

# Evaluación de los suplementos nutritivos sobre sustratos sólidos para la producción en masa de *Beauveria bassiana* (bálsamo) *Vuillemin* y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin nativos en el laboratorio

Evaluation on nutritional supplements for solid substrates mass production of *Beauveria bassiana* (Balsamo) *Vuillemin* and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin natives in the laboratory

Clemencia Oderay Merino Peñafiel<sup>1</sup>, Oscar Rafael Tinoco Gómez<sup>2</sup>, Myriam Merino Jaramillo. MSc.<sup>3</sup>, Moisés Arreguín Sámana<sup>4</sup>

RECIBIDO: 20/11/2015 - APROBADO: 30/06/2016

## RESUMEN

En la producción en masa, la relación carbono nitrógeno (C: N) afectan al crecimiento y producción de conidios. El objetivo fue evaluar *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos en sustratos sólidos arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.) enriquecidos con suplementos nutritivos, melaza (fuente-carbono) en concentración (2,5-5,0 g), las harinas de amaranto y soya, leche en polvo y levadura (fuentes-nitrógeno) de concentración (0,25-0,50 g), comparados con testigos. La relación C: N fue 10:1. El diseño experimental fue Categórico Multi-Factorial y la técnica, la observación. La producción en masa de hongos fue la fermentación sólida en 40 tratamientos con 3 repeticiones; el conteo de conidios en cámara Neubauer; y, el análisis de resultados con Statgraphics Plus-Ver.5.1, IBM-SPPS-Ver.22 y Excel-2013. La mejor producción de *B. bassiana* en arroz fue el T13 (melaza-2,5 y leche-0,25) g con media  $1,89 \times 10^9$  conidios/g; y, en *M. anisopliae* el T14 (arroz-melaza-0,25 y leche-0,25) y promedio  $1,86 \times 10^9$  conidios/g. La producción más baja de *B. Bassiana* en T19 (arroz-melaza-0,5 y levadura-0,5) g con  $1,28 \times 10^9$  conidios/g; y, *M. anisopliae* en T2 (testigo) con  $1,40 \times 10^9$  conidios/g. El rendimiento más elevado de *B. bassiana* en maíz fue el T33 (melaza-2,5 y leche-0,25) g con promedio  $2,05 \times 10^9$  conidios/g y *M. anisopliae* en T34 (arroz-melaza-2,5 y leche-0,25) g con media  $2,50 \times 10^9$  conidios/g; las más bajas en *B. bassiana* fue en T37 (arroz-melaza-2,5 y levadura-0,25) g con media de  $1,20 \times 10^9$  conidios/g y *M. anisopliae* en T38 (arroz-melaza-2,5 y levadura-0,25) g con promedio  $1,39 \times 10^9$  conidios/g. El ADEVA registró en los factores SS, SN y las interacciones AB y BC diferencias estadísticas significativas a  $\leq 0,05$ ; del mismo modo, en la comparación múltiple de medias con Tukey (nivel de confianza 95%) en los grupos y dentro de estos para sustrato-melaza-leche. Se concluye que la adición de SN al SS arroz y maíz para la producción en masa de HEP *B. Bassiana* y *M. Anisopliae* a escala de laboratorio influyó en el rendimiento de conidios/g, alcanzando una media total de  $1,64 \times 10^9$  conidios/g de bioproducto.

**Palabras clave:** Hongos entomopatógenos, biocontrol, sustratos sólidos, suplementos nutritivos, producción en masa, fermentación sólida, conidios, bioproducto.

## ABSTRACT

In mass production, the carbon-nitrogen ratio (C: N) affect growth and conidia production. The objective was to evaluate native *B. bassiana* and *M. anisopliae* on solid substrates rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.) enriched with nutritional supplements, molasses (source-carbon) in concentration (2.5-5, 0 g), amaranth flour and soy, milk powder and yeast (source-nitrogen)

1 Doctora en Química, especialidad Orgánica - Bioquímica. MSc. en Biología. Universidad Estatal de Bolívar, Avenida Che Guevara s-n y Gabriel Secaira. Guaranda-Ecuador. E-mail: www.ueb.edu.ec, cmerino@ueb.edu.ec

2 Doctor en Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida Universitaria, la Avenida Amezaga, la Avenida Óscar Benavides y la Avenida Venezuela (cuadras 34 y 36), en el distrito de Lima. E-mail: prof.tinoco@gmail.com

3 Ingeniera Zootecnista y MSc. En Cadenas Productivas Agroindustriales. Universidad Estatal de Bolívar, Avenida Che Guevara s-n y Gabriel Secaira. Guaranda-Ecuador. E-mail: www.ueb.edu.ec, mmerino@ueb.edu.ec

4 Ingeniero Forestal, Maestría en Ciencias Forestales y PHD en Problemas Económicos Agroindustriales. Universidad Estatal de Bolívar, Av. Che Guevara s-n y Gabriel Secaira Guaranda-Ecuador. Correo Electrónico: www.web.edu.ec, marreguin@web.edu.ec

concentration (0.25-0.50 g) compared with controls. The C: N ratio was 10: 1. The experimental design was Categorical Multi-Factorial and observation technology, Mass production of fungi was the solid fermentation in 40 treatments with 3 replications; conidia count in Neubauer chamber; and analysis results with Statgraphics Plus-Ver.5.1, IBM-SPPS-Ver.22 and Excel-2013. The best production of *B. bassiana* in rice was the T13 (molasses and milk-2,5-0.25) g with average  $1.89 \times 10^9$  conidia/g; and in *M. anisopliae* the T14 (molasses-rice-milk-0.25 and 0.25) g and average  $1.86 \times 10^9$  conidia/g. The lowest production of *B. bassiana* T19 (rice-molasses-yeast-0.5 and 0.5) g with  $1.28 \times 10^9$  conidia/g; and *M. anisopliae* in T2 (control) with  $1.40 \times 10^9$  conidia/g. The highest corn yield *B. bassiana* was the T33 (molasses and milk-2,5-0.25) g averaging  $2.05 \times 10^9$  conidia/g *M. anisopliae* in T34 (rice-molasses-2.5 and milk-0.25) g with mean  $2.50 \times 10^9$  conidia/g; the lowest in *B. bassiana* was T37 (rice-molasses-yeast-2.5 and 0.25) g with a mean of  $1.20 \times 10^9$  conidia/g *M. anisopliae* in T38 (rice-molasses-yeast-2.5 and 0.25) g averaging  $1.39 \times 10^9$  conidia/g. The ADEVA recorded in the SS, SN and AB and BC interactions  $\leq p$  differences significant at 0.05 statistical factors; Similarly, in the multiple comparison of means by Tukey (confidence level 95%) in groups and within these for substrate-molasses-milk. It is concluded that the addition of SN SS rice and corn for mass production of HEP *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* laboratory scale influenced the yield of conidia/g, reaching a total average of  $1.64 \times 10^9$  conidia/g bioproduct.

**Keywords:** Fungi entomopatógenos, biocontrol, solid substrates, nutritional supplements, mass production, solid fermentation, conidia, bioproduct.

## I. INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos (HEP) tienen la gran ventaja sobre otros organismos empleados para su producción en el ámbito microbiano de ser producidos sobre diferentes sustratos, lo que les permite su sobrevivencia en el ambiente como saprófitos. Habitualmente, los sustratos sólidos más empleados en la producción a escala Semi comercial de los HEP son granos de cereales, siendo el más utilizado es el arroz. Al momento de la recolección se debe asegurar el mayor desprendimiento posible de los conidios del hongo desde la superficie del grano, esto asegura una alta concentración de los mismos.

Los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, se han producido en diferentes sustratos sólidos. La falta de sustratos apropiados, económicos y fiables es una limitación importante en la producción en masa de los HEP; así como la evaluación en condiciones de campo. El conocimiento de las necesidades nutricionales es otro factor esencial en el cultivo de los HEP utilizando cualquier técnica de cultivo. Las biomoléculas se componen de macroelementos y estos están involucrados en mecanismos como la interacción huésped-patógeno (mecanismos de defensa) y son los responsables del crecimiento del micelio y la producción de conidios (Masoud, 2013). Para la producción en masa y comercialización, es necesario el suministro de medios de cultivo y sustratos sólidos simples y baratos (Raimbault, 1998).

Varios estudios nutricionales se han llevado a cabo en la producción y esporulación de los hongos filamentosos tales como *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *I. fumosorosea* donde sobresalió que para su producción, la relación carbono-nitrógeno (C: N) en el medio de cultivo es uno de los parámetros más críticos para aumentar la producción de conidios, medida que se debe controlar durante las fases de cultivación (Shah *et al.*, 2005).

La utilización de hongos HEP ascomicetes, tales como la *B. Bassiana* y *M. Anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Lecanicillium sp.*, *Isaria fumosoroseae* y *Farinosus*, han sido objeto de una creciente atención en estas últimas 50 décadas, se aprovechan como agentes de control biológico de especies de insectos plagas (Jaronski, 2012). Hay más de 170 productos comerciales y muchas cepas ya están disponibles alrededor del mundo. Estos hongos bajo condiciones naturales son los patógenos que con frecuencia causan la mortalidad natural de las poblaciones de insectos plagas en diferentes agro ecosistemas (Faria, 2007).

Entre las tecnologías de producción de los HEP sencillos y fiables se mencionan: la fermentación líquida sumergida para la producción de blastósporas, de corta duración e hidrófila (Rombach, 1989), la fermentación de estado sólido y la tecnología más viable de producción en masa incluye la difásica en el que los inóculos fúngicos (blastósporas y micelios) se producen en el cultivo líquido, que luego se utilizan para inocular los sustratos sólidos para la producción de conidios (Rousson, 1983).

El desarrollo de formulaciones biológicas para el control de insectos plaga agrícolas lleva a la sociedad científica a buscar métodos mediante los cuales se puedan obtener HEP eficaces para los sistemas agroecológicos e ir reemplazando paulatinamente las aplicaciones de plaguicidas químicos (Cruz, 2014).

Con esta investigación se determinó la concentración más idónea de carbono nitrógeno para la producción y reproducción de los HEP en los sustratos sólidos enriquecidos con suplementos nutritivos para incrementar la reproducción y esporulación de conidios viables que sirvan a futuro como agentes de biocontrol de insectos plagas agrícolas.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Localización

La investigación se realizó en el período enero-julio 2015, en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación, Posgrado y Conservación Amazónica (CIPCA), de la Universidad Estatal Amazónica, localizada en el Campus Central km. 44 vía Puyo-Tena, Troncal Amazónica E45, ciudad de Puyo, provincia de Pastaza, país Ecuador, cuya ubicación geográfica es de  $01^{\circ} 14' 4,105''$  de latitud sur y  $77^{\circ} 53' 4,27''$  de longitud oeste, a una altura de 584 msnm.

### 2.2 Unidad de análisis

En el ensayo se utilizaron 40 tratamientos con 3 réplicas resultando 120 unidades experimentales, conformados por 100 g de sustratos sólidos de arroz y maíz, más los suplementos nutritivos inoculados con los HEP nativos *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

## 2.2 Especímenes biológicos

Las muestras biológicas utilizadas en este ensayo provienen de los aislados nativos de *Beauveria bassiana* desde las almendras del café y el *Metarhizium anisopliae* de los cadáveres de insectos salvazo (*Aeneolamia andigena*. Jacobi) de la caña de azúcar (*Saccharomyces* sp.) colonizados por el HEP, respectivamente; fueron recolectados en la provincia de Pastaza-Ecuador.

## 2.3. Sustratos sólidos, suplementos nutritivos y medios de cultivo

Los sustratos utilizados en la producción de los HEP en el laboratorio fueron el arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*). Los suplementos nutritivos fueron la melaza, como fuentes de carbono; harina de amaranto, harina de soya, leche en polvo y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como fuentes de nitrógeno. Los medios de cultivo para la reproducción de los HEP *in vitro* fueron: Papa Dextrosa Agar + Extracto de levadura (PDA modificado) y Agar Dextrosa Sabouraud (SDA).

## 2.4 Diseño experimental

El diseño experimental aplicado fue un diseño Categórico Multi-factorial, comprendido por todas las combinaciones entre los niveles y factores. El resumen del diseño fue el siguiente:

Factores y niveles: El factor A con dos tipos de sustratos sólidos; el factor B con cinco suplementos nutritivos; el factor C con dos niveles de suplementos nutritivos: 2,5 - 0,25 g y 5, 0 - 0,50 g, y el factor D; dos HEP *bassiana* y *M. anisopliae*. La respuesta fue la producción de Conidios/g de Bio-producto.

Número de factores experimentales:	4
Número de residuos:	1
Número de ejecuciones:	40
Error Grados de libertad:	17
Aleatorizado:	No

### 2.4.1. Tratamientos

Los tratamientos se determinaron en base a los dos sustratos arroz y maíz, las dos concentraciones de los suplementos nutritivos (fuente de carbono y nitrógeno), más los dos HEP. El experimento constituyó 40 tratamientos con tres repeticiones. Ver Tabla N.º 1

### 2.4.2 Esquema del experimento

SS:	Sustratos Sólidos
SN:	Suplementos Nutritivos
C:	Concentración
HEP:	Hongos entomopatógenos
R:	Repeticiones
TUE:	Tamaño de la Unidad Experimental
UE/T:	Unidad Experimental/Tratamiento

Número total de Niveles: 11

Factor A 2 niveles (arroz y maíz)

Factor B 5 niveles (testigo absoluto, harina de amaranto, harina de soya, leche en polvo y levadura).

Factor C 2 niveles (concentraciones 2,5 - 5,0 carbono y nitrógeno 0,25 - 0,50), respectivamente.

Factor D 2 niveles (HEP *B. bassiana* y *M. anisopliae*).

Tabla N.º 1. Esquema del experimento de la combinación de factores y niveles

N.º	Factores							UE/T (g)
	A SS	B SN	C Cs	D HEP	C/T	R	TUE	
1	1	1	1	1	A1B1C1D1	3	100	300
2	1	1	1	2	A1B1C1D2	3	100	300
3	1	1	2	1	A1B1C2D1	3	100	300
4	1	1	2	2	A1B1C2D2	3	100	300
5	1	2	1	1	A1B2C1D1	3	100	300
6	1	2	1	2	A1B2C1D2	3	100	300
7	1	2	2	1	A1B2C2D1	3	100	300
8	1	2	2	2	A1B2C2D2	3	100	300
9	1	3	1	1	A1B3C1D1	3	100	300
10	1	3	1	2	A1B3C1D2	3	100	300
11	1	3	2	1	A1B3C2D1	3	100	300
12	1	3	2	2	A1B3C2D2	3	100	300
13	1	4	1	1	A1B4C1D1	3	100	300
14	1	4	1	2	A1B4C1D2	3	100	300
15	1	4	2	1	A1B4C2D1	3	100	300
16	1	4	2	2	A1B4C2D2	3	100	300
17	1	5	1	1	A1B5C1D1	3	100	300
18	1	5	1	2	A1B5C1D2	3	100	300
19	1	5	2	1	A1B5C2D1	3	100	300
20	1	5	2	2	A1B5C2D2	3	100	300
21	2	1	1	1	A2B1C1D1	3	100	300
22	2	1	1	2	A2B1C1D2	3	100	300
23	2	1	2	1	A2B1C2D1	3	100	300
24	2	1	2	2	A2B1C2D2	3	100	300
25	2	2	1	1	A2B2C1D1	3	100	300
26	2	2	1	2	A2B2C1D2	3	100	300
27	2	2	2	1	A2B2C2D1	3	100	300
28	2	2	2	2	A2B2C2D2	3	100	300
29	2	3	1	1	A2B3C1D1	3	100	300
30	2	3	1	2	A2B3C1D2	3	100	300
31	2	3	2	1	A2B3C2D1	3	100	300
32	2	3	2	2	A2B3C2D2	3	100	300
33	2	4	1	1	A2B4C1D1	3	100	300
34	2	4	1	2	A2B4C1D2	3	100	300
35	2	4	2	1	A2B4C2D1	3	100	300
36	2	4	2	2	A2B4C2D2	3	100	300
37	2	5	1	1	A2B5C1D1	3	100	300
38	2	5	1	2	A2B5C1D2	3	100	300
39	2	5	2	1	A2B5C2D1	3	100	300
40	2	5	2	2	A2B5C2D2	3	100	300

Fuente: Trabajo de laboratorio y campo. Merino Oderay (2015).

## 2.5. Población de estudio

Fueron las cepas puras de los HEP nativos *B. bassiana*, aislados desde la almendra del café y el *M. anisopliae* desde el cadáver del insecto salvazo de la caña de azúcar, con síntomas de micosis.

El tiempo de incubación del complejo sustratos-suplementos nutritivos-HEP, durante 15 días después de incubación a 27 °C de temperatura.

## 2.6. Variables

La variable independiente fue *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

La variable dependiente o de respuesta fue el promedio de la producción de conidios/g de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el laboratorio.

Las variables intervinientes fueron: sustratos, sólidos, suplementos nutritivos, HEP, la temperatura y humedad.

## 2.7. Técnicas de recolección de datos

La metodología del proceso de producción de los HEP en el laboratorio demandó de la aplicación secuencial de las siguientes técnicas: Elaboración de la solución patrón partiendo de las cepas nativas puras de los HEP, previamente identificadas, mantenidas inicialmente en ultra refrigeración a -84 °C y después en refrigeración a 4 °C, obtenidas de resiembras sucesivas en cajas Petri con Sabouraud Dextrosa Agar para *B. bassiana* y PDA modificada con 5 g de Extracto de Levadura para el *M. anisopliae*. Obtención de la dilución decimal  $1.0 \times 10^7$  conidios/g con la solución Tween-80 al 0.01% para la inoculación de los sustratos-suplementos nutritivos, partiendo de la solución patrón original. Para la producción en masa de los HEP en el laboratorio, se inoculó la suspensión conidial de concentración de  $1.0 \times 10^7$  conidios/g de las cepas puras de *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativas a los sustratos sólidos estériles arroz y maíz, se acondicionó y se formuló con melaza y los suplementos nutritivos, los dos sustratos a la concentración de 2,5 - 0.25 g y 5,0 - 0.50g; posteriormente se incubaron a 27 °C durante 15 días hasta esporulación completa. El conteo de conidios/g de sustrato-suplementos nutritivos se llevó a cabo en la cámara de Neubauer con la dilución  $1.0 \times 10^{-3}$  conidios/mL. El procedimiento experimental, se muestra en la Figura N.º 1.

En cada una de estas fases se registró la información en fichas de control y se estableció una base de datos. En las mediciones experimentales, se consideraron las siguientes variables:

- Sustratos sólidos
- Suplementos nutritivos
- Concentraciones
- HEP *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos
- Producción de conidios/g del complejo sustrato-suplemento nutritivo.

## 2.8. Análisis estadístico de la información

Los resultados obtenidos se examinaron estadísticamente con el software Statgraphics Plus, versión 5.1 y la hoja de cálculo de Microsoft Excel 2013. Para la determinación del análisis de varianza (ADEVA) entre los tratamientos con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

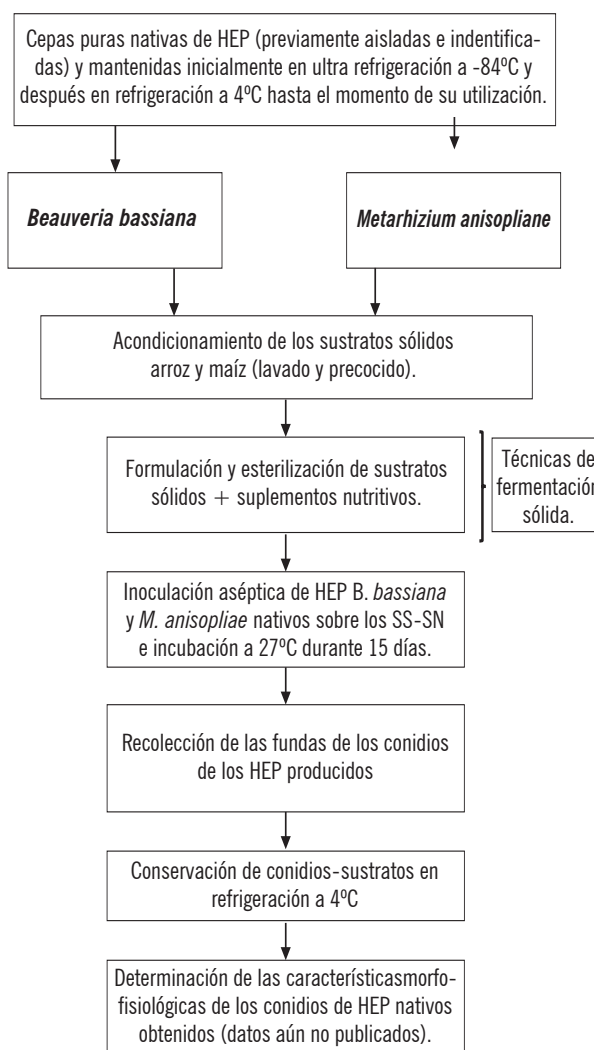


Figura N.º 1. Flujo grama de la producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el laboratorio.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Producción de conidios en *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el laboratorio

Los resultados experimentales obtenidos en el proceso de producción de conidios en condiciones de laboratorio de los HEP *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos, se resumen a continuación.

Tabla N.º 2. Tratamientos y valores medios de la producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en concentración  $1 \times 10^9$  de conidios/g de sustrato sólido - suplemento nutritivo.

TRATAMIENTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	A1B1C1D1	A1B1C1D2	A1B1C2D1	A1B1C2D2	A1B2C1D1	A1B2C1D2	A1B2C2D1	A1B2C2D2	A1B3C1D1	A1B3C1D2
	1,32	1,40	1,46	1,44	1,37	1,63	1,49	1,67	1,69	1,65
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	A1B3C2D1	A1B3C2D2	A1B4C1D1	A1B4C1D2	A1B4C2D1	A1B4C2D2	A1B5C1D1	A1B5C1D2	A1B3C1D1	A1B5C2D2
Combinaciones entre factores y nutrientes	1,79	1,67	1,89	1,86	1,67	1,75	1,39	1,49	1,28	1,46
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	A1B1C1D1	A1B1C1D2	A1B1C2D1	A1B1C2D2	A1B2C1D1	A1B2C1D2	A1B2C2D1	A1B2C2D2	A1B3C1D1	A1B3C1D2
	1,58	1,62	1,56	1,53	1,52	1,89	1,86	1,78	1,67	1,68
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	A2B2C2D1	A2B3C2D2	A2B4C2D1	A2B4C1D2	A2B4C2D1	A2B4C2D2	A2B5C1D1	A2B5C1D2	A2B5C2D1	A2B5C2D2
	1,69	1,68	2,50	2,05	1,99	1,93	1,20	1,39	1,38	1,45

Fuente: Trabajo de campo y laboratorio. Merino Oderay, 2015.

De la Tabla N.º 2, se deduce que los HEP *B. Bassiana* y *M. Anisopliae* presentaron un mejor desarrollo y reproducción en el sustrato arroz T13 y T14 ( $1,89 \times 10^9$  y  $1,86 \times 10^9$  conidios/g), en T33 y T34 conidios/g, con la melaza y el suplemento nutritivo leche en polvo a la concentración 1 (2,5 g - 0.25 g), respectivamente.

Los resultados demostraron que la producción más baja alcanzó *B. Bassiana* en el sustrato arroz con el suplemento levadura de 0,25 g y melaza 2,5 g (concentración 1) con un valor promedio de en T37 de conidios/g; de la misma manera, el arroz con la concentración de 5,0 g de melaza más levadura 0,5 g (concentración 2) con un promedio de  $1,28 \times 10^9$  conidios/g, en T19.

El valor promedio más bajo en la reproducción de conidios/gramo de sustrato-suplemento nutritivo en *M. anisopliae* se produjo en el arroz (testigo absoluto) con un valor en T1; además, en sustrato maíz con la adición de melaza 2,5 g y 0,25 g de levadura, dando un valor promedio de  $1,39 \times 10^9$  conidios/g, en T38.

El valor de la media del entomopatógeno *B. de bassiana* en el sustrato arroz (en el testigo absoluto) fue  $1,39 \times 10^9$  y  $1,46 \times 10^9$  conidios/g conidios/g (Tratamiento 1 y 3); comparando este resultado con el reportado por los autores Noboa, G y Quelal, (2015), registraron una concentración media en el sustrato arroz de  $1,43 \times 10^8$ , valor inferior al obtenido en la presente investigación.

En lo relacionado a la producción de los HEP en el sustrato arroz para el *M. anisopliae* se registró un valor medio de  $1,42 \times 10^9$  Conidios/g (Tratamiento 2 y 4); comparado con el resultado obtenido por Nussenbaum, (2014) que fue de  $1,18 \times 10^9$  conidios/g de arroz, el dato de esta investigación es inferior. La diferencia en ambos casos, se debió a las condiciones medio ambientales donde se realizó el ensayo de la presente investigación.

### 3.2 Estadísticos de la producción de conidios en *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Los valores estadísticos de la producción de conidios/g de los HEP *B. bassiana* y *M. anisopliae* obtenidas en el laboratorio con un intervalo de confianza de 95%, se presenta en el Tabla N.º 3

Tabla N.º 3. Valores descriptivos de la producción de Conidios/g en sustratos-suplementos nutritivos de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
Sustratos Sólidos	20	1,5685	0,18114	0,04051	1,4837	1,6533	1,28	1,89
2	20	1,6975	0,28855	0,06452	1,5625	1,8325	1,20	2,50
Total	40	1,6330	0,24661	0,03899	1,5541	1,7119	1,20	2,50

Fuente: Trabajo de campo y laboratorio. Merino Oderay, 2015.

De los resultados en la Tabla N.º 3, se evidencia que el valor medio total en la producción de *B. Bassiana* y *M. anisopliae* fue de  $1,63 \times 10^9$  por gramo de sustrato-suplemento en relación con el valor medio alcanzado por los testigos absolutos arroz y maíz ( $1,32 \times 10^9$  y  $1,58 \times 10^9$  conidios/g), respectivamente, una desviación estándar de 0,24661, un valor mínimo y máximo de conidios por gramo de sustrato - suplemento nutritivo.

### 3.3 Análisis de varianza (ADEVA) de la producción del promedio conidios en *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

El ADEVA de dos factores con interacciones en la Tabla N.º 4 resume la descomposición de la variabilidad en la producción de conidios/g de sustrato-suplemento alcanzados en esta investigación como efecto de la adición de suplementos nutritivos sobre el sustrato sólido arroz y maíz (Tabla N.º 4).

Tabla N.º 4. Análisis de la varianza del resume de la variabilidad en la producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a una concentración  $1,00 \times 10^9$  Conidios/g

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Sustratos sólidos	0,16641	1	0,16641	15,96	0,0009
B: Suplementos nutritivos	1,53667	4	0,384166	36,85	0,0000
C: Concentración	0,00169	1	0,001	0,16	0,6922
D: Hongos EP	0,01296	1	0,08649	1,24	0,2804
INTERACCIONES					
AB	0,205765	4	0,0514412	4,93	0,0080
AC	0,00144	1	0,00144	0,14	0,7147
AD	0,00961	1	0,00961	0,92	0,3504
BC	0,136835	4	0,0342087	3,28	0,0363
BD	0,120365	4	0,0300912	2,89	0,0542
CD	0,00289	1	0,00289	0,28	0,6053
RESIDUOS	0,17721	17	0,0104241		
TOTAL (CORREGICO)	2,37184	39			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Fuente: Trabajo de campo y laboratorio. Merino Oderay, 2015.

Análisis la varianza (ADEVA). En la Tabla N.º 4 se infiere que, como el p-valores son inferiores  $p \leq 0.05$ , existe diferencia significativa entre las medias de tratamientos a un nivel de confianza para la media del 95% en los factores sustratos y suplementos; además, en las interacciones AB y BC, revela que la adición de los suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz y maíz, incidieron en el incremento de la producción de conidios en *B. bassiana* y *M. anisopliae* nativos a nivel de laboratorio.

### 3.4. Análisis de ANOVA del factor producción de conidios con la prueba estadística de Tukey

En la Tabla N.º 5, se muestra los resultados del ANOVA obtenidos durante la evaluación y se realiza todas las posibles comparaciones de tratamientos de dos en dos, entre grupos y dentro de los grupos.

Tabla N.º 5. Análisis de ANOVA para la comparación de medias de la producción. De conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*

Conidios/g (E+08)	ANOVA				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	61880,261	4	15470,065	4,847	0,003
Dentro de grupos	111706,276	35	3191,608		
Total	173586,538	39			

Fuente: Trabajo de campo y laboratorio. Merino Oderay, 2015.

En la Tabla N.º 5, se visualiza que entre los grupos y dentro de los grupos se presentó significancia estadística al nivel  $p \leq 0.05$  en la producción de conidios por gramo en los HEP con una concentración de  $1.0 \times 10^8$  conidios/g.

### 3.5. Comparación múltiple de la variable conidios de HDS (Honestly Significant Difference) de Tukey

Esta técnica estadística, se realizó posterior al Análisis de la Varianza con la finalidad de analizar con mayor detalle los datos del experimento en relación al comportamiento del afecto de los suplementos nutritivos como fuente de carbono y nitrógeno sobre los sustratos arroz y maíz para la producción de conidios en los HEP *B. bassiana* y *M. anisopliae* en el laboratorio (Tabla N.º 6).

Tabla N.º 6. Comparación múltiple de la variable dependiente Conidios/g (E+08) HSD Tukey

(I) Suplemen- tos Nutritivos: Fuente C y N	(J) Suplemen- tos Nutritivos: Fuente C y N	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	Fuentes de Carbono y Nitrógeno	-11,0875	28,2472	,995	-92,300	70,125
	3	-20,2625	28,2472	,951	-101,475	60,950
	4	-103,3500*	28,2472	,007	-184,562	-22,138
	5	2,6625	28,2472	1,000	-78,550	83,875
	1	11,0875	28,2472	,995	-70,125	92,300
Fuentes de Carbono y Nitrógeno	3	-9,1750	28,2472	,997	-90,387	72,037
	4	-92,2625*	28,2472	,019	-173,475	-11,050
	5	13,7500	28,2472	,988	-67,462	94,962
3	1	20,2625	28,2472	,951	-60,950	101,475
	Fuentes de Carbono y Nitrógeno	9,1750	28,2472	,997	-72,037	90,387
	4	-83,0875*	28,2472	,043	-164,300	-1,875
	5	22,9250	28,2472	,925	-58,287	104,137
	1	103,3500*	28,2472	,007	22,138	184,562
4	Fuentes de Carbono y Nitrógeno	92,2625*	28,2472	,019	11,050	173,475
	3	83,0875*	28,2472	,043	1,875	164,300
	5	106,0125*	28,2472	,005	24,800	187,225
5	1	-2,6625	28,2472	1,000	-83,875	78,550
	Fuentes de Carbono y Nitrógeno	-13,7500	28,2472	,988	-94,962	67,462
	3	-22,9250	28,2472	,925	-104,137	58,287
	4	-106,0125*	28,2472	,005	-187,225	-24,800

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Fuente: Trabajo de campo y laboratorio. Merino Oderay, 2015.

La comparación múltiple de la variable dependiente conidios por gramo entre los tratamientos (Tabla N.º 6), de la concentración 1 y 2 del suplemento nutritivo melaza + leche en polvo en arroz, se presentaron diferencias estadísticas significativas  $p \leq 0.05$  en una concentración de  $1.0 \times 10^8$  conidios/g en los T13 y T15 para *B. bassiana* y en *M. anisopliae* en el T14 y T16. Comportamientos similares tuvieron la *B. bassiana* con el mismo suplemento, ostentando diferencias significancias en el T33 y T35 igual el T34 y T36 para *M. anisopliae* maíz; lo que expresa que la adición del suplemento nutritivo tuvo efecto sobre el incremento ascendente de la producción de conidios en el laboratorio de los HEP estudiados, como se muestra en la Figura N.º. 2 de medias.

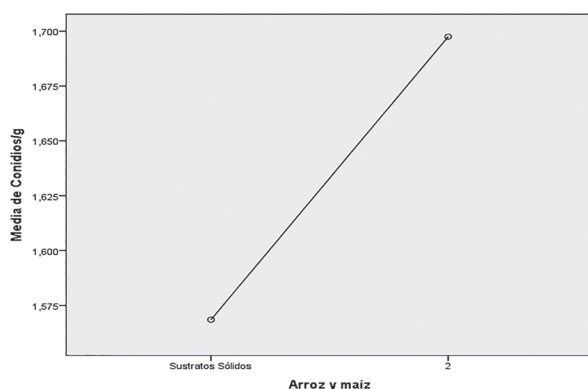


Figura N.º 2. Medias de conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

#### IV. CONCLUSIONES

La utilización de los suplementos nutritivos como fuentes de carbono y nitrógeno (melaza, harinas de amaranto, soya, leche en polvo y levadura) en la relación C: N (10:1) sobre los sustratos arroz y maíz para la producción de los hongos entomopatógenos *B. Bassiana* y *M. Anisopliae* a escala de laboratorio, influyó en el rendimiento de conidios, reportando un valor medio total de  $1,63 \times 10^9$  conidios/g en relación a  $1,32 \times 10^9$  conidios/g (arroz) y  $1,5^8 \times 10^9$  conidios/g (maíz) alcanzados por los testigos absolutos, versus  $2,5 \times 10^9$  conidios/g respectivamente.

El mejor tratamiento en arroz con la melaza y leche en polvo en la concentración 1, se presentó en el T13 ( $1,89 \times 10^9$  conidios/g) en la *B. bassiana* y en el T14 para el *M. anisopliae* ( $1,8^9 \times 10^9$  conidios/g). En maíz y en las mismas condiciones el T33 ( $2,05 \times 10^9$  conidios/g) y T34 ( $2,50 \times 10^9$  conidios/g) alcanzando los valores medios más elevados en la producción de conidios por gramo en los dos HEP, comparativamente.

La producción más baja de conidios en arroz, melaza, levadura y la concentración 2, reportó el T19 ( $1,28 \times 10^9$  conidios/g) en la *B. bassiana* y en el T2 ( $1,40 \times 10^9$  conidios/g) para *M. anisopliae* en el testigo. En maíz, melaza, levadura en las concentración 1 y 2, la *B. bassiana* alcanzó en el T37 ( $1,20 \times 10^9$  conidios/g) los valores medios más bajos en correspondencia con el T39 ( $1,38 \times 10^9$  conidios/g) conseguido por el *M. anisopliae* bajo las condiciones en las que se desarrollaron los procesos de la presente investigación.

En el análisis de varianza (ADEVA), se observó que existieron diferencias estadísticas significativas a un nivel  $\leq p 0,05$ , por la variabilidad existente entre los dos factores: sustratos sólidos y suplementos; así como también, en la interacción AB y BC, se corrobora con lo expuesto anteriormente donde se indica que la adición de suplementos nutritivos a los sustratos sólidos arroz y maíz sí influyó en el incremento de la producción en masa de los conidios por gramo en los HEP ensayados.

Aplicando la prueba estadística de Tukey a un nivel de confianza del 95%, se comprobó también que existieron diferencias significativas en la producción de conidios de *B. Bassiana* y *M. Anisopliae* en el laboratorio, entre los grupos y dentro de los grupos en el factor suplementos nutritivos, con la fuente de carbono melaza y mayormente en la de nitrógeno leche en polvo en la concentración 1 (2,5 g y 0,25 g).

#### V. AGRADECIMIENTOS

A mi querida Universidad Estatal de Bolívar. A la Universidad Estatal Amazónica en la persona del Doctor César Vargas Burgos, por darme la oportunidad de realizar los ensayos de esta investigación en el Laboratorio de Microbiología. A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en especial a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica y, al equipo de la Revista del Instituto de investigación RIIGEO.

#### VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cruz, I. (2014). *Control microbial*. UNAN-OEA.
2. Faria, M. &. (2007). Mycoinsecticides and Micoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types . En *Biologic Control*. 43, pp: 237-256.
3. Jaronski, S. &. (2012). Mass Production of Entomopathogenic Hypocreales. En *Manual Of Techniques In Invertebrate Pathology*. (Second Edition. ed., pp: 255). USA: Lawrence A. Lacey. IP Consulting International Yakima, Washington, USA. (Recuperado 13-01-2015).
4. Kumar, R. &. (1996). Integrated Disease Management Future Perspectives, Advances In Botany. En K.G. Mukerji, B. Mathur, B.P. Chamala and C. Chitralekha (Eds.),pp. 335-34. New Delhi: APH Publishing Corporation. (Recuperado 15-03- 2015)
5. Masoud, L. B. (2013). Mass Production Of Entomopathogenic Fungi *Beauveria Bassiana* (Balsamo) By Using Agricultural Products Based On Liquid- Solid Diphasic Method For Date Palm Pest Control. (I. 2.-6. Journal., Ed.) *International Journal of Agriculture and Crop Sciences. IJCS.*, pp:5-19. www.ijags.com.(Recuperado 16-03-2015).
6. Nobao, G. (2015). Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación de *B. bassiana* y *Trichoderma harziumum* como aporte a los productores de café orgánico de la Asociación "Río Intag" cantón Cotacachi.

7. Nussenbug, A. (2014). Aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* (Coleóptera: Curculionidae).
8. Raimbault, M. (1998). General and Microbiological aspects of Solid Substrate Fermentation. En *International Training Course On Solid State Fermentation. Proceedings*, pp:1-20. Curitiba, Brazil.
9. Romback, M. (1989). Production of *Beauveria bassiana* Conidia in Submerged Culture. *Entomophaga*.
10. Rousson, S. R. (1983). Zymotics a Large Scale Fermenter Design and Evaluation, *Appl. Biochem. Biotechnol.*