

## ARTICULOS GENERALES

# Evaluación de tres sistemas de agitación para la producción de blastosporas del hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin

## Evaluation of three systems of agitation for the production of blastosporas of the mushroom *Beauveria bassiana* (Balm) Vuillemin

Paddy L. Villalba M. , Horacio Grillo Ravelo y Rene Cupull S.

Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas , Santa Clara, Cuba.

E-mail: [hgrillo@uclv.edu.cu](mailto:hgrillo@uclv.edu.cu)

---

**RESUMEN.** *Beauveria bassiana*, cepa LBb-1, es uno de los hongos más usados en Cuba como control biológico de plagas de insectos, pero se requiere en grandes cantidades porque satisface solo una pequeña proporción del sustrato para su desarrollo. Esto representa un problema porque demanda más insumos, disponibilidad y tiempo. Como una salida alternativa resulta la producción de blastosporas como preinóculo en medio líquido agitado, que se produce en dependencia del grado de automatización del medio. Por ello se evaluaron tres sistemas de agitación: orbital, lineal y de transmisión magnética, donde se prepararon dos muestras por agitador haciendo los conteos de concentración de blastosporas a las 4, 8, 24, 28 y 32 horas. Los resultados obtenidos indican una mayor producción de blastosporas bajo un sistema de agitación mecánica de transmisión magnética alcanzando un título de  $1,62 \times 10^8$  blastosporas/mL, a las 24 horas, por lo que resulta efectivo para la producción en masa del hongo optimizando su crecimiento y a menor tiempo.

**Palabras clave:** *Beauveria bassiana*, medio líquido agitado, producción.

**ABSTRACT.** *Beauveria bassiana*, strain LBb-1, is one of the more used fungi in Cuba as biological control of pests of insects, but it is required in big quantities because it satisfies alone a small proportion of the substrate for its development. This represents a problem because demand more inputs, their readiness and time. As an alternative exit it is the production blastosporas like preinóculo between upset liquid that takes place in dependence of the degree of automation of the means. For it was evaluated it three agitation systems: orbital, lineal, and of magnetic transmission. Where they got ready two samples for agitator making the counts of blastosporas concentration at the 4, 8, 24, 28 and 32 hours. The obtained results indicate a bigger production of low blastosporas a system of mechanical agitation of magnetic transmission reaching a title of  $1,62 \times 10^8$  blastosporas/mL, at 24 hours; so, it is effective for the mass production of the fungus optimizing their growth and at smaller time.

**Key words:** *Beauveria bassiana*, half liquid upset, production.

---

## INTRODUCCIÓN

El hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin ha sido utilizado exitosamente para controlar plagas de muchas regiones del mundo como parte de las estrategias de manejo integrado de plagas. Por sus características patogénicas para controlar insectos, su factibilidad de reproducción en forma artificial y la rentabilidad de su uso, este hongo representa una alternativa viable al ser utilizado sin perjuicios al medio ambiente y sin efectos tóxicos. (Baeteman, 1997)

En Cuba hace más de treinta años que comenzaron los primeros ensayos con este entomopatógeno, y actualmente se produce con gran calidad. El método de reproducción más empleado es el artesanal donde se utiliza como sustrato sólido cabecilla de arroz fundamentalmente.

La cepa de *B. bassiana* más extendida en la producción es LBb-1. Anualmente se entrega una réplica de transferencia 1 a los laboratorios

provinciales de sanidad vegetal con el fin de que estos la repliquen y a su vez entreguen la cepa a los Centros Reproductores (CREE). (Elósegui, Nieves, Díaz, Bel Padrón y Carr, 2003). EL cultivo puro obtenido sobre cuñas de medio agarizado nutritivo es utilizado como inóculo en el sustrato sólido, y actualmente se requiere en grandes cantidades porque satisface solo una pequeña proporción del sustrato para su desarrollo. Esto representa un problema porque demanda más insumos, su disponibilidad y tiempo. Una salida alternativa resulta la producción del cultivo puro como preinóculo en medio líquido agitado, donde el crecimiento del hongo como cuerpos hifales o blastosporas puede producirse en forma dispersa o como pequeñas colonias, denominadas pellets, en dependencia del grado de automatización del medio que permite la máxima eficiencia en términos de cantidad, de la biomasa requerida para cubrir la superficie disponible (Lema y Roca, 1998; Elósegui, 2006). La agitación puede ser recíproca (de vaivén) o giratoria homogenizándose el medio, donde luego pasa como inóculo al soporte sólido.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la obtención de blastosporas de *B. bassiana* en un medio de cultivo líquido sobre tres sistemas de agitación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en los laboratorios de Sanidad Vegetal del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central de Las Villas, municipio de Santa Clara, Cuba. La investigación se llevó a cabo entre los años 2009-2010.

### Aislamiento

Se utilizó el aislamiento de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Curculionidae) conocido como Bcafe-18 de *B. bassiana*, contenida en un tubo de ensayo de Agar nutriente PDA (Agar papa dextrosa), del laboratorio de Sanidad Vegetal del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP).

### Producción de blastosporas en cultivo líquido sobre tres sistemas de agitación

Se prepararon 6 medios de cultivo líquido en erlenmeyers, que contenían una mezcla previamente

preparada de:

15 g de miel final  
1,5 g de levadura  
500 mL de agua.

La mezcla se ajustó a un pH de 6 y se homogenizó con una varilla por unos segundos. Posteriormente a los erlenmeyers se puso un tapón de algodón para luego ser esterilizada en la autoclave a una temperatura de 121°C por 20 minutos. Se dejó enfriar la mezcla y se inoculó con un cultivo puro. Todo el proceso se llevó a cabo en una Cámara de Flujo Laminar con la disposición de un asa de siembra, mechero y alcohol para evitar cualquier contaminación. Por último se dejó cada dos matraces en cada agitador por 32 horas, donde se hicieron las evaluaciones de concentración de blastosporas a las 4, 8, 24, 28 y 32 horas. Siendo estos:

1. Zaranda de agitación orbital, es un equipo de movimiento giratorio de 130 rpm. Esta agitación permite el crecimiento del hongo con la elongación polar y bipolar del micelio en mayor proporción, en relación con la división de las blastosporas que es menor debido al movimiento dirigido en un solo sentido.

2. Zaranda de agitación lineal, es un equipo de movimiento de vaivén de 120 rpm, que permite una mayor división de las blastosporas por el choque que existe entre las partes sólidas.

3. Agitador mecánico de transmisión magnética, es un proceso de automatización rápida, turbulenta; que actúa mediante una bala magnética, el mismo que se encarga de romper las hifas del micelio produciendo las blastosporas. El agitador se programó para que funcione 15 min por hora, y el resto del tiempo se dejó para la formación de nuevas células.

### Conteo de la concentración de blastosporas obtenidas en los agitadores

Para la determinación de las concentraciones se prepararon suspensiones de blastosporas, donde en tubos de ensayo se colocó 1 mL del líquido con blastosporas más 19 mL de agua destilada con una dilución de  $20^{-1}$ . Luego con una pipeta

Pasteur, se tomó una alícuota de la suspensión homogénea de blastosporas, se colocó en la ranura lateral de una cámara de Neubauer y se realizaron los conteos de conidias en 5 campos de la cámara para obtener el promedio de blastosporas de cada medio de cultivo sobre los diferentes medios de agitación (Pariona, Castellanos y León, 2007). Todos los conteos se realizaron en un microscopio de 400x de aumento.

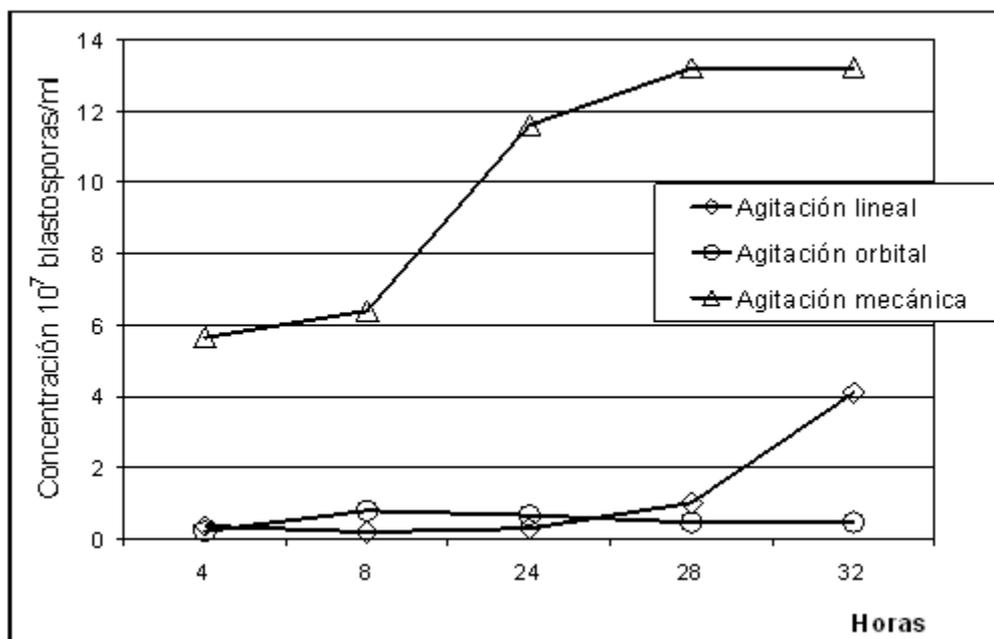
### Análisis estadístico de los resultados obtenidos

En todas las evaluaciones se realizó Análisis de Varianza, Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, con el paquete estadístico Statgraphics versión 5 .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los tres sistemas de agitación probados: zaranda de agitación orbital, zaranda de agitación lineal y agitador mecánico de acción magnética, se obtuvo un buen crecimiento del microorganismo. Resultó mejor significativamente el agitador mecánico de transmisión magnética,

ya que su concentración se encontró 20 veces superior en comparación con la concentración obtenida en los otros dos sistemas de agitación, resultado que mostró un mismo comportamiento en todos los intervalos de tiempo. (figura 1)



**Figura 1. Producción de blastosporas bajo diferentes sistemas de agitación, con una diferencia significativa para la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $P \leq 0,05$ )**

De este modo Znidarsic y Pavko (2001) consideran que el crecimiento de la biomasa o rendimiento está influenciado por variables de ingeniería, propiedades reológicas y la actividad metabólica del microorganismo, lo cual es importante desde el punto de vista de la productividad y el consumo de energía de los procesos.

También se debe considerar que los sistemas de agitación con un grado de automatización,

responden de diferente forma según el objetivo con el cual fueron diseñados, como es el caso de la zaranda de agitación orbital diseñada para los centros biotecnológicos para el cultivo de tejidos *in vitro*, donde el movimiento en una sola órbita o sentido no permite un intercambio gaseoso y sí la formación de cayos por los cuerpos que se encuentran, cumpliéndose así el objetivo fundamental del sistema. Por tanto es lógico el no poder encontrar una mayor masa de cuerpos hifales o blastosporas

bajo este sistema, por el hecho de que no existe una fuerza que sea lo suficientemente capaz para separar estas células del micelio y generar un nuevo ciclo de crecimiento vegetativo para el hongo. (figura 2)



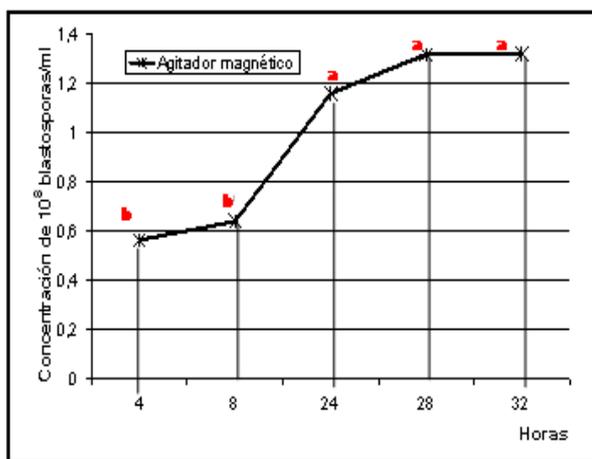
**Figura 2. Formación de micelio en condiciones de agitación orbital**

Se optimiza el crecimiento del microorganismo y la producción de blastosporas bajo un sistema de agitación mecánica de acción magnética, por el nivel de rapidez y turbulencia producido por el sistema en los 15 minutos de acción, rompiendo las cadenas de células que se forman en el tiempo de reposo de 45 minutos. (figura 3)



**Figura 3. Producción de blastosporas en condiciones de agitación mecánica**

Se observa en la producción de blastosporas en el tiempo una diferencia significativa de la producción a partir de las 24 horas, tiempo en el que se encuentran las mayores concentraciones alcanzando un título de  $1,62 \times 10^8$  blastosporas por mililitro, concentración que se mantiene equivalente a la obtenida en las últimas horas (figura 4). Por tanto, esto muestra que es posible cosechar en este tiempo, donde se obtienen las cantidades suficientes del preinóculo junto a una biomasa homogénea, que posteriormente sirve como inóculo en el sustrato coincidiendo con lo señalado por Cárdenas (1997); Jackson, Payne y Odelson (2004); y Elósegui (2006).



**Figura 4. Producción de blastosporas para el agitador mecánico de acción magnética, que presenta una diferencia significativa en el tiempo para la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $P \leq 0,05$ )**

Se observa que llevando a cabo este proceso de producción de blastosporas, aplicando este sistema de agitación mecánica, se llega a cumplir una de las ventajas mencionadas por Jenkins, Heviefio, Langewald, Cherry y Lomer (1998), que consiste en la rápida colonización del hongo reduciendo el tiempo de incubación. Teniendo en cuenta que además de acelerar el proceso se obtiene un producto de buena calidad.

## CONCLUSIONES

1. La producción de blastosporas presentó un crecimiento óptimo bajo un sistema de agitación mecánica de transmisión magnética, por lo que resulta efectivo para la producción en masa del hongo.
2. La cosecha de las blastosporas puede realizarse a las 24 horas de inoculado el medio de cultivo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Baeteman R: "The development of a mycoinsecticide for the control of locust and grasshoppers", Outlook on Agriculture. 26:13-18, 1997.
2. Cárdenas H.M.: Producción masiva de hongos entomopatógenos en medio líquido y difásico, en II Curso-Taller de Producción Masiva de Agentes de Control Microbiano, Tecoman, Col. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, 1997.

3. Elósegui O.: Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Ciudad de la Habana, Cuba, 61pp., 2006.
4. Elósegui, O.; C. Nieves; R. Díaz; N. Bel Padrón & A. Carr: Comportamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Cepa lbb-1 en Agar Sabouraud Dextrosa producido en Cuba, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Ciudad de La Habana, Cuba. *Fitosanidad*. 7(2): 49-53, junio de 2003.
5. Jackson M. A.; R. Payne & A. Odelson: "Liquid-culture production of blastosporas of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment", *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 31: 149-154, 2004.
6. Jenkins E. N.; G. Heviefó ; J. Langewald ; A. J. Cherry, & J. Lomer: "Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides", *Biocontrol New and information* 19(1):21-31, 1998.
7. Lema R; B.Roca: "Biorreactores no convencionales", en *Ingeniería Bioquímica*, Editorial Síntesis, pp. 189-214, 1998.
8. Pariona N.; P. Castellanos & E. León: Capacidad entomocida de cepas nativas de *Beauveria* sp. sobre *Schistocerca piceifrons peruviana* (Lynch Arribalzaga, 1903). © Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. Venezuela. Apartado 110058, Lima 11, Perú. *Rev. peru. biol.* 14(2): 253-257, diciembre. Version Online ISSN 1727-9933. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/biologia/v14n2/pdf/a12v14n2.pdf> [Consultado: 27 de agosto 2009].
9. Znidarsic P. & A. Pavko: "The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as Bioprocess Parameter". *Food technical Biotechnology*, 39 (3): 237-252, 2001.

Recibido: 15/07/2009

Aceptado: 28/09/2009