

## NOTA TÉCNICA

### Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch

Mónica Narrea-Cango'  
Jenny Malpartida-Zevallos<sup>2</sup>

*Beauveria brongniartii* es un hongo entomopatógeno que ataca al gorgojo de los Andes (*Premnotrypes* spp., Coleóptera: Curculionidae), constituyendo un eficiente biocontrolador de esta plaga. Presenta dos fases en su desarrollo, una saprofítica, viviendo en el campo sobre materia en descomposición, y otra parasítica, infectando al insecto (ALCÁZAR *et al.* 1990, VERA 1992). Sin embargo, para ser empleado en un Programa de Manejo Integrado del gorgojo de los Andes, este hongo necesita ser aislado y desarrollado en medios de cultivo que permitan la producción de células infectivas (conidias), para posteriormente ser incrementado masivamente y propiciar su aplicación (TORRES *et al.* 1993). Los medios de cultivo son fuentes naturales o sintéticas, que semejan el nicho ecológico en que se desarrollan los microorganismos. Para el cultivo de hongos existen en el mercado medios comerciales como el Agar Sabouraud, Agar extracto de Malta y Agar Papa Dextrosa. Por su composición, este último es fácil de preparar en laboratorio y es tradicionalmente empleado en la propagación de hongos entomopatógenos (AGURTO 1989, TORRES *et al.* 1993). El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento de tres medios comerciales de cultivo, y un medio de preparación en laboratorio, en la producción de conidias de *B. brongniartii*, seleccionando el más eficiente.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Municipalidad de Miraflores, Lima, Perú. Se empleó cuatro cepas de *Beauveria brongniartii* procedentes de la provincia de

Huancayo, Junín, Perú, mantenidas a 5 °C en tubos de ensayo conteniendo Papa Dextrosa Agar en medio inclinado. Estas cepas fueron identificadas como BhH1, BbH2, BbH3 y BbH4 e incubadas a 20 °C hasta su total esporulación.

Los medios de cultivo empleados fueron:

1) Agar extracto de Malta (MEA). Composición comercial : maltosa 12,75 g; dextrosa 2,75 g; glicerol 2,35 g; peptona 0,78 g y agar agar 15 g. Se preparó diluyendo en 1 l de agua destilada 33,6 g de agar MEA, agitando por 1 min hasta dilución total y esterilizándolo a 121 °C por 15 min. El pH final es 4,7 + 0,2.

2) Agar Sabouraud Dextrosa (llamado también Agar Sabouraud Modificado) (SDA). Composición comercial: peptona 10,0 g; dextrosa 20,0 g; agar agar 20,0 g. Se preparó diluyendo 50,0 g de agar SDA, en 1 l de agua destilada, se disolvió y esterilizó a 121 °C por 15 min. El pH final es 7,0 + 0,2.

3) Agar Sabouraud Maltosa (SMA). Composición comercial: peptona 10,0 g; maltosa 40,0 g; agar agar 15,0 g. Se preparó diluyendo 65,0 g de Agar SMA, en 1 l de agua destilada y esterilizando a 121 °C por 15 min. El pH final es 7,0 ± 0,2.

4) Agar Papa Dextrosa Agar (PDA). Este medio preparado en el laboratorio se compone de 250 g de trozos de papa con cascara, 20 g de dextrosa y 20 g de agar agar, todo esto para 1 l de agua destilada. La papa picada se hizo hervir en 500 ml de agua. Aparte, en un erlenmeyer se disolvió el agar con agua destilada. Se filtró el caldo de papa con una gasa. Se mezcló ambas preparaciones y se agregó la dextrosa. Se completó agua destilada a 1 l y se esterilizó a 121 °C por 15 min. El pH final es 5,6 + 0,1.

Luego de esterilizados, los medios se dejaron enfriar hasta 40 °C aproximadamente y a continuación se vertió 20 ml de cada medio en placas petri, hasta agotar el material preparado.

La evaluación de la producción de esporas se realizó a partir de los tubos conteniendo colonias esporuladas de las cuatro cepas de *B. brongniartii*. La siembra en los diferentes medios de cultivo a evaluar se efectuó por el método de punción en el centro de cada placa. Se selló las placas y se rotuló según número de cepa y tipo de medio de cultivo. Hubo cuatro repeticiones para cada cepa y medio de cultivo. Posteriormente se llevó a incubación a 20 °C, realizando la observación en forma diaria hasta el día 15, cuando se evaluó la producción de conidias. Para determinar el

Departamento de Entomología y Fitopatología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria "La Molina", Apartado 456, Lima-100, Perú. E-mail: mnarrea@hotmail.com  
Laboratorio de Microbiología, Subgerencia de Sanidad, Municipalidad de Miraflores, Lima, Perú. E-mail: sanidad@miraflores.gob.pe

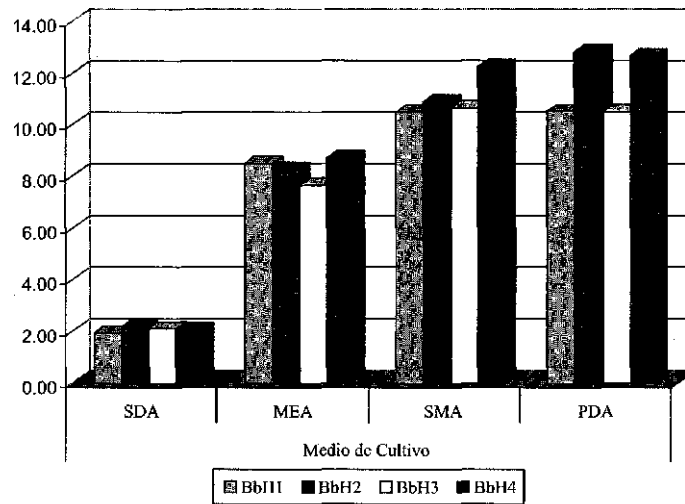


FIGURA 1.- Promedio de conidias producidas por cuatro cepas de *B. bronngiartii* en cuatro medios de cultivo.

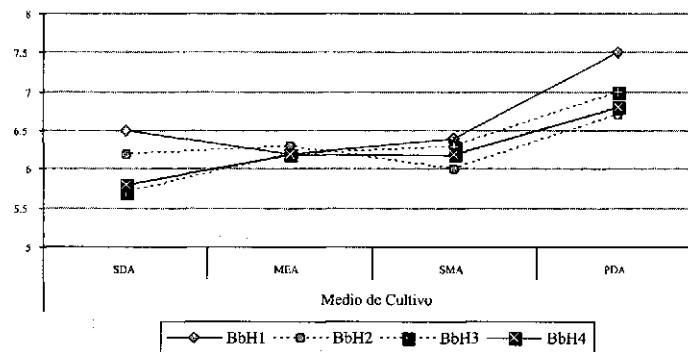


FIGURA 2.- Crecimiento diametral promedio de colonias de cuatro cepas de *B. bronngiartii* en cuatro medios de cultivo.

número de conidias por ml, se procedió a "lavar" todo el contenido de las colonias con agua destilada estéril y Tween 80 al 1 % para luego, a partir de esa suspensión, realizar el recuento de conidias en el hematocímetro. Para cada repetición se consideró el promedio de cinco lecturas.

Para la evaluación del crecimiento diametral, a partir de las cuatro cepas se realizó suspensiones en agua destilada estéril y Tween 80 al 1 %, hasta obtener una suspensión de esporas de  $1,0 \times 10^7$  conidias  $\text{ml}^{-1}$  (solución madre) por cada cepa. Las soluciones madre de cada cepa fueron sembradas en placas petri conteniendo los medios a evaluar (MEA, SDA, SAM y PDA). La siembra se realizó por el método de inoculación en el centro de 0,5

ml de solución madre. Se selló las placas y se rotuló según número de cepa y tipo de medio de cultivo. Se realizó cinco repeticiones para cada cepa y medio de cultivo. Posteriormente se llevó las placas a incubación a 20 °C. Los registros se llevaron a cabo diariamente, midiéndose el crecimiento cada dos días, por un promedio de 30 días para cada aislamiento. También se consideró la tasa promedio de crecimiento diario de cada una de las cepas evaluadas.

El resultado comparativo del promedio de conidias  $\text{ml}^{-1}$  producidas por las cuatro cepas en los cuatro medios de cultivo evaluados se muestra en la Tabla 1 y la Figura 1. La producción de esporas en los cuatro medios de cultivo presenta un valor promedio mínimo de

**TABLA 1.- Número promedio de conidias  $mi^{-3}$  producidas por cuatro cepas de *B. brongniartii* según medio de cultivo.**

Cepa	Medio de cultivo			
	SDA	MEA	SMA	PDA
BbH1	$1,95 \times 10^7$	$8,48 \times 10^7$	$1,05 \times 10^8$	$1,05 \times 10^8$
BbH2	$2,13 \times 10^7$	$8,24 \times 10^7$	$1,09 \times 10^8$	$1,28 \times 10^8$
BbH3	$2,11 \times 10^7$	$7,63 \times 10^7$	$1,06 \times 10^8$	$1,05 \times 10^8$
BbH4	$2,04 \times 10^7$	$8,70 \times 10^7$	$1,22 \times 10^8$	$1,26 \times 10^8$

**TABLA 2.- Crecimiento diametral promedio de cuatro cepas de *B. brongniartii* según medio de cultivo (x cm).**

Cepa	Medio de cultivo				Promedio por cepa (cm)
	SDA	MEA	SMA	PDA	
BbH1	6,5	6,2	6,4	7,5	6,7
BbH2	6,2	6,3	6,0	6,7	6,3
BbH3	5,7	6,2	6,3	7,0	6,3
BbH4	5,8	6,2	6,2	6,8	6,3
Promedio por medio (cm)	6,1	6,2	6,2	7,0	

**TABLA 3.- Tasa promedio de crecimiento diario de cuatro cepas de *B. brongniartii* según medio de cultivo (en mm).**

Cepa	Promedio	D.E.	Mín	Máx
BbH1	2,05	0,61	0,75	4,00
BbH2	1,94	0,61	0,25	3,25
BbH3	1,93	0,52	0,75	3,00
BbH4	1,91	0,59	0,25	3,25

D.E. = Desviación estándar

$1,95 \times 10^7$  conidias  $mi^{-3}$  correspondiente a la cepa BbH1 en el medio Agar Sabouraud Dextrosa y el valor promedio máximo de  $1,28 \times 10^8$  conidias  $mi^{-3}$  correspondiente a la cepa BbH2 en el medio Papa Dextrosa Agar, es decir entre  $10^7$  y  $10^8$  conidias  $mi^{-3}$ . Estos resultados coinciden con los obtenidos por VERA (1992) y VÉLEZ *et al.* (2000). Sin embargo, destacan los medios Agar Sabouraud Maltosa (SMA) y Agar Papa Dextrosa (PDA) por ser los que mayor número de esporas produjeron, independientemente de la cepa de *B. brongniartii*; estos resultados coinciden con los de

MACLEOD (1954). El medio con menor producción de cepas fue el Agar Extracto de Malta.

El resultado comparativo del crecimiento diametral promedio se muestra en la Tabla 2 y la Figura 2. La Tabla 3 muestra la tasa promedio de crecimiento diario. Al igual que con la producción de conidias, también en el medio Agar Sabouraud Dextrosa se dio el menor valor promedio de crecimiento, de 5,7 cm para la cepa BbH3, en 30 días; el máximo valor se dio con la cepa BbH1, con un crecimiento promedio de 7,5 cm en el medio Papa Dextrosa Agar. Esta última destaca también por su mayor crecimiento en todos los medios, con 6,7 cm en promedio; en las demás se reportó solo 6,3 cm para los cuatro medios. Asimismo, las colonias de la cepa BbH1 destacan en el desarrollo promedio de crecimiento diametral, con 2,05 mm diarios, manteniéndose las demás cepas entre 1,91 y 1,94 mm.

La Papa Dextrosa Agar (PDA) es el medio más eficiente por el desarrollo en la producción de conidias, y el desarrollo diametral. Además, por su fácil preparación y bajo costo de sus ingredientes, es el más indicado para iniciar el aislamiento y producción de *Beauveria brongniartii* y así propiciar su mejor desarrollo masal.

**Agradecimientos:**- Al Dr. CARLOS CONTRERAS RÍOS, subgerente de sanidad de la Municipalidad de Miraflores, por el apoyo y las facilidades brindadas para el desarrollo del presente trabajo.

#### Literatura

- Agurto T. 1989. Manual de técnicas en microbiología. Lima, Universidad Ricardo Palma.
- Alcázar J, Raman K, Torres H, Yábar E. 1990. *Beauveria* spp. hongo amigo del agricultor. Medio Ambiente (Lima) 45: 44-46.
- Macleod D. 1954. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill and *Tritirachium* Limber. Can. J. Bot. 32: 818-890.
- Torres H, Ortega A, Alcázar J, Ames T, Palomino L. 1993. Control biológico del gorgojo de los Andes con *Beauveria brongniartii*. Guía Invest. Centro int. Papa (Lima) 8.
- Vélez P, Gonzales M, Valderrama A, Estrada M, Bustillo A, Montoya E. 2000. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*. Cenicafé 51(3). 186-195.
- Vera A. 1992. Patogenicidad del hongo *Beauveria brongniartii* en el gorgojo de los Andes *Premnotrypes latithorax*. Tesis de Biólogo. Cuzco, Universidad Nacional San Antonio Abad.