

INFLUENCIA DE LA CARGA MICROBIANA CONTAMINANTE INICIAL DEL SUSTRATO EN LA CALIDAD FINAL DE BIOPREPARADOS DE *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFAI Y *BEAUVERIA BASSIANA* (BALSAMO) VUILLEMIN

Orestes Elósegui, Orietta Fernández-Larrea y Aidanet Carr

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, c.e.: oflarrea@inisav.cu

RESUMEN

Se estudió el nivel de esterilidad logrado a diferentes regímenes de esterilización en sustratos usados en la producción de *Beauveria* y *Trichoderma*, y su influencia en la calidad final del producto en Centros Reproductores de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) del occidente de Cuba. Se demostró que el régimen de esterilización debe ajustarse según la carga de contaminantes de la materia prima. En los productos de *Trichoderma* el 92% de las muestras tuvo una carga de contaminantes igual o mayor que 10^7 UFC/g. En contraste, para los de *B. bassiana* el 23% de las muestras presentó una carga de contaminantes de 10^7 UFC/g, con el resto de las muestras con una carga microbiana contaminante menor. En los productos de *Trichoderma* se observó una disminución de la viabilidad en producciones frescas para cargas de contaminantes del orden de 10^8 UFC/g, las que se correspondieron con la entrada temprana de contaminantes por deficiente esterilización del sustrato.

Palabras clave: control de calidad, bioplaguicidas, producción de hongos, control microbiano

ABSTRACT

The sterility achieved at differing sterilization regimes in substrates used for both *Beauveria* and *Trichoderma* mass production was studied as well as its influence on product quality in mass production centres of western Cuba. It was demonstrated that the sterilization regimes should be adjusted according to the contamination level of the substrate. A contamination level of 10^7 UFC/g or greater was found in 92% of *Trichoderma* samples. In contrast, 23% of *Beauveria* samples had a contamination level of 10^7 UFC/g meanwhile the rest of the samples had a lower contamination level. For *Trichoderma* products a decrease in viability was observed for the samples having contamination levels of 10^8 UFC/g, which belonged to the production runs developed on contaminated substrate.

Key words: quality control, biopesticides, fungus production, microbial control

INTRODUCCIÓN

Los agentes microbianos son usados ampliamente en la agricultura cubana en calidad de controles biológicos de plagas. Dentro de ellos los hongos, como ingrediente activo de los biopreparados, tienen un importante papel. Entre los de acción antagonista sobre hongos fitopatógenos está *Trichoderma*, y como patógenos de insectos se encuentran *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii* [Fernández-Larrea, 2001].

En Cuba se les realiza un control de calidad microbiológico lote a lote a las producciones obtenidas en los Centros Reproductores de Entomopatógenos (CREE), en los cuales se tiene en cuenta la viabilidad de los conidios, su concentración en la biomasa fúngica obtenida y la pureza. Cuando un lote no cumple con los valores mínimos permisibles no es liberado [NC-7205 y NC-7203].

El objetivo general del presente trabajo fue determinar el comportamiento de parámetros de calidad microbiológicos

en producciones terminadas de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* –desarrolladas sobre sustrato con diferentes niveles de esterilidad iniciales–, con el propósito de analizar su influencia en la calidad final del biopreparado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizó la carga microbiana en muestras de sustrato usado para la reproducción artesanal de *Trichoderma harzianum* y *Beauveria bassiana* antes y después de la esterilización en autoclave, en potes plásticos tapados de 430 mL capacidad efectiva, de forma cónica truncada, provenientes de ocho CREE de la región occidental de Cuba. Se ensayaron tres niveles de humedad: seco, húmedo el sustrato por 30 min y escurrido, y 10% v/p previo a la esterilización y dos tiempos: 35 y 40 min con la autoclave a carga máxima. Se usaron además tres contro-

les con el régimen recomendado de 40 min y 50% agua v/p previo a la esterilización, según la metodología de reproducción de hongos en potes plásticos de Hall *et al.* (2000).

Los sustratos se obtuvieron del almacén de los CREE y consistieron en cinco submuestras de 500 g tomadas al azar, y mezcladas en una fracción única. Para determinar el nivel inicial de contaminantes del sustrato antes de la esterilización, se tomó 1 g de cada muestra de sustrato, las que fueron resuspendidas en 10 mL de agua destilada más Tween 80 al 0,01%. Se realizaron diluciones decimales y se sembraron en placas Petri de 9 cm de diámetro con medio de cultivo agar nutriente (BIOCEN) a pH = 7,0 para conteo total de viables bacterianos, y en agar papa dextrosa (MERCK) a pH = 5,6 para la enumeración de hongos contaminantes [Manual BIOCEN, 2001].

De cada dilución se tomaron dos réplicas. Las placas se incubaron a 29°C en la oscuridad y se realizó el conteo total de viables a las 48 h para bacterias y 96 h para hongos. Se hallaron las medias correspondientes y se determinó el número de unidades formadoras de colonia por gramo de producto (UFC/g), según Jenkins *et al.* (1998) y Jenkins and Grzywacz (2000). Por muestra se efectuaron dos réplicas.

El nivel de esterilidad logrado para el producto terminado, luego del tratamiento en autoclave, se determinó en muestras de cinco potes plásticos «tarrinas» por lote, tomadas aleatoriamente y homogenizadas en una única fracción, a las que se les realizaron las siguientes pruebas:

a) *Prueba de viabilidad.* Se llevó a cabo mediante siembra en PDA de 0,1 mL de suspensiones conidiales con Tween 80 al 0,01% preparadas a partir del biopreparado final, a una concentración del orden de 10^6 esp/mL. Estas se incubaron a 28°C por 20 h para *Beauveria*, y 13 h para *Trichoderma*. El conteo de conidios se realizó en microscopio de contraste de fase (Zeiss) a 800X [Jenkins *et al.*, 1998; NC72-02,1993]. En todos los casos se tomaron dos réplicas. Se efectuaron tres conteos por réplica y los datos se expresaron en porcentaje de conidios germinados. Se hallaron las medias correspondientes. Para cada muestra se realizó un control positivo (subcultivo de la cepa reproducida) obtenido a partir del banco de hongos entomopatógenos y antagonistas del INISAV.

b) *Título de conidios.* Se determinó por medio del hemocitómetro, para lo cual se pesó 1 g de cada muestra y se resuspendió en tubos de agua destilada con tween 80 al 0,01%. Se realizaron cinco conteos por muestra y se determinó el valor medio, según Norma Cubana Biopreparados de Entomopatógenos [NC72-02,1993] y Lecuona (1996).

c) *Carga microbiana contaminante.* Se realizó el mismo procedimiento que el efectuado para la determinación de carga microbiana contaminante del sustrato explicado anteriormente, pero esta vez se tomó la muestra de un lote terminado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la *Tabla 1* se aprecia que el 92% de las muestras de *Trichoderma* tuvo una carga de contaminantes igual o mayor que 10^7 UFC/g. En relación con la viabilidad se observó una disminución (< 85%) en el 29% de las muestras analizadas, las que se correspondieron con una carga de contaminantes del orden de 10^8 UFC/g o mayor. Esta es considerada alta si se toma como referencia al producto Green Muscle de *Metarhizium anisopliae* desarrollado por LUBILOSA mediante tecnología artesanal, con una carga permisible de contaminantes menor que 10^6 UFC/g [Jenkins and Grzywacz, 2000].

La afectación en la viabilidad conidial pudo deberse a varias causas. Jenkins y Grzywacz (2000) se refieren a la influencia de metabolitos producidos por los contaminantes como decisiva en la pérdida temprana de la viabilidad en producciones frescas. De hecho, debe notarse que las muestras de *Trichoderma* con viabilidad afectada (< 85%) se corresponden con valores de carga contaminante final tan altos como 10^8 UFC/g.

Por otro lado, Moore y Higgins (1997), en *Metarhizium* y Hong *et al.* (2001) en *Beauveria*, analizaron la influencia de la humedad relativa (Hr) en la sobrevivencia de conidios en almacenaje, y llegaron a la conclusión que una Hr mayor de 4-5% puede afectar la estabilidad del conidio en un tiempo mayor de tres meses a temperaturas mayores que 17-20°C; sin embargo, aunque las muestras de la presente investigación no excedían los 20 días en condiciones de almacenaje, sí tenían Hr superior a 15%.

El 30% de las muestras tuvo un título final de conidios menor que 10^8 con/g, lo que resulta inadecuado según la norma cubana de calidad de biopreparados [Norma cubana para la producción de bioplaguicidas, 1993].

En el análisis de los bioproductos a partir de *B. bassiana*, el 23% de la carga contaminante estuvo en el orden de 10^7 UFC/g, y fue menor para el resto de las muestras. La viabilidad no estuvo afectada. El 46% de las muestras tuvo un título final de conidios menor que 10^8 con/g, lo cual es inadecuado según la norma cubana de calidad de biopreparados [NC 72-05, 1993] (*Tabla 2*).

Estos productos analizados fueron desarrollados sobre los sustratos que se muestran en la *Tabla 3*. Ellos aparecen enumerados en correspondencia con el número de muestra de las *Tablas 1* y *2*.

La mayoría de los sustratos usados en la reproducción de *Trichoderma*, bajo los regímenes de esterilización ensayados, no quedaron completamente esterilizados, contrariamente a lo que se observó para *Beauveria*. Se demostró que una parte de la carga contaminante entraba al sistema desde la primera fase, o sea, en la esterilización del sustrato (*Tabla 3*). Esta carga inicial debió incrementarse durante el proceso productivo. La carga contaminante para biopreparados terminados de *Trichoderma* fue de diez a cien veces superior con respecto a *Beauveria*.

Tabla 1. Calidad microbiológica final de muestras de *T. harzianum* procedentes de diferentes sustratos sometidos a regímenes de esterilización variables

<i>Trichoderma</i> (número de la muestra)	Título (con/g $\pm$ ES)	Germinación (% $\pm$ ES)	Contaminación Total (UFC/g $\pm$ ES))
1	$5,3 \times 10^8 \pm 0,3$	$54 \pm 1,4$	$2,3 \times 10^8 \pm 1,36$
2	$5,2 \times 10^8 \pm 0,14$	$9 \pm 0,8$	UFC $> 10^8$
4	$3,6 \times 10^9 \pm 0,1$	$28 \pm 1,1$	$5,3 \times 10^8 \pm 1,36$
5	$1,1 \times 10^8 \pm 0,1$	$90 \pm 0,6$	$3,3 \times 10^7 \pm 0,5$
6	$6,0 \times 10^7 \pm 0,1$	$96 \pm 0,3$	$2,2 \times 10^7 \pm 0,8$
7	$6,0 \times 10^7 \pm 0,1$	$96 \pm 0,5$	$2,2 \times 10^7 \pm 0,1$
8	$1,5 \times 10^9 \pm 0,1$	$13 \pm 0,5$	$2,8 \times 10^8 \pm 0,1$
9	$6,5 \times 10^8 \pm 0,1$	$96 \pm 0,4$	$8,2 \times 10^7 \pm 1,4$
10	$3,4 \times 10^9 \pm 0,1$	$95 \pm 1,1$	$8,8 \times 10^7 \pm 0,1$
11	$1,1 \times 10^9 \pm 0,1$	$98 \pm 0,3$	$9,3 \times 10^5 \pm 0,1$
12	$8,2 \times 10^7 \pm 0,1$	$94 \pm 0,3$	$1,7 \times 10^8 \pm 0,1$
13	$4,0 \times 10^7 \pm 0,1$	$95 \pm 0,3$	$6,1 \times 10^7 \pm 0,05$
14	$1,4 \times 10^9 \pm 0,1$	$85 \pm 1,1$	$6,3 \times 10^7 \pm 0,1$

ES: Error estándar.

Tabla 2. Calidad microbiológica final de muestras de *B. bassiana* procedentes de diferentes sustratos sometidos a regímenes de esterilización variables

<i>Beauveria</i> (número de la muestra)	Título (con/g $\pm$ ES)	Germinación (% $\pm$ ES)	Contaminación Total (UFC/g $\pm$ ES)
15	$4,2 \times 10^9 \pm 0,1$	$98 \pm 0,3$	$8,9 \times 10^6 \pm 0,1$
16	$1,8 \times 10^9 \pm 0,1$	$95 \pm 0,3$	$2,8 \times 10^6 \pm 0,2$
17	$1,0 \times 10^9 \pm 0,1$	$93 \pm 0,5$	$2,3 \times 10^6 \pm 0,1$
18	$4,6 \times 10^9 \pm 0,1$	$94 \pm 0,5$	$1,1 \times 10^7 \pm 1,0$
19	$4,5 \times 10^9 \pm 0,3$	$98 \pm 0,3$	$1,7 \times 10^6 \pm 0,8$
20	$1,2 \times 10^8 \pm 0,1$	$95 \pm 0,5$	$6,2 \times 10^6 \pm 0,05$
21	$4,0 \times 10^7 \pm 0,1$	$99 \pm 0,3$	$6,0 \times 10^6 \pm 0,1$
22	$4,4 \times 10^7 \pm 0,1$	$96 \pm 0,3$	$2,1 \times 10^6 \pm 0,2$
23	$3,0 \times 10^7 \pm 0,1$	$88 \pm 1,1$	$1,1 \times 10^7 \pm 0,05$
24	$5,8 \times 10^7 \pm 0,1$	$90 \pm 0,8$	$1,0 \times 10^7 \pm 0,15$
25	$9,0 \times 10^6 \pm 0,5$	$95 \pm 1,1$	$4,0 \times 10^5 \pm 0,4$
26	$2,8 \times 10^7 \pm 0,1$	$85 \pm 1,1$	$4,2 \times 10^6 \pm 0,1$
27	$1,7 \times 10^9 \pm 0,1$	$98 \pm 0,4$	$5,0 \times 10^3 \pm 0,5$

ES: error estándar.

Tabla 3. Nivel de esterilidad logrados en muestras de sustrato procedentes de CREE de occidente bajo diferentes regímenes de esterilización

a) <i>Trichoderma</i>				
Número de la muestra	Sustrato	Condiciones de esterilización	Antes (UFC/g)	Después (UFC/g)
1, 2	Cabecilla + bagacillo	121°C, 35', seco	$4,3 \times 10^8 \pm 0,13$	$3,2 \times 10^5 \pm 0,05$
4, 12	Cascarilla arroz	121°C, 40', 10% agua v/p	$2,5 \times 10^7 \pm 0,13$	$3,0 \times 10^2 \pm 0,05$
5	Cabecilla + bagacillo	121°C, 40', 10% agua v/p	$7,4 \times 10^6 \pm 0,21$	$2,0 \times 10^3 \pm 0,1$
6	Bagacillo	121°C, 40', 10% agua v/p	$7,4 \times 10^6 \pm 0,3$	$2,2 \times 10^3 \pm 0,08$
7	Cabecilla + bagacillo	121°C, 35', 10% agua v/p	$4,3 \times 10^8 \pm 0,13$	$2,3 \times 10^3 \pm 0,05$
8, 13	Cabecilla	121°C, 40', húmedo, escurrido	$3,0 \times 10^8 \pm 0,24$	$5,0 \times 10^4 \pm 0,08$
9, 10	Cabecilla + bagacillo	121°C, 40', seco	$4,3 \times 10^8 \pm 0,13$	$8,2 \times 10^4 \pm 0,08$
11, 14	Cascarilla, húmedo, escurrido	121°C, 40', agua 40% v/p	$6,3 \times 10^5 \pm 0,13$	0

CONCLUSIONES

- La esterilización deficiente del sustrato permitió la entrada de contaminantes al flujo productivo, lo que elevó la carga final de contaminantes en el biopreparado a niveles de 10^7 - 10^8 UFC/g.
- El régimen de esterilización del sustrato debe ajustarse para cada materia prima y/o su combinación, y tener en cuenta el nivel de contaminación inicial.
- En los productos de *Trichoderma* el 92% de las muestras tuvo una carga contaminantes igual o mayor que 10^7 UFC/g, mientras que para los de *B. bassiana* solo el 23% de las muestras presentó una carga de contaminante de 10^7 UFC/g.
- En los productos de *Trichoderma* se observó una disminución de la viabilidad en producciones frescas para cargas de contaminantes del orden de 10^8 UFC/g o mayor.

REFERENCIAS

- Fernández-Larrea, Orietta: *Temas interesantes acerca del control microbiológico en Cuba*, INISAV, La Habana, 2001.
- Hall, R.; Colectivo Investigadores Laboratorio Provincial Sanidad Vegetal Villa Clara y Subdirección Protección Vegetal Centro Nacional Sanidad Vegetal: «Metodología para la reproducción de hongos entomopatógenos con calidad alta y estable de forma artesanal», Centro Nacional de Sanidad Vegetal, La Habana, 2000.
- Hong, T. D.; J. Jun; R. H. Ellis; N. E. Jenkins; D. Moore: «The Effect of Storage Environment on the Longevity of Conidia of *Beauveria bassiana*», *Mycological Research* 105:597-602, 2001.
- Jenkins, N. E.; D. Grzywacz: «Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents-Assurance of Product Performance», *Biocontrol Science and Technology* 10:753-777, 2000.
- Jenkins, N. E.; D. Grzywacz: «Towards The Standardization of Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents». Chapter 18, *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures*, CAB International, 2003, pp. 247-262.
- Jenkins, N. E.; G. Heviefo; J. Langewald; A. J. Cherry; C. J. Lomer: «Development of Mass Production Technology for Aerial Conidia for Use As Mycopenicidides», *Biocontrol News and Information* 19, 21N-31N, 1998.
- Lecuona, R.: *Microorganismos patógenos empleados en el control de insectos plaga*, Talleres Gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, 1996.
- Manual BIOECN de medios de cultivo*, 2a. ed., Centro Nacional de Biopreparados, La Habana, 2001.
- Moore, D.; P. M. Higgins: «Viability of Stored Conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal, Produced Under Differing Culture Regimes and Stored with Clays», *Biocontrol Science and Technology* 7:335-343, 1997.
- Norma Cubana para la Producción de Bioplaguicidas, MINAGRI, Cuba, 1993.
- NC 72-02. Norma Cubana Biopreparados de Entomopatógenos. Métodos de ensayo. Biotecnología Agrícola, Cuba, 1993.
- NC 72-03. Norma Cubana Biopreparado del Entomopatógeno *Verticillium lecanii*. Especificaciones. Biotecnología Agrícola, 1993.
- NC 72-04. Norma Cubana Biopreparado del Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Especificaciones. Biotecnología Agrícola, Cuba, 1993.
- NC 72-05 Norma Cubana Biopreparado del Entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Especificaciones. Biotecnología Agrícola, 1993.