



A1-71 Producción del hongo nematofago *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 en fermentación sobre sustrato sólido.

Gortari, M.C.^{1,2}; Hours, R.A.²

¹Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA).
Correo electrónico: gortari@biotec.quimica.unlp.edu.ar

²Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI; UNLP, CONICET-La Plata). Correo electrónico: hours@biotec.org.ar

Resumen

Purpureocillium lilacinum es reconocido por su potencial para el control de nematodos agalladores de la raíz. La producción de hongos como agentes de biocontrol se desarrolla empleando fermentación sobre sustratos sólidos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la producción de conidias de *P. lilacinum* LPSC # 876 en 6 sustratos diferentes (residuos agroindustriales) y seleccionar el de mayor rendimiento para estudios adicionales. El afrecho de arroz (AA) produjo el máximo recuento de conidias/g de producto fermentado ($2,03 \times 10^{10}$ /g). Luego, el AA fue utilizado para evaluar la producción de conidias variando la cantidad de sustrato (altura de lecho). Se encontró una gradual disminución en el recuento de esporos a medida que aumentaba la cantidad de AA. Estos resultados indican que el AA provee los requerimientos nutricionales para la conidiogénesis de *P. lilacinum*. Sin embargo, deben optimizarse las condiciones del proceso de fermentación para escalar su producción.

Palabras-clave: control biológico; nematodo falso agallador; residuos agroindustriales.

Abstract

Purpureocillium lilacinum is recognized for its potential to control the root-knot nematode. Production of fungi as biocontrol agents is carried out using solid substrate fermentation. The objective of the present work was to evaluate the conidial production of *P. lilacinum* LPSC # 876 using 6 different substrates (agricultural wastes) to select the most suitable for subsequent studies. Rice bran (RB) yielded the highest conidial count per g of fermented substrate (2.03×10^{10} /g). Then, RB was selected to evaluate the conidial production with different amounts of substrate (height of bed). Increasing amounts of substrate resulted in a reduction in conidial counts. These results indicate that RB fulfills the nutritional requirements for sporulation of *P. lilacinum*. However, adequate fermentation conditions should be determined in order to scale up the process.

Keywords: biological control; false root-knot nematode; agricultural wastes.

Introducción

Purpureocillium lilacinum (Luangsa-ard *et al.*, 2011), anteriormente *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, es un hongo natural del suelo. El interés científico por este organismo se debe a su actividad antagónica sobre huevos y hembras de nematodos parásitos de plantas (NPP) (Lamovsek *et al.*, 2013). En particular, los nematodos agalladores de la raíz afectan un gran número y diversidad de cultivos de importancia productiva generando grandes pérdidas económicas. En Argentina, los géneros más importantes son *Meloidogyne* spp. y *Nacobbus* spp. Ambos pueden ser un factor limitante en la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum*) fundamentalmente en los cultivos bajo invernadero (Argerich y Troilo, 2011). El control de esta plaga se basa en el uso de desinfectantes de suelo como el Bromuro de metilo (BM) y nematicidas químicos. Sin embargo, la prohibición del BM para el año 2015, la aparición de resistencia, la presión social por el acceso a alimentos más

saludables y por el cuidado del ambiente ha llevado a la búsqueda de medidas alternativas de control. Una opción en este sentido es el control biológico (CB) mediante la utilización de microorganismos vivos y/o productos derivados de ellos. El suelo es un ecosistema complejo en el que se suceden múltiples interacciones. El CB se basa en la explotación de esta red de interacciones para evitar y/o disminuir el efecto de las plagas en los cultivos (Lamovsek *et al.*, 2013). Entre estos organismos, los hongos son importantes debido a la facilidad que ofrecen respecto de su aislamiento, producción masiva y formulación y tienen un rol importante en el manejo de plagas hortícolas (Brand *et al.*, 2010). Formulaciones de *P. lilacinum* son utilizadas en varios países como parte de las estrategias del manejo integrado de plagas (MIP) por su actividad biológica contra los NPP, la facilidad para ser producido *in vitro* y la falta de efectos adversos para el ambiente y/o otros seres vivos. La presencia de *P. lilacinum* en el suelo no garantiza un control eficiente de los nematodos y es necesario hacer múltiples aplicaciones con conidias viables, virulentas y resistentes para que actúen controlando los NPP (Sung and Liu, 2006). La fermentación en medio sólido (SSF) suele ser el mejor método de obtención de conidias. Las conidias áreas producidas por SSF son superiores a aquellas producidas en medio líquido (Holland *et al.*, 2002; Hölker *et al.*, 2004; Brand *et al.*, 2010; Gao y Liu, 2010). Un aspecto determinante en la adopción de una tecnología para el manejo de plagas es la posibilidad de contar con métodos de producción masiva de conidias viables y virulentas a un bajo costo. En este sentido, es importante la utilización de productos o subproductos agroindustriales de la región como sustratos para la producción (Mussatto *et al.*, 2012). El arroz es uno de los más utilizados y el que ha dado mejores rendimientos. Sin embargo, se han evaluado otros sustratos como: granos de cebada, trigo, maíz, sorgo, salvado de trigo, de arroz, cáscara de café, de soja, torta de soja, etc. (Brand *et al.*, 2004; Gulsar Banu *et al.*, 2006; Robl *et al.*, 2009; Amala *et al.*, 2012; Mar y Lumyong, 2012). El objetivo de este estudio fue analizar la producción de conidias de *P. lilacinum* LPSC # 876 utilizando diferentes sustratos sólidos (residuos agroindustriales de producción regional) y seleccionar el de mayor rendimiento para estudios adicionales.

Metodología

Microorganismo, cultivo e inóculo

Se utilizó *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 aislado en la ciudad La Plata (Buenos Aires) (Gortari *et al.*, 2007). El hongo se cultivó en agar papa glucosado (APG) a 28 ± 1 °C durante 10 días. Las conidias se resuspendieron en Tween 80 (0,1 %) y la concentración se determinó por recuento en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico (400 X)

Sustratos

Se evaluaron 6 sustratos sólidos: granos de arroz entero sin pelar (AE), afrecho de arroz (AA), cáscara de arroz (CA), residuo de la producción de *Pleurotus ostreatus* (RP), residuo de cáscara de langostino (RL) y aserrín de salicáceas (A). El arroz y sus subproductos, proporcionados por la Estación Experimental Ing. Agr. Julio Hirschhörn de la Fac. de Cs. Agrarias y Forestales (UNLP), fueron utilizados sin tratamiento previo. El RP y el RL fueron suministrados por un establecimiento productor (La Plata) y por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI-Mar del Plata), respectivamente. Ambos fueron secados en estufa (50 °C), molidos y tamizados para obtener fracciones de 0,8 a 2 mm. El A fue obtenido en aserraderos (ciudad de Berisso), secado a temperatura ambiente y usado sin tratamiento adicional. Se determinó materia orgánica, carbono, nitrógeno total, y cenizas en todos los sustratos utilizados (Lab. de Edafología, Fac. de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP).

Fermentación en sustrato sólido

En un primer ensayo 2 g de cada sustrato, humedecidos con agua destilada (AD), se colocaron en cajas de Petri (60 x 15 mm) y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 min. Posteriormente las placas (3/sustrato) se inocularon con 1 ml de una suspensión conidial (1×10^7 conidias/g de sustrato húmedo) ajustando la humedad inicial a 60 %. Las placas se incubaron 10 días a 28 ± 1 °C. Al final del cultivo se calculó el número de conidias/g de material fermentado. A una muestra de 1 g se le añadieron 9 ml de una suspensión de Tween 80 (0,1 %). Después de agitar 15 min se filtró con tela serigráfica (150 hilos/cm²) y se realizaron las diluciones necesarias. El recuento se hizo en cámara de Neubauer bajo MO (400 X). En función de los resultados obtenidos y con el objetivo de aumentar la producción de conidias, *P. lilacinum* LPSC # 876 se cultivó empleando cantidades crecientes de AA en diferentes recipientes. Primero se utilizaron 5 g de sustrato colocados en placas de Petri (100 x 15 mm) y en bolsas de polipropileno (15 x 24,5 cm). Posteriormente se utilizaron 5, 15 y 25 g de AA colocados en frascos de vidrio de iguales dimensiones (Ø: 6 cm, h: 8 cm) en un total de 9 frascos (3 por cada cantidad de AA). En todos los casos se esterilizó, inoculó y cultivó bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Al final de los cultivos se tomaron muestras para conocer el número de conidias/g de material fermentado.

El análisis estadístico se realizó con el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2008). Se aplicó el análisis de la varianza y el test de comparaciones múltiples de Fischer previa transformación logarítmica de los datos.

Resultados y discusión

Diversas investigaciones sostienen que la FSS es uno de los mejores métodos para la obtención de conidias de calidad para el CB (Holker *et al.*, 2004; Brand *et al.*, 2010). Sin embargo, la conidiogénesis difiere significativamente entre las especies fúngicas así como con los diferentes sustratos utilizados para su crecimiento y reproducción (Sun y Liu, 2006; Mar y Lumyong, 2012). Hay estudios que indican que la fuente de C, de N y la relación C/N son los factores que pueden afectar significativamente el desarrollo, el número de conidias y su calidad (Gao *et al.*, 2007). En este sentido, los contenidos en materia orgánica, carbono, nitrógeno total, y cenizas en todos los sustratos utilizados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Caracterización química de los sustratos utilizados.

Sustrato	Parámetro				
	M.O. ¹ (mg)	C ² (%)	Nt ³ (%)	Cenizas ⁴ (mg)	Relación C/N
AE	93,4	31,8	1,309	6,6	24,29
CA	80,2	8,92	0,268	19,8	33,28
AA	90,4	40,5	2,479	9,6	16,33
RP	19,5	34,98	0,737	80,5	47,46
RL	69,8	19,6	7,332	30,2	2,67
A	98,8	35,9	0,140	1,2	256,42

¹ Materia orgánica. Obtenida por diferencia en calcinación con mufla.

² Carbono fácilmente oxidable (método de Walkey-Black).

³ Nitrógeno total. Digestión húmeda, evaluación por el método de Microkjeldahl.

⁴ Cenizas, calcinación con mufla a 450°C.

En el primer ensayo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de conidias según el sustrato ($p < 0.05$). El mayor rendimiento fue para el AA ($2,03 \times 10^{10}$ /g) (Figura 1). Se puede afirmar que el sustrato aporta los requerimientos

nutricionales para el desarrollo y la conidiogénesis de *P. lilacinum* LPSC # 876. Estos resultados son coincidentes con los hallazgos de Amala *et al.* (2012).

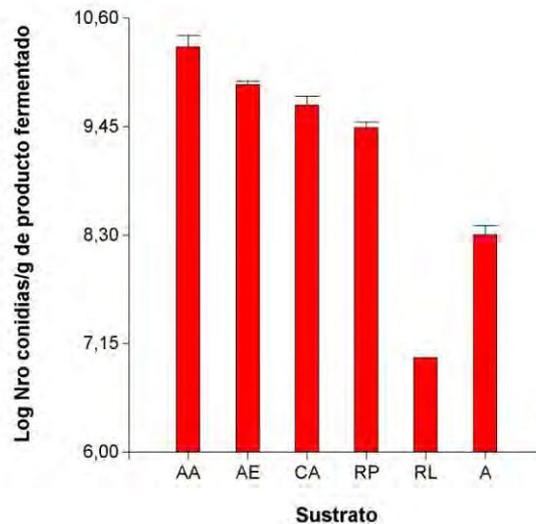


FIGURA 1. Producción de conidias (log) de *P. lilacinum* LPSC # 876 sobre diferentes sustratos.

Cuando se aumentó la cantidad de AA a 5 g en placas de Petri no hubo diferencias significativas respecto del primer ensayo ($p > 0,05$). Los cultivos en bolsas no se consideraron porque el apelmazamiento del AA y su adherencia a la bolsa dificultaron los procedimientos de inoculación, homogenización y cultivo. Con los frascos se obtuvieron rendimientos de $1,28 \times 10^{10}$, $9,35 \times 10^9$ y $5,0 \times 10^9$ /g de producto fermentado con 5, 15 y 25 g de AA, respectivamente, evidenciando una disminución del rendimiento a medida que aumenta la cantidad de sustrato (Figura 2).

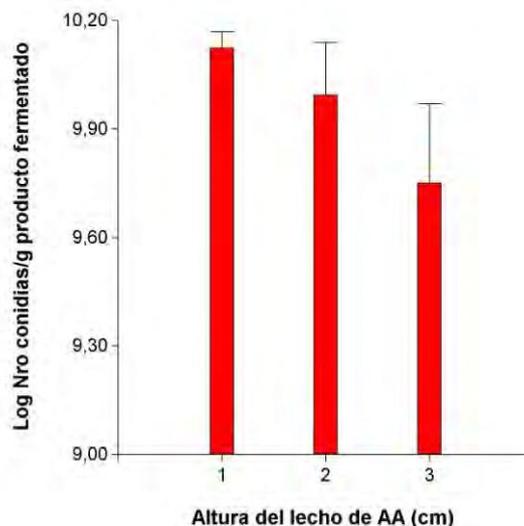


FIGURA 2. Efecto de la altura aproximada de lecho (afrecho de arroz) sobre la producción de conidias de *P. lilacinum* LPSC # 876.

Uno de los factores que afecta el crecimiento fúngico en las FSS es la estructura de la matriz formada cuando el sustrato se coloca en el recipiente donde va a desarrollarse el proceso fermentativo. En este caso, el aumento de AA en recipientes de igual tamaño generó espesores del lecho sólido de aproximadamente 1,0, 2,0 y 3,0 cm para 5, 15 y 25 g respectivamente, que fueron un factor limitante de la producción.

Conclusiones

El AA, un subproducto de la industrialización del arroz de bajo valor comercial, demostró buenas características nutricionales con un importante potencial en el uso como sustrato para la producción en masa de conidias de *P. lilacinus* LPSC # 876. Sin embargo, para el cambio de escala se hace necesario optimizar la altura del lecho y las condiciones del proceso de modo de evitar limitaciones en el crecimiento y conidiogénesis del hongo.

Referencias bibliográficas

- Amala U, T Jiji & A Naseema (2012) Mass multiplication of entomopathogenic fungus, *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson with solid substrates. *Journal of Biopesticides*, 5 (2): 168-170.
- Argerich C & L Troilo (2011) Manejo del cultivo para cualquier sistema de producción de tomate. En: *Manual de buenas prácticas agrícolas en la cadena de tomate*.
- Brand D, S Roussos, A Pandey, PC Zilioli, J Pohl & CR Soccol (2004) Development of a bioinsecticide with *Paecilomyces lilacinus* to control *Meloidogyne incognita*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118: 81-88.
- Brand D, CR Soccol, A Sabu & S Roussos (2010) Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematodes. *Mycology Applied International*, 22 (1): 31-48.
- Di Rienzo JA, F Casanoves, MG Balzarini, L González, M Tablada & CW Robledo (2008) Infostat, versión 2008, grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Gao L., MH Sun, XZ Liu & YS Che (2007) Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycological Research*, III: 87-92.
- Gao L & X Liu (2010) Nutritional requirements of mycelia growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. *Microbiología*, 79(5): 622-629.
- Gortari MC, C Cazau & R Hours (2007) Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24: 24-28.
- Gulsar Banu J, R Iyer & M Gunasekaran (2006) Mass multiplication and formulation of a nematophagous fungus, *Paecilomyces lilacinus*. *International Journal of Nematology*, 16 (2): 145-152.
- Holker U, M Hofer & J Lenz (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 175-186.
- Holland RJ, TS Gunasekera, KL Williams & KMH Nevelainen (2002) Ultra structure and properties of *Paecilomyces lilacinus* spores. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 879-885.
- Lamovsek J, G Urek & S Trdan (2013) Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): Microbes against the pests. *Acta Agronomica Slovenica*, 101: 263-275.
- Luangse-ard J, J Houbraken, T Van Doorn, S-B Hong, AM Borman, NL Hyel-Jones & RA Samson (2011) *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, 321: 141-149.
- Mar TT & S Lumyong (2012) Conidial production of entomopathogenic fungi in solid state fermentation. *KKU Research Journal*, 17 (5): 762-768.
- Mussatto SI, LF Ballesteros, S Martins & A Teixeira (2012) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. *Industrial Waste*, Prof. Kuan-Yeow Show (Ed.), ISBN: 978-95351-0253-3, In tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/industrial-waste/use-of-agro-industrial-wastes-in-solid-state-fermentation-processes>.
- Robl D, LB Sung, JH Novakovich, PRD Marangoni, MAC Zawadneak, PR Dalzoto, J Gabardo & IC Pimentel (2009) Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (THOM.) Samson strains on agro-industrial residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 296-300.
- Sun MH & XZ Liu (2006) Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*, 161: 295-305.