

## Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua

Arnulfo Monzón<sup>1</sup>

### Introducción

El uso excesivo de plaguicidas provoca efectos negativos en el suelo, el agua y el ambiente. Además ha contribuido a aumentar los problemas de plagas debido al desarrollo de resistencia y a la destrucción de los enemigos naturales. Muchos plaguicidas también afectan la salud de las personas.

Para reducir estos efectos se procura la implementación de sistemas agrícolas sostenibles, basados en el conocimiento de las relaciones entre los cultivos, el ambiente y los organismos presentes en el campo. Una de las alternativas es el uso de organismos entomopatógenos, los cuales tienen la capacidad de reducir las poblaciones de plagas. Existen varios tipos de organismos entomopatógenos, tales como virus, hongos, bacterias y nematodos. Actualmente, se han identificado y estudiado diversas especies de hongos que afectan plagas de cultivos de importancia económica; muchos de ellos son utilizados exitosamente en programas de control biológico. Algunos de éstos entomopatógenos son reproducidos masivamente y se venden comercialmente.

En Nicaragua, productores de café, repollo, plátano y chile dulce han logrado reducir el daño causado por las plagas mediante el uso de estos agentes microbianos sin afectar la salud humana ni el ambiente. Además sus cosechas están libres de plaguicidas sintéticos.

En Nicaragua se ha desarrollado una metodología para la producción semi-industrial de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. También se formulan productos con base en estos hongos para el control de plagas en diversos cultivos como café, repollo, plátano y algodón. Además se ha desarrollado una tecnología de multiplicación artesanal de hongos entomopatógenos.

En muchos casos, el uso de estos hongos se combina con otras medidas de control. Por ejemplo, en el cultivo de café, la aplicación de entomopatógenos para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) se complementa con prácticas culturales. En el caso de repollo, además del hongo entomopatógeno usado para el control de la palomilla del repollo (*Plutella xylostella*) se aplican productos botánicos como nim y microbianos como Dipel.

### Hongos entomopatógenos

Estos hongos se encuentran en la naturaleza, en rastros de cultivos, estiércol, en el suelo, las plantas, etc. Logran un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol.

Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos. Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos. Entre los más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophtora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*.

### Acción de los hongos entomopatógenos sobre la plaga

En general, las fases que desarrollan los hongos sobre sus hospedantes son: germinación, formación de aporosios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. El inóculo o unidad infectiva está constituido por las estructuras de reproducción sexual y asexual, es decir las esporas y conidias.

<sup>1</sup> Universidad nacional Agraria de Nicaragua. Managua, Nicaragua. esave@ibw.com.ni

El proceso se inicia cuando la espora o conidia se adhiere a la cutícula del insecto; luego se produce un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita la penetración física.

Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto.

Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de las relaciones patógeno- hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado dextruxinas, demetil-dextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos.

### Hongos entomopatógenos más utilizados

***Beauveria bassiana*.** Este hongo pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, Familia Moniliaceae (Barnet & Hunter 1972). Se ha informado atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de gran importancia agrícola. Entre las plagas más importantes controladas por este hongo están la broca del café, la palomilla del repollo y el picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus*).

Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo. ***Metarhizium anisopliae*.** Al igual que *B. bassiana*, este hongo pertenece a la clase Deuteromycetes, orden Moniliales, Familia Moniliaceae (Barnet & Hunter 1972).

Este patógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Algunas plagas que son afectadas por este hongo son la salivita de la caña de azúcar (*Aeneolamia varia*), y chinches plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este

hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula.

***Verticillium lecanii*.** Este hongo pertenece al mismo grupo que los anteriores, se encuentra frecuentemente atacando áfidos y escamas en zonas tropicales y subtropicales. Además ha sido encontrado sobre insectos del orden Coleoptera, Diptera, Hymenoptera y sobre ácaros. Los insectos infectados por este hongo tienen una apariencia blanquecina.

***Nomureae rileyi*.** Este hongo ataca más de 32 especies de insectos de los órdenes Coleoptera, Lepidoptera y Orthoptera. Con mayor frecuencia se encuentra atacando lepidópteros, por ejemplo *Spodoptera* en maíz. El cuerpo de los insectos muertos por este hongo presentan un micelio blanco, que puede tornarse verde con la esporulación.

### Plagas más importantes controladas mediante hongos entomopatógenos

Debido a las características de la especie y/o de la cepa, ámbito de hospedantes, patogenicidad, virulencia y condiciones ambientales, existen cepas específicas utilizadas para el control de diferentes plagas. Algunas de las plagas más importantes en Nicaragua controladas con hongos entomopatógenos se presentan en el Cuadro 1.

Aunque muchos organismos pueden ser eficaces para el control de plagas, no todos pueden ser utilizados como agentes de control microbiano. Para que un microorganismo patógeno de insectos pueda ser utili-

**Cuadro 1.** Plagas de importancia económica controladas mediante hongos entomopatógenos en Nicaragua.

Cultivo	Plaga	Hongo entomopatógeno
Café	Broca	<i>B. bassiana</i>
	Minador	<i>M. anisopliae</i>
Repollo	Plutella	<i>B. bassiana</i>
Plátano, algodón	Picudos	<i>B. bassiana</i> *
Chile, tomate		<i>M. anisopliae</i>
Tempate	Chinches	<i>B. bassiana</i>
Arroz		<i>M. anisopliae</i>
Ajonjolí		
Caña de azúcar, pastos	Salivazo	<i>M. anisopliae</i>
Papa	Gallina ciega	<i>B. bassiana</i>
Granos Básicos		<i>M. anisopliae</i>
Caña de Azúcar		
Diversos	Afidos y escamas	<i>V. lecanii</i>

zado como agente de control biológico debe tener algunas características como: seguro para los seres humanos, no patogénico a los cultivos, genéticamente estable, eficaz a bajas concentraciones, eficaz para el control de un amplio ámbito de plagas, compatible con prácticas de cultivo, incluyendo el uso de otros productos, fácil de usar y almacenar, capaz de sobrevivir en condiciones adversas y la relación beneficio-coste de su uso positiva.

El proceso de desarrollo de un agente de control microbiano conlleva varias etapas desde el aislamiento hasta su uso, las cuales deben tener una secuencia determinada. De acuerdo a Campbell (1989), la secuencia general para el aislamiento y estudio de agentes de control biológico es la siguiente: aislamiento e identificación del organismo, pruebas de eficacia y estabilidad, pruebas de seguridad ambiental, preservación de cepas, posibilidades de formulación, pruebas sobre estabilidad de almacenamiento, evaluación del costo del producto, investigación de mercado, comercialización y distribución del agente de control biológico.

Debido a que los hongos entomopatógenos son organismos vivos, para lograr un mejor uso como agentes de control de plagas, es muy importante entender aspectos como: a. los factores que propician el desarrollo de una epizootia para predecir y manejarla en funciones del manejo de las plagas, b. la dinámica de la interacción de las plagas, los patógenos y el ambiente. También se debe conocer la patogenicidad de la cepa contra la plaga a controlar, así como la cantidad de esporas necesarias para provocar una epizootia en el campo después de la aplicación del hongo. Por esta razón, al realizar las aplicaciones del hongo se debe estar seguro que se está utilizando la cantidad necesaria de conidias. La eficacia del control de plagas mediante entomopatógenos depende del contacto entre la plaga y el hongo, ya que es una medida de supresión directa, por lo cual la calidad del producto aplicado es clave.

### **Producción de hongos entomopatógenos**

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato natural. Hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soya, pero lo más utilizados son arroz y trigo.

Existen tres métodos de producción de hongos entomopatógenos: artesanal, semi-industrial e industrial. En Nicaragua se realiza la producción semi-in-

dustrial y multiplicación artesanal. A continuación se describen el proceso seguido en este país para cada uno de estos tipos de producción.

**Multiplicación artesanal.** Se inicia con un cultivo puro al que se le denomina "hongo patrón" o "semilla". Este material es suministrado por el laboratorio a los talleres artesanales. Posteriormente, en los talleres se deposita arroz en bolsas de polipropileno y se pone a hervir por una hora durante tres días consecutivos. El arroz en bolsas es inoculado con el hongo patrón y se deja en condiciones ambientales hasta que el hongo logra colonizar el arroz. Cuando la bolsa de arroz es colonizada completamente, se lava con agua. El caldo o mezcla obtenido del lavado del arroz, se aplica para el control de las plagas.

**Producción semi-industrial.** Este tipo de proceso se realiza en varias fases, que van desde la obtención del cultivo puro hasta la formulación del producto. En general el proceso está organizado en dos etapas: la etapa de cepario y la de producción. El tiempo empleado en desarrollar el proceso de producción es de aproximadamente un mes. La etapa de cepario comprende el aislamiento de la cepa y la obtención del cultivo puro. Además se considera el mantenimiento, reactivación y preservación de las cepas. La etapa de producción comprende la preparación de los sustratos, inoculación e incubación de matrices y bolsas, el proceso de secado (bandeja), la cosecha del hongo y la preparación de las formulaciones. A continuación se describen algunas de estas etapas.

El **aislamiento** consiste en la obtención del hongo a partir de la fuente de inóculo, la cual puede ser insectos, plantas; o medios artificiales como PDA (cajas de Petri, tubos de ensayo, entre otros.) o de preservación en seco como la sílica gel. A partir del aislamiento del hongo se procede a la inoculación de un medio de cultivo, para la obtención de un cultivo puro. Debido a que se trata del paso inicial del proceso de producción un error afecta todo el proceso. Por tal razón debemos estar seguros que el hongo aislado corresponde al hongo que nos interesa, además debe estar libre de contaminantes y tener buen vigor para su crecimiento.

El aislamiento de hongos entomopatógenos puede hacerse de dos maneras: por **dilución seriada** y **directo**. El aislamiento por dilución seriada es el método más utilizado, consiste en colocar un insecto esporulado en un recipiente que contiene 10 ml de agua destilada estéril con 0,1 % de Tween 80. La suspensión resultante se debe agitar bien por 1 min, pa-

ra que las conidias se desprendan del cuerpo del insecto. Como resultado se obtiene una suspensión concentrada del inóculo más otras partículas; esta suspensión es la solución madre. A partir de esta solución, se preparan diluciones en serie ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ). La primera dilución ( $10^{-1}$ ) se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril 1 ml de la solución madre a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 80, éste se agita fuertemente durante 1 min. Luego se coloca 1 ml de esta suspensión en otro tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril más 0,01 % de Tween 80, obteniendo así la segunda dilución. Esta operación se repite varias veces hasta lograr obtener una serie de diluciones ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ). Para realizar la siembra y obtener los cultivos del hongo se deben usar las últimas diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ).

El aislamiento directo consiste en la obtención directa del hongo a partir del cuerpo del insecto, pasándolo luego a un medio nutritivo. Esta técnica es desventajosa debido a que las muestras que se toman del insecto pueden estar sucias y contaminar el aislamiento. Por esta razón se recomienda hacer una desinfección externa del insecto con hipoclorito de sodio (3-5%), enjuagándose con agua destilada estéril. Este tipo de aislamiento puede ser de dos formas: a. raspando partículas del hongo en un insecto desinfectado, utilizando un asa bacteriológica y pasándola en un medio nutritivo o b. con una pinza seca y estéril se toma el insecto esporulado desinfectado y se agita con movimiento verticales y horizontales, sobre la superficie del medio de cultivo.

Para obtener los **cultivos puros** se hace un reaislamiento del hongo a partir del cultivo o fuente de inóculo original. El inóculo se siembra o deposita en cajas de Petri que contienen el medio de cultivo PDA. Este cultivo se conoce como puro porque únicamente está el hongo que se desea producir, sin contaminantes. El cultivo puro es la fuente de inóculo para iniciar el proceso de producción, ya que es utilizado para la inoculación de matrices.

La **incubación del cultivo** se realiza después de la inoculación, para lo cual las cajas de Petri se colocan en los lugares de crecimiento, a una temperatura entre 24 y 28 °C, durante 4 - 6 días. En ese período se observa el crecimiento del micelio. Se deben realizar observaciones cada 48 horas para eliminar los contaminantes.

Después de obtener el cultivo puro se inicia el proceso de producción propiamente dicho, para lo cual se utiliza el arroz como sustrato de producción.

Para la **incubación de matrices y bolsas** se utiliza arroz entero precocido como sustrato natural, el cual es humedecido y esterilizado previamente para lograr un buen crecimiento del hongo. Para la preparación del arroz, se coloca un recipiente con agua en la estufa. Cuando el agua comienza a hervir se vierte el arroz y se mantiene durante 5 min (el arroz deberá tener una consistencia suave). Posteriormente, el arroz se pone a escurrir en una zaranda hasta que esté totalmente frío y seco, con el objetivo de procurar que las matrices no adquieran humedad. Para la preparación de la matriz se usan recipientes de vidrio de 500 ml. Se utilizan 100 g de arroz en cada recipiente. Las matrices son esterilizadas en el autoclave, durante 4-5 min, a 121 °C y 1,2 bares de presión. Después éstas se agitan para evitar aglomeraciones de los gránulos de arroz, para lograr un crecimiento homogéneo del hongo sobre las matrices una vez inoculadas.

El objetivo de la matriz es reproducir el inóculo para la inoculación de las bolsas. Para realizar la **inoculación de las matrices** se prepara una suspensión de inóculo a partir del cultivo puro (PDA), este inóculo debe ser de buena calidad, o sea mostrar un buen crecimiento y estar libre de contaminantes. El inóculo de las cajas es raspado con cuidado hasta obtener un polvo de conidias del hongo. Estas se colocan en 60 ml de agua destilada estéril, para formar una suspensión de conidias, que deberá presentar aproximadamente una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias.

La inoculación de las matrices se realiza con una jeringa usada para uso veterinario, la cual debe ser esterilizada a 121 °C y 1,2 bar de presión. Se inoculan 15 cc de la suspensión del hongo por cada matriz que contiene 100 g de arroz precocido. La cantidad de inóculo obtenido a partir de una caja de Petri, es suficiente para inocular cuatro matrices.

Una vez preparadas y debidamente inoculadas, se **incuban las matrices** en un cuarto oscuro a 24 - 28 °C, por aproximadamente 8 días. Durante este período el hongo se desarrolla y producen estructuras reproductivas.

Las bolsas constituyen el medio de producción definitivo, ya que el hongo que se obtiene al final del proceso es el que crece durante esta etapa. La cantidad de arroz utilizada en la bolsa depende del tamaño de la bolsa, generalmente se usan 200 g por bolsa. **Las bolsas son inoculadas** con una suspensión de esporas obtenidas a partir de la matriz, para lo cual se deben preparar tanto las bolsas como el inóculo.

Para la preparación de las bolsas se depositan 200 g de arroz entero en bolsas plásticas de polipropileno

y se les agregan 100 ml agua (destilada o potable), éstas se sellan debidamente para ser esterilizadas en el autoclave a 1,2 bar de presión y 121°C, durante 4 a 5 min. Después de esterilizar las bolsas, se debe agitar con el objetivo de evitar aglomeraciones, para que el inóculo se distribuya uniformemente en el arroz y se obtenga un crecimiento homogéneo. Para la preparación del inóculo, a cada una de las matrices (colonizadas por el hongo) se les agregan 750 ml de agua destilada estéril al 0,1% de extravón y se agita el contenido, hasta obtener una suspensión de conidias, aproximadamente de 600 ml de suspensión. Cada una de las bolsas de 200 g de arroz es inoculada mediante 20 cc de la suspensión, para lo cual se utiliza una jeringa veterinaria previamente esterilizada. Con la suspensión de inóculo obtenida de cada matriz se inoculan aproximadamente 30 bolsas de 200 g.

Las bolsas inoculadas se colocan en los cuartos de crecimiento donde permanecen entre 4 y 6 días, durante este período se revisan las bolsas diariamente, eliminando aquellas que presentan crecimiento lento y no uniforme, débil y las que están contaminadas.

El objetivo del **proceso de secado** es la eliminación de la humedad del hongo y su reproducción. El arroz contenido en las bolsas es depositado en bandejas plásticas que presentan orificios en el fondo. Las bandejas se dejan a temperatura ambiente para que se sequen. Al inicio las bandejas se mantienen selladas y posteriormente se abren. El hongo está listo para la cosecha cuando el arroz tiene una humedad de 4 y 6%.

**La incubación del hongo presente en las bandeja** se inicia con la limpieza de estos recipientes, para lo cual se humedecen con alcohol y se flamean con un mechero. Se seleccionan las bolsas que muestran un contenido de buena calidad, el cual se deposita en las bandejas, colocando el contenido de 10 bolsas por bandeja.

El período de incubación es de aproximadamente 15 días y se desarrolla en 2 fases: a. **tapado de bandeja**, después de depositado el arroz en las bandejas éstas se sellan con cinta de papel pegante Maskin-Tape con el objetivo de formar una cámara de oscuridad con alta humedad relativa para que el hongo continúe su proceso de crecimiento y esporulación. Esta fase dura aproximadamente 6 días. b. **Destapado de bandejas**: una vez que el hongo cubre completamente los espacios del sustrato, se abren las bandejas para lograr eliminar rápidamente la humedad y acelerar el proceso de secado, el cual se realiza al aire libre y tarda de 12 a 15 días aproximadamente. El hongo está listo para la cosecha cuando el arroz se frota entre los

dedos y las conidias se desprenden de en forma de polvo.

La **cosecha del hongo** como parte del proceso de producción semi-industrial, consiste en separar del sustrato (arroz) de las estructuras del hongo (conidias y/o esporas) para su posterior formulación. El polvo que se obtiene contiene esporas y/o conidias y micelio más las partículas del sustrato de arroz. Aunque existen equipos mecánicos para la cosecha de estos hongos, en Nicaragua aún no han sido evaluados, por lo que actualmente este proceso se realiza de forma manual, utilizando tamices y frotación. Este método de cosecha solo es práctico para la producción a pequeña escala. El contenido de las bandejas (arroz colonizado), se deposita en un tamiz de 1 mm, luego por agitación y frotación, se separa el polvo de los granos de arroz. El material retenido por el tamiz se descarta y el polvo recolectado se deposita en recipientes para evaluar el rendimiento.

En condiciones ambientales, las conidias cosechadas pueden ser afectadas por la luz, humedad y altas temperaturas; por lo que una vez cosechado el hongo se debe mantener en refrigeración preservar su viabilidad por más tiempo. Durante todo el proceso de producción, el control de calidad constituye un factor clave porque permite garantizar el proceso de producción (rendimiento), además que el producto obtenido es de calidad y se evita la pérdida de materiales y reactivos.

### **Evaluación de rendimiento**

Al finalizar el proceso de producción se procede a evaluar el rendimiento, el cual se refiere a la cantidad de gramos de polvo cosechado y al número de conidias/g de polvo cosechado. A partir de este rendimiento se procede a estimar el rendimiento neto, para lo cual es necesario conocer la viabilidad del hongo cosechado.

El proceso de evaluación del rendimiento se desarrolla tiene los siguientes pasos: a. **determinación del peso del polvo cosechado** para lo cual se pesa la cantidad de polvo cosechado por bandeja o por kilo de arroz. Este rendimiento depende de la especie de hongo, de la cepa y del método de producción. En el proceso de semi-industrial este rendimiento puede variar entre 200 y 300 g de polvo/kg de arroz, aproximadamente. Por ejemplo, *B. bassiana* cepa Bb-64 produce 270 - 280 g de polvo/kg arroz; la cepa Bb-114 aproximadamente 220 g/kg arroz y la cepa NB aproximadamente 310 g/kg arroz. b. **conteo de conidias/g**

**de polvo cosechado**, para lo cual se utiliza una cámara de conteo (Neubauer). Este rendimiento está determinado por la cepa y por el estado de la misma y varía desde  $5 \times 10^3$  hasta  $2,5 \times 10^{11}$  conidias/g de polvo. Generalmente, las cepas de *B. bassiana* tiene mejor rendimiento que las de *M. anisopliae* y entre las cepas de una misma especie también existen diferencias de rendimiento. Para el conteo de conidias se preparan diluciones en serie ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) del hongo hasta obtener una que permita realizar el conteo.

La primera dilución se obtiene colocando 1 g de polvo cosechado en un tubo de ensayo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,1%, la siguiente dilución se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril 1 ml de la primera dilución a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con 0,01 % de Tween 80, este se agita fuertemente durante 1 min hasta lograr obtener una tercera suspensión de  $10^{-3}$ . De esta manera se va procediendo hasta encontrar la dilución adecuada. Cuando se obtiene la dilución para realizar el conteo, usando una pipeta Pasteur se toma una alícuota de la suspensión y se llena la cámara de conteo. Posteriormente, usando un microscopio se hace el conteo de conidias, este paso se repite varias veces hasta obtener un rendimiento promedio.

La cámara de conteo consiste en una lámina de cristal un poco más gruesa que la de un portaobjeto, la cual presenta una ranura en forma de H y contiene dos cámaras entre éstas. Para facilitar el conteo, el fondo de la cámara tiene un rayado "Neubauer" y presenta nueve cuadros principales (C.P) de 1 mm por lado, de los cuales se puede contar el contenido de las cinco, los cuatro de las esquinas y el central. Para propágulos grandes se puede utilizar los cuadrados principales, pero para los más pequeños como los de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se usan los cuadrados secundarios del cuadro principal (C.P) central.

**Evaluación de la viabilidad del hongo** (porcentaje de germinación): Su objetivo es obtener la concentración del hongo, a partir de la cual se preparan las dosis a utilizar en el campo. Para conocer la viabilidad del hongo se esterilizan las cajas de Petri, con papel filtro y portaobjetos todos en conjunto, en el autoclave a 1,2 bar de presión y 121 °C. Posteriormente se prepara un medio de cultivo y se esteriliza entre 15-17 min, posteriormente con una pipeta Pasteur se depositan dos alícuotas del medio de cultivo en un portaobjeto y con otra pipeta, se depositan sobre éstas, alícuotas de la suspensión del hongo. Después este mon-

taje es colocado en una cámara húmeda, la cual consiste en una caja de Petri con papel filtro humedecido y se mantiene a temperatura 24 - 26 °C.

Las mediciones se realizan entre las 20 y 24 horas después de realizado el montaje. Se realizan las observaciones al microscopio utilizando el objetivo de 25 o 40X. Las variables que se evalúan son: número de conidias germinadas, número de conidias no germinadas y el total de conidias. Como mínimo deben haber 200 conidias en cada montaje.

Una vez que se tiene toda la información de rendimiento (número de conidias/g y viabilidad), se determina la cantidad de hongo cosechado (polvo) necesarios para alcanzar la dosis de campo que es equivalente a  $10^{12}$  conidias/ha. Toda esta información sobre el rendimiento es fundamental para la formulación del hongo.

## Elaboración de formulaciones

La formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos. Estos materiales inertes ayudan a que el hongo trabaje mejor. Todo esto se hace con el fin de lograr una buena homogeneidad y distribución de las partículas del hongo, para poder ser manipuladas y aplicadas adecuadamente.

Para ser formulado, la viabilidad del hongo no debe ser menor de 95% y el contenido de humedad debe estar entre 4 y 6 %. A temperatura ambiente las conidias mantienen su viabilidad por más tiempo cuando el hongo ha sido formulado que cuando se almacena el polvo sin formular.

Hay dos tipos de formulaciones: a. **seca o polvo mo-  
jable** en la cual se utiliza un vehículo, el cual puede ser de origen mineral o vegetal, que ayuda a absorber la humedad de las conidias y mantiene la viabilidad por un tiempo considerable. b. **líquida o emulsificable** que utiliza un líquido solvente y un emulsificante. El líquido utilizado tiene la función de mantener suspendidas las conidias en el medio para lograr una mezcla homogénea que garantice una buena aplicación. Además este líquido debe evitar la absorción de agua por las conidias y mantener su viabilidad. Ambas formulaciones son de fácil manejo y su uso depende de la disponibilidad.

Los materiales utilizados en la formulación deben presentar algunas características tales como: a. No deben tener actividad biológica (efecto sobre animales o plantas). b. Debe ser inocuo al ambiente. c. Debe pre-

sentar características físicas adecuadas para mezclarse con las conidias. d. Debe facilitar la aplicación del producto. e. No debe afectar la actividad del hongo y f. Debe ser económicamente rentable.

La viabilidad de los conidias se mantiene mayor tiempo en la formulación líquida que en la sólida. Sin embargo, cuando en la formulación líquida se utilizan aceites minerales o derivados de petróleo, ésta no es aceptada en producción orgánica debido al tipo de aceite que contiene.

Estudios realizados indican que las conidias pierden su viabilidad a partir de los 10 – 15 días cuando se mantienen a temperatura ambiente, en cambio la viabilidad se mantiene por más de 60 días en las mismas condiciones, cuando las conidias son formuladas.

El producto formulado debe ser empacado o envasado en recipientes que no permitan la entrada de luz porque la radiación ultravioleta afecta la germinación de las conidias y la actividad del hongo. Además el recipiente debe estar cerrado herméticamente para evitar la absorción y penetración de agua.

Por tratarse de productos a base de organismos vivos la calidad (viabilidad) se pierde cuando se mantienen en condiciones desfavorables durante mucho tiempo. Uno de los factores que más afecta a los hongos son las altas temperaturas, por esta razón si se van a almacenar por mucho tiempo se recomienda mantenerlos en refrigeración. Si se almacenan por períodos cortos se pueden mantener en condiciones ambientales pero en lugares frescos, evitando la radiación directa del sol.

La aplicación de los hongos entomopatógenos, formulados en polvo o en aceite, es semejante a la de cualquier otro producto. Por ejemplo, la formulación en polvo es vertida en un el recipiente con agua y se agita bien por varios minutos para obtener una mezcla uniforme. Finalmente, la mezcla se deposita en la bomba y se asperja sobre el cultivo. El hongo aplicado se establece en el campo, ya sea en el suelo, las plantas o sobre la plaga.

## Control de calidad

En el proceso de producción de hongos entomopatógenos el control de calidad constituye un factor clave. Este consiste en la evaluación rigurosa de la calidad en cada uno de los pasos del proceso de producción. Su objetivo evitar los problemas de contaminación y garantizar la calidad del hongo producido.

Existen una variedad de microorganismos contaminantes que pueden afectar el proceso, algunos de los cuales son patógenos al hombre. Entre los conta-

minantes más comunes están los hongos y las bacterias; por las características de crecimiento algunos de ellos son más difíciles de eliminar que otros.

La diversidad de contaminantes es mayor en la etapa de cepario que en la etapa de producción (matrices, bolsas y bandejas). Se pueden presentar problemas de contaminación en matrices y bolsas. Sin embargo, en bandejas no hay posibilidad de presencia de contaminantes porque el hongo coloniza completamente el sustrato de arroz y utiliza todos sus nutrimentos.

**Control de calidad de la cepa.** El objetivo del control de calidad en esta etapa del proceso de producción es detectar la presencia de contaminantes en los medios de cultivo, para su eliminación y obtención de cultivos puros, con buenas características de crecimiento y de eficacia para el control de la plaga. Debido a que en la etapa de cepario se trabaja con medios de cultivo de alto valor nutritivo, existen mayores posibilidades de crecimiento de microorganismos no deseados, principalmente hongos y bacterias presentes en el ambiente o en otras fuentes de contaminación.

El control de calidad en la etapa de cepario debe realizarse con mucho rigor, debido a que es el inicio del proceso de producción, y la selección incorrecta de la cepa y del cultivo puro así como la presencia de contaminantes afectará los siguientes pasos del proceso, y por consiguiente la calidad y el rendimiento del producto obtenido.

**Contaminantes más comunes.** Se considera contaminante a todo microorganismo no deseado que se desarrolla en el medio en el cual se cultiva el hongo entomopatógeno. Los contaminantes pueden estar presentes en el ambiente y en los materiales empleados en el laboratorio cuando no se cumplen las normas de trabajo para evitarlo. Estos afectan al hongo porque compiten con los nutrimentos del medio y por el espacio, además los contaminantes pueden comportarse como hiperparásitos, es decir alimentarse del hongo, además pueden producir sustancias que inhiben el crecimiento y la formación de estructuras reproductivas.

Entre los hongos contaminante más comunes están los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pestalotia*.

**Fusarium:** Las colonias de este hongo pueden tener diferentes coloraciones o presentar pigmentaciones en el medio en que se encuentran. Estas coloraciones pueden ser naranjas, rosadas, amarillas, crema, violáceas y producen macro y micro conidias.

**Penicillium:** Conidióforos largos, septados, lisos o rugosos, individuales o en sinemas, ramificado cerca del

ápice en uno, dos o más verticilos, que le dan aspecto de una escoba, ramas terminadas en fiálides o células fértiles productoras de conidias, las cuales son producidas basipetalamente y unidas en cadenas. Las conidias son globosas a elípticos, lisos o equinulados.

***Aspergillus flavus***: Es un hongo cancerígeno, tiene conidióforos hialinos rugosos o reticulados y con vesículas globosas, cabezuelas conidiales globosas verde o verde amarillentas, esterigma en una o dos series a veces hasta en una misma vesícula. Conidias globosas a ovales.

***Pestalotia***: Las colonias son blancas y están salpicadas por unas gotas de exudado negro brillante en las que se encuentra millares de conidias del hongo, pueden tener de tres a cuatro septos y son de forma clavada a obclavada o fusoides a veces tienen coloración pálida uniforme. Lo más característico es la presencia de varias setas a un extremo y un pedicelo más o menos corto al otro extremo.

Los géneros de bacterias contaminantes más comunes son: *Serratia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

***Serratia***: Es una bacteria muy dañina para el proceso de producción de hongos entomopatógenos, porque no forma colonias sino que cubre por completo el cultivo puro donde se encuentra, tomando una coloración roja y por lo tanto es difícil de erradicar.

Todos estos contaminantes se presentan de manera general a excepción de *Pestalotia* que se presenta principalmente en cultivos de *Verticillium*.

Para evitar el crecimiento de bacterias al medio se le debe de agregar un antibiótico como penicilina, cloranfenicol y regular el pH adicionando ácido láctico. Cuando el daño por bacterias es elevado se recomienda asperjar el lugar de trabajo con formalina para erradicarla y esterilizar todo el material que presente forma de colonias rojas.

El reconocimiento de algunos hongos y bacterias contaminantes se realiza el crecimiento característico, por ejemplo, la presencia de puntos con diferentes formas de coloración. Si el crecimiento del entomopatógeno es lento y seco y se forman colonias cuya coloración es rojo, amarillento, verde pálido, cremas, entonces se trata de hongos.

Cuando la contaminación es por bacterias, el entomopatógeno no logra crecer completamente en el sustrato y se forma una masa suave, y pueden aparecer en el sustrato manchas de color rojo, cremas y/o amarillentos. Además las bacterias presentan un olor fuerte y desagradable. Los hongos contaminantes presentan un olor característico a fermentación fuerte, el

que se diferencia del olor característico de los entomopatógenos.

**Control de calidad de los cultivos puros.** Los cultivos puros utilizados como fuente de inóculo para la matriz, deben ser sometidos a un riguroso control de calidad. Estos se organizan por lote para dar seguimiento a las características de crecimiento que presenten contaminantes. La prueba para bacterias contaminantes se realiza inoculando el hongo con asa bacteriológica mediante rayado en la caja de Petri que contiene agar nutriente. Para ello se introduce el asa debidamente esterilizada, sobre diferentes puntos de la caja con cultivo puro del hongo entomopatógeno, luego se inocula por medio de un rayado con el asa sobre la superficie de las cajas de Petri que contienen el agar nutriente.

A las cajas inoculadas se les da un control constante y se etiquetan con la información apropiada (fecha del control, cepa, numeración de cada una, número de pase, tipo de crecimiento, etc.). Las observaciones sobre el crecimiento de bacterias, se hacen entre las 24-48 horas después de montada la prueba, descartando las cajas de Petri que muestran presencia de bacterias. En el caso de hongos contaminantes se realiza una limpieza del cultivo, eliminando las colonias por completo.

**Control de calidad en la etapa de producción.** En la etapa de producción, principalmente en matrices y bolsas la diversidad de contaminantes es menor que en el cepario. Los principales problemas de contaminación son ocasionados por bacterias y generalmente ocurren debido a mal manejo del sustrato, por ejemplo aglomeraciones de arroz o exceso de humedad. El tipo de control que se realiza puede ser descriptivo o visual. El descriptivo consiste en llevar en forma detallada, información referente a la cepa, registro de la caja de Petri con su respectivo control de calidad, fecha de inoculación, lote, etc. El control visual consiste en la observación del crecimiento del entomopatógeno en las bolsas.

**Control de calidad de matriz.** Las matrices se preparan de inóculos de hongos provenientes de cultivos puros. Por esta razón se debe hacer una adecuada selección del cultivo a utilizar. Además cada caja se le debe hacer el control de calidad apropiado. Este se inicia seleccionando adecuadamente los materiales, principalmente cajas con cultivos puros que presentan buen crecimiento de conidias, libres de contaminantes de hongos y bacterias.

Durante el proceso de incubación, la matriz se revisa diariamente a partir del tercer día después de la



inoculación, para detectar la presencia de contaminantes, principalmente bacterias. Si el crecimiento del hongo es lento y no uniforme o el sustrato adquiere una consistencia blanda, ocurre una coloración amarillenta, ya sea focalizada o generalizada, entonces se debe descartar la matriz y esterilizarla para destruir el inóculo contaminante.

**Control de calidad de la bolsa.** Los problemas de contaminación en bolsa son similares a los que ocurren en matriz, pero se pueden presentar con mayor frecuencia, debido a problemas de humedad o problemas en la inoculación. Durante la fase de bolsa se debe realizar un control sistemático para evitar problemas de contaminación y seleccionar adecuadamente el material. Este control se realiza mediante la observación del crecimiento, el cual puede ser de varios tipos: **Disparejo:** crecimiento focalizado sobre diferentes puntos del sustrato, el material debe ser descartado por completo del lote en producción. Este tipo de crecimiento puede deberse a la presencia de contaminantes y/o a una mala manipulación durante la inoculación. **Lento:** este tipo de crecimiento puede ser focalizado o parejo. Puede estar asociado a una mala agitación del sustrato después de efectuada la inoculación, factores ambientales, estado de la cepa, presencia de contaminantes o calidad del inóculo. **Homogéneo.** Este es el criterio apropiado para la selección de la bolsa que entrará en producción. Este crecimiento presenta las características de ser uniforme sobre todo el sustrato de arroz y además es rápido.

**Control de calidad del producto cosechado.** El control de calidad del producto cosechado se realiza mediante la evaluación de rendimiento en número de conidias por gramo de polvo cosechado y la **viabilidad** de las conidias (porcentaje de germinación). Se considera de calidad aquel rendimiento que no sea inferior al rendimiento promedio de la cepa y que la viabilidad no sea menor al 95%. Si una cepa presenta un rendimiento muy bajo no debe utilizarse porque su rentabilidad sería muy baja. Cuando el rendimiento es muy bajo se debe a que la cepa es muy vieja y ha ido perdiendo sus características, por lo que se recomienda reactivarla en el insecto hospedante. Las evaluaciones de rendimiento (conidias por gramo de polvo) se deben realizar al momento de la cosecha y antes de la preparación de la formulación.

**Control de calidad de la preservación en sílica gel.** El control de calidad del material preservado se inicia con la selección adecuada del cultivo puro, el cual debe ser reciente y debe presentar características de

buen crecimiento, buena esporulación y buen vigor. El proceso del control de calidad se efectúa entre 5 y 6 días después de la preservación, con el objetivo de determinar el estado del cultivo. Si éste se encuentra en mal estado, es necesario descartar todo el material preservado. Se siembran cristales de sílica gel en un medio de cultivo con el propósito de observar el tipo de crecimiento del entomopatógeno y detectar la presencia de contaminantes (bacterias y hongos).

#### **Procedimiento para el control de calidad**

1. Anotar en un registro algunas características de coloración de los cristales de sílica gel, si contiene humedad, tubo muestreado, la fecha de preservación anterior, etc.
2. De los tubos preservados se toman de 10 a 15 cristales de sílica gel y se siembran en 2 a 3 cajas de Petri con PDA.
3. A las cajas de Petri se les coloca una etiqueta que lleva la información: la fecha del día del control de calidad, el código de la cepa, la fecha de preservación y número de la caja.
4. Posteriormente las cajas son colocadas en una incubadora o se dejan a temperatura ambiente.
5. Las cajas deben ser revisados tres días después de la inoculación para observar el tipo de crecimiento. El crecimiento del hongo debe ser característico del aislamiento preservado.

#### **Literatura consultada**

- Alves, SB. 1986. Controle microbiano de insectos. Sao Pablo, Brasil, Editora Manole. 407 p.
- Badilla, F. Potencial del control biológico en el manejo de plagas agrícolas y forestales. Sin publicar.
- Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogen. Cambridge University Press. 199 p.
- Lacey, L. 1997. Manual of techniques in Insect Pathology. Biological Techniques Series. Academic Press. California, USA. 408 p.
- Leucona, RE. 1995. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de insectos Plaga. Argentina 338 p.
- Roberts DW. 1989. World Picture of biological control of insects by fungi. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro p.89-100.
- Rogg, HW. 1998. Guía Práctica de Producción Masiva del Entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el Control Biológico de Insectos Plaga y Vectores en Bolivia. Universidad Autónoma "Gabriel René Moreno" Instituto de Investigaciones Agrícolas "El Vallecito" Bolivia. 36 p.
- Samson, RA; Evans, CH; Latgé, Jean-Paul 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag. 186 p.
- Universidad Nacional Agraria. 2000. Producción y Uso de Hongos Entomopatógenos para el control de plagas agrícolas. Managua, Nicaragua. En prensa. 49 p.