

PRODUCCIÓN MASIVA DE *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON MEDIANTE UNA ALTERNATIVA DE CULTIVO BIFÁSICO

A. Méndez, E. del Pozo, Irma García

*Departamento de Sanidad Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana (UNAH),
Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: amaury@isch.edu.cu*

RESUMEN: En este trabajo se utilizó el aislamiento Nr-003 de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, conservado en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana, con el objetivo de producir masivamente dicho hongo por el método bifásico. Para la primera fase se utilizaron los medios de cultivo líquido siguientes: melaza-extracto de levadura, melaza-levadura torula, extracto de levadura, levadura torula y melaza, inoculados con una suspensión de conidios a una concentración de $3,5 \times 10^7$ conidios.mL⁻¹, evaluándose la biomasa (g.L⁻¹ de masa seca) a los tres días. Por otro lado, se evaluó a los 14 días la producción de conidios aéreos en arroz entero, en tres variantes de precocinado: en autoclave, a 121°C por 12 minutos; en un recipiente se añadió agua en una proporción de 300 mL por cada kilogramo de arroz y se dejó cocinar hasta que se gastó el líquido; y por último, se añadió el arroz en un recipiente con suficiente agua en ebullición y se precocinó durante cinco minutos. El hongo produjo biomasa en todos los tratamientos; sin embargo, se destacó el de melaza-extracto de levadura con un valor de 11,67 g.L⁻¹. La mayor producción de conidios se obtuvo en las variantes donde el arroz fue precocido en agua (en el orden de 10^{10} conidios.g⁻¹, en comparación con el precocido en autoclave (en el orden de 10^9 conidios.g⁻¹).

(Palabras claves: *Nomuraea rileyi*; producción masiva; cultivo bifásico)

MASS PRODUCTION OF *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON BY AN ALTERNATIVE OF BIPHASIC CULTURE

ABSTRACT: The isolate Nr-003 of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson from the Crop Protection Laboratory of the Agronomy Faculty, Agrarian University of Havana, was used with the objective of mass producing this fungus by using the biphasic method. In the first phase the following liquid media were used: molasses-yeast extract, molasses-torula yeast, yeast extract, torula yeast and molasses. They all were inoculated with a conidial suspension at a concentration of $3,5 \times 10^7$ conidia.mL⁻¹ and incubated with agitation at room temperature and the biomass produced (g.L⁻¹, dry weight) evaluated three days after inoculation. In addition, the production of airborne conidia was evaluated in three variants of precooked rice; in an autoclave at 121°C for 12 minutes; in a pan with 300 mL of water per kilogram of rice and cooking until drying; and submerging the rice in boiling water for five minutes. The fungus produced biomass in all the liquid media; however, the highest value was obtained in the variant with molasses-yeast extract, which yielded 11,67 g.L⁻¹ of dry biomass. The highest amount of conidia were obtained when the rice was precooked in boiling water (10^{10} conidia.g⁻¹ of rice), in comparison with the variant where the cereal was autoclaved (10^9 conidia.g⁻¹ of rice).

(Key words: *Nomuraea rileyi*; mass production; biphasic culture)

INTRODUCCIÓN

Los bioplaguicidas basados en bacterias, virus, nematodos y hongos son considerados frecuentemente como buenos agentes de control de insectos nocivos. El uso de hongos entomopatógenos en el control de plagas se ha incrementado a nivel global en las últimas décadas (1). La producción de un inóculo en cantidades adecuadas y con buena calidad es un componente esencial para que estos microorganismos sean empleados en programas de manejo de plagas (2, 3, 4).

El desarrollo de medios biológicos para el control de insectos nocivos lleva implícito la búsqueda de patógenos eficaces, desarrollar métodos mediante los cuales se puedan obtener biopreparados masivamente e ir sustituyendo gradualmente las aplicaciones químicas sobre la base de la efectividad de los medios biológicos aplicados (3).

El hongo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson ha sido informado como patógeno de más de 30 especies de larvas de lepidópteros, principalmente cuando estas se encuentran en condiciones de tiempo húmedo (5). Ha sido aislado, fundamentalmente, a partir de insectos muertos y de suelos cultivados (6), encontrándose muy asociado a fitófagos importantes, como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), en campos de maíz (7). En Cuba, se han obtenido buenos resultados cuando se ha utilizado para el control de dicha especie (8).

Aunque se reconoce la potencialidad del hongo como agente de control biológico, aún no ha sido ampliamente utilizado como micoinsecticida (1). En los últimos años se han logrado avances en su reproducción masiva, pero aún es necesario continuar trabajando en esa dirección (8, 9, 10).

La mayoría de las especies de hongos deben ser producidas en medios sólidos, donde el hongo crece como micelio superficial y produce conidios en hifas aéreas. Sustratos naturales como el arroz o el salvado de trigo constituyen medios de cultivo adecuados para ese propósito. Sin embargo, la producción de hongos en sustratos sólidos dificulta la automatización del proceso y carece de una economía de escala satisfactoria (11). Debe tenerse en cuenta que para el control de insectos nocivos con hongos generalmente se requieren de 10^5 a 10^6 conidios.cm²⁻¹ de superficie foliar.cm³⁻¹ de suelo, para lo cual se necesitarían de 10 a 15 kg de sustrato sólido, con buena esporulación del hongo, para cada hectárea a tratar (12).

Por otro lado, pocas especies, como *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin e *Hirsutella thompsonii*

Fisher, pueden producir conidios en cultivos sumergidos. Este problema puede ser parcialmente resuelto por un proceso de producción en dos fases (cultivo bifásico), en el que los cultivos sumergidos son usados para producir una gran cantidad de micelio, el cual es colocado después sobre un sustrato sólido para obtener los conidios necesarios (11). El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar alternativas para la producción masiva de *N. rileyi* mediante el cultivo bifásico.

MATERIALES Y MÉTODOS

El aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* utilizado en los ensayos, se obtuvo a partir de larvas de *S. frugiperda* infectadas, colectadas en campos de maíz establecidos en el municipio Quivicán, provincia La Habana. El aislamiento es conservado en cuñas de agar con una fina capa de aceite mineral y refrigerado, en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de La Habana.

Producción de biomasa del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* en diferentes medios de cultivo líquido con agitación

Los medios de cultivos empleados y su composición se muestran en la Tabla 1. En todos los casos, para su preparación, se utilizó agua destilada.

TABLA 1. Medios de cultivo líquidos utilizados en el ensayo. / *Liquid culture media used in the experiment*

Componentes	Cantidad
Melaza - extracto de levadura	20 mL.L ⁻¹ - 20 g.L ⁻¹
Melaza - levadura torula	20 mL.L ⁻¹ - 20 g.L ⁻¹
Extracto de levadura	20 g.L ⁻¹
Levadura torula	20 g.L ⁻¹
Melaza	20 mL.L ⁻¹

Se utilizaron frascos erlenmeyers de 250 mL a los cuales se les añadió 75 mL de medio de cultivo, se taparon con tapones de algodón y gasa y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min. Después de enfriado, cada frasco se inoculó con 2 mL de una suspensión de conidios con una concentración de $3,5 \times 10^7$ conidios.mL⁻¹, preparada con agua destilada estéril y Tween 80, a una concentración de 0,05%, a partir de una colonia del hongo en Agar Extracto de Malta, de 15 días de edad. Posteriormente, los frascos se incubaron en una zaranda, a 120 golpes.min⁻¹ y una temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C. Para el montaje del ensayo se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones por tratamiento. A

los tres días se evaluó la biomasa formada, la cual se separó del sustrato por filtración usando una bomba de vacío y papel de filtro, y se colocó en una estufa a 80°C durante 24 horas con el objetivo de obtener la masa seca, la cual se expresó en g.L⁻¹.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de clasificación simple, y para la comparación de las medias se utilizó la Prueba de Tukey con un nivel de significación de 0,05%.

Producción de conidios aéreos en arroz

Para la producción de conidios se utilizó un sustrato sólido constituido por arroz entero, al cual se le varió la forma de preparación, específicamente en el paso de precocido, constituyendo cada una de estas variantes un tratamiento.

Tratamiento 1: El arroz se lavó tres veces, se dejó en remojo por 1 h, se escurrió durante 0,5 h, y se precoció en autoclave a 121°C durante 12 minutos.

Tratamiento 2: El arroz se lavó tres veces, se dejó en remojo por 1 h, se escurrió durante 0,5 h, se colocó en un recipiente con una proporción de 300 mL de agua por cada kilogramo de arroz y se dejó cocinar hasta que el agua se gastó.

Tratamiento 3: El arroz se lavó tres veces, se dejó en remojo por 1 h, se escurrió durante 0,5 h, y se colocó en un recipiente que contenía agua en ebullición, donde se mantuvo solo por cinco minutos.

En los tres casos, después de precocido, el arroz se dejó enfriar en una bandeja, después se colocaron 200 g del mismo en bolsas de polipropileno, las cuales se sellaron y se esterilizaron en autoclave, a 121°C por 20 minutos. A cada uno de los tratamientos se le determinó la humedad final con la ayuda de una balanza infrarroja (Saltorius).

Las bolsas con arroz se inocularon con 75 mL de un inóculo de *N. rileyi* obtenido en un medio líquido agitado elaborado a base de melaza (20 mL.L⁻¹) y extracto de levadura (20 g.L⁻¹). Después de inoculadas las bolsas se incubaron a una temperatura de 25,0±2,0°C. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por tratamiento.

A los siete días, el sustrato sólido cubierto completamente de micelio, se extrajo de las bolsas y se colocó en bandejas, llegando a estar completamente esporulado a los 14 días después de la inoculación.

Para determinar la producción de conidios, de cada bolsa se tomó un gramo de sustrato y se colocó en un tubo de ensayos que contenía 10 mL de agua des-

tilada más Tween 80 a una concentración de 0,05%, y se agitó en un Vortex durante 1 min para separar los conidios del arroz. El conteo de conidios se realizó con la cámara de Neubauer. Finalmente, los rendimientos fueron expresados en conidios.g⁻¹ de sustrato.

Los datos obtenidos fueron transformados a su logaritmo (log₁₀) y procesados mediante un análisis de varianza de clasificación simple. Para la comparación de medias se utilizó la Prueba de Tukey con un nivel de significación de 0,05%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción de biomasa del aislamiento Nr-003 de *N. rileyi* en diferentes medios de cultivo líquido con agitación

El análisis estadístico realizado mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Como puede observarse en la Figura 1, el hongo produjo biomasa en todos los tratamientos ensayados; sin embargo, se destaca el de melaza-extracto de levadura, en el que se registró a los tres días un valor de 11,67g.L⁻¹ de masa seca, con diferencias significativas sobre el resto de los tratamientos. Los valores menores en la producción de biomasa se obtuvieron en las variantes donde se utilizó solo el extracto de levadura o la melaza, sin diferencias significativas entre ellas.

Los resultados mostrados corroboran lo señalado por otros autores en cuanto a que la producción de biomasa de los hongos mitospóricos se ve favorecida en aquellos medios de cultivo capaces de aportar no solo carbono, sino también nitrógeno (12,13). Se ha señalado que la cantidad de carbono presente en el medio de cultivo, así como la relación carbono:nitrógeno, influye grandemente en diferentes procesos del desarrollo de estos hongos, y que dicha influencia es dependiente del aislamiento fungoso (14).

El extracto de levadura ha sido muy utilizado como fuente de nitrógeno en medios de cultivo líquido para la producción de hongos mitospóricos (11,13), informándose de buenos resultados en el caso de *N. rileyi* (9,10). Se hizo evidente que la adición de melaza al medio de cultivo, como fuente de carbono, resultó favorable. Aunque la melaza es una mezcla de azúcares en la que predomina la sacarosa, también contiene fructosa y glucosa, así como vitaminas y otros elementos que también podrían ser esenciales para el desarrollo del hongo (15).

En otros trabajos, la glucosa ha resultado más favorable que la sacarosa para la producción de biomasa, tanto en hongos mitospóricos como en

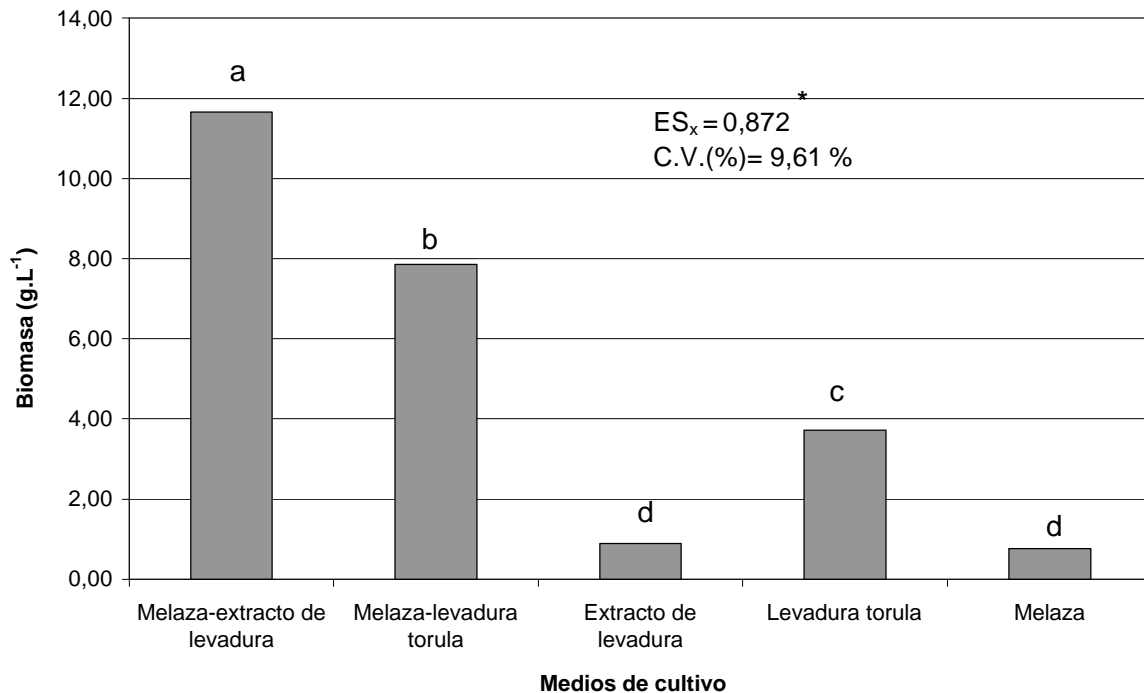


FIGURA 1. Producción de biomasa de *Nomuraea rileyi* en diferentes medios de cultivo líquidos en agitación./ *Biomass production by Nomuraea rileyi in agitated liquid culture media.*

Medias con letras iguales no difieren significativamente, según Tukey ($p \leq 0,05$).

entomophthorales (16). Además, es importante considerar que la melaza es un subproducto en el proceso de obtención de sacarosa a partir de la caña de azúcar, por lo que resulta un producto relativamente barato en el caso de Cuba, aspecto este que debe ser considerado a la hora de seleccionar los componentes de un medio de cultivo para un proceso de producción masiva (17).

La mayor producción de biomasa en la combinación melaza-extracto de levadura en relación con la de melaza-levadura torula sugiere que este último

componente nitrogenado aporta una menor cantidad de nutrientes asimilables por el hongo que el extracto de levadura.

Producción de conidios aéreos en arroz

El análisis estadístico realizado mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Como puede observarse en la Tabla 2, el hongo produjo conidios en todas las variantes, destacándose los tratamientos 2 y 3, sin diferencias estadísticas entre ellos, donde se obtuvieron valores de $1,40 \times 10^{10}$ y $1,68 \times 10^{10}$ conidios.g⁻¹ de sustrato, respectivamente.

TABLA 2. Producción de conidios de *Nomuraea rileyi* en los diferentes tratamientos./ *Conidia production by Nomuraea rileyi in the different treatments*

Tratamientos	Humedad del sustrato (%)	X orig.	X transf.
Arroz precocido en autoclave (T1)	24,98	$1,05 \times 10^9$	9,02 b
Arroz cocinado hasta gastar el agua (T2)	38,58	$1,40 \times 10^{10}$	10,14 a
Arroz cocinado cinco minutos (T3)	34,96	$1,68 \times 10^{10}$	10,22 a
C.V. (%)			0,51
ESx			0,071*

Medias con letras iguales no difieren significativamente, según Tukey ($p \leq 0,05$).

Los hongos entomopatógenos desarrollados sobre arroz en bolsas plásticas bajo un sistema de producción artesanal han alcanzado rendimientos del orden de 10^{10} conidios.g⁻¹, aunque lo más frecuente, en la mayoría de las especies, han sido los valores de 10^9 conidios.g⁻¹ (11, 17). En el caso de la producción de conidios de *N. rileyi* sobre un sustrato a base de arroz, generalmente se han alcanzado producciones en el orden de 10^{10} conidios.g⁻¹ de sustrato (9,10).

En los tratamientos 2 y 3, donde el precocido se realizó con agua, los valores de humedad alcanzados en el sustrato antes de inocular las bolsas, fueron de 38,58 y 34,96%, respectivamente. Según algunos autores, el contenido de humedad del sustrato sólido es un parámetro determinante en el rendimiento de conidios de los hongos mitosporicos, debiendo estar entre un 35 y un 60%. El efecto se debe, fundamentalmente, a la relación que existe entre el contenido de humedad y la disponibilidad de oxígeno (17, 18), elemento este que es indispensable en el caso de la esporulación de *N. rileyi* (9).

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la combinación de melaza y extracto de levadura resultó ser un medio líquido adecuado para la producción de biomasa del hongo entomopatógeno *N. rileyi*, mientras que el arroz entero, mediante un proceso de precocido en agua, resultó muy efectivo para la producción de conidios del hongo, por lo que ambas alternativas deben continuar evaluándose para su posible introducción en un programa de producción masiva de dicho hongo mediante el método bifásico.

REFERENCIAS

1. Faria M, Wraight SP. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 2007;43:237-256.
2. Avery P, Faulla J, Simmonds, M. Effect of different photoperiods on the infectivity and colonization of *Paecilomyces fumosoroseus*. *Insect Sci*. 2004;4:38.
3. Cuadra R, Castañeda R, Rodríguez N. Patogenicidad de una cepa cubana de *Paecilomyces fumosoroseus* sobre *Meloidogyne incognita*. *Rev. Protección Veg*. 2000;15(2):114-17.
4. Sharma K. Bionatural management of pests in organic farming. *Agrobios Newsl*. 2004;2:296-325.
5. Devi U, Mohan C, Padmavathi J, Ramesh K. Susceptibility to Fungi of Cotton Bollworms before and after a natural epizootic of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Biocontrol Sci Technol*. 2003;13(3):367-371.
6. Bing S, Yu H, Chen A, Liu X. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. *Crop Protection*. 2008;27:1421-1426.
7. Wyckhuys KA, O'Neil RJ. Population dynamics of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) and associated arthropod natural enemies in Honduran subsistence maize. *Crop Protection*. 2006;25:1180-1190.
8. Méndez A, del Pozo E, García I. Producción de biomasa del aislamiento (Nr-r003) de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson en diferentes medios de cultivos líquidos con agitación y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Rev. Protección Veg*. 2007;22(1):118-123.
9. Devi PS, Chowdary A, Prasad YG. Cost-effective multiplication of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson. *Mycopathologia*. 2001;151(1):35-39.
10. García I, del Pozo E, Méndez A, Céspedes Y. Producción de biomasa de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, aislamiento Nr-003, en diferentes medios de cultivos líquidos, con agitación. *Rev. Protección Veg*. 2006;21(3):173-177.
11. Wraight S, Jackson M, Kock S. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt TM, Jackson C, Magan N, editors. *Fungi as Biological Control Agent: Progress, Problems and Potencial*. CAB International. 2001.
12. Van Driesche R, Hoddle S, Center T. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. The Forest Health Technology Enterprise Team (FHTET), United States Department of Agricultura (USDA). 2007; p. 431-442.
13. Safavi SA, Shah FA. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus

- Beauveria bassiana*. FEMS Microbiology Letters. 2007;270(1):116-123.
14. Gao L, Sun MH. Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. Mycol Res. 2007;111(1):87-92.
15. Anónimo. Typical Composition of U. S. Sugar's Heavy Mill Run Cane Molasses, 2003. (En línea). Disponible en: <http://www.sugarlik.com/molasses/composition.html>. (Consultado: 25 feb 2009).
16. Leite LG, Alves SB, Batista A, Roberts DW. Effect of salts, vitamins, sugars and nitrogen sources on the growth of three genera of Entomophthorales: *Batkoa*, *Furia*, and *Neozygites*. Mycol Res. 2003;107:872-878.
17. Sahayaraj K, Karthick S. Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and byproducts. Afr J Biotechnol. 2008;7(12):1907-1910.
18. Bhanu Prakash GVS, Padmaja V, Siva Kiran RR. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae*. Bioresource Technology. 2008; 99(6):1530-1537.

(Recibido 11-6-2009; Aceptado 14-10-2009)

ORIENTACION DE SUS PRINCIPALES RESULTADOS :

...al Servicio de la Salud Agropecuaria



40
años

Fundado en 1969, el CENSA entra en su quinto decenio con un trabajo sostenido y resultados de impacto en la economía y la sociedad