereditarias, lo que supone que el organismo sintetice la proteína deseada, aumentando además el rendimiento de producción en muchos casos. Las técnicas para utilizar este proceso son diferentes en función de los problemas a los que nos enfrentemos a la hora de transformar (manipular genéticamente) un organismo (NICHOLL, 2008). Con este método es posible generar una gran cantidad de enzimas a partir de la modificación de ciertos organismos modelo, entre los cuales destacan bacterias y levaduras. La aplicación de la ingeniería genética permite una gran versatilidad en la generación de los kits (introduciendo incluso mutaciones puntuales dirigidas del material genético de los hongos entomopatógenos), así como especificidad en función de la problemática a tratar en cada caso concreto.

Métodos de aplicación

En la agricultura, el método de aplicación más común es en forma de emulsión o polvo en suspensión de conidios desecados. Sin embargo, la aplicación de estos conidios mediante una formulación líquida en obras de patrimonio histórico podría suponer un riesgo de daño del sustrato a tratar, que en la mayoría de casos ya se encuentran debilitados tanto por el efecto del paso del tiempo como por la acción de los insectos. Es por ello que aquí se proponen diferentes métodos de aplicación para esta opción. Hay varias patentes y artículos relacionados con nuevas formulaciones que incluyen estos hongos entomopatógenos para el control de plagas en formas variadas: una emulsión de fase externa oleosa usando conidios exclusivamente de *B. bassiana* (FENG; PU; YING et ál., 2004) o una mezcla de conidios y esporas sexuales de varias especies de hongos entomopatógenos (*Verticillium*, *Metarhizium*, *Beauveria* y *Paecilomyces*) (TORRE-MARTÍNEZ; ASSAF TORRES, 2010); también se puede usar como fase oleosa el aceite de nim para aumentar el efecto insecticida y repelente de insectos del tratamiento (MAZARIEGOS-HURTADO, 2016); pero de nuevo todas estas formulaciones podrían generar un daño en el sustrato a tratar.

Aun así, las formulaciones en forma de emulsiones son susceptibles de ser probadas dependiendo del sustrato; es decir, en función de si se va a tratar un lienzo o una pieza de madera el efecto de la emulsión será diferente, es por eso que no tienen por qué descartarse como posible método de aplicación.

Otra opción es el empleo de una trampa con el hongo entomopatógeno que, mediante feromonas, atraiga e infecte a los insectos y, posteriormente, los deje volver a su hábitat natural, haciendo que los insectos infectados originalmente infecten a su vez el nido del que procedan (MALAYSIAN PALM OIL BOARD, 2006). Este método sería plausible para su aplicación en obras de arte, puesto que no genera ningún tipo de daño en el sustrato y es un tratamiento que puede ser retirado tras su acción.

Respecto a los kits enzimáticos, ya se ha comentado anteriormente que la intervención enzimática puede ser un método más seguro para la integridad de las obras en su conservación en comparación con los métodos convencionales que se conocen. El empleo de geles es uno de los mejores métodos aplicados actualmente en la conservación y restauración de patrimonio histórico. En la propuesta presentada, estos geles contendrían enzimas y toxinas entomopatógenas. En Lera Santín (2011) se pueden consultar protocolos exhaustivos a seguir para la preparación y utilización de dichos geles, así como métodos de empleo y requisitos que han de cumplirse para la aplicación de los mismos.

DISCUSIÓN

En este artículo se propone el uso de los hongos entomopatógenos como biocidas naturales para la conservación del patrimonio histórico. En la actualidad hay muchos tratamientos mediante los cuales se combaten las agresiones de insectos a diferentes obras de arte, aunque distan de parecerse al mecanismo de acción de las propuestas aquí presentadas.

La problemática general de los métodos insecticidas empleados actualmente suele ser su método de aplicación y su toxicidad (REY; LEE; CARBO, 2011). Como ya se ha comentado, el modo de aplicación de la desinsectación por anoxia se restringe a obras de arte de pequeño tamaño, ya que no puede ser utilizado en el caso de patrimonio de gran tamaño o también de aquellas obras difíciles de aislar (edificios, retablos, etc.) (VALENTÍN, 2003). Además, en muchas ocasiones estos métodos de aplicación pueden provocar un deterioro de mayor grado en el sustrato a tratar. A diferencia de todos los inconvenientes expuestos, la propuesta del uso de hongos entomopatógenos como micoinsecticidas supondría un gran avance, tanto en la protección de la obra a tratar como de los organismos no relacionados con la plaga, siendo este tratamiento inocuo para el material a tratar. Además, pueden ser aplicados de manera controlada; es decir, este nuevo método no generaría toxicidad en el ambiente, por lo que se puede emplear en cualquier obra de patrimonio histórico, sea cual sea su localización. Una ventaja adicional del uso de estos organismos o de sus derivados es la presencia de quitinasas; esto podría afectar a la pared celular de hongos que también estén provocando daño en la obra a tratar (una problemática muy común) y, por tanto, servir de insecticida y fungicida al mismo tiempo.

El uso de los conidios producidos por las dos especies mencionadas, *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se plantea como una solución potencial a los problemas anteriormente expuestos, ya que pueden ser empleados de forma inmediata debido a que su generación es rápida y económica. No obstante, la forma de producción de los conidios puede suponer una variación en el coste del producto, en función de si su obtención es a través de una empresa especializada o por generación propia en condiciones controladas de laboratorio. Por otro lado, es difícil controlar el comportamiento de un organismo vivo, de ahí que exista la posibilidad de que las esporas del hongo que queden en la obra puedan activar su ciclo de vida en presencia de un nuevo insecto, siendo esto una posible ventaja, pues resultaría en una protección residual a largo plazo.

Otro aspecto a tener en cuenta es el efecto de las condiciones ambientales en el patrimonio, ya sean cambios en la temperatura, la humedad o el pH, que conducen a una mayor degradación y alteración de los sustratos a tratar. Los valores de estas variables pueden producir modificaciones en el

volumen y peso de la obra, además de poder provocar alabeamiento, resquebrajamientos y desconchados del color; es decir, un debilitamiento de las estructuras (MARTIARENA, 1992). Además, estas condiciones van a determinar el desarrollo, germinación y patogenicidad de los hongos entomopatógenos en el sustrato y su efecto sobre el insecto.

Para solventar los posibles inconvenientes del uso de conidios, los kits enzimáticos ofrecen estabilidad y especificidad; además, presentan versatilidad, pudiéndose crear diferentes formulaciones según las necesidades. Cabe también la posibilidad de emplear toxinas y ácidos orgánicos para reforzar la actividad enzimática de estos kits de una forma novedosa y rentable, ya que estas toxinas son producidas por el mismo hongo. La producción de kits enzimáticos puede ser abordada de dos formas: generando baterías de enzimas para realizar kits especializados, siendo este un método a largo plazo, u obteniendo de manera directa la batería de enzimas y toxinas, a través de la extracción de los conidios producidos por el hongo entomopatógeno en un periodo de tiempo corto.

Como conclusión final, en este trabajo se proponen dos métodos complementarios para el uso de hongos entomopatógenos como biocida natural en el tratamiento del patrimonio histórico. Así, en una actuación a corto plazo, se propone la utilización de conidios naturales, por ser rápida su obtención y, a largo plazo, la posibilidad de usar kits enzimáticos como método más específico y eficaz.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los Dres. Robledo y Monterrubio (UAM- Iztapalapa, México), M.^a Esperanza Sepúlveda (INIA, Chile) y Grahame Jackson (Queens Park, Australia), así como al Dr. Octavio Loera Corral (UAM-Iztapalapa, México) la cesión de las imágenes utilizadas en este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- AMIRI, B.; IBRAHIM, L.; BUTT, T. M. (1999) Antifeedant properties of destruxins and their potential use with the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* for improved control of crucifer pest. *Biocont. Sci. Technol.*, vol. 9, n.º 4, 1999, pp. 487-498
- ASAFF A.; CERDA-GARCÍA-ROJAS C.; TORRE, M. DE LA (2005) Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 68, 2005, pp. 542-547
- AVALOS DE LEÓN, O. (2011) *Identificación y análisis de los genes productores de proteasas tipo subtilisina y tipo tripsina en el hongo Metarhizium anisopliae como factores de virulencia para su aplicación en el control biológico de insectos plaga* [disponible en línea] Tesis inédita. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional (UPIITA), México, 2011 <<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/15965>> [Consulta: 04/06/2018]
- BANIK, G.; CREMONESI, P.; LA CHAPELLE, A. D. et ál. (2003) *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*. Padova: Il Prato, 2003
- BARBOZA-CORONA, J. E.; ESCUDERO-ABARCA, B. I. (2002) Cómo usar una bacteria para combatir plagas y hongos. *Ciencia*, vol. 53, n.º 3, 2002, pp. 76-83
- BERLANGA-PADILLA, A. M.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. M. (2002) Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *M. a. var. acridum* y *Beuveria bassiana* en *Shistocerca piceifrons piceifrons*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, n.º 63, 2002, pp. 51-55
- BURGESS, A.; HUSSEY, N. (1981) *Microbial Control of Insect Pests and Mite*. London & New York: Academic Press, 1981, pp. 161-167
- CAMARGO, M.; MARCIANO, A.; SÁ, F. et ál (2014) Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. *Vet. Parasitol.*, vol. 205, n.º 1-2, 2014, pp. 271-276
- DELGADO BLANDÓN, F.; LÓPEZ FORERO, Y.; GIRALDO CARDOZO E. M. (2001) Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. *Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica*, n.º 60, 2001, pp. 43-49
- EKESI, S. MANIANIA, N. K.; AMPONG-NYARKO, K. et ál. (1999) Effect of intercropping cowpea with maize on the performance of *Metarhizium anisopliae* against *Megalurothrips sjostedti* (Thysanoptera: Thripidae) and predators. *Environ. Entomol.*, 28, n.º 6, 1999, pp. 1154-1161
- FAN, Y.; FANG, S.; GUO, X. et ál. (2007) Increased insect virulence in *Beuveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, n.º 1, 2007, pp. 295-302
- FENG, M. G.; PU, X. Y.; YING, S. H. et ál. (2004) Field trials of an oil-based emulsifiable formulation of *Beuveria bassiana* conidia and low application rates of imidacloprid for control of false-eye leafhopper *Empoasca vitis* on tea in southern China. *Crop Prot.*, vol. 23, n.º 6, 2004, pp. 489-96
- FRANCO, K. G.; RODRÍGUEZ, S.; CERVANTES, J. F. et ál. (2011) Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticida y fungicida. *Sociedades Rurales, Producción y Medioambiente*, vol. 11, n.º 2, 2011, pp. 143-160
- GILBERG, M. (1987) Friedrich Rathgen: The father of modern archaeological conservation. *J. Am. Inst. Conservat.*, vol. 26, n.º 2, 1987, pp. 105-120
- GILLESPIE, A. T.; CLAYDON, N. (1989) The use of entomopathogenic fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pest. Manag. Sci.*, vol. 27, n.º 2, 1989, pp. 203-215
- GÓMEZ PEREIRA, P.; MENDOZA, J. (2004) *Guía para la producción de Metarhizium anisopliae*. Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador. Publicación técnica, n.º 5, 2004
- HAJEK, A. E.; CARRUTHERS, R. I. Y.; SOPER, R. S. (1990) Temperature and moisture relations of sporulation and germination by *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthoraceae), a fungal pathogen of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ. Entomol.*, vol. 19, n.º 1, 1990, pp. 85-90
- JIN, K.; PENG, G.; LIU, Y. et ál. (2015) The acid trehalase, ATM1, contributes to the in vivo growth and virulence of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium acridum*. *Fungal Genet. Biol.*, vol. 77, 2015, pp. 61-67
- JOHNSON, D. L.; GOETTEL, M. S.; BRADLEY, C. et ál. (1992) Field trials with the entomopathogenic fungus *Beuveria bassiana* against grasshoppers in Mali West Africa July 1990. En LOMER, C. J.; PRIOR, C. (ed.) *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. Wallingford: CABI. pp. 296-310
- JOOP, G.; VILCINSKAS, A. (2016) Coevolution of parasitic fungi and insect host. *Zoology*, vol. 119, 2016, pp. 350-358
- JORDÁN, J. (2003) Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *Offarm*, vol. 22 n.º 3, 2003, pp. 102-113
- KOESTLER, R. J.; MATHEWS, T. (1994) Application of anoxic treatment for insect control in manuscripts of the library of Megistri Laura, Mount Athos, Greece. En *Actes des Deuxièmes Journées International d'Etudes de l'ARSAG*. París: ARSAG, 1994, pp. 59-62

- LERASANTÍN, A. DE (2011) *Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa* [en línea] Tesis Doctoral. Euskal Herriko Unibertsitatearen Argitalpen Zerbitzua <<https://addi.ehu.es/handle/10810/14292>> [Consulta: 01/05/2018]
- MALAYSIAN PALM OIL BOARD (2006) A method and device for dissemination of entomopathogens involving a temporary trap with an insect attractant and an entomopathogen. Patent n.º 2426196, United Kingdom
- MARTIARENA, X. (1992) Conservación y restauración. *Cuadernos de la sección de Artes Plásticas y Documentales*, n.º 10, 1992, pp. 177-203
- MASCARIN, G.; JARONSKI, S. (2016) The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32 n.º 11, 2016, pp. 177
- MAZARIEGOS-HURTADO, L. (2016) Pest control formulation composed of *Beauveria bassiana*, cold pressed Neem oil and refined Pyrethrum extract, and methods of making and using same. Patent n.º 20160128340A1, United States
- MONZÓN, A. (2001) Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integral de Plagas*, vol. 63, 2001, pp. 95-103
- MORALES, R.; BLANCO P.; LALANA, P. et ál. (2013) Extractos naturales para la desinfección y desinsectación de bienes culturales. Las plantas medicinales y el patrimonio histórico. En *La Ciencia y el Arte IV. Ciencias experimentales y conservación del patrimonio*. Madrid: Edición Secretaría General Técnica. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, España, 2013, pp. 148-162
- MOSLIM, R.; HISHAM, N.; BASRI, M. et ál. (2005) Mass production of *Metarhizium anisopliae* using solid state fermentation and wet harvesting methods. *Proceedings of the PIPOC 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability)*, 2005, pp. 928-942
- NICHOLL, D. S. (2008) *An introduction to genetic engineering*. Cambridge: University Press, 2008
- PEREIRA, R. M.; ROBERTS, D. W. (1990) Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 56, n.º 1, 1990, pp. 39-46
- POSADA-FLÓREZ, F. J. (2008) Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. *J. Insect. Sci.*, vol. 8, n.º 41, 2008, pp. 1-13
- PUCHETA, M.; FLORES, A.; RODRÍGUEZ, S. et ál. (2006) Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, vol. 31, n.º 12, 2006, pp. 856-860
- QUIOT, J. M.; VEY, A.; VAGO, C. (1985) Effects of mycotoxins on invertebrate cells in vitro. *Adv. Cell Culture*, vol. 4, 1985, pp. 199-211
- RETNAKARAN, A.; KRELL, P.; FENG, Q. et ál. (2003) Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, vol. 54, n.º 4, 2003, pp. 187-199
- REY, S. M.; LEE, Y. U.; CARBO, M. T. (2011) Evaluación del empleo de biocidas naturales en mezclas adhesivas de base proteica. *Arché*, 6, 2011, pp. 273-278
- ROBLEDO Y MONTERRUBIO, M. S. (2011) *Obtención y análisis de cepas más virulentas de Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.* Tesis Doctoral. UAM-Iztapalapa, Posgrado en Biotecnología. Ciudad de México, México, 2011
- RUIZ HERRERA, J. (2013) *Viaje al asombroso mundo de los hongos*. México: Fondo de Cultura Económica, 2013
- SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, vol. 56, n.º 7, 2010, pp. 1267-1274
- SEEMA, Y.; NEERAJ, T.; KRISHAN, K. (2013) Mass production of entomopathogens *Beauveria Bassiana* and *Metarhizium anisopliae* using rice as a substrate by diphasic liquid-solid fermentation technique. *International Journal of Advanced Biological Research*, n.º 3, 2013, pp. 331-335
- STONER, J. H. (2005) Changing approaches in art conservation: 1925 to the present. En *Scientific Examination of Art. Modern Techniques in Conservation and Analysis*. Washington, D.C., USA: The National Academies Press, 2005, pp. 40-57
- TANADA, Y.; KAYA, K. H. (ed.) (1993) *Insect Pathology*. San Diego, California, USA: Academic Press, Inc., 1993, pp. 318-387
- TÉLLEZ-JURADO, A.; CRUZ RAMÍREZ M. G.; MERCADO-FLORES, Y. et ál. (2009) Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev. Mex. Mic.*, vol. 30, 2009, pp. 73-80
- TORRE-MARTÍNEZ, M. M. DE LA; ASSAF TORRES, A. J. (2010) Una mezcla y un método de entomopatógenos para el control de insectos *Planococcus ficus*, en plantas de la vid. Patente MX 2009000083 A, México
- TORRES, H.; ORTEGA, A.; ALCÁZAR, J. et ál. (1993) Control biológico del gorgojo de los Andes (*Premnotrypes* spp.) con *Beauveria brongniartii*. Guía de investigaciones, vol. 8, 1993
- VALENTÍN, N. (2003) Análisis de biodeterioro: infestaciones y su erradicación. *Bienes culturales: Revista del Instituto del Patrimonio Histórico Español*, 2003, n.º 2, (ejemplar dedicado a: Retablos), pp. 175-186

- VALLEJOS SIRPA, J. G; ESPINAL CHURATA, C.; MOLLINEDO, P. et ál. (2014) Evaluación de la actividad insecticida y quitinolítica de *Trichoderma inhamatum* y *Beauveria bassiana* en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. *Rev. Boli. Quim.*, vol. 31, n.º 1, 2014, pp. 5-9
- WEEKS, E.; MACHTINGER, E.; GEZAN, S. et ál. (2017) Effects of four commercial fungal formulations on mortality and sporulation in house flies (*Musca domestica*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Med. Vet. Entomol.*, vol. 31, n.º 1, 2017, pp. 15-22
- WITTMER, I. K.; BADER, H. P.; SCHEIDEGGER, R. et ál. (2010) Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. *Water Res.*, vol. 44, n.º 9, 2010, pp. 2850-2862