

Manual para la producción de hongos entomopatógenos y análisis de calidad de bioformulados

Instituto Nacional de
Investigaciones Agropecuarias



GUILLERMO LASSO
PRESIDENTE

PRESIDENTE DE LA REPÚBLICA

Guillermo Lasso Mendoza

MINISTRO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Bernardo Manzano

DIRECTOR EJECUTIVO DE INIAP

Raúl Jaramillo

AUTORES

David Adrián Hidalgo Mata

Cristina Margarita Tello Torres

REVISORES COMITÉ TÉCNICO

PUBLICACIONES INIAP

Digner Santiago Ortega Cedillo

Víctor Javier Cevallos Sandoval

Mercedes Elizabeth Navarrete Párraga

Mario Rolando Ramos Veintimilla

Martha Alicia Romero Pizarro

CITACIÓN CORRECTA

Hidalgo, D., y Tello, C. (2022). Manual para la producción de hongos entomopatógenos y análisis de calidad de bioformulados. Manual N° 128. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Santo Domingo. La Concordia, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. 35 p.

DISEÑO

Unidad de Comunicación Social INIAP

Santiago Martínez

ISBN

978-9942-22-569-6

Primera Edición, 2022

© Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Edificio MAG - 4to. piso
www.iniap.gob.ec

La reproducción parcial o total de esta publicación, en cualquier forma y por cualquier medio mecánico o electrónico, está permitida siempre y cuando sea autorizada por los editores y se cite correctamente la fuente.

**DISTRIBUCIÓN GRATUITA
PROHIBIDA SU VENTA**

**Instituto Nacional de
Investigaciones Agropecuarias**



República
del Ecuador



PRESENTACIÓN

En la actualidad, el sector agropecuario enfrenta nuevos desafíos, que requieren la integración de un enfoque ecológico, para mejorar los rendimientos y minimizar el impacto ambiental. Los microorganismos son imprescindibles para mantener el equilibrio de los ecosistemas, los cuales están ganando importancia en la investigación para su producción y uso como fertilizantes o para el control sanitario, dado que se han comprobado resultados positivos de su aplicación como alternativas al uso de insumos químicos de alta toxicidad.

Esta publicación recopila experiencias adquiridas en investigaciones realizadas en los Departamentos de Protección Vegetal de las Estaciones Experimentales Santo Domingo y Santa Catalina del INIAP, respecto a la producción de hongos entomopatógenos y el control de calidad de bioformulaciones.

La Estación Experimental Santo Domingo, en el año 2019, inició una línea de investigación para desarrollar biopesticidas con base en hongos entomopatógenos, siendo posteriormente direccionados los esfuerzos a la búsqueda de una alternativa para el control de garrapatas en ganado bovino, al ser uno de los principales problemas para la producción pecuaria en el trópico.

Por su parte, la Estación Experimental Santa Catalina, cuenta con un Laboratorio de Control Biológico; en el cual se han realizado trabajos de estandarización e implementación de metodologías para realizar pruebas de control de calidad de bioinsumos con base en hongos biocontroladores, en las que se consideran evaluaciones de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos, que nos permiten caracterizar un bioinsumo, con el fin de asegurar a los usuarios un producto de calidad.

El presente manual didáctico, constituye una herramienta de guía respecto a los procedimientos utilizados por el Departamento de Protección Vegetal del INIAP, para la producción y control de calidad de bioinsumos con base en hongos entomopatógenos.

Este documento está dirigido a técnicos de laboratorio, asociaciones agrícolas y de ganaderos que deseen implementar un proceso de producción y control de calidad de hongos entomopatógenos para bioformulaciones de uso agrícola y pecuario.

TABLA DE CONTENIDO

IMPORTANCIA DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	6
METODOLOGÍAS DE LABORATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	
PROTOCOLO 1	
Monitoreo y colecta de hongos entomopatógenos en campo	7
PROTOCOLO 2	
Preparación de materiales y medios de cultivos	10
PROTOCOLO 3	
Purificación y caracterización de cepas	14
PROTOCOLO 4	
Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch)	18
PROTOCOLO 5	
Producción sobre sustrato sólido (arroz)	22
METODOLOGÍAS DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE CONTROL DE CALIDAD DE BIOFORMULACIONES	
PROTOCOLO 6	
Porcentaje de germinación de esporas	25
PROTOCOLO 7	
Concentración de esporas (Cuantificación en cámara de Neubauer)	27
PROTOCOLO 8	
Determinación de viabilidad (Conteo de unidades formadoras de colonias - UFC)	29
PROTOCOLO 9	
Porcentaje de pureza	31
METODOLOGÍA PRUEBAS DE EFICACIA DE UN PRODUCTO CON BASE EN HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	
PROTOCOLO 10	
Bioensayos para determinación de eficacia	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

INTRODUCCIÓN

Morón (2001), al tratar sobre la importancia del Codex Alimentarius en la seguridad alimentaria y el comercio de alimentos menciona que, para tener una vida activa y sana, la inocuidad alimentaria es un requisito básico de calidad. Implica la ausencia de contaminantes, adulterantes, toxinas y cualquier otra sustancia que pueda hacer nocivo el alimento para la salud, o bien unos niveles inocuos o aceptables de los mismos. Además de la inocuidad, las características de calidad incluyen el valor nutricional y las propiedades organolépticas y funcionales.

Según Bonilla (2016), en su trabajo Aplicación del convenio de Estocolmo: caso en el Ecuador, menciona: “El Convenio de Estocolmo es un acuerdo internacional ratificado por el Ecuador en el año 2004, que busca la reducción o eliminación de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) en el ambiente. El Convenio es auspiciado por la ONU a través del PNUMA. En el Ecuador, después de varios estudios, se han determinado que las fuentes predominantes de COPs son la agricultura, el sistema de energía eléctrica vigente y el manejo de desechos, lo que ha llevado a nuestro país a realizar esfuerzos para el control de los mismos a través del fortalecimiento de la normativa ambiental vigente entre otras acciones”.

El empleo de microorganismos toma mayor importancia por el mínimo impacto ambiental, pues con una adecuada selección de cepas se puede alcanzar especificidad. Para el efecto, surge la necesidad de crear mecanismos que permitan almacenarlos y evaluar su efectividad en campo de manera que permita un control de la plaga objetivo (Hidalgo, 2019).

El INIAP a través de sus estaciones Santo Domingo (EESD) y Santa Catalina (EESC) unen su experiencia para el desarrollo del presente manual mediante protocolos sencillos junto con imágenes que ejemplifican a su ejecución en laboratorio y campo.

Los hongos entomopatógenos representan una tecnología alternativa que no excluye su uso en interacción con insecticidas en control de plagas de cultivos o ectoparásitos de animales, brindando una alternativa a los problemas de resistencia como por ejemplo la resistencia a los acaricidas que han adquirido las garrapatas en Ecuador (Rodríguez et al., 2018).

IMPORTANCIA DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos fueron la primera herramienta biotecnológica empleada para el control de plagas, siendo descritos originalmente durante el siglo XVIII como patologías en insectos de interés como el gusano de la seda o abejas. En la segunda mitad del siglo XIX, en Estados Unidos se lideraron muchos trabajos relacionados con el control de insectos perjudiciales con levaduras, los cuales no tuvieron buenos resultados. Aproximadamente, en la misma época en Europa oriental (Rusia), se desarrolló de manera notable la idea de la patología de insectos aplicada, la cual, tuvo éxito gracias a los trabajos de Elie Metchnikoff, que luego de determinar que la plaga llamada “escarabajo de los granos” *Anisoplia austriaca*, era atacada por un hongo, una bacteria y un nematodo, logró aislar y multiplicar al hongo que llamó *Entomophthora anisopliae* empleando al mismo para su control; actualmente se conoce al hongo con el nombre de *Metharizium anisopliae* (Espinell et al., 2018).

Actualmente, el deterioro ambiental se ha incrementado por el amplio uso de pesticidas químicos, lo que promueve a la búsqueda de componentes de manejo de cultivos, más amigables con el medio ambiente. Los hongos entomopatógenos tienen difusión en países del primer mundo, en agricultura orgánica e inclusive son empleados ampliamente en países latinoamericanos, existiendo desde hace años biopesticidas comerciales de producción nacional en Argentina, México, Chile, Brasil y Colombia; los cuales son utilizados como alternativa para disminuir el uso de agroquímicos, minimizando así, el daño a la salud humana y ecosistemas (Gómez et al., 2018).

Institutos como SENASA en Perú, BioINIA en Chile o los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREEs), supervisados por el INISAV en Cuba, por citar algunos, proveen a los agricultores de esporas producidas sobre medio sólido con distintas especies de hongos entomopatógenos para control de una amplia gama de plagas (Hidalgo, 2019).

Los hongos entomopatógenos conforman un amplio grupo de importancia como biocontroladores, se los puede encontrar en restos de cultivos, materia orgánica, en insectos muertos, suelo, etc, los cuales pueden ser aprovechados por su potencial para una agricultura sostenible.

Sin embargo, la producción de hongos de forma artesanal o tecnificada, sobre sustrato sólido en centros de producción, tiene el inconveniente de que las esporas pueden ser inhaladas en grandes concentraciones por parte del personal, ocasionando el síndrome de Alveolitis Alérgica Extrínseca, que de ser recurrente desembocará en afección bronquial crónica y fibrosis intersticial pulmonar. Por lo anteriormente expuesto, los citados centros disponen de protocolos de producción, control de calidad del producto y bioseguridad de los operarios, para evitar riesgos a la salud (Sarduy et al., 2011).

METODOLOGÍAS DE LABORATORIO PARA LA PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

PROTOCOLO 1

Monitoreo y colecta de hongos entomopatógenos en campo

1.1 Objetivo

Realizar una prospección de hongos entomopatógenos a partir de muestras de insectos infectados para crear un banco base de cepas.

1.2 Materiales Trampas de caída

- Cajas plásticas
- Cuchillo
- Feromonas
- Fruta y/o proteína hidrolizada

Trampas adherentes de colores

- Postes
- Plásticos de colores
- Pega agrícola

Técnica de “Insecto Trampa”

- Tarrinas plásticas de 250 cc
- Aguja o punzón
- Placas Petri
- Vaso de precipitación
- Hipoclorito de sodio
- Larvas de *Galleria mellonella*

1.3 Metodología

1.3.1 Trampas de caída

Seleccionar la caja plástica a utilizarse, que dependerá del tamaño del insecto a capturar, por ejemplo, insectos de hasta 2 cm de tamaño y sin capacidad de vuelo pueden ser capturados en cajas de 1 litro de capacidad, mientras que, insectos grandes y con alta capacidad de vuelo, como *Rynchophorus palmarum* o *Strategus aloeus* requieren cajas plásticas de hasta 20 litros.

En el caso de insectos rastreros debemos hacer hoyos en el suelo en cuyo interior se deposita una tarrina plástica, quedando la boca de esta al ras del suelo, luego se cubre con hojarasca a manera que brinde sombra y permita el ingreso del insecto. Se debe tomar en consideración desagües para evacuar el agua de lluvia, ya que los hongos en especímenes mojados no van a esporular.

Para el caso de insectos voladores, en las trampas se emplea un cebo atrayente como puede ser fruta descompuesta o para asegurar su eficacia se adiciona una feromona específica para la especie de insecto a capturar. Las trampas son forradas con un costal para permitir el agarre del insecto y facilite el ingreso del mismo a través del orificio (**Figura 1**) y son colgadas en troncos a una altura de 1.5 m; adicionalmente, se debe poner fibra en la base para evitar que los insectos muertos e infectados entren en contacto con la humedad de la fruta descompuesta.



Figura 1. Trampas de caída con atrayente y feromona para *Rynchophorus palmarum*.

1.3.2 Trampas adherentes de colores

Las trampas adherentes (**Figura 2**), capturan indistintamente todo tipo de insecto volador, pero los colores aumentan la prevalencia de ciertos órdenes; el color amarillo permite capturar insectos de los órdenes homóptera, díptera, hemíptera y lepidóptera, el color azul insectos del orden thysanoptera y el color blanco permite el monitoreo de ácaros.



Figura 2. Insectos capturados en trampa adherente.

Los insectos infectados/ esporulados con hongos entomopatógenos en trampas cromáticas con adherente que se utilizan para aislamiento y multiplicación, son tomados de la parte media de la trampa hasta el borde superior de la misma, extrayendo porciones de los insectos esporulados con una pinza y se colectan en un tubo eppendorf. No se colecta del borde inferior de la trampa debido a que la acumulación de goma inhibe la esporulación. Las muestras serán debidamente etiquetadas y llevadas al laboratorio para su procesamiento y aislamiento de hongos entomopatógenos.

1.3.3 Técnica de “Insecto Trampa”

Se realizan colectas de suelo en tarrinas, etiquetando la tapa y realizando orificios en esta con una aguja para permitir el paso de aire, luego se transfieren larvas de *Galleria mellonella* o *Tenebrio molitor* (**Figura 3**). Transcurridos de 5 a 7 días se remueven los insectos muertos, observándose que estos presentan crecimiento de hifas donde se recuperan estas mediante siembra en medio de cultivo *Saboreaud Dextrosa más Dodine*.



Figura 3. Técnica del “Insecto trampa”.

Si se observan larvas muertas, posiblemente infectadas (color rosado) o no bien esporuladas, se procede a esterilizarlos introduciéndolos durante 60 segundos en una solución de agua estéril con hipoclorito de sodio al 0.5 %. A continuación, las larvas son lavadas dos veces con agua estéril, se colocan sobre una servilleta para su secado y se envían a la cámara húmeda hasta su esporulación.

PROTOCOLO 2

Preparación de materiales y medios de cultivo

2.1 Objetivo

Preparar y dispensar medios de cultivo previo a las actividades de laboratorio.

2.2 Materiales y equipos

- Ácido láctico o antibióticos (Estreptomicina, Penicilina, Tetraciclina)
- Agar (Papa Dextrosa Agar - PDA, Saboreaud Dextrosa Agar - SDA)
- Agua destilada
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Cristal Violeta
- Diodina
- Estufa
- Gradillas
- Papel
- Placas Petri
- Sellador de fundas
- Tubos de ensayo con tapa

2.3 Metodología

2.3.1. Limpieza previa

- El material de vidrio contaminado con medios de cultivo y agentes biológicos, debe ser sometido a esterilización por autoclave previo al lavado.
- Eliminar todos los residuos una vez que se enfríen.
- Lavar con detergente u otro surfactante y enjuagar con abundante agua.
- De observarse sarro, dejar los materiales sumergidos en limpia sarro por al menos 24 horas y proceder nuevamente a su lavado.



Figura 4. Esterilización de materiales. Empaquetado (a y b), esterilización en autoclave (c) y esterilización en estufa (d).

2.3.2. Esterilización de materiales. Método Húmedo (Autoclave)

Se emplea con materiales que no resisten altas temperaturas como plásticos o medios de cultivo. Se realiza en autoclave a 121° C - 15 libras de presión - PSI, durante 20 minutos. Para materiales como puntas o tapas de plástico, se empaquetan en fundas de polipropileno herméticamente selladas y se esterilizan (**Figura 4 a,b y c**).

2.3.4. Esterilización de materiales. Método Seco (Estufa)

Las placas Petri y frascos de vidrio deben empaquetarse en papel, cilindros de acero inoxidable, papel aluminio, etc. y ponerse en la estufa a 180 °C durante 2 horas posteriormente dejarlas enfriar 2 horas antes de retirar el material (**Figura 4 d**).

2.3.4. Preparación y dispensado de medios de cultivo

Los medios de cultivo que se emplean para hongos entomopatógenos son el Papa Dextrosa Agar (PDA) y el Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) (Villa et al., 2012). De manera general, los pasos para la preparación de medios son:

1. Pesar en una balanza electrónica empleando un sobre de papel aluminio la cantidad en gramos de agar recomendada por la casa comercial para la preparación del volumen deseado del medio de cultivo.
2. Calentar el volumen de agua requerido a 95 °C.
3. Verter el agar lentamente sobre el agua caliente y posteriormente agitar hasta lograr la dilución del mismo.
4. Aforar el agar disuelto dentro de un frasco erlenmeyer hasta la mitad de su capacidad, tapar la boca del envase con algodón y autoclavar durante 20 minutos a 15 PSI de presión.
5. Dispensar en placas Petri (**Figura 5**) o tubos de ensayo (**Figura 6**).

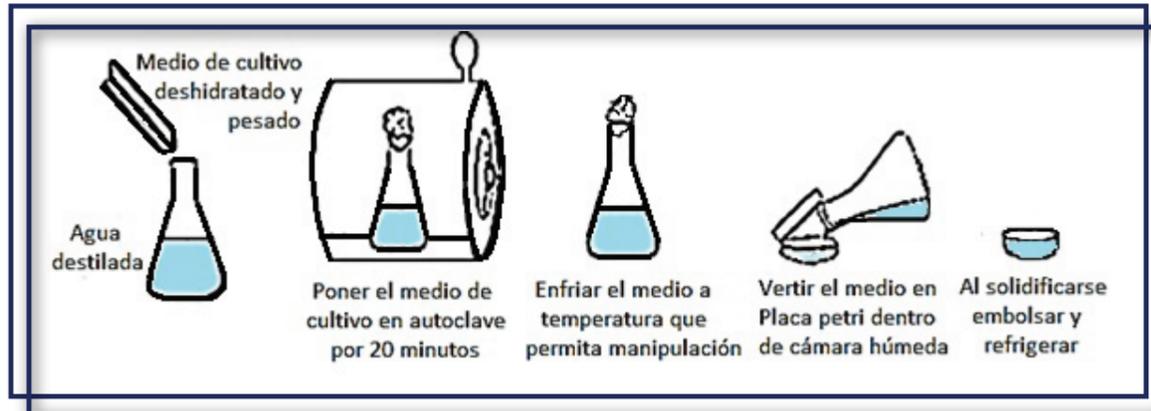


Figura 5. Dispensado de agar en placas Petri (Agrios, 2002).

El dispensado de tubos de ensayo se emplea para conservación de cepas puras en refrigeración durante un año (Figura 5).

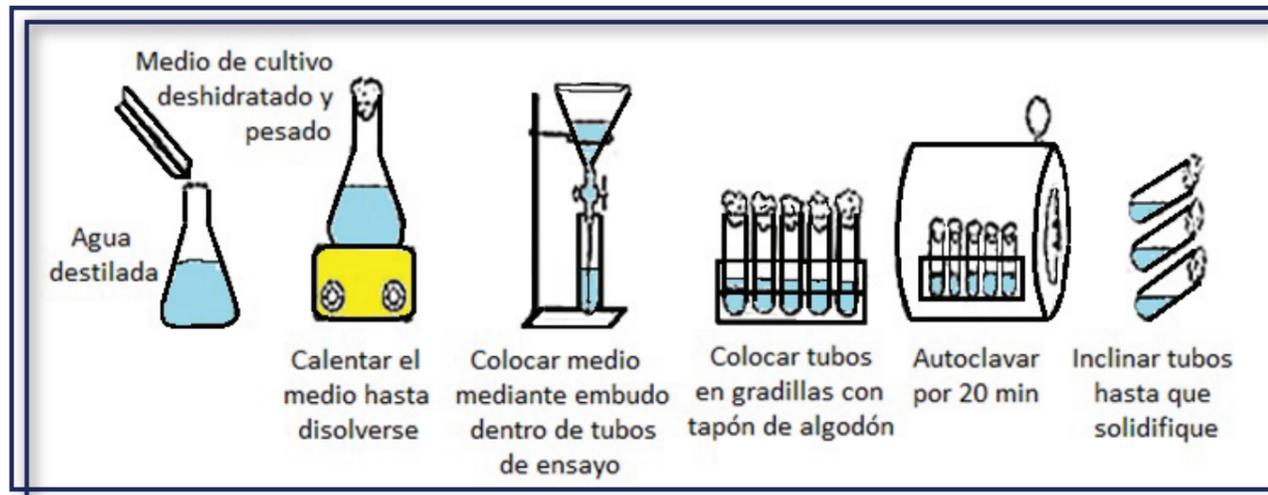


Figura 6. Dispensado de agar en tubos (Agrios, 2002).

Para evitar el desarrollo de bacterias se agregan antibióticos al medio de cultivo después de ser esterilizado en autoclave y enfriado a una temperatura de 30° C, como Penicilina + Estreptomicina (30 - 50 ppm), tetraciclina (50 ppm) o 40 gotas de ácido láctico por litro.

2.3.5. Medio selectivo SDA + Dodine

Este medio de cultivo es selectivo para hongos entomopatógenos como Beauveria, Isaria y Metarhizium, limitando el crecimiento de otros hongos (Chase et al., 1986). Se emplea para recuperar hongos entomopatógenos de muestras contaminadas o de muestras de suelo.

Para su elaboración se prepara medio Saboraud Dextrosa Agar, el medio se esteriliza en autoclave y al bajar la temperatura a 30 °C se añade 0.345 ml de Syllit (ingrediente activo Dodine 0.4 g/l) y ácido láctico 0.32 ml como antibiótico. Para visualizar el crecimiento del hongo se añade por litro de agar 10 mg de Cristal Violeta (Figura 7).

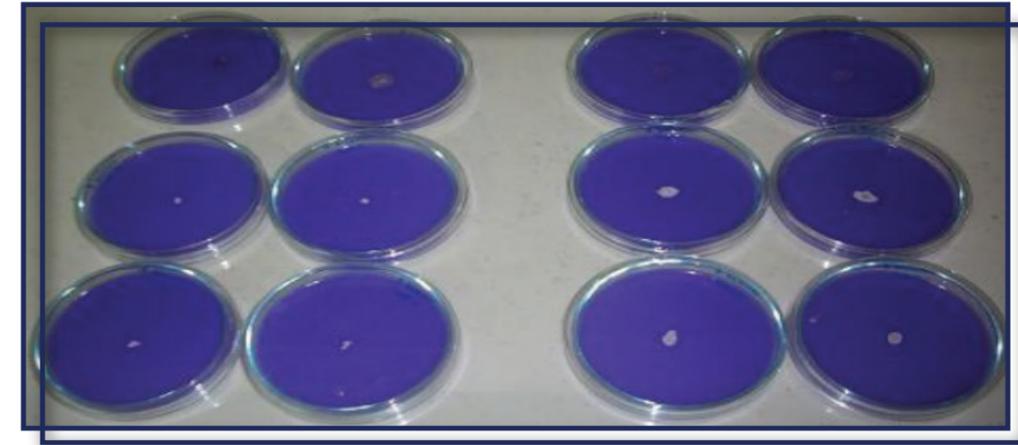


Figura 7. Medio Dodine con Cristal violeta.

El medio Dodine debe guardarse bajo sombra, ya que la luz desnaturaliza al ingrediente activo.

PROTOCOLO 3 Purificación y caracterización de cepas

3.1 Objetivo

Purificar y caracterizar cepas de hongos entomopatógenos a partir de muestras de campo.

3.2 Materiales y equipos

- Ácido láctico o antibióticos (Estreptomicina, Penicilina, Tetraciclina)
- Agar (PDA, SDA)
- Agua destilada
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Placas Petri
- Microscopio
- Porta y cubre objetos
- Cinta adhesiva transparente

3.3 Metodología

3.3.1 Cultivos monospóricos

Adaptado de metodología CIP (Ames, 2004), CINCAE (Pereira y Mora, 2004), (Contreras y Bustillos, 2019).

1. Con un asa de inoculación estéril, obtenga una cantidad muy pequeña de esporas de una cepa crecida en el medio de cultivo y suspenda en unos pocos ml de Tween 80 en un vial estéril.
2. Suspenda las esporas en el agitador durante 5 minutos (para obtener una gran proporción de esporas únicas en suspensión).
3. Retire asépticamente una muestra de la suspensión y realice un conteo de hemocitómetro. [Es necesario conocer la concentración aproximada de esporas para determinar a qué distancia deben llevarse las diluciones para obtener aproximadamente 100 esporas/ml].
4. Diluir la suspensión de esporas con Tween 80 estéril al 0.1 % en la medida necesaria para obtener aproximadamente 50-100 esporas por ml (**Figura 8**). Aproximadamente 0.1 ml de una suspensión de 50 esporas / ml equivalen de 5 a 15 esporas por placa. Un número mayor por placa puede dificultar el posterior aislamiento de colonias individuales.

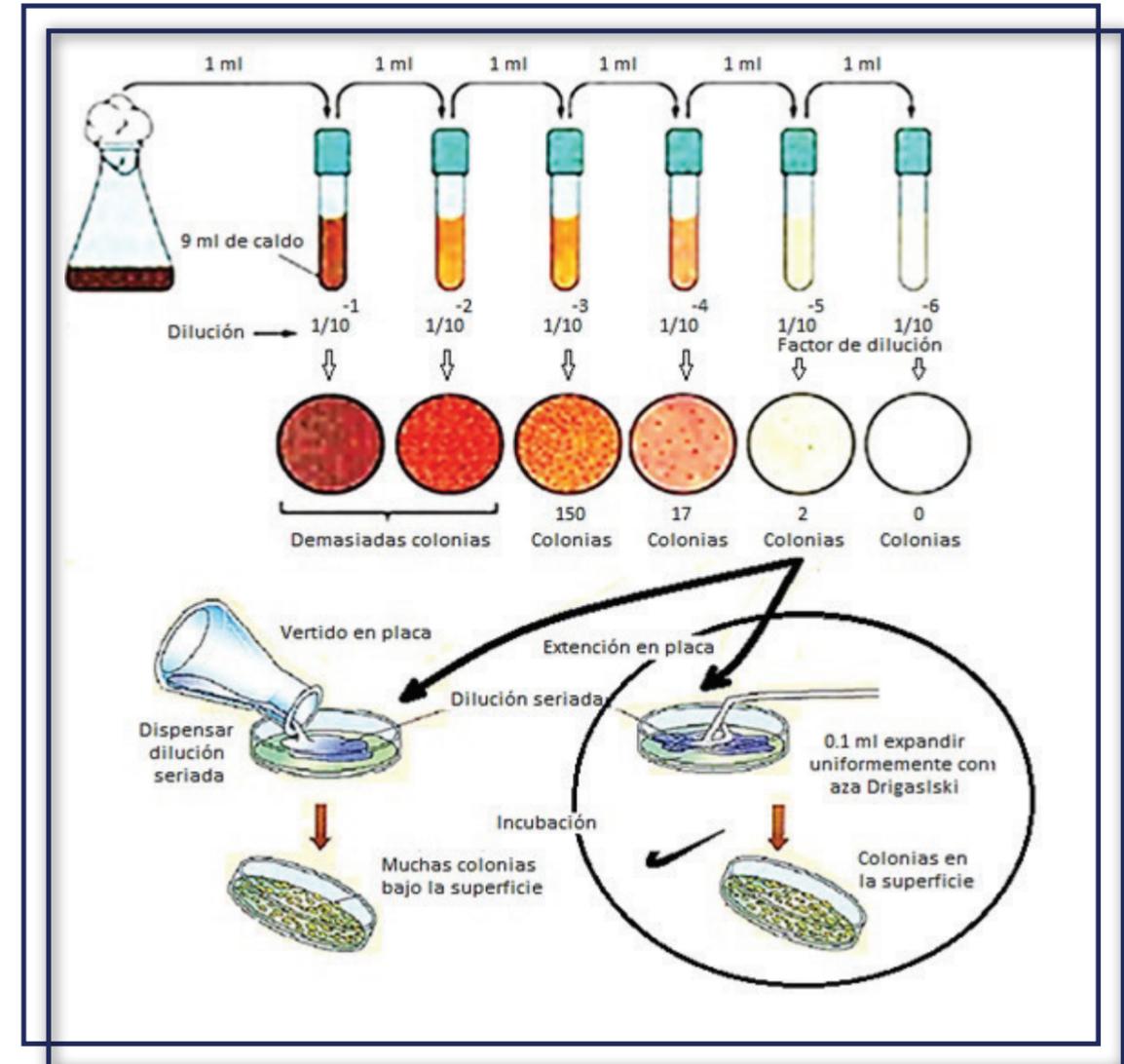


Figura 8. Dilución y siembra de colonias Modificado de: Domínguez (2019).

5. Colocar 0.1 ml de la dilución escogida en cada una de placas Petri y extender sobre la superficie de cultivo (Agar) con una barra de extensión flameada.
6. Incubar las placas Petri a 25-30 °C hasta que las colonias alcancen 2-4 cm de diámetro.
7. Examine colonias por diferencias morfológicas (**Figura 9**).

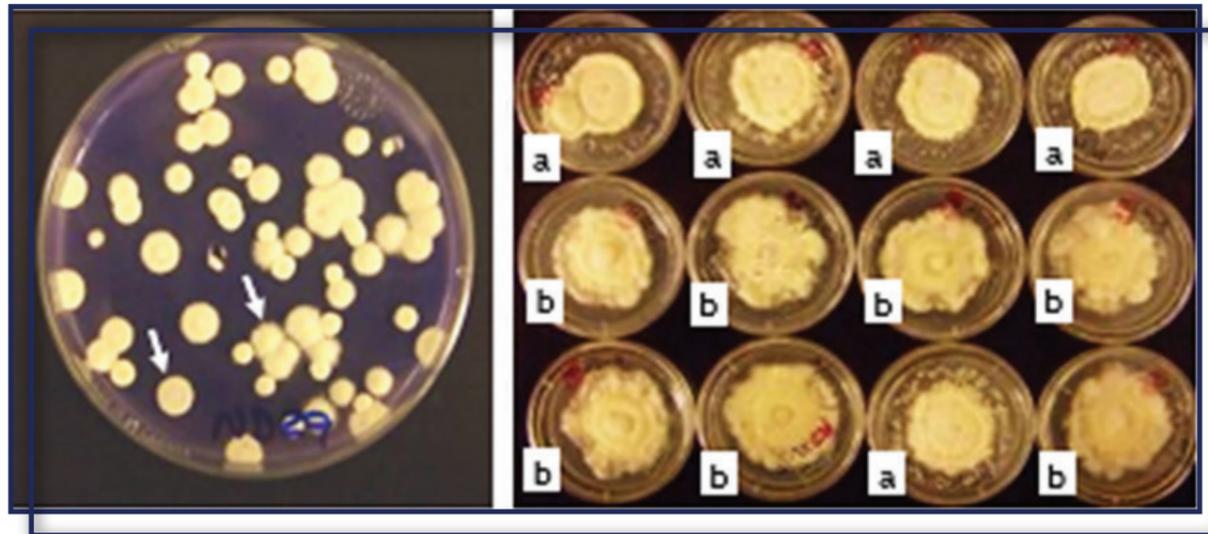


Figura 9. Separación de cepas monospóricas (Imagen muestra dos cepas, a y b).

3.3.2 Morfología macroscópica

Para cada aislado preparar con PDA 5 placas Petri de 90 mm de diámetro. Transfiriera material al centro de la placa mediante técnica de palillo estéril. Las placas deben incubarse a 25°C durante 5 días.

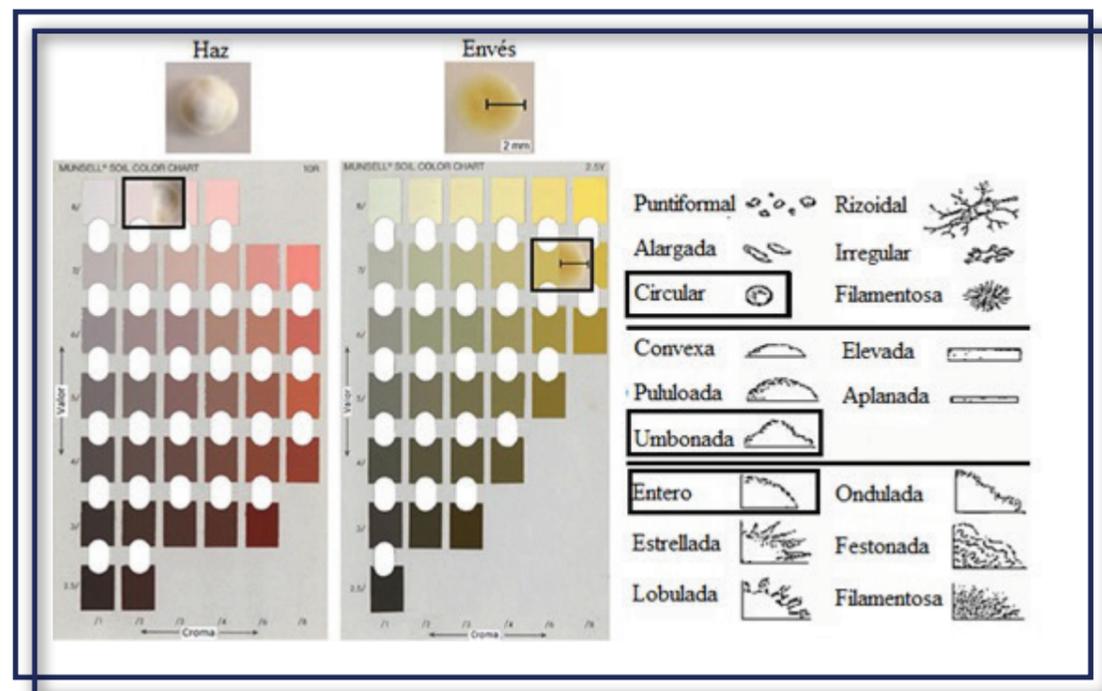


Figura 10. Caracterización de cepas (Hidalgo, 2019; adaptado de Salvador y Vega, 2013).

3.3.3 Morfología microscópica

1. Una vez colonizada la placa Petri con el micelio del hongo, colocar en una lámina portaobjetos una gota de azul de lactofenol u otro colorante.
2. Con una aguja entomológica o un alfiler minutum tomar una pequeña muestra de tejido hifal y dispersarla sobre la gota de colorante, luego hay que cubrirla con un cubreobjetos.
3. También se puede tocar levemente la superficie de la colonia en desarrollo con una cinta adhesiva transparente y pegarla sobre la lámina portaobjetos.
4. Observar al microscopio con aceite de inmersión cuando las estructuras son muy pequeñas. Utilizar claves taxonómicas para la identificación a nivel de género del hongo en estudio.
5. Medir la longitud y diámetro de cualquier estructura de interés de acuerdo a la especie que este observando.

3.3.4 Registro de cepas

Siguiendo la metodología de Contreras y Bustillos (2019), cada cepa a registrar se le asigna un código y se elabora una tabla con los siguientes datos:

- Género
- Especie
- Localidad origen
- Hospedero original
- Hospedero evaluado
- Producción de conidios
- Concentración de conidios en sustrato
- Tasa de crecimiento radial
- Tamaño de conidios (diámetro mínimo y máximo)

Adicionalmente, se incluye fotografías del anverso y reverso del crecimiento de la colonia en el medio de cultivo. También debe incluirse fotografías microscópicas de conidióforos, conidias y fiálides.

PROTOCOLO 4

Pruebas de patogenicidad (Postulados de Koch)

4.1 Objetivo

Determinar la patogenicidad de las cepas aisladas de hongos entomopatógenos.

4.2 Materiales y equipos

- Ácido láctico o antibióticos (Estreptomycin, Penicilina, Tetraciclina)
- Agar (PDA, SDA)
- Agua destilada
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Dispensador
- Estufa
- Gradillas
- Insectos criados en laboratorio
- Papel aluminio
- Pipeta
- Placas Petri de diferente diámetro
- Recipientes de vidrio (Erlenmeyer, vaso de precipitación)
- Recipientes plásticos (vasos, tarrinas)
- Sustrato/alimento
- Tubos de ensayo de 10 ml

4.3 Metodología

4.3.1 Cría de insectos en laboratorio

Para la realización de bioensayos se debe disponer de crías en laboratorio de las plagas a controlar, o como alternativa insectos pertenecientes a la misma familia con hábitos similares de alimentación.

Los insectos más comunes de cría en laboratorios son *Galleria mellonella*, *Sitotroga cerealella*, *Spodoptera frugiperda*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus orizae*, *Acheta domesticus*, *Musca domestica* y *Hermetia illucens*. Cuando se trabaja con hemípteros, se recurre a jaulas con malla que disponen de plantas en macetas; mientras que, para insectos hematófagos se dispone de jaulas con compuertas de ingreso para animales de sangre caliente como conejos, así como sitios apropiados para oviposición como fuentes de agua en el caso de culícidos.

4.3.2 Preparación de materiales

1. Prepare recipientes con insectos criados en laboratorio. Colocar 30 insectos inmaduros o 15 insectos adultos en cada recipiente de cría y tape la boca del recipiente con una tapa perforada o papel aluminio perforado para permitir el paso de aire.

2. Partiendo de 1 gramo del producto (sustrato - hongo), ejecute el protocolo de conteo de conidias.

3. En base a los resultados obtenidos, realice las diluciones correspondientes para obtener las dosificaciones planteadas a aplicar en recipientes debidamente etiquetados.

4.3.3 Inoculación de insectos Inmersión

Esta metodología es empleada en Perú, con larvas de *Galleria mellonella*, empleando larvas en último instar que son inmersas en la disolución de esporas de hongo durante un minuto, posteriormente se la deja escurrir sobre papel toalla y pasa a recipientes donde se espera la incubación del hongo (**Figura 11**).

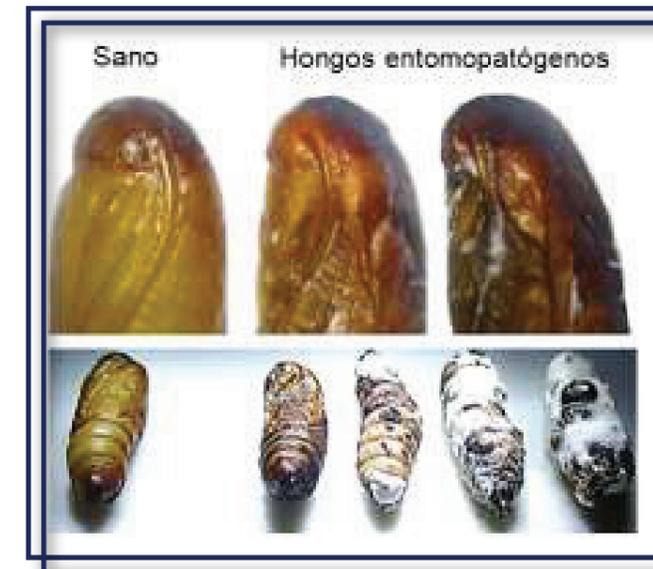


Figura 11. Inoculación al insecto por inmersión (Hidalgo, 2019).

Aspersión

Esta metodología es empleada en insectos que presentan mayor movilidad como larvas de garrapatas o insectos adultos. Se dispone una cantidad determinada de insectos dentro de recipientes lo que permite una rápida transferencia de estos a los recipientes de incubación donde serán expuestos al hongo, en el caso de garrapatas se realiza la transferencia de huevos en tubos de ensayo y se espera a la incubación de las larvas.

Las disoluciones son dispuestas dentro de aspersores y se preparan los recipientes con insectos sobre papel para que absorba el excedente de humedad, realizando pruebas preliminares para observar la cantidad de agua que se puede rociar sin saturar de humedad el recipiente, ya que esta puede ahogar al insecto si se acumula en sus espiráculos. Mediante rápidos movimientos se transfiere los insectos y se rocía la solución sobre ellos, posteriormente se tapan bien los recipientes y se etiquetan (**Figura 12**).



Figura 12. Ninfas de garrapata rociadas con hongos entomopatógenos.

4.3.4 Cámara húmeda (esporulación)

La cámara húmeda brinda un ambiente con elevada humedad relativa, pero evita que los insectos muertos entren en contacto con el agua. Para esto empleamos una placa Petri de diámetro menor dentro de otra placa Petri estándar, entre estas placas se coloca agua y se procede a tapar y etiquetar (**Figura 13**).

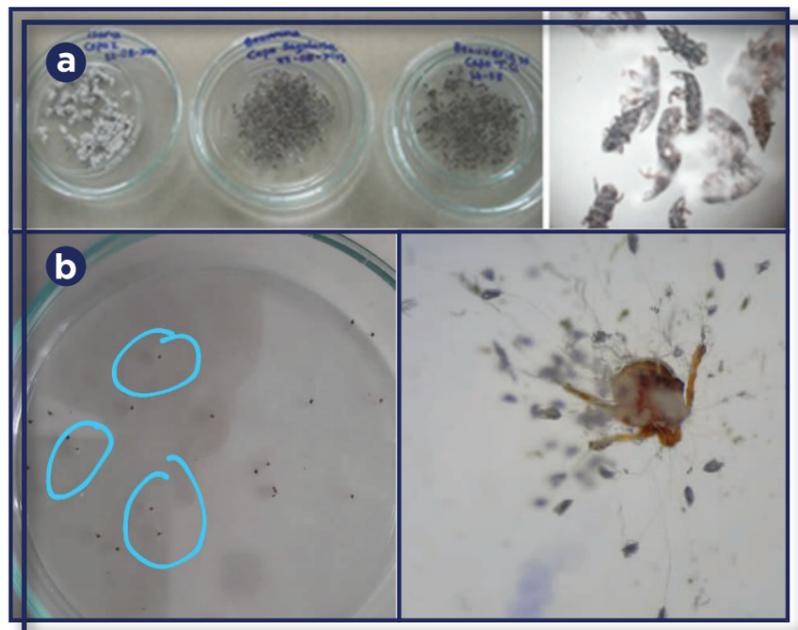


Figura 13. Cámara húmeda. Ejemplos de esporulación con a) *Sitophilus orizae*, b) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Los insectos muertos son colectados 8 días después de la inoculación y luego de 5 días de incubación en la cámara húmeda se observará sobre los mismos el crecimiento de hifas. Una vez esporulados, se deben procesar para el aislamiento e identificación del hongo entomopatógeno; si se dejan mucho tiempo dentro de la cámara húmeda los insectos se deterioran y se pierde la muestra.

4.3.5 Recuperación de hongos

Siembre en PDA una carcasa del insecto esporulado en el centro de una placa Petri e incube por 15 días. Posterior a la esporulación, transfiera el material a placas Petri con PDA y se conserva, con lo cual se habrá recuperado la cepa original (**Figura 14**).

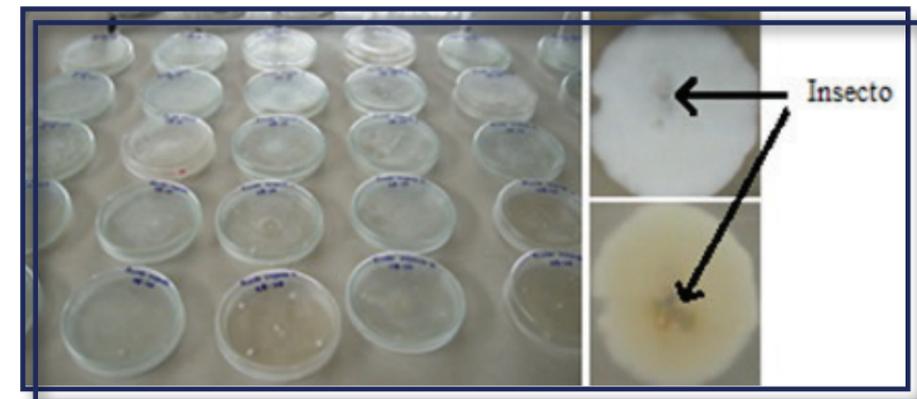


Figura 14. Siembra de insectos para recuperación de hongos.

En caso de tener problemas de contaminación por hongos, emplee medio SDA + Dodine, si la contaminación es bacteriana añada antibiótico o ácido láctico al PDA.

Este procedimiento se conoce también como reactivación y se realiza una vez al año para mantener la virulencia de la cepa, misma que se pierde paulatinamente con cada réplica de conidias en el medio de cultivo.

PROTOCOLO 5 Producción sobre sustrato sólido (arroz)

Adaptación de metodología de Pereira y Mora (2004).

5.1 Objetivo

Producir hongos entomopatógenos esporulados sobre sustrato de arroz en presentación de fundas de 800 g.

5.2 Materiales y equipos

- Agua destilada
- Alcohol y aspersor
- Arroz
- Autoclave
- Bandejas
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Fundas plásticas
- Grapadora/Sellador de fundas
- Guantes de nitrilo
- Jeringas
- Mascarilla completa con protector facial
- Recipientes de vidrio (Erlenmeyer, vaso de precipitación)
- Trajes de seguridad biológica

5.3 Metodología

Existen tres métodos de producción de hongos entomopatógenos, el primero consiste en la producción sobre sustrato sólido (cereales), partiendo de conidias obtenidas de colonias puras en placas Petri, este método artesanal se emplea en investigación y producción a pequeña escala.

El segundo método es un sistema mixto donde se producen blastosporas del hongo en medio líquido de papa dextrosa, como fuente de inóculo para su incorporación sobre sustrato sólido. En este sistema se abarata la fuente de inóculo y es posible disponer de grandes volúmenes, por lo que se considera un sistema semi artesanal.

Finalmente, se considera un método industrial la producción de blastosporas mediante el uso de biofermentadores. Si bien se incrementa significativamente la producción de esporas frente al sustrato sólido, al ser blastosporas tienen poca tolerancia al medio ambiente y su periodo de almacenamiento en percha usualmente no supera los 15 días.

El presente manual muestra las técnicas de producción sobre sustrato sólido tipo artesanal.

5.3.1 Preparación de sustrato

El arroz es lavado tres veces para eliminar impurezas y almidón suelto y se deja escurrir por 20 minutos. Posteriormente, se elaboran paquetes de hasta un kg dentro de fundas que son selladas herméticamente, procurando dejar una bolsa de aire en el interior.

5.3.2 Inoculación del sustrato

Se extraen esporas de placas Petri raspando su contenido con un asa. Verter el contenido de 3 placas en 500 ml de agua destilada estéril. Las esporas son hidrófobas por lo que para poder dispersarlas se coloca una gota de Tween 80



Figura 15. Inoculación de sustrato.

Se inyectan 5 ml de la solución por funda (Figura 15) y se procede a remover el arroz a partir del sexto día.

5.3.3 Remoción y control de contaminantes

Las fundas se abren luego de observar la cobertura completa de los granos de arroz, situación que se da al sexto día (Figura 16, a).

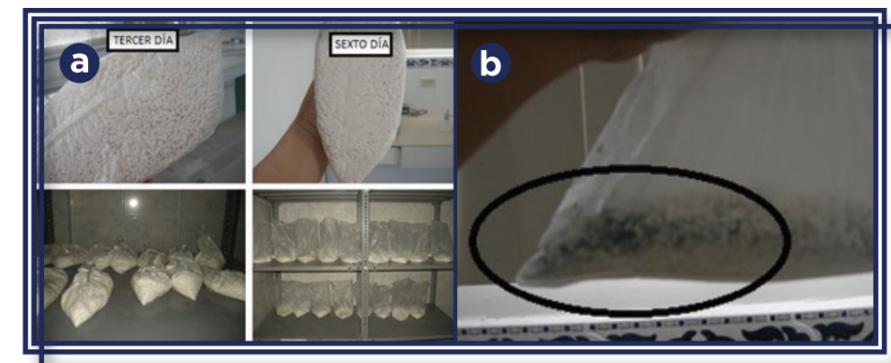


Figura 16. a) Crecimiento del hongo en fundas, b) Sustrato contaminado.

Cuando se procesan pocas fundas, es posible monitorear contaminación y eliminarla para evitar la pérdida de todo el material. En volúmenes grandes, esta actividad consume mucho tiempo, por lo que se procede a eliminar las fundas contaminadas (**Figura 16, b**).

Luego de la cobertura total del arroz se abren las fundas y se extienden sobre bandejas para su secado, proceso que dura una semana (**Figura 17a**). Posteriormente, se empaquetan en fundas de 800 gramos. Al evaluar parámetros de control de calidad, se espera un mínimo de 1×10^8 conidios por gramo con un porcentaje de germinación del 90% a las 18 horas y un porcentaje de pureza del 98% (**Figura 17b**).



Figura 17. Secado y empaquetado.

METODOLOGÍAS DE PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE CONTROL DE CALIDAD DE BIOFORMULACIONES

PROCOLO 6 Porcentaje de germinación de esporas

6.1 Objetivo

Determinar la viabilidad mediante la cuantificación de conidios germinados en 24 horas.

6.2 Materiales y equipos

- Sustrato arroz colonizado por el hongo entomopatógeno de interés
- Solución de Tritón X-100 al 0.1%
- Agar agua
- Micropipetas 1000ul y 100ul
- Placas Petri
- Azul de lactofenol
- Bisturí
- Porta y cubre objetos
- Incubadora
- Cámara de flujo laminar
- Microscopio

6.3 Metodología (Báez et al., 2019)

1. Tomar tres submuestras de 1g del sustrato de arroz colonizado o bioformulado con la especie de hongo entomopatógeno de interés.
2. Cada submuestra se coloca en tubos de ensayo con 9 ml de solución estéril de Tritón X-100 al 0.1%, agitar en vórtex hasta que se homogenice completamente la suspensión.
3. La suspensión obtenida corresponde a la dilución 10-1.
4. A partir de la dilución 10-1 realizar diluciones seriadas (10-2, 10-3), tomando una muestra de 1000 ul y colocándola en un nuevo tubo de ensayo con 9 ml de solución estéril de Tritón X-100 al 0.1%, sucesivamente.
5. Tomar 100 ul de las diluciones seriadas 10-2 y 10-3 y sembrarlas en placas Petri conteniendo Agar Agua, dispersándolas en toda la superficie.
6. Incubar a una temperatura entre 22°C - 25°C.
7. Se puede evaluar a partir de las 10 horas de incubación hasta

máximo 24 horas después de la siembra, el tiempo de germinación será específico para cada especie de hongo utilizado.

8. Colocar tres gotas de azul de lactofenol sobre la superficie del agar y cortar segmentos de agar de aproximadamente 1 cm² (**Figura 18**).

9. Colocar sobre una placa portaobjetos y observar al microscopio.

10. Contar las esporas germinadas y no germinadas por campo óptico, mínimo 300 esporas por muestra (**Figura 19**). Expresar en porcentaje el número de esporas germinadas. Se considera aceptable > 90% de esporas germinadas en 24 horas.



Figura 18. Procedimiento para conteo de germinación de esporas (Hidalgo, 2019).



Figura 19. Identificación de esporas germinadas (Hidalgo, 2019).

En la figura 19, se observan esporas vivas (color azul), en contraste con material inerte; se considera espora germinada a aquellas cuyo tubo germinativo excede al diámetro del conidio.

PROTOCOLO 7

Concentración de esporas (Cuantificación en cámara de Neubauer o Hematocitómetro)

7.1 Objetivo

Determinar la cantidad de esporas o conidios existentes por unidad de masa o volumen.

7.2 Materiales y equipos

- Solución de Tritón X-100 al 0.1%
- Cámara de Neubauer o Hematocitómetro
- Micropipetas 100ul y 1000ul
- Vórtex
- Microscopio
- Muestra de bioformulado
- Tubos de ensayo
- Balanza

7.3 Metodología (Báez et al., 2019)

1. Tomar tres submuestras de 1 g del bioformulado con la especie de hongo entomopatógeno de interés.

2. Colocar cada muestra en un tubo de ensayo con 9 ml de solución estéril de **Tritón X-100 al 0.1%**. La suspensión obtenida corresponde a la dilución 10-1.

3. Agitar fuertemente hasta que la muestra se disperse completamente.

4. A partir de la dilución 10-1, realizar diluciones seriadas (10-2, 10-3), tomando una muestra de 1000ul y colocar en un nuevo tubo de ensayo, sucesivamente.

5. Tomar una muestra de 50ul de la dilución 10-3 y transferirla a la cámara de Neubauer (**Figura 20**), hasta que se llene la cámara por capilaridad.

6. Proceder a realizar el conteo en microscopio, cuantificar las esporas presentes en 20 cuadros, como se muestra en la **Figura 21**.

7. Realizar el promedio de las 20 lecturas y aplicar la siguiente fórmula, ajustada de Gómez et al. (2014):

Concentración de esporas / g o ml = Promedio 20 lecturas x 10 000 x 16 x FD

Donde,

FD: Factor de dilución (inverso de la dilución utilizada para el conteo)
16 y 10 000: Constantes para cuadrantes laterales

Se considera aceptable una concentración de esporas por gramo a valores superiores a 1×10^8 .

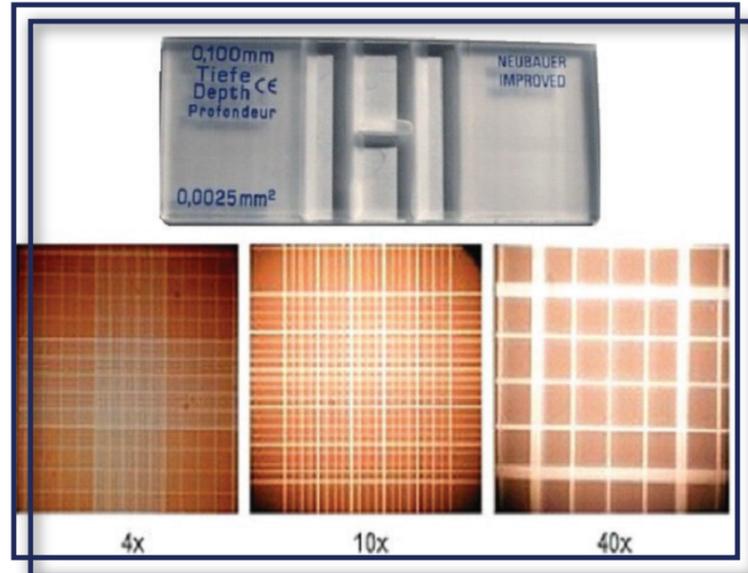


Figura 20. Cámara de Neubauer (Hidalgo, 2019).

Para determinar el número de esporas por volumen contenidas en una determinada suspensión se utiliza una cámara de Neubauer o Hematocitómetro, el cual es una lámina de vidrio que contiene dos cámaras de 0.1 mm de profundidad. Cada cámara está dividida en cuadrículas que nos permiten realizar los conteos de esporas (**Figura 21**).

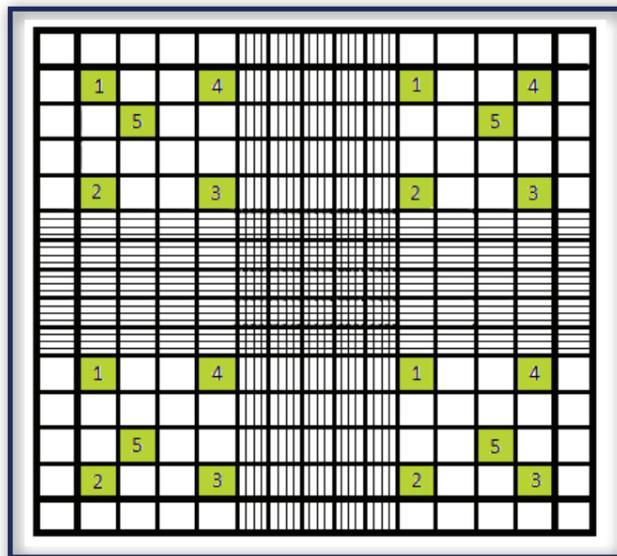


Figura 21. Esquema de las celdas para cuantificación en cámara de Neubauer.

PROTOCOLO 8 Determinación de viabilidad (Conteo de unidades formadoras de colonias - UFC)

8.1 Objetivo

Determinar la cantidad de esporas o conidios viables por unidad de masa o volumen.

8.2 Materiales y equipos

- Muestra de bioformulado con el hongo entomopatógeno de interés
- Solución Tritón X-100 al 0.1%
- Micropipetas 100ul y 1000ul
- Balanza
- Placas Petri
- Vórtex
- Medio de cultivo PDA
- Incubadora

8.3 Metodología (Báez et al., 2019)

1. Tomar tres submuestras de 1 g del sustrato de arroz colonizado con la especie de hongo entomopatógeno de interés.
2. Colocar cada muestra en un tubo de ensayo con 9 ml de solución estéril de Tritón X-100 al 0.1%. La suspensión obtenida corresponde a la dilución 10-1.
3. Agitar fuertemente hasta que la muestra se disperse completamente.
4. A partir de la dilución 10-1, realizar diluciones seriadas (hasta 10-6), tomando una muestra de 1000ul y colocar en un nuevo tubo de ensayo, sucesivamente.
5. Sembrar por triplicado 100ul de las diluciones obtenidas en el medio PDA.
6. Extender la muestra en toda la superficie de las placas Petri.
7. Dejar incubar a 24°C hasta que las colonias sean visibles para su conteo de cinco a siete días.
8. Seleccionar la dilución adecuada para realizar el conteo, se recomienda que existan de 10 a 100 colonias por placa Petri.
9. Contar el número de colonias en las tres placas Petri de la dilución seleccionada (**Figura 22**).

10. Promediar el número de colonias registrado en las tres repeticiones y calcular las UFC mediante la siguiente fórmula:

UFC / g o ml = Promedio # de colonias x factor de dilución.

Se considera aceptable cuando la concentración de UFC/ g o ml es mayor a 1×10^8 .



Figura 22. *Conteo de colonias (Hidalgo, 2019).*

PROTOCOLO 9 Porcentaje de pureza

Determinar la presencia de microorganismos diferentes al hongo entomopatógeno de interés.

9.2 Materiales y equipos

- Muestra de bioformulado con el hongo entomopatógeno de interés
- Solución Tritón X-100 al 0.1 %
- Medios de cultivo para hongos y bacterias (Agar Nutritivo y PDA)
- Placas Petri
- Incubadora
- Cámara de flujo laminar
- Micropipetas de 1000ul y 100ul

Metodología (Báez et al., 2019)

1. Tomar tres submuestras de 1 g del sustrato arroz colonizado con la especie de hongo entomopatógeno de interés.
2. Colocar cada muestra en un tubo de ensayo con 9 ml de solución estéril de Tritón X-100 al 0.1 %. La suspensión obtenida corresponde a la dilución 10-1.
3. Agitar fuertemente hasta que la muestra se disperse completamente.
4. A partir de la dilución 10-1, realizar diluciones seriadas (hasta 10-6), tomando una muestra de 1000 μ l y colocar en un nuevo tubo de ensayo, sucesivamente.
5. Sembrar por triplicado 100 μ l de las diluciones obtenidas en medios de cultivo de acuerdo a lo que se quiere cuantificar (bacterias: medio agar nutritivo; hongos: medio Papa dextrosa agar).
6. Incubar a 25 °C por 48 horas para bacterias y por siete días para hongos.
7. Realizar el conteo de colonias de microorganismos contaminantes en las diluciones y aplicar la fórmula descrita para UFC en el **Protocolo 8**.
8. Expresar en porcentaje la cantidad de microorganismos contaminantes en relación al número de colonias del hongo entomopatógeno de interés.

$$\% \text{ Pureza} = (\text{UFC del hongo deseado} / \text{UFC totales}) \times 100$$

Una carga alta microbiana diferente al biocontrolador genera un efecto negativo en el tiempo de almacenamiento y pérdida de la eficiencia del producto.

Se consideran valores óptimos de pureza cuando superan al 90 %.

METODOLOGÍA PRUEBAS DE EFICACIA DE UN PRODUCTO CON BASE EN HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

PROTOCOLO 10 Bioensayos para determinación de eficacia

Evaluar la eficacia de un producto formulado con base en hongos entomopatógenos para su selección y recomendación de uso.

10.2 Materiales y equipos

- Muestra de bioformulado
- Tween 20
- Agua esterilizada
- Sustrato
- Envases plásticos
- Cría de insectos plaga
- Incubadora

10.3 Metodología

1. Pesarse un gramo de bioformulado con el hongo entomopatógeno de interés.
2. A 9 ml de agua agregar tween 20 y agitar.
3. Determinar la concentración de esporas o conidias, utilizando la metodología descrita en el **Protocolo 7**.
4. Preparar diferentes dosis del producto a evaluar (alta, media y baja); como control se utilizará agua esterilizada.
5. Inocular con las diferentes dosis los sustratos a utilizarse para las pruebas, en el esquema de la **(Figura 23)**, se detallan los pasos a seguir; de acuerdo a la metodología por inmersión **(Figura 24)** o por uso de un sustrato alimenticio.
6. Preparar los recipientes con los insectos criados en laboratorio (unidad experimental).

7. Colocar 15 insectos adultos en cada recipiente de cría (etiquetar con la respectiva dosis). En caso de emplear insectos inmaduros para el bioensayo; use al menos 30 insectos por dosis.

8. Colocar las unidades experimentales con los insectos y sus respectivos tratamientos en la incubadora (25-28° C, 80% H.R.).

9. El registro de datos se realizará a las 24 horas después de la inoculación de insectos, se elimina todos los insectos muertos y recién mudados (blancos).

10. Examinar los envases con insectos y removerlos diariamente.

11. Registre diariamente la cantidad de insectos vivos en cada envase y expresar en porcentaje.

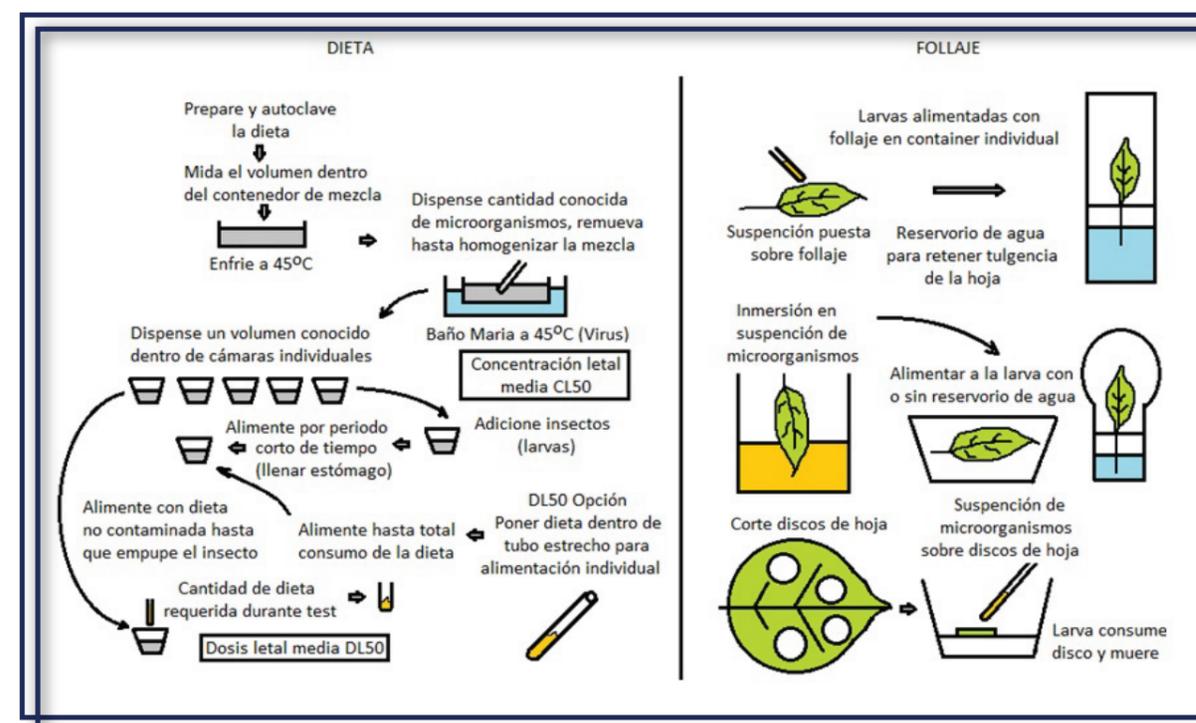


Figura 23. Inoculación al sustrato (modificado de Lacey et al., 1997).

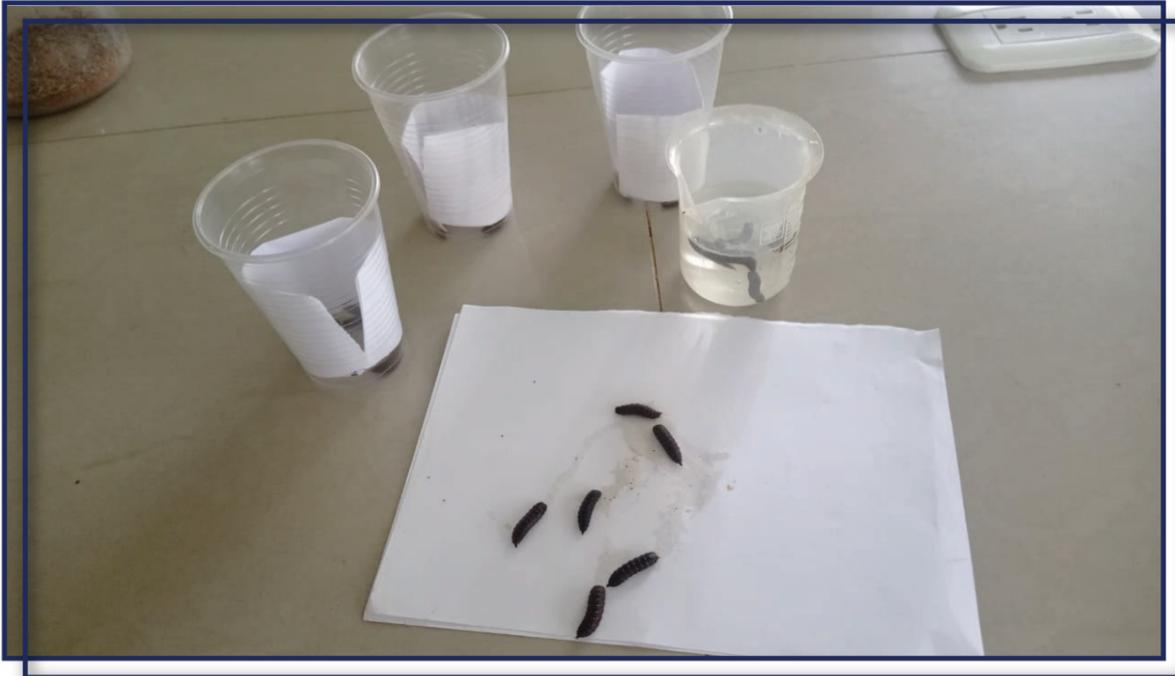


Figura 24. Inoculación al insecto por inmersión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. N. (2002). *Fitopatología*. Uteha-Noriega. p 287. Obtenido de: <https://bit.ly/3bHjn10>
- Ames de Icochea, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. International Potato Center. Obtenido de: <https://bit.ly/2FgeN7d>
- Báez, F., Perdomo, C., Pincay, A., Tello, C., Villamizar, L., Trevor, J., Jaronski, S., y Viera, W. (2019). *Manual para el análisis de calidad de formulaciones de hongos benéficos*. Manual N° 112. INIAP - Estación Experimental Santa Catalina. Mejía - Ecuador. 45 p. Obtenido de: <https://bit.ly/3Fleu5z>
- Bonilla Acebo, P. F. (2016). *Aplicación del convenio de Estocolmo: caso en el Ecuador. Tesis de grado obtenida no publicada*. Guayaquil - Ecuador. Obtenido de: <https://bit.ly/2YQ9sOM>
- Chase, A., Osborne, L., y Ferguson V. (1986). *Selective isolation of the entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae from an artificial potting medium*. Florida - EEUU. p 285-292. Obtenido de: <https://bit.ly/3BhMmih>
- Contreras, L. y Bustillos, L. (2019). *Caracterización morfológica de cepas de hongos entomopatógenos de Beauveria bassiana, Cordyceps spp., Metarhizium spp. y Purpureocillium lilacinum*. Bucaramanga - Colombia. Obtenido de: <https://bit.ly/312neLO>
- Domínguez, E. (2019, 9 octubre). *Manual de Prácticas de Microbiología* - Universidad Miguel Hernández. El Solucionario. Recuperado 12 de julio de 2022, de <https://www.elsolucionario.org/manual-de-practicas-de-microbiologia-universidad-miguel-hernandez/>
- Espinel, C., Torres, L., Villamizar, L., Bustillo, A., Zuluaga, M., y Cotes, A. (2018). *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. Capítulo 6. Hongos entomopatógenos para el control biológico de insectos plaga*. Mosquera - Colombia. Obtenido de: <https://bit.ly/3o5dCcn>
- Gómez, M., Alarcón, A., León, M., Oehlschlager, C., y Solórzano, L. (2018). *Comercialización de agentes de control biológico. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros, 2nd ed.* Mosquera, Colombia. p 762-793. Obtenido de: <https://bit.ly/3o6vYJO>

- Hidalgo, D. (2019). **Desarrollo de una metodología de peletización para *Beauveria bassiana* con insumos peruanos. Tesis de grado obtenida no publicada. Universidad Nacional Agraria “La Molina” (UNALM).** Lima – Perú.
Obtenido de: <https://bit.ly/2TAmpXTINTAIN>
- INTA, (2016). **Trampas para el control de plagas en los cultivos.**
Obtenido de: <https://bit.ly/3sOhBha>
- Lacey, L. A. (Ed.). (1997). Manual of techniques in insect pathology. California – EEUU. Academic Press. Pag 40. Obtenido de: <https://bit.ly/2VAMCGH>
- Morón, C. (2001). **Importancia del Codex Alimentarius en la seguridad alimentaria y el comercio de alimentos.** Revista Salud Pública y Nutrición, 2(3).
Obtenido de: <https://bit.ly/3c0Bk5S>
- Pereira, P. G., y Mora, J. M. (2004). **Guía para la producción de *Metarhizium anisopliae*. CINCAE,** Guayas, Ecuador.
Obtenido de: <https://bit.ly/2XTDbBi>
- Rodríguez-Hidalgo, R., Pérez-Otañez, X., Garcés, S., Vanwambeke, S. O., y Madder, M. (2018). **Estado actual de la resistencia a alfa-cipermetrina, ivermectina y amitraz de la garrapata del ganado bovino (*Rhipicephalus microplus*) en Ecuador.**
Obtenido de: <https://bit.ly/3dd7g5M>
- Salvador B. y Vega L. (2013). **Manual de prácticas de laboratorio de Bacteriología y Micología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.** Toluca - México.
Obtenido de: <https://bit.ly/3qIUuT7>
- Sarduy, N. L., Roque, I. Á., Fernández, T. M. L., Ruiz, H. P., Andreu, M. E. G., Padrón, H. D., y Lafargue, B. L. F. (2011). **Guía para el control y seguimiento de la salud en los trabajadores de los centros de reproducción de entomófagos y entomopatógenos.** Revista Cubana de Salud y Trabajo, 12 (3), 64-70.
Obtenido de: <https://bit.ly/2CfP4rS>
- Villa M., Meneses M., y Sosa M. (2012). **Manual de prácticas de laboratorio, Asignatura: Bacteriología y micología.** Benemerita Universidad Autónoma de Puebla.
Obtenido de: <https://bit.ly/3iC1qi8>



@agroinvestigacionecuador



@iniapecuador



@iniapecuador

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias



República
del Ecuador