

3er. Congr. SIBAE, Londrina, Brazil, mayo 24-28 1999

CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS DEL CAFETO: PRODUCCIÓN Y SECADO DE BIOPESTICIDAS EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

S. ROUSSOS¹, C. BAGNIS¹, W. RODRIGUEZ², M-A. AQUIHAUATL², O. BESNARD³, R. DUPONNOIS³

(1) Laboratoire de Microbiologie IRD, Université de Provence, CESB/ESIL, Case 925, 163 Avenue de Luminy, 13288 Marseille cedex 9, France ; Email: roussos@esil.univ-mrs.fr

(2) Depto Biotecnología ; UAM-Iztapalapa ; AP 55-535 ; CP 09340 Mexico DF ; Mexico

(3) Société Mycos; Parc Scientifique Agropolis II; 34397 Montpellier Cedex 5; France

(3) Laboratoire de Biopedologie. IRD. BP 1386. Dakar. Senegal

Biological control of coffee pests : large scale production of fungal biopesticide in solid state fermentation

Abstract: Over 400 species of fungi can control specific nematodes or insect pests. The concept of using fungal pathogens to control insects is by no means new; the first reports of mass production appeared in the nineteenth century. During the last 20 years, research has been stimulated by the increasing resistance of insects to chemical pesticides and by a greater public awareness of environmental impacts of chemicals. Recent success in using nematophagous and entomophagous fungi as biopesticides demonstrate a high potential for coffee production and possible commercial applications. The study of the sporulation physiology, allowed to define optimum media and environmental conditions to produce large quantities of conidiospores of *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Poecilomyces fumosoroseus*, and *Trichoderma harzianum* in bulk. Pilot plant scale production of conidiospores was conducted in solid state fermentation using two methods: disk fermentor and natural solid support (sugarcane bagasse). In disk fermentor, optimal production of conidiospores was obtained after 6 days of incubation for *T.harzianum*, with an exceptionally high yield of 3.5×10^{10} conidiospores per gram of substrate. In a column type reactor, *T.harzianum* yielded up to 1.1×10^{10} spores per gram of sugarcane bagasse. Conidiospore conservation was tested by refrigeration (4°C), freezing (-4°C) and drying (20 and 40°C). Best results were obtained by refrigeration and drying at 20°C. The kinetics of viability of refrigerated and dried conidiospores of *T.harzianum* showed the possibility of a reliable utilization of these strains with a 98% of viability, even after two months. We discuss the applicability of these methods to the major groups of fungi with actual or expected potential as biopesticide to control insects and nematodes causing economic damage in coffee production. Information about their physiology, spore production at a commercial scale, equipments and formulations is compiled.

RESUMEN:

El estudio de la fisiología de esporulación, relacionado con la producción cuantitativa de conidiosporas, permitió definir las condiciones medio ambientales y optimizar la composición de los medios de cultivo para la producción masiva de conidiosporas de hongos filamentosos utilizados en lucha biológica (*Beauveria bassiana*, *Trichoderma harzianum*). *B.bassiana* es un hongo entomopatógeno que se utiliza contra los insectos como la broca del grano de café (*Hypothenemus hampei*). *T.harzianum* se utiliza como biopesticida en el control biológico de hongos fitopatógenos (*Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*). Se estudió la producción de esporas a nivel laboratorio, a un nivel semi piloto en un esporulador de discos y a un nivel planta piloto en un fermentador estático tipo zymotis. Los rendimientos de esporulación de *T.harzianum* en Zymotis fueron de 5×10^{13} esporas, cantidad que nos permite tratar al menos una hectarea de cultivo. La conservación de las esporas se realizó por secado directo del producto fermentado en el bioreactor. Los mejores resultados se obtuvieron, introduciendo un flujo de aire seco de 3 litros por minuto durante 24 horas a una temperatura de 20°C. En estas condiciones se obtuvo un biopesticida con 5×10^9 esporas por gramo de peso seco, que conservan una viabilidad de 98% después de varias semanas. La misma técnica de producción y de secado de esporas en Fermentación en Medio Sólido (FMS) podría ser utilizada para otros hongos filamentosos entomopatógenos.

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : B * 20386 Ex : 1

Fonds Documentaire ORSTOM



010020386

Tabla 2: Algunos antagonistas de insectos que se utilizan como entomopatógenos en Control biológico.

Orden	Insectos Género y Especie	Hongos Entomopatógenos Antagonistas
Ortoptera	<i>Schistocerca gregaria</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Dermaptera	<i>Forficula spp.</i>	<i>Entomophthora formicula</i>
Eleroptera	<i>Scotinophora</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
Omoptera	<i>Trialeurodes</i>	<i>Aschersonia aleuridis</i>
Tisanoptera	<i>Thrips tabaci</i>	<i>Verticillium lecanii</i>
Coleoptera	<i>Hypothenemus hampei</i> : (la broca)	<i>Beauveria bassiana</i>

El uso de hongos patógenos para controlar insectos, es un concepto cuyos primeros reportes de producción masiva aparecieron en el siglo XIX. Unos ejemplos de hongos entomopatógenos antagonistas de insectos se reportan en la Tabla 2. Los reportes de los últimos veinte años sobre el uso de hongos entomopatógenos y nematófagos como biopesticidas ofrece alternativas interesantes de uso de estos microorganismos en la agroindustria cafetalera, así como de su explotación comercial (Bustillos, 1999; Dufour et al. 1999).

FISIOLOGIA DE ESPORULACION DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS

Los hongos filamentosos se reproducen por multiplicación vegetativa (conidiogénesis) produciendo conidiosporas que se llaman comúnmente esporas. Los índices de esporulación (Ie) para un hongo, indican la cantidad de esporas producidas por gramo de substrato inicialmente presente en el medio de cultivo (Roussos 1985). Estos índices pueden cambiar según la fuente de carbono y la relación Carbono-Nitrógeno (C/N) de los medios de cultivo. El estudio de la fisiología de esporulación, en relación con la producción cuantitativa de conidiosporas de 5 cepas de hongos filamentosos (Tabla 3) permitió definir las condiciones medio ambientales y optimizar la composición de los medios de cultivo (Roussos y al. 1989). Se anota que los índices de esporulación son muy altos cuando la harina de yuca está utilizada como fuente de carbono y alcanzan valores de 7.2×10^9 para *Beauveria bassiana* y 1.4×10^{10} para *Trichoderma harzianum*. *T. harzianum* es un hongo filamentoso antagonístico que se utiliza como agente de biocontrol contra *Pythium ultimum* y otras enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos (Jensen & Wolfmechel, 1995). *B. bassiana* es un hongo entomopatógeno que se utiliza contra la broca de café (Bustillos, 1999; Dufour et al. 1999; Feng et al. 1994).

Tabla 3: Esporulacion de 5 cepas de hongos filamentosos cultivadas en matraces conteniendo un medio de cultivo con Papa Dextrosa Agar a 25°C.

Hongos filamentosos	Indice de esporulación	Fuente de carbono	C/N
<i>Trichoderma harzianum</i>	14.1×10^9	Harina de yuca	14
<i>Aspergillus niger</i>	5.2×10^9	Harina de yuca	24
<i>Beauveria bassiana</i>	7.2×10^9	Harina de yuca	24
<i>Aspergillus terreus</i>	9.9×10^9	Melaza	14
<i>Penicillium roquefortii</i>	7.2×10^9	Melaza	24

La producción de esporas para uso de laboratorio se hacen en condiciones esteriles utilizando matraces. Para una producción de esporas en mayores cantidades se utilizan otros tipos de reactores y estrategias de producción de inóculos ya se han desarrollado (Jenkins & Goettel 1997; Montero et al. 1989; Roussos et al. 1992, Bustillos 1999).

PRODUCCIÓN DE ESPORAS DE HONGOS FILAMENTOSOS EN MEDIO SÓLIDO

El cultivo tradicional de los hongos en medio sólido se practica de manera industrial para la producción de hongos comestibles (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*) y para la elaboración de alimentos fermentados como los quesos tipo roquefort o el Tempe, alimento obtenido por fermentación de granos cocidos de soya. La Fermentación en Medio Sólido (FMS) es un nuevo proceso de cultivo de microorganismos sobre sustratos naturales (salvado de trigo, bagazo de caña, pulpa de café, harina de yuca, granos de arroz) o sobre soportes sólidos previamente humidificados con una solución nutritiva (Raimbault et al. 1989; Vinicgra-Gonzalez, 1997). La FMS presenta una multitud de ventajas para la producción de enzimas, esporas y metabolitos de microorganismos (Roussos et al. 1997). En el último decenio, no ha habido a nivel mundial un desarrollo de explotación comercial tan evidente de la FMS como el que se ha dado en la investigación básica del mismo proceso. Una de las mayores razones para esta situación, es la falta de técnicas eficientes para la obtención de inóculos esporales activos, los cuales son requeridos en gran cantidad en los procesos de FMS. La forma, edad y proporción del inóculo son también de importancia crítica en los sistemas de FMS (Lonsane et al. 1992), los cuales requieren una cantidad grande de inóculo (2×10^{10} esporas/Kg de sustrato seco). En los sistemas de FMS, comúnmente se prefiere como inóculo las esporas al micelio vegetativo, por la facilidad de mezclado de estas, con los sustratos sólidos humedecidos (Raimbault & Alazard, 1981).

Tabla 4 : Productividad de esporas de *Trichoderma harzianum* en diferentes biorreactores (Roussos y al. 1991).

Biorreactor	Producción de conidiosporas	
	por gramo de harina de yuca	por cm ² de la superficie de cultivo
Matrices Erlenmeyer	1.1×10^{10}	1.7×10^8
Fermentador de discos D1	9.3×10^9	2.2×10^8
Columna, 18 g materia húmeda	5.0×10^{10}	$*8.8 \times 10^8$
Zymotis : Carga útil de 21 Kg	5.0×10^{10}	$*7.7 \times 10^8$

* El resultado es por cm² de la superficie de cultivo

Se conocen diferentes técnicas de FMS para la producción de conidiosporas a nivel de planta piloto o industrial. Las más antiguas se refieren al uso de botellas de Roux o de charolas (Vezina & Sing, 1975). En los últimos 20 años, se han reportado varios procesos nuevos de fermentación para la producción de propágulos de hongos filamentosos tanto en medio líquido como en medio sólido (Rombach et al. 1988; Feng et al. 1994; Jenkins & Goettel, 1997) y en fermentadores de discos (Raimbault y Roussos, 1985). En la Tabla 4 se presenta la productividad de esporas de *T.harzianum* en diferentes biorreactores (Roussos y al. 1991). La producción de esporas de hongos filamentosos en biorreactores en FMS se lleva a cabo bajo condiciones controladas de esterilidad y seguridad de manejo y ofrece una multitud de ventajas: (1) uso de sustratos agrícolas de bajo costo, (2) los biorreactores son de tamaño reducido, (3) el volumen de la aireación requerida de los medios de cultivo es muy baja (4) los sustratos sólidos desarrollan una gran superficie libre de esporulación (5) la transferencia de oxígeno es muy eficiente, (6) la esporulación es muy rápida, eficiente y (7) las esporas producidas son de mejor calidad.

CONSERVACIÓN Y SECADO DE ESPORAS DE HONGOS FILAMENTOSOS

La conservación de conidiosporas de hongos filamentosos para cepas de colección a nivel laboratorio se llevan a cabo mediante congelación (-18°C o -196°C en nitrógeno líquido) y secado en suelo estéril o liofilización. Estas técnicas de conservación son muy eficientes y se utilizan con éxito para mantener pequeñas cantidades de conidiosporas, pero el funcionamiento práctico en unos casos y el elevado costo del equipo en los otros, las hacen de uso limitado para escalas mayores. En la naturaleza las esporas de hongos filamentosos se conservan secas y la dispersión en el medio ambiente se hace por los vientos. Hay que mencionar que las esporas son formas de reproducción asexual de los hongos y se caracterizan por su resistencia a la sequía pero son lábiles a la temperatura y a la luz ultravioleta. Las esporas de *Trichoderma harzianum* se destruyen por un tratamiento térmico a 50°C por 30 min. (Roussos y al. 1989).

NUEVA TECNICA PARA LA PRODUCCION Y SECADO DE ESPORAS DE HONGOS EN FMS

A continuación se presenta un ejemplo de producción y secado de esporas de *T.harzianun* por FMS para la obtención directa de un biopesticida. Una mezcla de bagazo de caña y de cascara de remolacha (80/20) se utilizó como sustrato sólido. Este sustrado (1 Kg) fué humidificado con 1 Litro de agua potable; se homogeneizó por mezclado y se esterilizó en un autoclave a 110°C por una hora. Al sustrato estéril, se anadieron 2 litros de una suspensión de esporas de *T.harzianun* conteniendo 2×10^{10} esporas. La inoculación homogénea del sustrato sólido se obtuvo por mezclado. El sustrato inoculado se ha repartido en 20 columnas de FMS (De Araujo et al. 1997) y estos biorreactores se incubaron a una temperatura de 29°C durante 8 días. Para favorecerla germinación del inóculo,

Bustillos A. 1999. El papel del control biológico en un programa de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. Proceedings of III SIBAC, Londrina 24-28 May 1999, Brazil

De Arujo A. A., Lepilleur C., Delcourt S., Colavitti P. and Roussel S. 1997. Laboratory scale bioreactors for

- Roussos, S. 1985. Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. *Thèse d'Etat*, Université de Provence, Marseille, 193 p.
- Roussos, S., Aquilualt, M.A., Brizuela, M.A., Olmos, A., Rodriguez, W. and Viniegra, G. 1989. Production, conservation and viability of filamentous fungi inoculum for solid substrate fermentation. *Micol. Neotrop. Apl.* 2: 3-17.
- Roussos, S., Olmos, A., Rimbault, M., Saucedo-Castañeda, G. and Lonsane, B.K. 1991. Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system : Conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol. Tech.* 5: 415-420
- Roussos, S., Rimbault, M., Prebois, J-P. and Lonsane, B.K. 1993. Zymotis, A large scale solid state fermenter: Design and evaluation. *Applied Biochem. Biotechnol.* 42: 37-52.
- Roussos, S., Lonsane, B.K., Rimbault, M. and Viniegra-Gonzalez, G. (Eds.), *Advances in solid state fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 631 p.
- Schoeller, M., Rubner, A. 1994. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiol. Res.* 149: 145-149
- Vezina, C. and K. Sing. 1975. Transformation of organic compounds by fungi spores. In: Smith, J.E. and D.R. Berry (Eds.), *The filamentous fungi. I. Industrial Mycology*, Edward Arnold, Londres.
- Viniegra-Gonzalez, G. 1997. Solid state fermentation: Definition, characteristics, limitations and monitoring. In Roussos, S., Lonsane, B.K., Rimbault, M. and Viniegra-Gonzalez, G. (Eds.), *Advances in solid state fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Ch.2: 5-22.

100

100