

Producción y uso de hongos

ENTOMOPATOGENOS



Producción y uso de hongos entomopatógenos

Edición:

Ing. Arnulfo Monzón C. UNA
Universidad Nacional Agraria,
Facultad de Agronomía,
Departamento de Protección Agrícola y Forestal

Revisión técnica:

Dr. Falguni Guharay
Programa CATIE/MIP-AF

Diseño y realización:

Darwin Granda

El autor reconoce que parte de la información utilizada en la elaboración de este manual proviene de trabajos realizados previamente por otras instituciones como: Universidad Nacional Agraria, Programa CATIE/MIP-AE, Grupo de Control Microbial, así como de personas que han trabajado en este campo en Nicaragua.

Presentación

El uso excesivo de los plaguicidas, ha dejado efectos negativos en el suelo, el agua y en el ambiente; ha provocado aumento de las plagas debido a la destrucción de los enemigos naturales; el uso de estos productos ha causado serios problemas en la salud de las personas, incluyendo mortalidad.

Para reducir el efecto negativo del uso indiscriminado de los plaguicidas, se ha hecho necesario la implementación de sistemas agrícolas sostenibles basados en el conocimiento de las relaciones entre cultivos, el ambiente y los organismos que viven en el campo.

En la naturaleza existe una gran diversidad de organismos, los cuales afectan a los insectos, reduciendo así las poblaciones de plagas. Entre estos organismos encontramos hongos, bacterias, virus y nemátodos entomopatógenos, algunos de los cuales, principalmente los hongos, han sido manipulados y reproducidos masivamente para ser utilizados exitosamente en el control de importantes plagas agrícolas.

Para que los insecticidas a base de hongos entomopatógenos estén disponibles para los usuarios, deben producirse en cantidades suficientes, para lo que se necesita implementar métodos de producción que además de obtener buenos rendimientos, proporcionen un producto de buena calidad.

El objetivo de éste documento es el de proporcionar información que contribuya a un mejor conocimiento de los hongos entomopatógenos, su biológica, ecología y principalmente la forma de producción de dichos agentes para ser usados en el manejo de las plagas.

La elaboración de este documento ha sido posible gracias al apoyo financiero de la Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua, (**FUNICA**), a través del Fondo de Apoyo a la Investigación Tecnológica Agropecuaria y Forestal de Nicaragua, (**FAITAN**).

Indice

Presentación	Pag. 3
Introducción	4
Producción de hongos entomopatógenos	10
Anexos	35
Guía para elaborar medios de cultivo	35
Guía para aislar e inocular hongos entomopatógenos	37
Guía para preparar e inocular matrices y bolsas	39
Guía para la incubación, secado de bandejas y cosecha de hongos entomopatógenos	41
Guía para evaluar el rendimiento de hongos entomopatógenos y preparación de formulaciones	42
Guía para preservar hongos entomopatógenos	45
Guía para reactivar cepas de hongos entomopatógenos	47
Guía para realizar control de calidad	52
Uso de hongos entomopatógenos para el manejo de plagas agrícolas	55

Presentación

El uso excesivo de los plaguicidas, ha dejado efectos muy negativos en el suelo, el agua y en el ambiente; ha provocado un aumento de las plagas debido a la destrucción de los enemigos naturales; el manejo de las plagas se ha hecho más difícil debido al surgimiento de resistencia. Además, el uso de estos productos ha causado serios problemas en la salud de las personas, incluyendo mortalidad.

Para reducir el efecto negativo del uso indiscriminado de plaguicidas, se ha hecho necesaria la implementación de sistemas agrícolas sostenibles basados en el conocimiento de las relaciones entre los cultivos, el ambiente y los organismos que viven en el campo; es decir entender mejor la naturaleza. Esto permitiría obtener buenas cosechas, sin contaminación ambiental y sin daño a la salud humana.

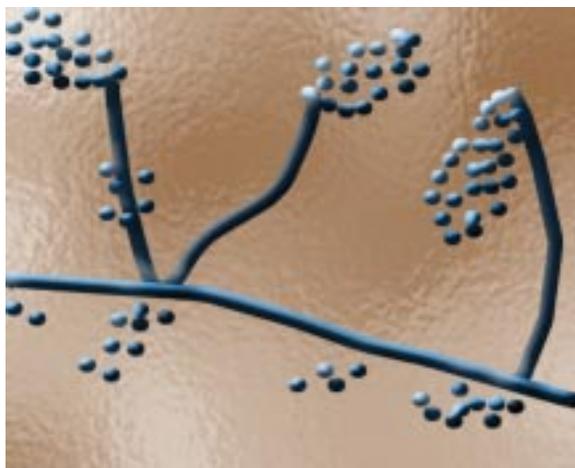
En la naturaleza existe una gran diversidad de organismos, los cuales afectan a los insectos, reduciendo así las poblaciones de plagas. Entre estos organismos encontramos los entomopatógenos, entre los cuales están hongos, bacterias, virus y nematodos. Algunos de microorganismos, principalmente los hongos, han sido manipulados y reproducidos masivamente para ser utilizados comercialmente en el control de importantes plagas agrícolas. Al uso de estos microorganismos para el control de plagas es lo que llamamos control microbial.

A los hongos que utilizamos en el control de insectos plagas los llamamos entomopatógenos, por que causan enfermedades a los insectos o producen toxinas, hasta causar su muerte. Actualmente se han identificado y estudiado diversas especies de hongos que afectan a las plagas de muchos cultivos, de manera que muchos de ellos son utilizados exitosamente en programas de manejo de plagas.

El presente manual tiene el objetivo de proporcionar información que contribuya a un mejor conocimiento de los hongos entomopatógenos, su biología, ecología y principalmente la forma de producción de dichos agentes para ser usados en el manejo de plagas.

Introducción

Los hongos son organismos microscópicos que se encuentran en la naturaleza en el ambiente, rastros de cultivos, en el suelo, las plantas, etc; obtienen su nutrición de otros organismos o de materia orgánica, su cuerpo está constituido por una estructura llamada micelio, que es un conjunto de estructuras filamentosas llamadas hifas. Estos se desarrollan bien en lugares frescos, húmedos y con poco sol. A los hongos que obtienen su nutrición a partir de insectos son conocidos como entomopatógenos, ya que causan enfermedades en los insectos plagas hasta causar su muerte.



Gráfica microscópica de micelio y conidias del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

Los Hongos Entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plagas. Virtualmente todos los insectos son susceptibles a las enfermedades causadas por hongos. Se conocen muchas especies de hongos entomopatógenos, correspondientes a alrededor de 100 géneros. Entre los géneros más importantes podemos mencionar: *Metarrhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*.

Hongos entomopatógenos más utilizados

De todos los hongos entomopatógenos conocidos por su efecto sobre plagas, en Nicaragua y en toda la región los más utilizados corresponden a las especies *Beauveria bassiana* y *Metarrhizium anisopliae*, de las cuales se han evaluado muchas cepas contra plagas de importancia agrícola.

Beauveria bassiana: Es un hongo que pertenece a la clase Deuteromycete, orden Moniliales, familia Moniliaceae. Este hongo ha sido encontrando atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de mucha importancia agrícola (Alves 1986). Entre las plagas más importantes controladas por este hongo están la broca del café, la palomilla del repollo, picudo del plátano (*Cosmopolites sordidus*), así como el picudo de la chiltoma (*Anthonomus eugeniei*). 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. Este patógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes (Alves 1986). Algunas plagas que son afectadas por este hongo son la salivita de la caña de azúcar (*Aeneolamia* spp y *Prosapia* sp), 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.

Para cada plaga en particular existen cepas específicas, las cuales se han venido seleccionando debido a la patogenicidad que tienen sobre la plaga, así como por sus características de producción. Por ejemplo para el control de la broca del café la cepa más efectiva es Bb-114; para plutella de repollo es la cepa Bb-38, para el control de picudo de chiltoma es la cepa Bb-64 y para el control de la salivita de caña, la cepa más efectiva es la cepa Ma-NB.

Modo de acción de los hongos entomopatógenos sobre los insectos

Los hongos entomopatógenos al igual que la mayoría de los hongos de plantas y vertebrados, infectan al hospedante a través de la cutícula externa. Esta forma de penetración es única de los hongos ya que otros entomopatógenos como bacterias y virus penetran por la vía oral.

El contacto entre el inóculo del entomopatógeno y el insecto es fundamental para el inicio del proceso infeccioso; el contacto ocurre al azar, un clima favorable, suficiente cantidad de inóculo del entomopatógeno en el ambiente, así como la existencia de suficientes insectos hospedantes, son factores que favorecen el efecto de los hongos entomopatógenos.

La epicutícula o capa más externa del integumento del hospedante es el sitio inicial de la interacción patógeno-hospedante. El integumento es una estructura muy compleja, cuya composición química es muy importante para el proceso de penetración. Entre sus componentes se encuentran lípidos, lipoproteínas, polifenoles y proteínas. Se ha observado que esta capa posee finos canales por los cuales ocurre el suministro de ceras, azúcares y proteínas, los cuales juegan un rol muy importante en las interacciones señal-receptor, entre la cutícula y la espora. Azúcares no-estructurales y compuestos nitrogenados producidos por las plantas o el insecto pueden contaminar la cutícula, afectando así el proceso de fijación.

En general en el proceso de la patogénesis (micosis), se observan tres fases: a) germinación de la espora en la cutícula del hospedante; b) penetración del integumento del insecto por medio del tubo germinativo; c) desarrollo del hongo dentro del cuerpo del insecto y su multiplicación. En este proceso se pueden verificar los siguientes pasos: Adhesión, germinación, penetración, multiplicación del hongo, producción de toxinas, muerte del insecto, colonización, producción de micelio hacia el exterior, esporulación y diseminación del hongo.

Adhesión

Consiste en la fijación de los propágulos del hongo con la superficie del insecto. Esta constituye una de las fases más importantes del proceso infeccioso y está correlacionada con la especificidad hospedante - patógeno. Sólo las cepas más virulentas logran exitosamente la adhesión. En el proceso de adhesión participan sustancias como lectinas (proteínas o glucoproteínas) y mucopolisacáridos, además de algunos lípidos. Estas sustancias o secreciones aparecen al inicio del contacto del hongo con el insecto.

En el cuerpo del insecto existen ciertas zonas preferidas para la adhesión, como son las regiones intersegmentales, en donde la composición y estructura son diferentes al resto del cuerpo del insecto.

Germinación

Luego de la adhesión de la espora sobre el integumento del insecto, ésta germina emitiendo un tubo germinativo, formando luego un apresorio. El tubo germinativo puede ser largo o corto y en algunos casos puede no llegar a formarse. En el proceso de germinación juegan un rol importante los requerimientos nutricionales de la espora y las condiciones ambientales presentes. En este sentido se ha observado que las esporas de *beuveria* son más exigentes en carbono y energía que las de *metarhizium*.

Penetración

Después de la germinación se producen una serie de transformaciones físicas y químicas, tanto en el insecto como en el hongo, que permiten al patógeno penetrar la cutícula de su hospedante. Un conidio puede germinar, sin embargo si no se dan las condiciones físicas y químicas y los estímulos correspondientes no logra penetrar. Enzimas principalmente lipasas, proteasas y quitinasas, son producidas por la hifa y ocasionan una alteración de la cutícula, que facilita la entrada de la hifa de penetración.

Multiplicación del hongo en el homocelo

En el interior del insecto el hongo se multiplica, principalmente por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamadas blastosporas en los Deuteromycetes, también se pueden formar en el hifas, protoplastos y células sin pared.

Los insectos tienen un sistema inmunológico que les permite reconocer y reaccionar a partículas extrañas como propágulos de hongos, bacterias y virus, en el homocelo del insecto, las cuales pueden ser fagocitados, evitando así la presencia de otros organismos.

Producción de toxinas

Las toxinas son sustancias de baja toxicidad para mamíferos pero muy tóxicas para artrópodos, por lo que pueden causar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas; además actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del insecto. La producción de toxinas es una característica de todos los hongos y cepas. Las toxinas producidas pueden ser de dos tipos: a) macromoléculas proteicas y b) sustancias de bajo peso molecular. Las primeras son enzimas secretadas en cantidades significativas tanto en medios de cultivo como en el cuerpo del insecto. La serilproteasa y sulfidrilproteasa, han sido aisladas de *metarhizium*; otras enzimas encontradas son lipasas, glicogenasas, amilasas y quitinasas. El segundo tipo corresponde a metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos, pero que puede ser afectada por factores como nutrientes, pH, temperatura, etc. Las toxinas más comunes de este tipo son principalmente las destruxinas, demetildextruxina y protodextruxina.

Muerte del insecto

La muerte del insecto parasitado, ocurre generalmente antes que el hongo colonice totalmente el homocelo del insecto. Esto se debe en gran parte a la acción de las toxinas. Con la muerte del insecto finaliza la fase parasítica y se inicia la saprofítica. Cuando el insecto muere no se observa evidencia del hongo causante de la muerte, sino posteriormente. La duración de la muerte depende de la cepa del hongo, del hospedante y de las condiciones ambientales.

Colonización total

Luego de la muerte del insecto, el micelio invade todos los órganos y tejidos, iniciando generalmente por el tejido graso. Pueden existir órganos o tejidos que no son colonizados. Después de la colonización, el cadáver del insecto se transforma en una momia, la que es resistente a la descomposición bacteriana, aparentemente debido a la acción de antibióticos liberados por el hongo.

Emergencia del hongo hacia el exterior

Después de la colonización, si las condiciones externas son de baja humedad relativa, el hongo puede mantenerse en el interior del insecto, protegido por el integumento, pero en condiciones húmedas el hongo emerge del cuerpo del insecto principalmente a través de las zonas menos esclerosadas.

Esporulación

Después que las hifas atraviesan el integumento, si las condiciones son de alta humedad relativa, en un período de 24 a 48 horas ocurre la producción de esporas o conidias. Es en esta fase el insecto muerto adquiere una coloración característica de acuerdo al hongo, por ejemplo verde si es *metarhizium* y blanco si es *beauveria*.

Producción de hongos entomopatógenos

El uso de los hongos entomopatógenos, para el control de plagas agrícolas, como un componente de los programas de manejo integrado de plagas, constituye una alternativa viable para los productores, ya que además de ser eficiente en el control de las plagas presenta muchos beneficios desde el punto de vista ambiental, agroecológico y de salud humana.

Para que los insecticidas a base de hongos estén disponibles para los usuarios, deben producirse en cantidades suficientes, es decir que se necesita implementar métodos de producción que además de obtener buenos rendimientos, proporcionen un producto de buena calidad. La producción de hongos entomopatógenos, se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (esporas y/o conidias) en un substrato natural. Hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de substratos naturales, principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soya; siendo el arroz y el trigo los más utilizados actualmente.

Los métodos de producción desarrollados incluyen desde la multiplicación artesanal realizada por los mismos productores, la producción semi-industrial a mediana escala, hasta la producción industrial a gran escala que se realiza en empresas más grandes o compañías, para la cual se requiere de reactivos y equipos más especializados.

La diferencia entre estos métodos no se manifiesta en la calidad del producto obtenido, si no más bien en los procesos empleados y en los volúmenes de producción; ya que si se realiza un buen control de calidad con cualquiera de los métodos se obtiene un producto de alta calidad. De manera que utilizar uno de los métodos de producción depende de la disponibilidad de recursos humanos y materiales, equipos e instalaciones. A partir de estas consideraciones el método que mejor se ajusta a las condiciones de Nicaragua es el método de producción semi industrial.

Producción semi-industrial

El proceso de producción semi-industrial 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 etapa de producción.

El tiempo empleado en desarrollar el proceso de producción, para producir un lote de producto es aproximadamente un mes, desde que se obtiene el cultivo puro hasta que se cosecha y formula el producto.

Pasos del proceso de producción semiindustrial de hongos entomopatógenos

<p>Cepario</p> <p>Aislamiento del hongo</p> <p>Elaboración de cultivos puros</p>
<p>Producción</p> <p>Preparación de matrices y bolsas.</p> <p>Inoculación e incubación de matrices</p> <p>Inoculación e incubación de bolsas</p> <p>Proceso de secado</p> <p>Cosecha del hongo</p> <p>Elaboración de formulaciones</p>

La etapa de cepario comprende el aislamiento de la cepa y la obtención del cultivo puro. Además se considera la obtención de cepas nuevas, el mantenimiento, reactivación y preservación de las cepas. La etapa de producción comprende la preparación de los substratos, inoculación e incubación de matrices y bolsas, el proceso de secado (bandeja), la cosecha del hongo y la preparación de las formulaciones.

Aislamiento

Este paso consiste en la obtención del hongo a partir de la fuente de inóculo, la cual puede ser a partir de insectos, plantas; o medios artificiales como: PDA (platos petri, tubos de ensayo, etc.) o de preservaciones en seco como silica-gel. A partir del aislamiento del hongo se procede a su inoculación en un medio de cultivo, para la obtención de un cultivo puro.



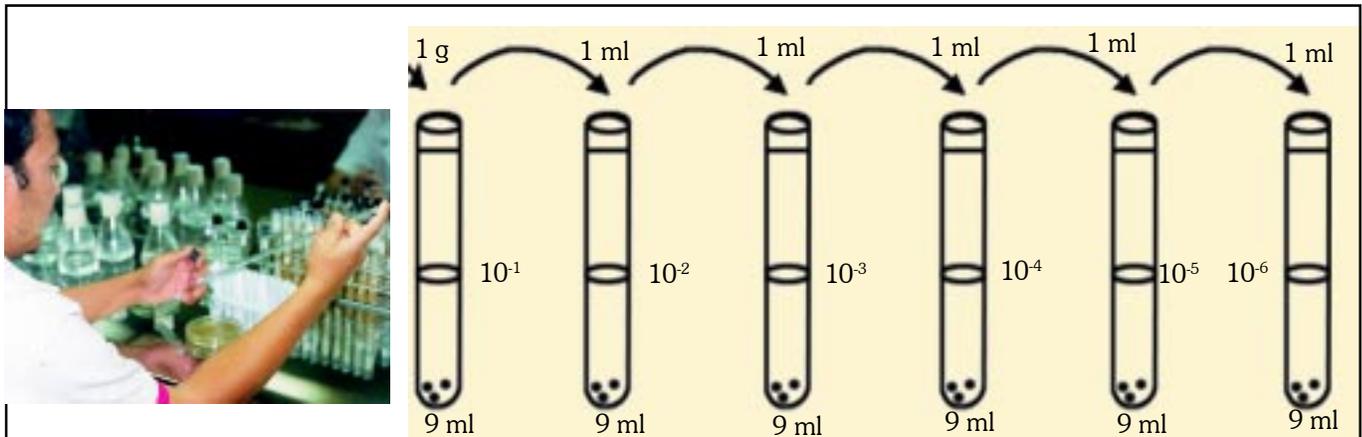
Chinches muertos, cubiertos por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

Debido a que se trata del paso inicial del proceso de producción debemos asegurar el éxito del mismo, ya que un error en este paso tiene consecuencias en 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 debe tener buen vigor para su crecimiento.

El aislamiento de hongos entomopatógenos puede hacerse de diversas maneras, siendo las más comunes el aislamiento por dilución seriada y el aislamiento directo.

Aislamiento por dilución seriada es el método más utilizado, consiste en colocar un insecto cubierto con las esporas del hongo, en un recipiente que contiene 10 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de Tween 80. La suspensión resultante se debe agitar por 1 minuto, para que las conidias se desprendan del cuerpo del insecto. Lo que resulta de la mezcla es una suspensión concentrada del inóculo más otras partículas; a esta suspensión la llamamos solución madre.

A partir de la solución madre, 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 un 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 minuto, luego tomamos un ml de esta suspensión y lo colocamos en otro tubo de ensayo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de Tween 80, obteniendo así la segunda dilución. Este operación se repite varias veces hasta lograr obtener una serie de diluciones (10^{-1} hasta 10^{-6}). Para realizar la siembra del hongo se deben usar las últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}); esto se hace principalmente para reducir los riesgos de contaminación con otros microorganismos.



Aislamiento directo

La técnica de 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 puede acarrear problemas de contaminación en el aislamiento. Por esta razón se recomienda hacer una desinfección externa del insecto con hipoclorito de sodio, enjuagándose con agua destilada estéril. Este tipo de aislamiento puede ser de dos formas:

- a. Raspando con un asa bacteriológica las partículas del hongo en un insecto desinfectado, pasándola luego mediante la técnica de rayado a un medio de cultivo.
- b. Con una pinza seca y estéril, tomamos el insecto esporulado desinfectado y se agita con movimientos verticales y horizontales sobre la superficie del medio de cultivo.

Cultivos puros

Un cultivo puro, es el desarrollo de un organismo libre del crecimiento de otros organismos. Se obtiene haciendo un aislamiento del hongo a partir del cultivo o fuente de inóculo original. El inóculo se siembra o deposita en platos petri que contienen el medio de cultivo PDA (u otro medio). Se le llama puro por estar presente únicamente el hongo de interés (sin contaminantes).

En todo proceso de producción de hongos, la obtención del cultivo puro es el paso más importante, ya que éste constituye la fuente de inóculo para iniciar el proceso de producción, ya que es utilizado para la inoculación de los substratos.

Al obtener un cultivo puro para incorporarlo al proceso de producción, debemos estar seguros que el aislamiento es reciente y que tiene todas las características de la cepa, relacionadas principalmente a su vigor de crecimiento y a su patogenicidad. Para mantener estas características es necesario reactivar el hongo por lo menos dos veces al año.

La reactivación del hongo se hace mediante bioensayos y consiste en la inoculación del hongo en insectos de la especie que es controlada por el hongo, por ejemplo si es una cepa para el control de broca de café, se tiene que hacer colecta de este insecto para hacer el bioensayo. Después de la inoculación se procede a la incubación, colocando el bioensayo en condiciones adecuadas de temperatura. El bioensayo se tiene que revisar todos los días y los insectos muertos se extraen y se colocan en cámara húmeda para favorecer la esporulación del hongo. Finalmente a partir de los insectos esporulados se hace el aislamiento del hongo, utilizando las técnicas correspondientes.

Incubación del cultivo

La incubación es el período durante el cual ocurre el crecimiento y reproducción del hongo. Después de realizar la inoculación, los platos petri se colocan en los lugares de crecimiento a temperatura de 24 a 28 °C, durante un tiempo de 4 a 6 días.

Durante este período se observa el crecimiento del micelio y la producción de conidias. Normalmente esta etapa finaliza cuando el hongo llega a cubrir toda la superficie del medio de cultivo en el plato petri. Para realizar limpieza de los contaminantes y darle seguimiento al cultivo, se deben realizar observaciones cada 48 horas.



Platos petri colocados en lugares de crecimiento del hongo, a temperaturas de 24 a 28 grados centígrados, durante un tiempo de 4 a 6 días.

Matrices y bolsas

Estas dos etapas del proceso de producción, tienen como objetivo reproducir masivamente el hongo en un sustrato de arroz entero, para obtener las unidades infectivas, o sea las conidias del entomopatógeno. En la matriz se produce el hongo que se utiliza para inocular las bolsas, y en las bolsas se reproduce el hongo que luego es pasado a las bandejas y que será cosechado al final del proceso de producción.

La matriz se establece en recipientes de vidrio (erlenmeyer) y las bolsas en bolsas de polipropileno. Para la matriz se utilizan 100 gramos de arroz en cada erlenmeyer. La cantidad de arroz a colocar en la bolsa, depende del tamaño de ésta, generalmente se usan 200 gramos por bolsa.

Preparación del sustrato de arroz para las matrices

El arroz que se utiliza en las matrices, debe ser precocido, para lo cual se coloca un recipiente con agua, en la estufa, cuando el agua comienza a hervir se deposita el arroz y se mantiene hasta que el arroz presenta una consistencia suave, lo cual toma aproximadamente 5 minutos. 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, durante su incubación. En cada erlenmeyer se depositan 100 gramos del arroz pre-cocido y seco, lo cual constituye la matriz. Las matrices son esterilizadas en el autoclave, durante 4 a 5 minutos, a 121°C y 1.2 bares de presión, con el fin de eliminar contaminantes.

Después de esterilizadas las matrices, éstas se agitan para evitar aglomeraciones de los granos de arroz, lo que favorece el crecimiento homogéneo del hongo sobre las matrices una vez inoculadas.

Inoculación de matrices

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, es decir de buen crecimiento y libre de contaminantes.

El inóculo se obtiene raspando cuidadosamente el hongo de la superficie del medio de cultivo hasta obtener un polvo de conidias del hongo. Este se coloca en 60 ml de agua destilada estéril, para formar una suspensión de conidias, que deberá tener aproximadamente una concentración de 1×10^8 conidias.

La inoculación de matrices se realiza con jeringa 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 un plato petri, es suficiente para inocular cuatro matrices.

Incubación de matrices

Después de la inoculación, las matrices son incubadas en un cuarto oscuro a temperaturas de 24 a 28°C , por un período aproximado de 8 días. Durante este período el hongo se desarrolla y produce estructuras reproductivas o conidias.



Proceso de inoculación de matrices a partir de la preparación de una suspensión de inóculo.

Inoculación de bolsas



La inoculación de bolsas con 200 gramos de arroz con esporas obtenidas a partir de la matriz.

Las bolsas son inoculadas con una suspensión de esporas obtenidas a partir de la matriz, para lo cual se deben preparar las bolsas y preparar el inóculo.

Para la preparación de las bolsas se depositan 200 gramos 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 minutos. 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 aproximadamente 600 ml de suspensión de conidias.

Cada bolsa de 200 gramos de arroz es inoculada con 20 cc de la suspensión de conidias, utilizando una jeringa veterinaria que debe ser esterilizada previamente. Con la suspensión de inóculo obtenida de cada matriz se inoculan aproximadamente 30 bolsas de 200 gramos.

Incubación de Bolsa

Las bolsas inoculadas se ubican en los cuartos de crecimiento donde pasan un período de 4 a 6 días. Durante este período se revisan las bolsas diariamente, para ir seleccionando las bolsas de buena calidad, eliminando las bolsas que presentan crecimiento lento y no uniforme, bolsas que presentan un crecimiento débil así como las bolsas con presencia de contaminantes.

Incubación y secado del hongo

El objetivo de esta fase 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 que se colocan en un local a temperatura ambiente para que se sequen. Al inicio las bandejas se mantienen selladas y posteriormente se abren.

Inicialmente las bandejas se limpian, se humedecen con alcohol y se flamean con el mechero. Luego se seleccionan las bolsas de mejor calidad, se abren y el contenido de 10 bolsas es depositado en cada bandeja, lo que equivale aproximadamente a 2000 gramos de arroz colonizado por el hongo.

El período de incubación tarda aproximadamente 15 días y se desarrolla en 2 fases, que son la incubación y el secado: La incubación de la bandeja dura aproximadamente 6 días, durante este tiempo el hongo crece y se reproduce en condiciones de oscuridad y alta humedad relativa. Para



Incubación de bolsas.



Hongos en proceso de secado.

ello, una vez depositado el arroz en las bandejas, estas se apilan y se sellan con masking-tape, tapando los orificios con el objetivo de formar una cámara oscura dentro de la bandeja, para que el hongo continúe su proceso de crecimiento y esporulación.

Una vez que el hongo cubre completamente los espacios del substrato se procede a abrir las bandejas para tener una rápida pérdida de humedad y acelerar el proceso de secado el cual ocurre aproximadamente de 12 a 15 días. El hongo está listo para cosecha cuando frotamos el arroz con el hongo entre los dedos y ocurre desprendimiento de conidias en forma de polvo. El tiempo de secado puede ser menor, si en el cuarto de secado se coloca un extractor de humedad.

Cosecha del hongo



La cosecha como el paso final del proceso de producción semi industrial, consiste en separar del substrato (arroz) las estructuras del hongo (conidias y/o esporas) y recolectarlas, las cuales son obtenidas en forma de polvo. Para realizar la cosecha, la humedad del hongo no debe exceder de 4 a 6%. El polvo que se obtiene en la cosecha de hongos entomopatógenos contiene esporas y/o conidias y micelio, que son estructuras del hongo, más las partículas del substrato de arroz.

Aunque se han desarrollado algunos equipos mecánicos para la cosecha de estos hongos en producción a gran escala, en Nicaragua aún no han sido validados, por lo que en la actualidad la cosecha se realiza de forma manual utilizando tamices más frotación. Este método de cosecha solo es práctico para producción a mediana escala.

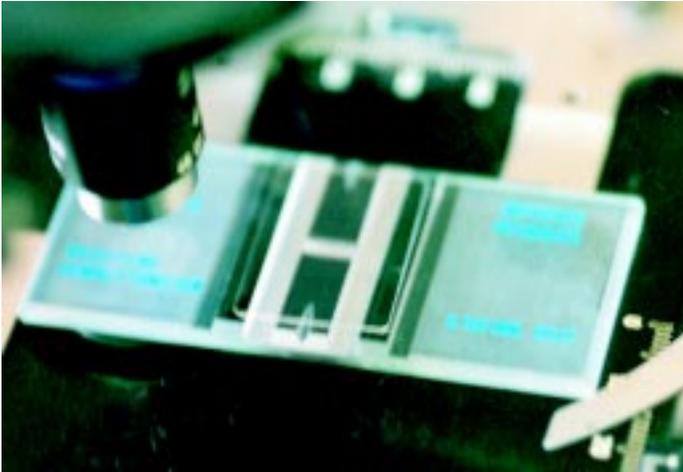
La cosecha se hace depositando el arroz colonizado en un tamiz con diámetro de orificios de 0.5mm, luego por agitación y frotación, se separa el polvo de los granos de arroz. El material retenido por el tamiz se descarta y el polvo recolectado se deposita en recipientes para evaluar el rendimiento.

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 para mantener su viabilidad por más tiempo.

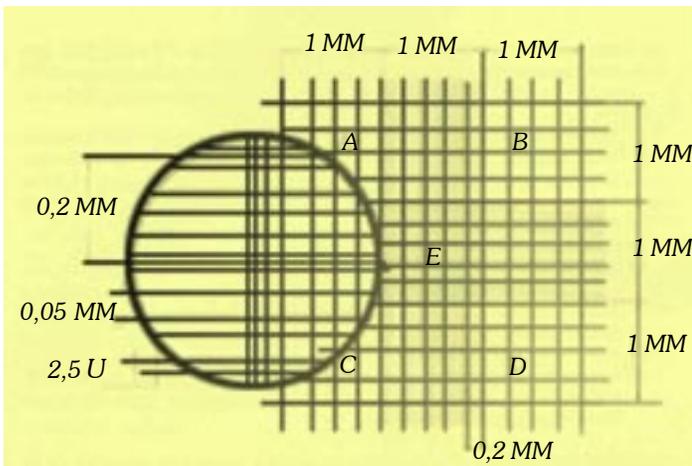
Evaluación de rendimiento

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 por gramo de polvo cosechado. A partir de este rendimiento se procede a estimar el rendimiento neto, para lo cual se debe conocer la viabilidad del hongo cosechado. El proceso de evaluación de rendimiento se desarrolla de acuerdo a los siguientes pasos:

- 1) **Peso del polvo cosechado:** Consiste en pesar la cantidad de polvo cosechado por bandeja o por kilogramo de arroz. Este rendimiento puede variar desde 20 gramos, hasta 80 o más gramos de polvo por cada kilogramo de arroz utilizado en todo el proceso de producción, es decir tomando en cuenta el arroz de las matrices, así como el arroz que se descarta por contaminación o crecimiento deficiente. Si tomamos en cuenta el rendimiento del hongo, a partir del arroz de las bandejas, éste puede alcanzar hasta más de 200 gramos de polvo por kilogramo de arroz.



Cámara Neubauer de conteo de conidias con apoyo de un microscopio. En el dibujo de abajo se observa el rayado Neubauer en el que se hace el conteo.



- 2) Conteo de conidias por gramos de polvo cosechado: Este rendimiento está determinado por la cepa y por el estado de la misma y varía desde 5×10^3 hasta 2.5×10^{10} conidias/g. Generalmente las cepas de *B. Bassiana* tienen 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, de la misma manera que se preparan las diluciones para aislar el hongo. El objetivo de hacer diluciones es evitar mucha aglomeración de conidias, para facilitar su conteo. Las diluciones se hacen en agua destilada estéril con Tween 80 al 0.1%.

Para hacer el conteo de conidias se usa una cámara de conteo (Neubauer). Con una pipeta pasteur, se toma una alícuota de la dilución seleccionada para el conteo (10^{-5} o 10^{-6}) y se coloca en las cámaras de conteo; luego a través del microscopio hacemos el conteo de conidias, este paso se repite varias veces hasta obtener un rendimiento promedio.

La cámara de conteo consiste en una lámina de vidrio un poco más gruesa a la de un porta objeto, la cual presenta una ranura en forma de H y contiene dos cámaras. El fondo de la cámara tiene un rayado Neubauer, el cual presenta 9 cuadros principales (C.P) de 1 mm por lado. Si las conidias son relativamente grandes, se cuenta el contenido de 5 cuadros, los 4 de las esquinas y el central (A, B, C, D y E).

Para propágulos pequeños como los de *B. bassiana* y *M. anisopliae* usamos el cuadro principal (C.P) central, que está dividido en 25 cuadritos secundarios (C.S) de 0.2 mm por lado. El conteo también se puede hacer seleccionando solamente algunos de los cuadrados secundarios, obteniendo luego su promedio.

Para calcular la concentración de conidias por mililitro, se multiplica el número de conidias observadas en el cuadro, por el factor de cámara, multiplicamos luego por el factor de dilución. El factor de cámara es 10,000 para cuadrados principales y 250,000 para cuadrados secundarios.

$$\text{No. de Conidias/g} = \text{No. de Conidias en el cuadro} \times \text{Factor de Cámara} \times \text{Factor de Dilución}$$

Ejemplo: Si para el conteo se utiliza la dilución 10^{-5} y en el cuadrado central encontramos 85 conidias, entonces el número de conidias por gramo se obtiene de la siguiente forma:

$$\text{No. de conidias/g} = 85 \times 10,000 / 0.00001(10^{-5}) = 8.5 \times 10^{10}.$$

- 3) Evaluación de la viabilidad del hongo (porcentaje de germinación): Este paso tiene el objetivo de obtener la concentración efectiva del hongo, a partir de la cual se preparan las dosis a utilizar en el campo. La viabilidad de las conidias expresada en porcentaje, indica el porcentaje del total de conidias que se encuentran viables, es decir que tienen la capacidad de germinar. Un producto de buena calidad debe tener una viabilidad cercana al 100%. En la medida que un producto pierde

viabilidad, se reduce la capacidad de establecerse en el campo y causar epizootias, reduciendo así su efectividad sobre la plaga.

Para conocer la viabilidad del hongo se prepara un medio de cultivo, como Agar-Agua. Este se esteriliza y posteriormente con una pipeta pasteur se depositan dos alícuotas del medio de cultivo en un porta objeto (una en cada extremo). Posteriormente con otra pipeta, se depositan sobre las alícuotas del medio, alícuotas de la suspensión del hongo. Finalmente este montaje es colocado en una cámara húmeda, la cual consiste en un plato petri con papel filtro humedecido y se mantiene en un cuarto de crecimiento. Todos los materiales utilizados en este procedimiento deben ser esterilizados en autoclave a 1.2 bar de presión y 121 °C.

Las mediciones se realizan entre las 20 y 24 horas después de realizado el montaje. Las observaciones se realizan al microscopio, utilizando el objetivo de 25 o 40X. Las variables que se miden son: número de conidias germinadas, número de conidias no germinadas y el total de conidias. Como mínimo se deben observar un total de 200 conidias por cada montaje para que el dato obtenido tenga poco margen de error.

Una vez que se tiene toda la información de rendimiento (No. de conidias/g y viabilidad), se determina la cantidad de hongo cosechado (gramos de polvo) necesarios para alcanzar la dosis de campo, la que es equivalente a 10^{12} conidias por hectárea, dicha cantidad es la que se va a utilizar para hacer la formulación, de acuerdo al área a tratar. Ejemplo:

Al momento de realizar la cosecha de un lote de producción de *B. Bassiana*, se obtuvo un rendimiento total de 8.5×10^{10} conidias por gramo de polvo. Para conocer el rendimiento neto se procedió a evaluar la viabilidad de las conidias. La viabilidad de las conidias producidas en este lote fue de 95%. Esto indica que en un gramo de polvo existen 8.075×10^{10} conidias viables.

Rendimiento Total : 8.5×10^{10} conidias por gramo de polvo.

Viabilidad : 95%

Rendimiento neto : 8.075×10^{10} conidias

$(8.5 \times 10^{10}$ conidias/g (95% de viabilidad) = $8.5 \times 10^{10} \times 0.95$ (95%) = 8.075×10^{10} conidias viables por gramo de polvo).

Para obtener la dosis a utilizar en el campo, a partir del rendimiento neto, se debe estimar cuantos gramos de polvo se necesitan para tener 10^{12} conidias, lo cual se realiza a través de una regla de tres simple:

$$\begin{array}{r}
 1\text{g} \quad 8.075 \times 10^{10} \\
 \times \quad 10^{12} \\
 \hline
 1\text{g} \times 10^{12} \text{ conidias} \\
 \hline
 8.075 \times 10^{10} \text{ conidias}
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{r}
 1\text{g} \times 10^{12} \\
 \hline
 8.075 \times 10^{10}
 \end{array}
 = 12.3 \text{ g}$$

Esto indica que para aplicar en una hectárea (10^{12} conidias) se necesita formular 12.3 gramos de polvo de hongo cosechado.

Si el número de conidias por gramo de polvo es bajo y la viabilidad también es baja, se necesita mayor cantidad de polvo para aplicar en un área determinada. En cambio si se produce mayor cantidad de conidias por gramo de polvo y la viabilidad es mayor, se necesita menor cantidad de polvo para aplicar en la misma área.

Elaboración de formulaciones

La formulación es la forma como se prepara un producto para ser adquirido, manipulado y/o aplicado por los usuario, es decir es la forma de presentación de un producto. 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, sin afectar su viabilidad.

En el proceso de formulación el hongo se debe combinar con sustancias sólidas o líquidas, dando como resultado dos tipos de formulaciones; una formulación sólida que tiene aspecto de polvo y una formulación líquida que es aceitosa. El productor puede usar cualquiera de estas formulaciones para el control de las plagas de los cultivos.

Para ser formulado, la viabilidad del hongo no debe ser menor de 95% y el contenido de humedad no debe ser mayor del 4 a 6 %.

Resultados de diversos estudios indican que, a temperatura ambiente las conidias mantienen su viabilidad por mayor tiempo cuando el hongo ha sido formulado que cuando se almacena el polvo cosechado (sin formular).

Hasta el momento en Nicaragua se han desarrollado dos tipos de formulaciones:

1. Formulación seca (Polvo mojable). En este tipo de formulación debe utilizarse un vehículo, el cual puede ser de origen mineral o vegetal, que además de proporcionar una buena distribución de las conidias, ayude a absorber la humedad de las mismas y que las mantenga viables por un tiempo considerable.

2. Formulación líquida (Emulsificable). Debe utilizarse un líquido solvente y un emulsificante (o un aceite 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 la conidia y mantener su viabilidad.

Ambas formulaciones son de fácil manejo, por lo que su uso dependerá de la disponibilidad de la formulación.

Los materiales utilizados en la formulación deben presentar algunas características para poder ser utilizados, entre estas podemos mencionar:

- Deben ser inertes, es decir no deben tener actividad biológica (sobre animales o plantas)
- Deben ser inocuos al medio ambiente
- Deben presentar características físicas adecuadas para mezclarse con las conidias
- Deben facilitar la aplicación del producto
- No deben afectar la actividad del hongo
- Deben ser económicamente rentables



Formulación seca de hongos (polvo mojable) y formulación líquida de hongos (emulsificante), ambas de fácil manejo.

Algunos estudios indican que la viabilidad de los conidias se mantiene mayor tiempo en la formulación líquida que en la sólida, sin embargo en estudios realizados en la Universidad Nacional Agraria, no se encontraron diferencias entre ambos tipos de formulaciones. Además la formulación líquida presenta el inconveniente que el aceite a utilizar no está disponible en Nicaragua, por lo que se tiene que comprar en otros países, además, 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/envasado en recipientes que no permitan la entrada de luz, ya que 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.



Conidias de hongos en refrigeración.

Almacenamiento del producto

Por tratarse de productos hechos con organismos vivos (conidias del hongo), la calidad expresada en su viabilidad, se pierde cuando se mantienen en condiciones desfavorables por 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, por períodos cortos también se pueden mantener en condiciones ambientales pero en lugares frescos evitando la radiación directa del sol.

De acuerdo a estudios realizados, el producto formulado puede almacenarse en condiciones ambientales por períodos de uno a dos meses, sin que éste pierda su viabilidad, siempre que no esté expuesto directamente a la luz solar o la humedad. Almacenamiento por mayor tiempo, tiene que hacerse en refrigeración a temperatura aproximada de 4 °C. En cambio el producto cosechado (sin formular) es conveniente almacenarlo siempre en refrigeración.

Control de calidad

Durante el proceso de producción, el control de calidad constituye un factor clave, ya que además de garantizar un buen rendimiento, el producto obtenido es de alta calidad y se evita la pérdida de materiales y reactivos.

El control de calidad se refiere al seguimiento y evaluación de la calidad en cada uno de los pasos del proceso de producción. Esto se hace con el fin de realizar una selección adecuada del hongo, detectar y descartar la presencia de agentes contaminantes en cada etapa del proceso para obtener al final del mismo un producto de buena calidad (viabilidad, patogenicidad y virulencia) y de buen rendimiento.

En general todo el proceso de producción semi-industrial está sujeto al problema de contaminación y a la ocurrencia de fenómenos que afecten tanto el rendimiento como la calidad de los procesos y productos del mismo. Por esta razón el control de calidad es fundamental en dicho proceso.

Entre los contaminantes más comunes están los hongos y las bacterias. Debido a sus características de crecimiento algunos contaminantes son más difíciles de eliminar que otros.

La diversidad de contaminantes es mayor en la etapa de cepario (medios de cultivo) que en la etapa de producción (matrices, bolsas y bandejas). Se pueden presentar problemas de contaminación en matrices y bolsas, sin embargo en bandejas ya no existe posibilidad de presencia de contaminantes, ya que el hongo ha colonizado completamente el sustrato de arroz y ha utilizado todos sus nutrientes.

Control de calidad en la etapa de cepario

Debido a que en la etapa de cepario se trabaja con medios de cultivo de alto valor nutritivo, existen mayores posibilidades que ocurran el 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 en esta etapa que se inicia el proceso de producción, de manera que si se selecciona incorrectamente la cepa y el cultivo puro y además existe presencia de contaminantes, esto afectará los siguientes pasos del proceso, lo que al final incide en la calidad y el rendimiento del producto obtenido.

Contaminantes más comunes

Se considera contaminante a todo aquel tipo de microorganismo no deseado que se desarrolla en el medio donde estamos cultivando el hongo de interés. Generalmente los contaminantes siempre están presentes en el ambiente y en los materiales empleados en el laboratorio y se presentan cuando no se cumplen las normas de trabajo en el laboratorio.

Los contaminantes afectan al hongo que estamos cultivando compitiendo con los nutrientes del medio y en espacio que debería ocupar el entomopatógeno, además los contaminantes se pueden comportar como hiperparásitos, es decir se alimentan del hongo que estamos cultivando, además pueden producir sustancias que inhiben el crecimiento y la formación de estructuras reproductivas.

En el proceso de producción de hongos entomopatógenos se presentan una gran variedad de hongos y bacterias contaminantes, algunos de ellos son patógenos al hombre. Entre los hongos más comunes como contaminantes están los géneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pestalotia*. Los géneros de bacterias más comunes como contaminantes son: *Serratia*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Las colonias de *Fusarium* pueden tener diferentes coloraciones o presentar pigmentaciones en el medio en que se encuentran, estas pueden ser: naranjas, rosadas, amarillas, crema o violáceas.

Penicillium y *Aspergillus* son los contaminantes más comunes en el ambiente, ya que se mantienen como saprofitos, sobre cualquier material. Estos hongos forman colonias que pueden presentar diferentes coloraciones, principalmente diversas tonalidades de verde y amarillo.

Las colonias de *Pestalotia* son blancas y están salpicadas por unas gotas de exudado negro brillante en las que se encuentra por millares los conidias del hongo.

Serratia es una bacteria muy dañina en el proceso de producción de hongos entomopatógenos, ya que no forma colonias si no 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*. El principal problema es que se desarrollan más rápidamente que el hongo entomopatógeno, de manera que cubren todo el espacio del medio y consumen todos sus nutrientes, evitando el crecimiento del entomopatógeno.

Para evitar el crecimiento de bacterias se le debe de agregar al medio un antibiótico como penicilina, cloranfenicol y regular el pH por medio de la adición de ácido láctico, cuando el daño por bacterias es elevado es recomendable desinfectar el lugar de trabajo con formalina para poder erradicarla y esterilizar todo material.

El reconocimiento de algunos hongos y bacterias contaminantes de laboratorios se puede basar en el crecimiento característico que presenta; en algunos casos se observa directamente el crecimiento de las colonias, observando la forma y color de las colonias del contaminante; en otros no se observan fácilmente estas características, pero se observa que el crecimiento del entomopatógeno es lento y anormal.

Cuando la contaminación es por bacterias, el entomopatógeno no logra crecer en el sustrato por completo debido a que el crecimiento de la bacteria es más que el del hongo, además se forma una masa suave, y pueden aparecer en el sustrato manchas de color rojo, cremas y/o amarillentos. Además las bacterias tienen la característica de presentar un olor fuerte y desagradable. En cambio los hongos tienen la cualidad de presentar olor característico a fermentación fuerte, el que se diferencia del olor característico de los entomopatógenos.

Control de calidad de Cultivos Puros

A los cultivos puros se les debe hacer la prueba para bacterias contaminantes, la que consiste en inocular el hongo en un medio de cultivo Agar-Nutriente. Estos platos son etiquetados con la información correspondiente y se les da constante seguimiento. Las observaciones del crecimiento de bacterias se hace entre las 24 y 48 horas siguientes, descartando los platos en los que desarrollen bacterias.

En el caso de hongos contaminantes se realiza una limpieza del cultivo, eliminando las colonias del contaminante o realizando una nueva siembra. Si el contaminante ha cubierto todo el cultivo el plato debe ser descartado.

Control de calidad en la etapa de producción

Los principales problemas de contaminación son ocasionados por bacterias y generalmente ocurren debido a mal manejo del sustrato, por ejemplo aglomeraciones de arroz, exceso de humedad, mala esterilización del arroz, etc.

Control de calidad de matriz

El control de calidad se inicia seleccionando adecuadamente los materiales, principalmente los platos del cultivo puro a utilizar. Estos platos deben ser de crecimiento rápido y vigoroso; deben presentar las

características de crecimiento del hongo (forma y color); además cada plato utilizado debe estar libre de cualquier tipo de contaminante.

Una vez inoculada la matriz, se debe revisar diariamente a partir del tercer día después de la inoculación, durante el proceso de incubación, para la detección 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 que puede ser tanto localizada como generalizada, entonces se debe descartar la matriz y esterilizarla para destruir el inóculo contaminante.

Control de calidad de 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 control sistemático, para evitar problemas de contaminación y seleccionar adecuadamente el material, este control se realiza mediante la observación del crecimiento. El tipo de crecimiento observado puede: disparejo, lento, homogéneo.

Un crecimiento disparejo es localizado sobre diferentes puntos del sustrato. Este tipo de crecimiento puede deberse a la presencia de contaminantes y/o a una mala manipulación al momento de la inoculación. El crecimiento lento 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. El crecimiento homogéneo y rápido, es el tipo de crecimiento apropiado para la selección de la bolsa que entrará en producción.

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 ya que no sería rentable. 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 y viabilidad) se deben realizar al momento de la cosecha y antes de la preparación de la formulación.

Control de calidad de la preservación en silica gel

El control de calidad del material preservado 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 de los tubos preservados de silica gel, se efectúa entre 5 y 6 días después de la preservación, con el objetivo de conocer si lo que preservamos se encuentra en buen estado. Si la preservación está en mal estado, es necesario descartar todo el material preservado. Para conocer el estado de la preservación, se siembran cristales de silica gel de la preservación, en un medio nutritivo como PDA, con el propósito de observar el tipo de crecimiento del entomopatógeno y detectar la presencia de contaminantes (bacterias y hongos). La observación se debe hacer a los tres días después de la inoculación, haciendo una observación cuidadosa del crecimiento y de la presencia de otros agentes.

Anexo

Guías para la elaboración de cada uno de los pasos del proceso de producción semi-industrial de hongos entomopatógenos.

Guía para elaborar medios de cultivos

Elaboración de los medios de cultivos PDA y AN

El medio de cultivo PDA puede ser preparado utilizando el reactivo PDA (papa-dextrosa-agar) (Difco, Merck, etc.), que viene en polvo o granulado listo para ser preparado. También este medio se puede preparar propiamente en el laboratorio a partir de agar, dextrosa y papas frescas. El AN se prepara a partir del reactivo que lleva el mismo nombre y que es distribuido por diversas compañías.

a) Procedimiento para la preparación de PDA

- 1- Pesar 40 gramos del reactivo (PDA) y mezclarlo con un litro de agua destilada, agitando la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea.
- 2- Sellar el frasco con papel aluminio y masking-tape y poner a esterilizar la mezcla en autoclave por 20 minutos, a 121 °C y 1.2 bar de presión. Después de este proceso se puede verter el medio en platos petri o se puede guardar en el frasco, para su uso posterior. En este caso el frasco se debe poner en baño de maría al momento que se vaya a verter.
- 3- Verter aproximadamente de 10 a 20 cc del medio en cada plato petri: esto se debe hacer cuando la temperatura del medio permita su manipulación, evitando que se enfríe completamente, o sea antes que se inicie la solidificación del agar.

- 4- Dejar solidificar el medio en los platos petri. Para un mejor manejo del cultivo y evitar contaminación se recomienda usar el medio (realizar la siembra del hongo) después de 12 horas de haber vertido el medio en los platos petri.

Si no dispone del reactivo PDA, el medio se puede preparar a partir de Agar, dextrosa y papas de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Lavar, pelar y cortar las papas en trocitos pequeños, pesar 300 gramos y luego ponerla a cocer en un litro de agua destilada por 40 minutos, hasta que las papas se ponen suaves. Luego se debe filtrar en un colador fino y recolectarla en un erlenmeyer.
2. Cuando el filtrado de papa está tibio, agregar poco a poco 20 gramos de agar y 20 de dextrosa.
3. Agitar suavemente el contenido del erlenmeyer hasta obtener una disolución completa. En caso necesario aforar el medio con agua destilada hasta completar 1000 ml.
4. Determinar y ajustar el pH del medio (pH H" 7). Luego sellar el erlenmeyer con papel aluminio y masking-tape y esterilizar el medio en autoclave por 20 minutos, a 121 °C y 1.2 bar de presión.
5. Para la preparación de los platos con el medio de cultivo, así como su uso se debe proceder de la misma manera como se procede con el medio preparado a partir del reactivo preparado PDA.

b) Preparación del medio de cultivo Agar Nutriente (AN)

- 1- Pesar 20 gramos del reactivo Agar Nutritivo (AN), mezclar con un litro de agua destilada y agitar la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea.
- 2- Sellar el frasco con papel aluminio y masking-tape y poner a esterilizar la solución por 20 minutos, a 121 °C y 1.2 bar de presión.
- 3- Verter el medio en platos petri o en la cristalería a usar y dejar enfriar la solución para su uso.

Guía para aislar e inocular hongos entomopatógenos

El Aislamiento e inoculación consiste en la obtención del inóculo a partir de la fuente (insectos, medios de cultivo, preservaciones, etc.) y colocarlo en un medio de cultivo para su crecimiento. Aunque existen varios métodos para hacer aislamientos, nos referimos a los más utilizados.

Aislamiento por dilución seriada

1. Colocar el insecto momificado en un recipiente que contenga 10 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de tween - 80 y agitar durante 1 minuto.
2. Transferir con una pipeta estéril 1 ml de la solución a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de tween - 80 y agitar fuertemente durante 1 minuto.
3. Repetir el paso 2 hasta lograr obtener una segunda dilución de 10^{-2} y repetimos nuevamente la operación durante cuatro veces más (hasta lograr obtener un total de seis diluciones en serie).
4. Sembrar a partir de las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en platos petri con medio de cultivo (en un total de 3 a 5 platos petri por cada dilución). La siembra del hongo se hace tomando de la dilución, una gota (0.1 ml) con una pipeta estéril y depositándola sobre el medio de cultivo.
5. Almacenar los platos inoculados, en un cuarto a 25 °C, durante un periodo de incubación aproximado de 3 a 4 días, hasta obtener el crecimiento característico del hongo.
6. Posteriormente se realiza un reaislamiento a partir de las colonias en crecimiento, tomando el inóculo y sembrándolo en otros platos petri, los cuales serán luego incubados para su crecimiento.

Aislamiento directo del hongo a partir del insecto

1. Tomar un insecto momificado y desinfectarlo superficialmente con hipoclorito de sodio (2%) o alcohol.
2. Raspar partículas del insecto desinfectado con una asa bacteriológica e inocular usando el método de rayado, en un medio nutritivo.
3. Rotular adecuadamente los platos inoculados, ponerlos en incubación y observarlos tres días después.

Aislamiento de silica gel

Cuando el hongo se encuentra preservado en seco (silica gel), el aislamiento se puede hacer a partir de la preservación, de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Preparar el medio de cultivo y verter en platos petri
2. A partir del tubo de ensayo donde se encuentra el hongo preservado, tomar los cristales de silica gel y colocarlos en el medio de cultivo. Se deben sembrar en cada plato, aproximadamente 15 cristales de silica gel, los cuales deben distribuirse en toda la superficie del medio.
3. Sellar y rotular adecuadamente los platos petri inoculados, colocarlos en incubación y observarlos 5 días después.

Guía para preparar e inocular matrices y bolsas

Preparación de la matriz

1. Colocar en la estufa un recipiente que contenga 500 ml de agua potable, cuando el agua comienza a hervir depositar 600 gramos de arroz y dejarlo cocer por 5 minutos, hasta que presente una consistencia suave (pre-cocido).
2. Retirar el arroz de la estufa y escurrirlo en una zaranda hasta que esté totalmente frío y seco.
3. Colocar 100 gramos del arroz precocido en un erlenmeyer de 1000 ml (para obtener la matriz). Sellar con papel aluminio y masking-tape y esterilizar en autoclave a 121 °C, 1.2 bar de presión por un tiempo de 4 a 5 minutos.
4. Dejar enfriar y agitar las matrices con el objetivo de evitar aglomeraciones del arroz.

Inoculación de matrices

1. Seleccionar un cultivo puro del hongo, al cual se le debió haber hecho el control de calidad, para estar seguros de que se encuentra libre de contaminantes.
2. Obtener el inóculo (conidias) a partir del cultivo puro, mediante un raspado del plato. El inóculo se debe depositar en un recipiente que contenga agua destilada estéril. Se deben utilizar 60 ml de agua, lo cual es suficiente para inocular 4 matrices.
3. Agitar la mezcla hasta obtener una suspensión homogénea del inóculo y luego proceder a inocular la matriz con 15 ml de la suspensión fungosa. Para la inoculación de las matrices se utiliza una jeringa veterinaria, la cual debe ser esterilizada a 121 °C y 1.2 bar de presión durante 15 minutos.

4. Una vez inoculadas, las matrices se colocan en un cuarto oscuro a temperatura de 23 a 28 °C, por un período aproximado de 8 días, hasta que el hongo colonice completamente el sustrato.

Preparación de bolsas

1. Depositar 200 gramos de arroz entero en bolsas de polipropileno, agregar 100 ml de agua destilada o potable y sellar las bolsas con grapas.
2. Esterilizar las bolsas que contienen el arroz, con calor húmedo (autoclave) a 121 °C y 1.2 bar de presión, durante 4-5 minutos.
3. Después de esterilizar las bolsas, agitarlas para evitar aglomeraciones en el arroz y dejar enfriarlas.

Inoculación de las bolsas

1. La inoculación de las bolsas se hace con el inóculo producido a partir de la matriz. Para ello agregar a la matriz (colonizada) 750 ml de agua destilada estéril al 0.1 % de extravón.
2. Agitar el contenido hasta obtener una suspensión homogénea de conidias.
3. Inocular con el contenido de una matriz aproximadamente 30 bolsas, utilizando una jeringa veterinaria debidamente esterilizada. Cada bolsa es inoculada con 20 cc de la suspensión del hongo.
4. Una vez inoculadas las bolsas, colocarlas en un cuarto oscuro a temperatura de 24 a 28 °C, durante un periodo de 4-5 días. Las bolsas deben ser revisadas a los 2 o 3 días para detectar el crecimiento de contaminantes y para observar el tipo de crecimiento del hongo.
5. Se deben descartar aquellas bolsas que estén contaminadas y/o que su crecimiento sea muy lento o que no sea homogéneo. Se deben seleccionar las bolsas que presenten crecimiento homogéneo y normal.

Guía para la incubación, secado de bandejas y cosecha de hongos entomopatógenos

1. Seleccionar las bolsas de arroz que presenten buenas características de crecimiento (homogéneo, rápido y libres de contaminantes), para depositar su contenido en las bandejas.
2. Preparar las bandejas plásticas, desinfectando con alcohol y flameándola con el mechero.
3. Tomar las bolsas con crecimiento de hongo y abrirlas con una tijera la cual se flamea constantemente en el mechero. Depositar en cada bandeja de 70 cm de largo por 40 de ancho x 20 de alto, el contenido de 10 bolsas con hongo después de su incubación y remover con la ayuda de una espátula para poder tener mayor uniformidad en la esporulación.
4. Colocar una bandeja sobre otra y sellar con masking-tape para evitar la penetración de luz. Se deben etiquetar las bandejas con el nombre de la cepa, número del lote y fecha de incubación.
5. Colocar las bandejas en un cuarto frío a temperatura de 24 a 26 °C durante un periodo de 6 días.
6. Destapar las bandejas con el objetivo de eliminar el exceso de humedad durante un tiempo de 12 a 15 días, hasta que se desprendan las conidias (aspecto polvoso) y facilite el proceso de cosecha.

Cosecha manual de hongos entomopatógenos

1. Se preparan todos los utensilios (tamices, guantes, mascarillas, recipientes, etc) para realizar la cosecha del hongo.
2. El substrato colonizado (arroz con el crecimiento del hongo) se coloca en un tamiz con orificios de 1mm de diámetro, para separar el polvo (conidias) del hongo de los granos de arroz.

3. El tamiz es colocado en un recipiente hermético, para facilitar la recolección del polvo del hongo. Agitar fuertemente por varios minutos para tamizar el producto y obtener las conidias del hongo.
4. Dejar reposar por espacio de unos tres minutos, con el propósito que las conidias se asienten en el fondo del recipiente y luego recolectar el polvo cosechado.
5. Al polvo cosechado se le realiza la evaluación de rendimiento y viabilidad del producto, para su debida formulación.
6. El polvo cosechado se debe pesar y colocarlo en un recipiente limpio y completamente oscuro para evitar la entrada de luz. Etiquetar el recipiente (numero de lote, cepa, fecha de cosecha, etc) y almacenar en refrigeración a temperatura de 5 a 6 °C.

Guía para evaluar el rendimiento de hongos entomopatógenos y preparación de formulaciones

1. Pesar la cantidad total de polvo cosechado por bandeja o por kilogramo de arroz.
2. Determinar la concentración de conidias del polvo cosechado, para lo cual se debe contar el número de conidias por gramo de polvo cosechado utilizando una cámara de conteo Neubauer.
3. Preparar diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-6}) del hongo, hasta obtener una dilución que permita realizar el conteo. Las diluciones se preparan de la siguiente manera:
 - a. Colocar un gramo del polvo cosechado en un tubo de ensayo que contenga 9ml de agua destilada estéril con tween 80 al 0.01%.

- b. Transferir con una pipeta estéril 1ml de la primera dilución a un tubo que contiene 9ml de agua destilada estéril con 0.01% de tween 80, éste se agita fuertemente durante un minuto, hasta lograr obtener una tercera dilución de 10^{-3} de esta manera se va procediendo hasta encontrar la dilución adecuada (10^{-5} , 10^{-6}).
 - c. De la dilución seleccionada, tomar con una pipeta pasteur una alícuota de la suspensión y llenar la cámara de conteo.
4. Hacer el conteo de conidias a través del microscopio, utilizando el cuadro principal (c.p) central, el cual esta dividido en 25 cuadritos secundarios. Si se desea se puede contar el número de conidias solamente en algunos de los cuadrados secundarios y obtener el promedio. Este paso se repite varias veces hasta obtener un rendimiento promedio.
 5. Para calcular la concentración de conidias por gramo, se multiplica el número de conidias observadas en el cuadro observado, por el factor de cámara, multiplicar luego por el factor de dilución. El factor de cámara es de 10,000 para cuadros principales y 250,000 para cuadros secundarios.

Evaluación de viabilidad

1. Esterilizar platos petri, con papel filtro y porta objeto todos en conjunto, en el autoclave a 1.2 bar de presión y 121 °C por un tiempo de 20 minutos.
2. Preparar un medio de cultivo de agar-agua y esterilizarlo durante 15-17 minutos. Posteriormente con una pipeta pasteur depositar dos alícuotas del medio de cultivo en un porta objeto.
3. Depositar con una pipeta pasteur sobre las mismas alícuotas del medio, dos alícuotas de la suspensión del hongo y colocar el montaje en una cámara húmeda, la cual consiste en un plato petri con papel filtro humedecido.

4. Colocar el montaje a temperatura entre 24 y 26 °C.
5. Hacer el conteo de conidias totales, registrando las germinadas y las no germinadas, de 20 a 24 horas después de realizado el montaje.
6. Como mínimo se deben observar un total de 200 conidias por cada montaje.

Elaboración de formulaciones

1. Pesar la cantidad de hongo (polvo cosechado), equivalente a 10^{12} conidias por manzana, dependiendo del área para la que vamos a formular ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, 1 mz, etc.).
2. Mezclar la cantidad de hongo pesado con el vehículo utilizado o con solvente emulsificante, en proporción 1:5 si es formulación sólida o 1:10 si es formulación líquida; agitar hasta homogenizar la mezcla. Esta proporción puede variar de acuerdo al rendimiento (conidias/g) del hongo, lo que se quiere es que el hongo quede bien distribuido en toda la formulación y que no afecte su aplicación.
3. Colocar etiquetas conteniendo: hongo, cepa, fecha de elaboración, fecha de vencimiento, indicaciones de uso, plaga y cultivo en que se debe utilizar.

Guía para preservar hongos entomopatógenos

1. Preparación del material.
 - a. Colocar 4 gramos de silica gel en un tubo de ensayo de rosca.
 - b. El tubo con silica gel se coloca en un horno durante 3 a 4 horas a una temperatura de 100 °C para esterilizarlos.
 - c. La silica gel adquiere un color azul que nos sirve como indicador que está seca y lista para utilizarse.
 - d. Colocar los tapones de los tubos de ensayo en calor húmedo (autoclave) por 15 minutos a 121°C y 1.2 bar de presión.
 - e. Cuando los tubos están listos se procede a taparlos y se dejan por 5 minutos más dentro del horno, para evitar una posible contaminación.

2. Preparación de la suspensión fungosa e inoculación
 - a. Pesar 10 gramos de leche descremada y mezclarla con 100 ml de agua destilada en un erlenmeyer y esterilizar en calor húmedo por 15 minutos a 121°C y 1.2 bar de presión.
 - b. Seleccionar el cultivo puro, de donde se obtiene el hongo que se va a preservar.
 - c. Utilizar una espátula de punta fina, para raspar y tomar las estructuras del hongo y luego agregarlas en el tubo de ensayo que contiene la silica - gel.
 - d. Tomar 1 ml de la leche descremada y agregarla al tubo que contiene la silica y el hongo.

- e. Tapar el tubo y agitarlo para mezclar el contenido y depositarlo en un beaker que contenga agua helada, para evitar que se quemem las conidias por las altas temperaturas que alcanza la mezcla.
- f. Colocar una etiqueta donde se anote, el código de la cepa, fecha de preservación, naturaleza del cultivo puro (original o reactivado).
- g. Colocar los tubos en una rejilla y guardarlos en refrigeración.

Guía para reactivar cepas de hongos entomopatógenos

Introducción

En estudios de laboratorios es muy común trabajar con el montaje de bioensayos estos se realizan para determinar patogenicidad y virulencia, evaluar la efectividad de las cepas de los hongos entomopatógenos sobre determinada plaga o para la reactivación de cepas.

Bioensayo se define como cualquier método que mide alguna propiedad, de algún material en términos de respuesta biológica, toma al organismo vivo como objeto de medición y establece el parámetro biológico de mortalidad para relacionar el fenómeno causal con el efecto sobre el organismo (Ibarra 1990). Los ensayos realizados con organismos vivos en condiciones de laboratorio son del tipo dosis-respuesta o sea de respuesta binomial: dos posibilidades muerto o vivo.

En general los bioensayos se realizan suministrando determinadas dosis o concentraciones del hongo entomopatógeno a grupos del insecto evaluado, registrando el número de insectos vivos y muertos en un tiempo o tiempos establecidos.

Procedimiento

1. Colecta de insectos: pueden ser obtenidos del campo o de crías de laboratorio. Los insectos que se utilizan en las evaluaciones deben estar sanos, es decir libres de parásitos o patógenos, así como de plaguicidas.
2. Colocación de los insectos en jaulas o cajas.
3. Exposición del insecto al hongo. El método o técnica de exposición del insecto puede ser por inmersión o aspersión,

4. Establecimiento del bioensayo: Una vez realizada la aplicación del hongo las jaulas que contienen los insectos son colocadas en el lugar destinado para realizar el seguimiento.
5. Lectura de los bioensayos: consiste en el registro diario del número de insectos vivos y muertos
6. Colectar los insectos muertos y colocarlos en cámara húmeda

Colecta de insectos

Los insectos que se utilizan en las evaluaciones deben estar sanos, es decir libres de parásitos o patógenos, así como de plaguicidas. Para que las evaluaciones sean más precisas es conveniente reproducir los insectos en el laboratorio (cría) y descartar las primeras generaciones.

En el caso de utilizar directamente insectos provenientes del campo, éstos deben colectarse en áreas donde no exista incidencia del hongo y que no tengan aplicaciones de químicos, para evitar la muerte por causa ajenas al hongo que estamos evaluando. La captura de los insectos se puede hacer de varias formas, dependiendo del tipo de insecto, por ejemplo, los chinches, generalmente se colectan directamente con red entomológica; para plagas de frutos como los picudos o la broca se colectan los frutos afectados y los insectos se extraen en el laboratorio.

Colocación de los insectos en jaulas o cajas

Los insectos deben colocarse en locales donde se permita su manipulación (aplicación del tratamiento, conteo, etc.). A los insectos se les deben suministrar todas las condiciones que ellos requieran para su sobrevivencia, es decir aire, alimento, refugio, agua, etc.

Generalmente lo que se usan son jaulas con malla de acuerdo al tamaño del insecto en estudio. Colocar dentro de las jaulas a las plantas hospederas (el cultivo que atacan). En el caso de insectos como broca o picudos se debe colocar el tejido del que ellos se alimentan (frutos).

El número de insectos que se usa es variable, depende del tipo y la disponibilidad de insectos. En plagas como picudo de chile se utilizan 100 insectos por cada repetición, para chinche del arroz se usan 150 insectos, para salivita en caña se usan un total de 50, etc; entre mayor número de insectos se utiliza, se obtiene mayor disponibilidad de inóculo reactivado.

Exposición del insecto al hongo: Consiste en la inoculación del insecto con la cepa de hongo que se está reactivando. Los métodos o técnicas de exposición que se usan comúnmente son Inmersión y aspersion,

Inmersión: Este método es recomendable para insectos que tienen el cuerpo endurecido o que no son muy delicados, es decir que resistan la manipulación (picudos, broca, larvas de lepidoptera, etc.). Los pasos que se sigue son:

- a. Preparar en agua destilada la suspensión del hongo equivalente a 10^8 conidias de la cepa a utilizar.
- b. Sumergir los insectos en la suspensión de conidias por 2 a 3 segundos y luego secarlos en papel toalla. La inmersión puede hacerse colocando los insectos en una malla y luego sumergiéndola en la suspensión del hongo.
- c. En el caso de picudo los insectos se colocan en frascos de vidrio que contienen un vaso con tierra y plantas de chile con flores y frutos, el frasco se cierra con malla fina, para asegurar una buena circulación de aire. En el caso de broca se colocan en vasos descartables con frutos de café y se le hacen perforaciones al vaso para que circule el aire.
- d. Los frascos se colocan en un lugar fresco donde se les hace el seguimiento establecido para el bioensayo.

Aspersión: Este método se recomienda para insectos de cuerpo delicado como salivita, chinches, moscas, etc., ya que ocurre menos manipulación del insecto. Los pasos que se siguen son:

- a. Preparar en agua destilada la suspensión del hongo equivalente a 10^8 conidias de la cepa a utilizar.
- b. Seleccionar los insectos que serán utilizados en el bioensayo.
- c. Realizar la aspersión. Esta puede realizarse colocando a los insectos dentro de la jaula en su planta hospedera y luego asperjar la suspensión del hongo, con un atomizador De Vilbis o una aspersora pequeña. También se pueden colocar los insectos en una bandeja y sobre ésta realizar la aspersión y posteriormente depositar los insectos en la jaula donde está la planta hospedera.
- d. Colocar las jaulas a temperatura ambiente, en el lugar destinado para realizar el seguimiento correspondiente al bioensayo.

Establecimiento del bioensayo

Una vez realizada la aplicación del hongo las jaulas que contienen los insectos son colocadas en el lugar destinado para realizar el seguimiento.

Cada grupo de insectos colocados en la jaula o vaso es considerado una repetición y se recomienda utilizar como mínimo 5 repeticiones, aunque el número de repeticiones y de cepas a evaluar en un bioensayo depende de la disponibilidad de materiales principalmente jaulas e insectos, así como de la conveniencia del manejo del bioensayo.

En el bioensayo siempre se debe tener un testigo, al cual debe ser tratado de la misma manera que los tratamientos, pero en vez de inocularse con hongo es asperjado o inmerso en agua.

Lectura de los bioensayos: consiste en el registro diario del número de insectos vivos y muertos. La primera lectura se realiza, en el caso de chinche del arroz, al día siguiente después de la inoculación, y para picudo de chiltoma, se hace 3 días después de la inoculación, se contabilizan los insectos vivos y muertos. A partir de la primera lectura, es recomendable hacer lecturas cada 24 horas.

Las lecturas pueden cesar cuando ocurra la mortalidad de todos o la mayoría de los insectos tratados con el hongo, o cuando se incremente la tasa de mortalidad en el testigo, también puede finalizar cuando se observe que el efecto del hongo ya pasó, es decir cuando ya no hay más mortalidad.

Colecta de insectos muertos y colocación en cámara húmeda

Se extraen de las jaulas los insectos muertos y se colocan en cámara húmeda, donde los insectos permanecen entre 8-12 días, las cámaras se revisan cada dos días para observar el tiempo en que ocurre la esporulación.

Guía para realizar control de calidad

Introducción

El control de calidad en el proceso de producción semi-industrial de hongos entomopatógenos, constituye uno de los aspectos más importantes a considerar al establecer un proceso de producción. El control de calidad está dirigido principalmente a evitar o eliminar los microorganismos contaminantes y a garantizar la producción de hongo de buena calidad y de la cepa adecuada.

El control de calidad consiste en la evaluación de las características de la cepa (identificación correcta), y eliminación de contaminantes, lo cual se hace a través de observación visual del cultivo y mediante la utilización del medio Agar-Nutriente que es selectivo para bacterias.

Control de calidad de cultivos puros

El control de calidad en esta etapa de cepario debe realizarse con mucho rigor, debido a que es en esta etapa que se inicia el proceso de producción y es la más sensible a los contaminantes debido a los medios de cultivo que se usan. Todos los platos que servirán como fuente de inóculo para la matriz, deben ser sometidos al control de calidad para la detección de bacterias contaminantes.

Procedimiento:

- a. Preparar un medio de cultivo AN (Agar Nutriente) y verterlo en platos petri.
- b. Con un asa bacteriológica tomar la muestra de cepa del hongo de cultivo puro, inocularla en AN.
- c. Sellar los platos y etiquetarlos con la información de la cepa y la fecha del control de calidad; posteriormente colocarlos en incubación.

- d. Observar los platos inoculados después de 24 horas de montada la prueba y registrar el crecimiento de hongos y / o bacterias.
- e. Descartar los platos de cultivo puro, si en el AN se observa crecimiento bacteriano.
- f. Limpiar los platos de cultivo puro si en el AN se observa crecimiento localizado de hongos contaminantes; si el crecimiento es generalizado en el plato, descartarlo.

Control de calidad en la etapa de producción

En esta etapa de producción se presenta contaminación principalmente en matrices y bolsas. Estos son ocasionados por bacterias y es debido al mal manejo del sustrato, por ejemplo aglomeraciones de arroz y exceso de humedad.

Control de calidad de matriz

Una vez inoculada la matriz, durante el proceso de incubación se debe revisar la matriz diariamente a partir del tercer día después de la inoculación, para la detección de contaminantes, principalmente bacterias. El criterio que se toma en cuenta para la selección de una matriz es el tipo de crecimiento y la presencia de contaminantes. Si el crecimiento del hongo es lento y no uniforme, si el sustrato adquiere una consistencia blanda, presenta una coloración amarillenta, entonces se debe descartar la matriz y esterilizarla para destruir el inóculo contaminante.

Control de calidad de bolsas

Los problemas de contaminación en bolsa se presentan con más frecuencia que en matriz debido a la humedad y problemas en la inoculación. El criterio que se toma en cuenta para seleccionar las bolsas que entraran al proceso de producción, es el mismo que se considera en las matrices.

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 bueno aquel rendimiento que no sea inferior al rendimiento promedio de la cepa y que la viabilidad no sea menor al 95 %. Las evaluaciones de rendimiento, se deben de realizar al momento de la cosecha y antes de la preparación de la formulación.

Control de calidad de la preservación en silica gel

Procedimiento

- g. Preparar un medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) y verterlo en platos petri.
- h. Con un asa bacteriológica tomar una muestra de la cepa del hongo de la preservación (aproximadamente 10 a 15 cristales) e inocularlos en el PDA. Realizar al menos tres réplicas de cada preservación
- i. Sellar los platos y etiquetarlos con la información de la cepa y la fecha del control de calidad; posteriormente colocarlos en incubación.
- j. Observar los platos inoculados después de 24 horas de montada la prueba y registrar el crecimiento del hongo por cinco a seis días.
- k. Descartar las preservaciones que presenten crecimiento inadecuado (muy lento, poco vigor, coloración extraña, etc.) o que presenten crecimiento de hongos o bacterias contaminantes.
- l. Seleccionar y almacenar en refrigeración las preservaciones que presenten buen crecimiento y están libres de contaminantes.

Uso de hongos entomopatógenos para el manejo de plagas agrícolas

El uso de hongos entomopatógenos para el manejo de plagas agrícolas constituye una alternativa viable para el manejo de diversas plagas. Existen experiencias de diversos países donde los hongos entomopatógenos forman parte de programas de manejo integrado de plagas de mucha importancia. En Nicaragua se han alcanzado logros importantes en este campo, de manera que cada día la demanda de este tipo de productos aumenta debido a que los consumidores demandan cada vez más, productos de consumo, libres de residuos de plaguicidas. Hasta el momento los mayores avances se han logrado en el manejo de la broca del café, picudo del plátano, picudo del algodón, picudo de la chiltoma y salivita en caña de azúcar entre otros.

El uso de hongos entomopatógenos debe considerarse como parte de programas de manejo integrado de plagas y no como una medida unilateral de manejo de las plagas. Además es importante tomar en cuenta que los productos a base de hongos son una medida de supresión directa, cuya efectividad depende del contacto con la plaga, si no se logra establecer dicho contacto no hay control, por lo que al momento de realizar una aplicación se debe garantizar la calidad de la misma, tomando en cuenta que factores son favorables para estos productos; además hay que considerar que por tratarse de organismos vivos, son afectados por los rayos ultravioleta, por lo que al ser expuestos al sol sufren degradación; además hay que estar claros que debido a la velocidad de su acción, su efecto inmediato y otras propiedades, estos productos no son sustitutos de los insecticidas químicos sintéticos.

En el cultivo de café el uso de hongos entomopatógenos se combina con uso de variedades de floración uniforme, actividades de graniteo, repela y pepena, muestreos sistemáticos de la plaga en la etapa de fructificación, así como muestreo de frutos caídos en la época seca. En control de broca en café se ha

demostrado que dos aplicaciones (Junio y Septiembre) combinadas con acciones anteriormente mencionadas son suficientes para el manejo de la plaga. Se ha encontrado además que el uso de los hongos mejora la calidad de la cosecha.

En el cultivo de repollo el uso de hongos entomopatógenos se combina con muestreos y uso de productos botánicos (Nim) y microbiales (Dipel), así como la siembra de cultivos en asocio y liberación de parasitoides de la plaga.

En el cultivo de caña de azúcar la aplicación de hongos entomopatógenos es parte de un programa de manejo integrado que incluye muestreo de huevos en la época seca, muestreo de ninfas y adultos en la época lluviosa, labores culturales, control de malezas.

Debido a la naturaleza de este tipo de productos se debe poner atención a aspectos como la cepa, dosis, aplicación, compatibilidad y almacenamiento.

Cepas: Diversos estudios realizados en el país donde se ha evaluado la efectividad de diversas cepas de hongos entomopatógenos, ha permitido que en la actualidad se tengan seleccionadas las cepas más efectivas para cada una de las plagas de mayor importancia en los principales cultivos. Partiendo de esta experiencia se recomienda utilizar las cepas de acuerdo a las especificaciones que se presentan en el cuadro de la siguiente página.

Dosis

Resultados de laboratorio y de campo indican que la dosis de hongos entomopatógenos a utilizar en cualquier cultivo es de 10^{12} conidias por manzana, independientemente de la cepa. Además el hongo debe tener una viabilidad de al menos 95%. Esta cantidad de conidias es suficiente para ocasionar epizootias en el campo, cuando las aplicaciones se hacen correctamente. Esto significa que si aplicamos de forma adecuada 10^{12} conidias en una manzana de cultivo, el hongo logra establecerse en el campo

Cultivo	Plaga	Cepa	Hongo
Café	Broca (<i>Hypothenemus hampei</i>)	Bb-114	<i>Beauveria bassiana</i>
Musaceas	Picudo (<i>Cosmopolites sordidus</i>)	Bb-64	<i>Beauveria bassiana</i>
Repollo	Palomilla (<i>Plutella xylostella</i>)	Bb-38	<i>Beauveria bassiana</i>
Caña de azúcar	Salivita (<i>Aenolamia</i> sp y <i>Prosapia simulans</i>)	Ma-NB	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Chiltoma	Picudo (<i>Anthonomus eugenii</i>)	Bb-64Bb-121	<i>Beauveria bassiana</i>
Arroz	Chinche (<i>Oebalus</i> spp)	Bb-114Ma-NB	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>

y afectar significativamente a los insectos plagas. Esta cantidad de conidias equivale a 40 gramos de producto formulado en polvo mojable. Esta cantidad de hongo debe aplicarse en una cantidad suficiente de agua, de manera que se logre una buena cobertura de aplicación en el cultivo.

Aplicación

Debido a que el efecto de los hongos entomopatógenos no es inmediato se requiere realizar la primera aplicación antes que la plaga alcance niveles altos de población o antes del período crítico del cultivo. Por tal razón la primera aplicación se debe realizar de forma preventiva, al momento de inicio de la floración en cultivos como chiltoma y arroz, de acuerdo a un programa calendario o al observarse los primeros insectos plagas en otros cultivos. Posterior a la primera aplicación se debe continuar con las

actividades de recuento; si se encuentra el umbral de aplicación se debe proceder con una segunda y tercera aplicación si es necesario.

La mezcla de aplicación se hace de la misma forma como se preparan mezclas de otros tipos de insecticidas. La aplicación debe realizarse después de las 4 de la tarde, para evitar que el sol afecte al hongo aplicado y aprovechar la temperatura de la noche, la cual es más baja que durante el día lo cual favorece el establecimiento del hongo, la sobrevivencia y su multiplicación. La aplicación del hongo puede realizarse con bomba de mochila, motobomba o cualquier otro equipo de aplicación.

Debido a que el producto aplicado es elaborado a partir de hongos, no es recomendable realizar aplicaciones de fungicidas durante el período de aplicación de hongos entomopatógenos, por que pueden ser afectados por los fungicidas.

Para ver si el hongo está teniendo algún efecto sobre la plaga es recomendable hacer revisiones en el campo, dos o tres días después de la aplicación del hongo. Se pueden encontrar insectos muertos o se puede observar que la población de la plaga se ha reducido

Compatibilidad

Los productos elaborados a base de estos hongos son compatibles con muchos productos de uso agrícola, sin embargo no deben hacerse mezclas con fungicidas y tampoco se recomienda la aplicación de éstos por lo menos 24 horas después de haber aplicado los hongos (excepto hidróxido de cobre). Se ha observado que cuando se mezclan los hongos con Imidacloprid se logra una acción sinérgica sobre varias plagas.

Por tratarse de un organismo vivo, es posible que los productos a base de hongos entomopatógenos sean afectados por otros productos agroquímicos, en estos casos se debe tratar de evitar la realización de mezclas o el usuario debe consultar al fabricante.

Hay que tomar en cuenta que los hongos requieren condiciones de pH ácido, por lo que al momento de la aplicación hay que tener cuidado con este factor, ya que si el agua es alcalina se afecta la efectividad del hongo. Por esta razón se debe procurar siempre hacer las aplicaciones con agua limpia y evitar el uso de aguas estancadas y sucias.

Almacenamiento

Uno de los principales problemas de los micoinsecticidas es el almacenamiento, ya que se debe mantener la viabilidad de las conidias. La capacidad de sobrevivencia de las conidias depende de su contenido de humedad. En condiciones de refrigeración (4 -5 °C), se puede mantener la viabilidad hasta por un año, pero en condiciones ambientales la conservación es de uno a dos meses, a menos que se tenga un buen tipo de formulación que ayude a proteger a las conidias.

Para evitar que se reduzca la calidad y efectividad de los productos a base de hongos entomopatógenos, éstos se deben guardar en lugares frescos, no húmedos y en lugares que no reciban la incidencia directa del sol, debido a que estos factores son desfavorables para los hongos. Además una vez que el usuario obtuvo el producto no debe almacenarlo en condiciones ambientales por más de dos meses.

Riesgos

A pesar que los insecticidas a base de *Beauveria* y *metarhizium* son productos de riesgo reducido, los aplicadores deben guardar ciertas normas como ropa y zapatos adecuados, mascarillas (ya que ellos son generalmente polvos mojables), así como guantes impermeables. Además se cree que este tipo de productos pueden ser tóxicos para peces, por lo que se debe evitar su aplicación en el agua.

Se han realizado diversos estudios para evaluar el efecto de *metarhizium* y *beauveria*, sobre especies no sujetas de control, tales como aves, reptiles, mamíferos, etc., y no se han encontrado evidencias de ser

afectados por los hongos; sin embargo dado su amplio rango de acción sobre insectos, estos pueden afectar algunas especies benéficas.

Para garantizar la efectividad y el uso de seguro de los insecticidas a base de *Beauveria* y *Metarhizium*, se deben tener además los siguientes cuidados:

- Abrir el producto hasta que se va a utilizar, una vez abierto es mejor utilizarlo todo de una vez. Si se deja abierto el producto, absorbe agua y se afecta su calidad.
- Utilizar el producto antes de su vencimiento: en la etiqueta del producto se indica cual es la fecha de vencimiento, después de dicha fecha no es conveniente utilizar el producto debido a que su efectividad será menor.
- Debe aplicarse preferiblemente por la tarde, para evitar que los rayos del sol afecten al producto. Además se debe aprovechar la menor temperatura de la noche, la que es favorable para los hongos.
- Leer la etiqueta, ya que en ella aparece información importante relacionada con el uso y cuidados a tener con los productos a base de hongos.
- Usar ropa y zapatos adecuados al momento de la aplicación, aunque se trata de productos no tóxicos cuyo origen es natural y no químico, siempre es conveniente guardar las normas básicas de seguridad, debido a que en algunos casos pueden provocar alergias.

Ventajas del uso de Hongos Entomopatógenos como agentes de control

- Constituyen alternativas eficientes de manejo de las plagas: si se usan adecuadamente puede ser tan eficiente como cualquier otro insecticida.

- Se reducen los riesgos de contaminación al ambiente, el suelo, el agua: por ser productos elaborados a base de un organismo vivo, no sintético, no contamina el ambiente.
- Se reducen los riesgos de intoxicaciones, ya que los hongos entomopatógenos no afectan la salud de los trabajadores, ni de los animales domésticos.
- Se protegen los enemigos naturales, debido a que son productos bastante específicos y su acción no es inmediata.
- Los productos agrícolas se obtienen libres de residuos tóxicos: por tratarse de un organismo vivo no deja residuos en los cultivos, por lo tanto los consumidores pueden estar seguros que los productos que consumen no tienen problemas de residuos químicos.
- Los costos pueden resultar más bajos, tanto para el país como para los usuarios, debido a que si se usan correctamente se puede requerir de menor número de aplicaciones, además que no se requiere de inversión de divisas por que pueden ser producidos de localmente.