

INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGIA

INFORME DE PRACTICA DE ESPECIALIDAD

**CONTROL DE CALIDAD EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS Y ANTAGONISTAS MEDIANTE FERMENTACIÓN EN
SUSTRATO SÓLIDO**

William Rivera Méndez

CARTAGO, 2002

INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGIA

INFORME DE PRACTICA DE ESPECIALIDAD

**CONTROL DE CALIDAD EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS Y ANTAGONISTAS MEDIANTE FERMENTACIÓN EN
SUSTRATO SÓLIDO**

William Rivera Méndez

CARTAGO, 2002

CONTROL DE CALIDAD EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y ANTAGONISTAS MEDIANTE FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO

William Rivera Méndez*

RESUMEN

Ante la problemática de la contaminación y los riesgos a la salud ocasionados por el uso irracional de pesticidas surgió la opción del control biológico de plagas como sistema de producción sano y ecológicamente equilibrado. La gran demanda de productos orgánicos ha provocado la llegada de productos de control orgánico. En nuestro país el Instituto Nacional de Aprendizaje ha desarrollado una serie de productos de este tipo y se ha iniciado un proceso de control de calidad de los mismos. El objetivo fundamental de este proceso es aplicar normas internacionales de calidad de bioproductos producidos por fermentación en sustrato sólido, con el fin de brindar un producto a los capacitados del Instituto y al productor en general. Para esto se ha realizado una revisión del proceso de producción, así como pruebas de concentración, pureza, efectividad y germinación *in vitro*. Los resultados obtenidos en todas las pruebas confirman la alta calidad de estos productos y los colocan en un nivel semejante a los producidos en países potencias del control biológico como Cuba, Colombia, Australia, España, Alemania y Ucrania. Este trabajo es considerado un primer paso de estandarización de métodos y estándares con el fin de desarrollar la implementación a corto plazo de un sistema de calidad que permita la certificación del laboratorio.

Palabras clave: control biológico, control de calidad, bioproductos, microorganismos, hongos, entomopatógeno, antagonista.

- Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 1999.

CONTROL OF QUALITY IN THE PROCESS OF PRODUCTION OF ENTOMOPATOGENIC AND ANTAGONISTIC FUNGI BY MEANS OF FERMENTATION IN SOLID SUSTRATE

William Rivera Méndez *

ABSTRACT

In the face of the problem of the contamination and the risks to the health caused by the irrational use of pesticides the option of the biological control of plagues arose as healthy and ecologically balanced production system. The great demand of organic products has caused the arrival of products of organic control. In our country the National Institute of Learning (INA) has developed a series of products of this type and a process of control of quality of the same ones has begun. The fundamental objective of this process is to apply international norms of bioproductos quality taken place by fermentation in solid substrate, with the purpose of offering a product to those qualified of the Institute and to the producer in general. For this has been carried out a revision of the production process, as well as concentration tests, purity, effectiveness and germination in vitro. The results obtained in all the tests confirm the high quality of these products and they place them in a level similar to those taken place in countries powers of the biological control as Cuba, Colombia, Australia, Spain, Germany and Ukraine. This work is considered a first step of standardization of methods and standard with the purpose of developing the short term implementation of a system of quality that allows the certification of the laboratory.

Keywords: biological control, control of quality, bioproducts, fungi, entomopathogenic, antagonic.

Inform of Practice of Specialty, School of Biology, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. 1999.

**CONTROL DE CALIDAD EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HONGOS
ENTOMOPATÓGENOS Y ANTAGONISTAS MEDIANTE FERMENTACIÓN EN
SUSTRATO SÓLIDO**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**Ph.D. Edwin Canessa Amador
Profesor Guía**

**Ph.D. Miguel Obregón G.,
Lector**

**Lic. Jaime Brenes Madriz
Lector**

DEDICATORIA

A Dios que me ha dado todo, a mi familia y a Gaby por su apoyo durante mis estudios.

William

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a las siguientes Instituciones y personas, por sus valiosos aportes en el presente trabajo:

Al Instituto Nacional de Aprendizaje, por las facilidades brindadas en la realización de la práctica.

Al señor Claudio Orozco por su amistad y consejos durante mi asistencia al laboratorio.

Al Dr. Miguel Obregón por ser más que un asesor y maestro.

A los miembros del Tribunal evaluador, por su valiosa guía, y muy especialmente al Dr. Edwin Canessa, profesor consejero, por su dedicación y aportes.

INDICE GENERAL

Resumen	III
Dedicatoria	V
Agradecimientos	VI
Indice general	VII
Indice de cuadros	VIII
Indice de figuras	IX
Introducción	1
Objetivos	3
Revisión de literatura	4
Cuestionamientos a la revolución verde	4
Control químico	5
Control biológico	11
El INA y los bioproductos	12
Control de calidad de productos biológicos	16
MATERIALES Y METODOS	18
Localización de la práctica	18
Revisión y optimización del diagrama de flujo	18
Evaluación de la concentración	18
Evaluación de la pureza	20
Evaluación de la germinación	22
Pruebas de eficacia de hongos entomopatógenos	22
Pruebas de eficacia del antagonista <i>Trichoderma</i> spp	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA	76

INDICE DE CUADROS

Num.	Título	Pag.
1	Desarrollo temporal y clasificación de los plaguicidas.	6
2	Importación total de agroquímicos en Costa Rica de 1991 a 1998.	7
3	Intoxicaciones reportadas por plaguicidas en Costa Rica: 1987-1999.	8
4	Resultado de conteos para <i>Beauveria bassiana</i> Balls (Vuill).	27
5	Resultado de conteos para <i>Verticillium lecanii</i> (Zimm).	27
6	Resultado de conteos para <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom).	28
7	Resultado de conteos para <i>Metarhizium anisopliae</i> (Sorok).	28
8	Resultado de conteos para <i>Trichoderma</i> spp.	28
9	Medición del largo y ancho de los conidios de <i>Paecilomyces lilacinus</i> .	29
10	Medición del largo y ancho de los conidios de <i>Beauveria bassiana</i> .	29
11	Medición del largo y ancho de los conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	30
12	Medición del largo y ancho de los conidios de <i>Verticillium lecanii</i> .	30
13	Resultado de las pruebas de pureza de los productos fúngicos.	31
14	Porcentaje de germinación de los conidios de los hongos a las 24 horas de incubación.	32
15	Porcentaje de parasitación de <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre <i>Sitophilus oryzae</i> .	33
16	Porcentaje de parasitación de <i>Verticillium lecanii</i> sobre áfidos de la rosa.	34
17	Porcentaje de parasitación de <i>B. bassiana</i> sobre <i>Sitophilus oryzae</i>	35
18	Porcentaje de parasitación de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sobre <i>Trichoderma</i> sp.	36
19	Medición del crecimiento en centímetros del frente de expansión de los hongos probados en el ensayo.	37

INDICE DE FIGURAS

Num.	Título	Pag.
1	Persistencia de los plaguicidas dentro de los ecosistemas	11
2	Muestra de una división (1/16) de un cuadrante esquinero de la cámara	19
3	Cámara húmeda preparada para las pruebas con <i>M. anisopliae</i> y <i>B. bassiana</i>	23
4	Diagrama de flujo de la producción de hongos para combate biológico	26
5	Muestras de las pruebas de pureza sobre <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	31
6	Comportamiento gráfico de las relaciones de mortalidad y parasitación de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>Sitophilus oryzae</i> (L)	33
7	Comportamiento gráfico de las relaciones de mortalidad y parasitación de <i>Verticillium lecanii</i> sobre el áfido de la rosa	34
8	Comportamiento gráfico de las relaciones de mortalidad y parasitación de <i>Beauveria bassiana</i> sobre <i>Sitophilus oryzae</i>	35
9	Relaciones de mortalidad y parasitación de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sobre <i>Trichodorus sp</i>	36
10	Conidios del hongo <i>P. lilacinus</i> observadas a 40 x en el microscopio de luz	43
11	Conidios del hongo <i>Beauveria bassiana</i> observadas a 40 x en el microscopio de luz	44
12	Conidios del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> observadas a 40 x en el microscopio de luz	46
13	Conidios del hongo <i>Verticillium lecanii</i> observadas a 40 x en el microscopio de luz	47
14	Conidios del hongo <i>Trichoderma sp</i> observadas a 40 x en el microscopio de luz	48
15	Germinación de conidios de <i>V. lecanii</i> a las 24 horas	53
16	Germinación de conidios de <i>P. lilacinus</i> (A) y <i>B. bassiana</i> (B) a las 24 horas	54
17	Germinación de conidios de <i>Trichoderma sp</i> a las 24 horas	54
18	Gorgojo parasitado y no parasitado por <i>M. anisopliae</i>	57
19	Insecto parasitado y no parasitado por <i>Verticillium lecanii</i>	59
20	Insecto parasitado y no parasitado por <i>B. bassiana</i>	61
21	<i>Trichodorus sp</i> parasitado por <i>Paecilomyces lilacinus</i>	63
22	Inhibición del crecimiento del micelio de los hongos por <i>Trichoderma spp</i>	66
23	Estructura simplificada de la proteína exoglucanasa CBHI de <i>T. reesei</i>	70
24	Túnel tridimensional en el dominio catalítico de la CBHI	71
25	Esquema de la acción de las glucosidasas sobre cadenas de celulosa	72

INTRODUCCION

La revolución verde trajo consigo muchos progresos en la producción agrícola logrando convertirse en un freno de las hambrunas en muchas partes del mundo; no obstante también provocó impactos negativos, en especial a la salud humana y al equilibrio de los ecosistemas.

De esta manera nace el control biológico como una alternativa de producción amigable con el ambiente y con la salud humana. Si bien para igualar los rendimientos obtenidos con el control químico hace falta todavía mucha investigación, se ha logrado avances impresionantes en especial en el campo de la agroecología y el manejo de la microfauna.

Con la ampliación del mercado para los productos agrícolas orgánicos y con los precios más atractivos que estos adquieren en países desarrollados ha surgido un enorme interés por desarrollar insumos de control biológico que sean efectivos y no presenten problema a los productores que deseen certificar sus fincas como “orgánicas”. Inspirados por el afán comercial una gran variedad de compañías nuevas y tradicionales del mercado internacional de pesticidas han logrado ofrecer algunos productos de este tipo y se encuentran en la fase de investigación de otros más.

En nuestro país algunas instituciones o empresas han intervenido con éxito en la difusión de estas nuevas tecnologías orgánicas, y INA, específicamente en el Laboratorio de Fitoprotección del Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica se ha dado a la tarea de capacitar productores en la elaboración y manejo de estos biopesticidas.

Con el fin de asegurar una buena calidad en sus productos y llevar a cabo un eficiente programa de transferencia tecnológica el INA ha introducido sus productos a controles de calidad comparables a los realizados en distintas partes del mundo. No obstante hasta el momento en el país no se han establecido ni registrado metodologías concretas y detalladas que conlleven a un eficiente proceso de control de calidad de este tipo de nuevos productos.

El presente informe detalla los aspectos técnicos, tecnológicos y científicos de las pruebas de calidad más importantes y significativas realizadas a nivel de laboratorio en países líderes en cuanto a producción orgánica adaptadas a las condiciones y necesidades de nuestro país, a saber; pruebas de concentración, pureza, viabilidad y efectividad *in vitro*. Todo esto con miras de optimizar metodologías y procedimientos, además de establecer estándares y patrones de comparación definidos. Todo lo anterior permitirá realizar a futuro una implementación de herramientas de calidad que permitan obtener la certificación del laboratorio y continuar en la vanguardia en educación técnica y tecnológica que hasta el momento el INA ha desarrollado.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Aplicar variables y estándares internacionales en la producción de bioproductos para controlar la calidad de la producción de hongos entomopatógenos y antagonistas fabricados mediante fermentación en sustrato sólido en el Laboratorio de Fitoprotección del INA.

Objetivos específicos:

- 1- Optimizar el diagrama de flujo del proceso de producción de hongos entomopatógenos y antagonistas, en el Laboratorio de Fitoprotección del INA en la Chinchilla de Cartago.
- 2- Determinar la pureza del producto final mediante pruebas de caracterización morfológica del hongo y de posibles contaminantes.
- 3- Estimar la concentración del microorganismo en el producto final mediante conteos de conidios con el hematocimetro.
- 4- Determinar la viabilidad de los hongos en el producto final a través de pruebas de germinación y resistencia *in vitro*.
- 5- Evaluar la eficacia del producto microbiano terminado examinando factores como la mortalidad, la parasitación y la relación mortalidad – parasitación, a través de pruebas *in vitro* para entomopatógenos y para el hongo antagonistas.

1-REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 CUESTIONAMIENTOS A LA REVOLUCIÓN VERDE

La agricultura, técnica sobre la que se ha asentado el desarrollo de las civilizaciones y la supervivencia de la humanidad, nos plantea ahora el enorme reto de poder brindarle el sustento a la creciente población mundial y a la vez disminuir los impactos ambientales negativos y los efectos a la salud humana.

Ese reto a logrado orientar el quehacer humano en la búsqueda de métodos más eficientes de producción, aumentando los rendimientos y protegiendo los cultivos. No obstante se han descuidado otros factores que han resultado enormemente perjudicados por las técnicas desarrolladas. Testimonio de esto lo constituye la degradación del ambiente a causa del empleo de químicos de gran potencial destructivo y contaminante, y los daños irreparables en la salud de los trabajadores y personas que se han puesto en contacto con estos pesticidas.

La revolución verde impulsada en la década de los sesentas fue uno de los procesos por los cuales se trató de acelerar el crecimiento del sector agrícola en todo el mundo. Bajo esa terminología se notó un progreso en los rendimiento de los cultivos alimenticios de mayor importancia a nivel mundial, en especial del arroz, trigo y maíz (FAO, 2000). Los rendimientos alcanzados en países como los asiáticos ayudaron a su población a lograr la autosuficiencia alimentaria y los convirtió en base a los excedentes de producción en exportadores de alimentos y materia prima.

Este proceso se caracterizó por la introducción en los campos de cultivo de variedades muy homogéneas y mejoradas en forma de semillas, de instrumentos mecanizados de siembra y recolección de cosechas, así como de preparación de los terrenos.

Otra de las principales características de dicho movimiento fue el uso intensivo de compuestos químicos en forma de pesticidas y fertilizantes que lograban proteger los productos en sus desequilibrados ecosistemas de monocultivo (Guardina, 1989).

Los alcances reales de la revolución verde son muy cuestionados y actualmente se plantea la inquietud de cuan favorable resultó en relación a cuantos problemas pretendió resolver y cuantos problemas ha generado (Altieri, 2001). Dentro de sus alcances se puede mencionar el que durante los últimos 50 años de producción agrícola los rendimientos promedio a nivel mundial han sido 1,6 veces mayores que los rendimientos obtenidos hasta 1950 (FAO, 2000). Además se logró evitar y reducir hasta cierto punto las hambrunas originadas por la Segunda Guerra Mundial y las catástrofes naturales. La revolución verde ofreció las primeras luces a la humanidad de que el hambre en el mundo es un proceso que se puede detener y que tiene su origen en la distribución y disponibilidad de alimentos y no tanto en la cantidad de alimento producido (FAO, 2000 y Altieri, 2001).

Pese a las soluciones que brindó la revolución verde; se deben destacar una serie de factores originados por esta que han resultado en impactos negativos para el planeta. Entre dichos factores se pueden mencionar la resistencia desarrollada por insectos y microorganismos contra los agroquímicos, el daño de los pesticidas al medio ambiente y a la salud humana y animal, uso indiscriminado de las fuentes de agua, erosión genética en los principales cultivos mundiales a causa de la mejora de variedades y abandono por parte de los agricultores de variedades nativas, mayor empobrecimiento en las zonas del mundo en que la revolución no pudo ser implantada, dependencia a la fertilización química, erosión del suelo y una baja sensible en la cantidad de materia orgánica del suelo. Los ecosistemas agrícolas, hasta 1950 caracterizados como diversos, pasaron a ser en mayoría monocultivos de frágil base ecológica a merced de plagas, enfermedades y malezas. Los daños provocados por los plaguicidas explican la importancia del control biológico

1.2 CONTROL QUÍMICO

1.2.1 GENERALIDADES DE LOS PLAGUICIDAS

Los pesticidas o plaguicidas son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de plagas. El uso de pesticidas se masificó a partir de la segunda guerra mundial y está estrechamente vinculado con los cambios introducidos en los modelos de producción y cultivo que duplicaron la productividad de la agricultura respecto al resto de la economía. Los plaguicidas por sí solos son responsables de al menos el 30% de ese aumento de producción. El primer plaguicida utilizado en los años '40, el DDT, fue presentado al mundo como la solución para todas las plagas. Su facilidad de obtención y aplicación, la rapidéz de sus resultados y su costo reducido extendieron rápidamente su uso indiscriminado, sin sospechar los efectos negativos sobre los seres vivos y el ambiente (UNA, 1999).

A nivel doméstico y para el control de insectos se ha extendido el uso de los piretroides, derivados sintéticos de un insecticida natural extraído del crisantemo. Actualmente, además de los insecticidas, integran los plaguicidas compuestos de acciones muy variadas, como los herbicidas, funguicidas, rodenticidas y reguladores de crecimiento, entre otros.

Aunque resulta innegable que los pesticidas han beneficiado la producción agrícola y el combate de enfermedades humanas y animales, como la malaria, la fiebre amarilla, el dengue y numerosas parasitosis externas e internas, el uso continuo y desaprensivo de agrotóxicos y la ausencia de normas efectivas de prevención, determinaron la aparición de problemas que inciden sobre la salud humana y la supervivencia de numerosas especies. Hoy en día la enorme variedad de estos compuestos puede ser resumida a manera de cronología en el siguiente cuadro:

Tabla 1. *Desarrollo temporal y clasificación de los plaguicidas.

Período	Tipo de compuesto	Fuente	Características
1800-1920	Primeros plaguicidas orgánicos, nitrofenoles, clorofenoles, creosota, naftaleno, aceites de petróleo	Química orgánica, productos derivados de la elaboración de gas de carbón, etc.	Con frecuencia, carecen de especificidad y eran tóxicos
1945-1955	Productos orgánicos clorados, DDT, HCCH, ciclodien. Clorados	Síntesis orgánica	Persistentes, buena selectividad, buenas propiedades agrícolas, resistencia, efectos ecológicos nocivos
1945-1970	Inhibidores de la colinesterasa, compuestos organofosforados, carbamatos	Síntesis orgánica, buena utilización de las relaciones estructura-actividad	Menor persistencia, cierta toxicidad para el usuario, algunos problemas ambientales
1970-85	Piretroides sintéticos, avermectinas, imitaciones de las hormonas juveniles, plaguicidas biológicos	Perfeccionamiento de las relaciones estructura-actividad, nuevos sistemas de selección de objetivos	Cierta falta de selectividad, resistencia, costos y persistencia variable
1985-	Organismos obtenidos por la ingeniería genética	Transferencia de genes para plaguicidas biológicos a otros organismos y a plantas y animales beneficiosos. Alteración genética de las plantas	Posibles problemas con mutaciones y fugas, perturbación de la ecología microbológica, monopolio de los productos

Microsoft Word

*Fuente: Stephenson y Solomon, 1993. Tomado de www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm

1.2.2 CONSUMO EXAGERADO DE AGROQUÍMICOS

Según estimaciones realizadas por la FAO en la década de 1950 se usaron en todo el mundo un total de 17 millones de toneladas de fertilizante, pero en la década de los 90's esta cifra se incrementó ocho veces. Además se tiene en la actualidad un total de 80 compuestos activos para los insecticidas, 100 en los funguicidas y 150 en los herbicidas que son mezclados para formular una enorme cantidad de productos comerciales que varían en su nivel toxicológico (FAO, 2000).

En nuestro país el consumo de agroquímicos ha experimentado una tendencia que en forma general se puede resumir como ascendente, con lo cual los efectos secundarios que estos producen también se han visto aumentados. El aumento en el uso de estas sustancias tiene varias causas entre las que sobresalen la expansión de tierras dedicadas a monocultivos de diferentes especies de palma aceitera, banano, café, palmito, flores, piña, y otra gran variedad de productos agrícolas que se destinan al mercado nacional e internacional (Auge, 1976).

Otras causas importantes son las aplicaciones innecesarias cuando los niveles de la plaga son controlables por el mismo ecosistema, aplicaciones fuera de tiempo, dosis mayores a las recomendadas en un área menor a la recomendada, y aplicaciones bajo condiciones climáticas no adecuadas (Salmeron, 1977). En el siguiente cuadro se ilustran las importaciones totales de agroquímicos hasta 1998.

Tabla 2. Importación total de agroquímicos en Costa Rica (en miles de kilogramos y litros) entre 1991 a 1998.

AÑO	PLAGUICIDAS	FERTILIZANTES	OTROS
1991	6.438,5	267.271,1	330,2
1992	10.291,5	285.079,6	499,5
1993	13.770,4	298.467,6	72.491,6
1994	10.139,8	235.908,6	191.363,1
1995	32.392,1	364.175,5	112.744,5
1996	60.886,1	458.149,5	24.312,9
1997	132.130,0	534.544,2	9.821,0
1998	25.939,4	407.224,9	19.842,6

Microsoft Word

*FUENTE: 1991: Información suministrada por la Cámara de Insumos Agropecuarios, con base en datos de la Cámara de Insumos Agropecuarios y la Dirección de Sanidad Vegetal del Ministerio de Agricultura y Ganadería.
1992-1998: Información suministrada por la Cámara de Insumos Agropecuarios, a partir de la base de datos de Ventanilla Única de COMEX.

1.3 EFECTOS DEL USO DE AGROQUÍMICOS

1.3.1 EFECTOS EN LA SALUD HUMANA

Simultáneamente con el aumento del uso de plaguicidas, crecieron significativamente los accidentes y enfermedades asociadas. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas. De ese total, las 3/4 partes de afectados pertenecen a los países subdesarrollados, donde únicamente se utiliza el 25% de la producción mundial de plaguicidas (OliveraBravo, 2000).

El contacto con pesticidas y su entrada al organismo -a través de la piel, la respiración y/o por ingestión- se produce por exposición laboral y en el hogar debido a usos y aplicaciones incorrectos, falta de medidas preventivas y de protección, almacenamiento inadecuado, reutilización de envases (comederos de animales, almacenamiento y traslado de agua) y fumigaciones aéreas. Según las estadísticas oficiales manejadas por el Ministerio de Salud el número de intoxicaciones por pesticidas en nuestro país aumenta en forma general año tras año, esto se pone en evidencia al observar el comportamiento de las intoxicaciones desde 1987, hasta 1999 (Ministerio de Salud, 1993).

Tabla 3. *Intoxicaciones reportadas por plaguicidas en Costa Rica: 1987- 1999.

Año	Número de intoxicaciones
1987	193
1988	346
1989	267
1990	321
1991	335
1992	489
1993	526
1994	670
1995	1130
1996	694
1997	920
1998	n.d.
1999	633

Microsoft Word

*Fuente: Ministerio de Salud. Departamento de Estadísticas. 1993.

Los efectos indeseados producidos dependen del pesticida, la dosis, la vía y el tiempo de exposición. Los efectos agudos (vómitos, diarrea, aborto, cefalea, somnolencia, alteraciones del comportamiento, convulsiones, coma, muerte) están asociados a accidentes donde una única dosis alta es suficiente para provocar los efectos que se manifiestan tempranamente. Los crónicos (cánceres, leucemia, necrosis de hígado, malformaciones congénitas, neuropatías periféricas, a veces solo malestar general, cefaleas persistentes, dolores vagos) se deben a exposiciones repetidas y los síntomas o signos aparecen luego de un largo tiempo (hasta años) de contacto con el pesticida, dificultando su detección. Dado que su biotransformación es muy lenta, los pesticidas provocan efectos acumulativos en las personas expuestas.

Según la Conferencia Internacional Sobre el Uso de Pesticidas en Países en Desarrollo realizada en 1998, en todo el mundo se ha reportado un aumento de enfermedades ligadas al uso inadecuado y excesivo de plaguicidas para proteger los cultivos base de la economía de cada uno de los países mencionados. Se reportaron entre otros daños los siguientes: enfermedades neurológicas de diferente índole, cáncer de pulmón, de colon, de estómago, cáncer gástrico, ulceraciones en la piel, esterilidad, intoxicaciones mortales, cardiopatías, derrames cerebrales, cáncer de esófago, hipertensión arterial, etc. El rango de daños reportados corre por todo el orbe, pero los problemas se acentúan en África, Asia y América Latina, donde el subdesarrollo tiene su cuna. No obstante en los países desarrollados los efectos no se han dejado de sentir y la preocupación por los efectos de los agroquímicos no es menos importante.

1.3.2 EFECTOS ECOLÓGICOS DE LOS PLAGUICIDAS

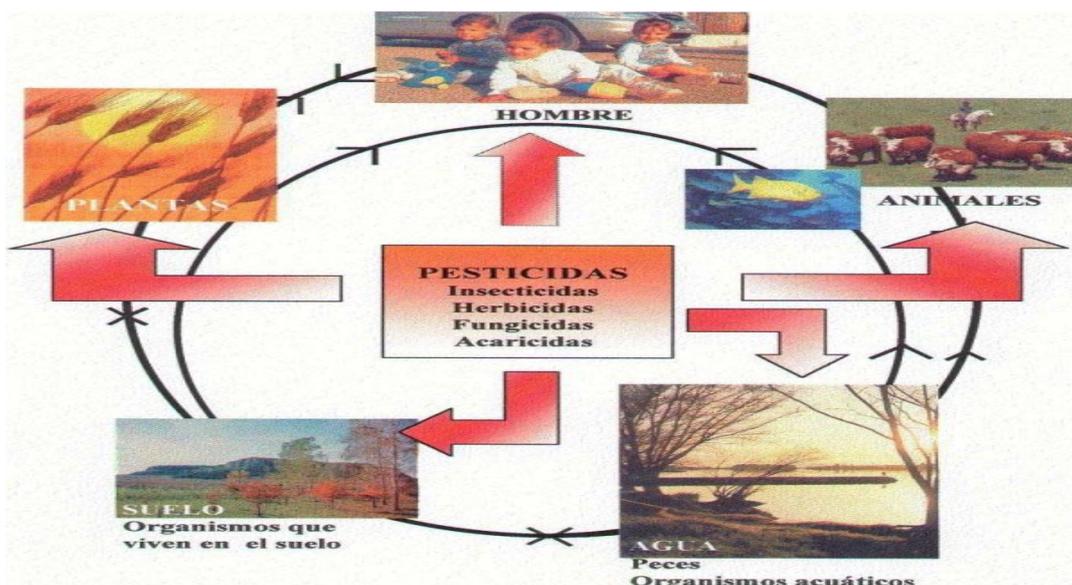
Aunque los pesticidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos indeseados como la generación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de recursos hídricos, con degradación de la flora y fauna. Al aparecer resistencia en la especie a combatir se requiere el incremento de las cantidades necesarias de pesticida o la sustitución por agentes más tóxicos para lograr controles efectivos. Los organoclorados son un ejemplo de persistencia ambiental pues permanecen en los suelos sin degradación significativa hasta 30 años después de aplicados.

Esa permanencia favorece la incorporación a las cadenas tróficas y la acumulación en los tejidos grasos humanos y animales. Aunque los organoclorados se utilizan escasamente desde los años 80, en nuestro país aún se detectan sus residuos en tejidos vivos. Asimismo, la aplicación sistemática de plaguicidas altera los equilibrios existentes en las cadenas tróficas normales al causar la desaparición o disminución de los enemigos naturales de distintas plagas, de descomponedores de materia orgánica, de incorporadores de nitrógeno y de otras especies vitales para el ambiente como por ejemplo los polinizadores. Además de destruir recursos genéticos y farmacológicos conocidos y otros aún no descubiertos, el empobrecimiento de la biodiversidad puede conducir a la proliferación de las especies antagónicas de aquellas extinguidas, provocando nuevos desequilibrios ecológicos y nuevas plagas. Un efecto adverso adicional proviene de los envases y contenedores vacíos. Pese a que en nuestro país existen normativas para su eliminación como el triple lavado entre otras, frecuentemente se realiza la incineración a cielo abierto sin tener en cuenta que algunos productos al ser expuestos al calor desprenden dioxinas cuya toxicidad es ampliamente mayor que el agrotóxico original. Los factores mencionados forman un ciclo cerrado que se retroalimenta y refuerza profundizando los efectos adversos.

Aunque los plaguicidas tienen sin duda efectos en la superficie terrestre, el principal daño es la contaminación del agua por la escorrentía de los plaguicidas. Los efectos ecológicos de los plaguicidas (y otros contaminantes orgánicos) son muy variados y están con frecuencia interrelacionados. Se considera que los efectos producidos en los organismos y en el medio ambiente constituyen una advertencia de las posibles repercusiones en la salud humana. Los principales tipos de efectos son los que se enumeran a continuación y varían según el organismo sometido a investigación y el tipo de plaguicida. Los distintos plaguicidas provocan efectos muy diferentes en la vida acuática, por lo que es difícil formular afirmaciones de alcance general. Los efectos ecológicos de los plaguicidas van más allá de los organismos individuales y pueden afectar a los ecosistemas.

Jonsson y colaboradores (citado por Olivera Bravo, 2000) informan que el continuado descenso de la población de perdices suecas está vinculada a los cambios en el aprovechamiento de la tierra y a la utilización de medios químicos de lucha contra las malas hierbas. Estos últimos tienen el efecto de reducir el hábitat, disminuir el número de especies de malas hierbas y desplazar el equilibrio de especies en la comunidad vegetal. Los estudios realizados en Suecia revelan también la influencia de los plaguicidas en la fertilidad de los suelos, incluyendo la inhibición de la nitrificación con la consiguiente merma de la fijación de oxígeno por las plantas (www.fao.org). En esos estudios se indica también que los plaguicidas influyen negativamente en los microorganismos del suelo que son causantes de la degradación microbiana de la materia vegetal (y de algunos plaguicidas) y de la estructura del suelo. Los plaguicidas se incluyen en una gran variedad de microcontaminantes orgánicos que tienen efectos ecológicos. Las distintas categorías de plaguicidas tienen diferentes tipos de repercusión en los organismos vivos, por lo que es difícil hacer afirmaciones generales.

El uso de plaguicidas y su introducción dentro de los ecosistemas a través de las cadenas tróficas logra completar un ciclo que pone en riesgo el delicado equilibrio del máximo ecosistema: la biosfera entera. Estas alteraciones y su ciclo dentro de los ecosistemas es evidenciada en la siguiente figura tomada de Olivera Bravo (2000).



Microsoft Power Point

Figura 1. Persistencia de los plaguicidas dentro de los ecosistemas.

1.4 CONTROL BIOLÓGICO

Dadas las repercusiones que han producido los pesticidas, mucha gente alrededor del mundo se ha encaminado hacia una búsqueda de opciones para la agricultura ambientalmente sostenibles y humanamente saludables, sin olvidar la protección de los cultivos y la tarea de aumentar los rendimientos de producción para un futuro.

Dentro de las opciones presentadas con este fin sobresalen el uso de organismos transgénicos y los avances en el control biológico de manera individual o como parte de una estrategia del control integrado de plagas (CATIE, 1989). No obstante que la tecnología ha permitido poner en boga el tema de los productos transgénicos la verdad es que ante los ojos de los consumidores y de muchos investigadores estos productos no han demostrado su seguridad y los rendimientos asombrosos que las compañías impulsoras de estos productos prometieron (Altieri, 2001). La controversia generada ha permitido volver a colocar al frente de la investigación los conocimientos de control biológico y el uso de microorganismos dentro de este como parte de una estrategia sana de producción y protección vegetal (CATIE, 1989).

1.5 EL INA Y LOS BIOPRODUCTOS

Como parte de ese interés en la investigación de soluciones agroecológicas a los problemas de plagas y enfermedades de los cultivos el INA en su Unidad Especializada en Agricultura Orgánica construyó un Laboratorio de Fitoprotección para solventar la problemática de la falta de información para agricultores y productores orgánicos (Obregón, 2002).

Actualmente el laboratorio como parte de sus programa de transferencia tecnológica brinda 6 productos a base de hongos y 2 a base de bacterias. Los productos fúngicos se encuentran clasificados como antagonistas o como entomopatógenos. Los hongos antagonistas son aquellos que presentan reacciones de ataque contra otros hongos patógenos de vegetales (Obregón, 2002). Los hongos entomopatógenos son los que atacan insectos plagas y logran su muerte a través de enfermedades en el sistema nervioso por la producción de toxinas y el crecimiento del hongo dentro del cuerpo del insecto (Acuña, 1998).

No obstante los buenos resultados que se han logrado con la aplicación de estos productos, en nuestro país no existen parámetros de producción que sean controlados para asegurar la calidad del producto que llega a manos de los agricultores como lo existe en otros países que han tenido experiencias en el control biológico. La necesidad de medir y asegurar la calidad de estos productos es una de las metas propuestas por el personal del laboratorio, para lo cual se usarán los modelos más desarrollados en cuanto a protección vegetal en Latinoamérica; Cuba, Colombia y México, además de modelos de producción europeos y de Norteamérica (Rogg y Tovar, 1998; MAG-INIFAT, 1996; INIFA, 1993; Conway, 1984; Tamara Ltd., 1989). El control de calidad de productos biológicos sale un poco fuera del campo del control de calidad de cualquier producto tradicional por lo cual es importante usar las variables establecidas por investigadores y países con más experiencias en este campo. El compromiso del INA con la investigación y la extensión del conocimiento generado es asegurado mediante el control de la calidad del producto que pone a disposición del agricultor nacional.

1.5.1 DESCRIPCIÓN DE LOS HONGOS QUE PRODUCE EL INA

El Laboratorio de Fitoprotección se encuentra en la producción de 6 hongos divididos en 4 hongos entomopatógenos y dos hongos antagonistas. Los hongos entomopatógenos producidos son: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium lecanii*. Los hongos antagonistas producidos son del género *Trichoderma*. El proceso productivo es en sus etapas básicas el mismo para todos (Obregón, 2002).

***Beauveria bassiana* (Balls)**

Es quizá dentro del control biológico el hongo más estudiado y utilizado en el mundo. En general tiene una apariencia blanca cremosa y polvorienta en las placas en el laboratorio y sobre los insectos muertos y parasitados. Es un hongo imperfecto, clasificado en la subdivisión Deuteromycotina, de la clase de los Deuteromycetes o Hyphomycetales que crece bien a temperaturas entre los 23 a 28 °C y a un 90% de humedad relativa (Rogg y Tovar, 1998). Se ha documentado que ataca a más de 500 insectos. Se utiliza en especial para controlar plagas en café, banano, caña de azúcar y hortalizas. Investigaciones del Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica ponen en evidencia que puede atacar insectos domésticos como cucarachas, termitas, chinches transmisores del mal de Chagas y babosas (Obregón, 2002).

En el mercado mundial existen varias formulaciones comerciales en las que el hongo se presenta en forma de mezclas de conidios en polvo con talcos, conidios en medios líquidos, conidios en sustrato sólidos como el arroz (Obregón, 2002).

***Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorok.**

Es un hongo imperfecto, clasificado en la subdivisión Deuteromycotina, de la clase de los Deuteromycetes o Hyphomycetales. Tiene una apariencia de color verde oliva y polvorienta en las placas en laboratorio y en los insectos muertos y parasitados. Crece bien a temperaturas entre los 25 a 27 °C a una humedad relativa del 90% (Obregón, 2002). Los insectos que controla son aproximadamente 40 tipos de abejones (Scarabidae), 20 tipos de larvas de mariposa, la mosca blanca *Bemisia tabaci*, cucarachas, termitas, barrenadores de la caña de azúcar, garrapatas y cochinilla blanca del helecho (www.postgrad.checque.uq.edu.au). Existen formulaciones de los conidios en polvo o en líquido de diferentes casas comerciales y centro de investigación.

***Verticillium lecanii* (Zimm)**

Es un hongo imperfecto, clasificado en la subdivisión Deuteromycotina, de la clase de los Deuteromycetes que tiene un color blanco y una apariencia algodonosa en las placas de petri y en los insectos parasitados. Crece bien a temperaturas entre los 20 a 25 °C a una humedad relativa del 90%. El presenta un rango de acción muy amplio en cuanto a hospederos se refiere. Se ha reportado parasitando coleópteros, dípteros, homópteros y collembolas. Además se sabe que ataca áfidos, mosca blanca *Bemisia tabaci*, ácaros, arañas, nematodos, royas, mildiu polvoso, etc (Obregón, 2002). Las distintas preparaciones existentes en el mercado mundial se basan en suspensiones de conidios en medios líquidos, o una mezcla de conidios y micelio en granos de arroz.

***Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson**

El genero *Paecilomyces* tiene varias especies entomopatógenas, entre ellas: *P. tenuipes*, *P. farasinus*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus*, *P. javanicum*, etc. este es un hongo imperfecto, clasificado en la subdivisión Deuteromycotina, de la clase de los Deuteromycetes que tiene una apariencia esponjosa de color lila en las placas petri y en los insectos parasitados y muertos. Crece bien a temperaturas entre los 20 a 28 °C. Las experiencias con este hongo se han desarrollado principalmente en Austria, Colombia, Cuba y en países europeos; en donde se realizan aplicaciones de suspensiones de conidios fumigados para controlar insectos o inyectado para nematodos (Obregón, 2002).

Trichoderma spp

Es un hongo imperfecto que tiene una apariencia musgosa de color verde que varia de tonos según la especie de que se trate. Es ampliamente estudiada y se han extraído un a cantidad considerable de antibióticos de este género de hongos. Crece bien a temperaturas entre los 20 – 30 °C a una humedad relativa del 90 %. Se ha demostrado su efectividad contra diversos hongos entre los que figuran: *Sclerotinia spp*, *Sclerotium spp*, *Phytophthora spp*, *Fusarium spp*, *Botrytis spp*, *Pythium spp*, *Penicillium digitatum*, *Collectotrichum spp*, *Monilia spp*. También tiene efecto nematicida y combate hongos basidiomycetes contaminantes de sustratos (Obregón, 2002, Rifai, 1964).

1.5.2 DESCRIPCION GENERAL DEL PROCESO PRODUCTIVO.

El proceso productivo se comienza con el aislamiento de cepas entomopatógenas de insectos o de cepas de antagonistas de enfermedades fungosas en las plantas, o para el caso de contar ya con cepas lo que se realiza es un pasaje del hongo a través del insecto o del hongo patógeno con el fin de fortalecer la cepa que se va a emplear en la producción. Estas cepas son purificadas y luego algunas muestras son guardadas en tubos de ensayo con agar inclinado con el fin de establecer un banco de cepas productoras madre propias del laboratorio. Estos tubos madre son renovados y fortalecidos cada seis meses.

De la colección de tubos madre se rayan varias placas (el número se calcula con base en las necesidades de producto que tenga el Centro) en agar PDA, estas se ponen a incubar y después son refrigeradas para su mantenimiento hasta que sea necesitadas. De estas placas se prepara una solución a razón de tres placas en 150 ml de agua destilada y estéril y con esta solución se inoculan botellas llenas con el sustrato estéril y húmedo (matriz), usando 15 ml por cada botella. Las matrices son incubadas por cerca de 10 días, aunque el período varía según el hongo del que se trate, a una temperatura de 25° C.

Al cabo del período de incubación, el sustrato está totalmente colonizado por el hongo en su fase de esporulación, usando 500 ml de agua destilada estéril se prepara una solución dentro de la matriz con el fin de obtener un inóculo líquido altamente cargado de esporas y conidios, generalmente a una concentración de entre 10^9 y 10^{10} conidios por ml. Se preparan bolsas con 300 g del sustrato y 90 ml de agua, las cuales posteriormente se sellan y esterilizan.

Una vez esterilizadas son enfriadas y luego son inoculadas con 15 ml de la solución preparada en la matriz. Las bolsas se llevan al cuarto de incubación o "Biofabrica", donde se ponen a crecer a temperaturas entre los 24 y 28° C durante 12 o 15 días, aunque nuevamente este período puede variar en función del hongo del que se trate.

Pasado este tiempo de incubación el producto es refrigerado para su almacenamiento hasta que sea necesitado por el personal del Núcleo Agropecuario de Instituto Nacional de Aprendizaje o por los alumnos y capacitados del laboratorio de Fitoprotección (Obregón, 2002).

Como información complementaria se propuso una metodología para el rastreo y detección de contaminantes durante los distintos pasos del proceso productivo, con el fin de asegurar la producción final como libre de contaminantes serios o en gran cantidad. La metodología propuesta se basa en la purificación inicial de todas las cepas que se usarán en la producción. Conforme avanza el proceso se hace una revisión por medio de un chequeo visual, y en los puntos críticos del proceso el examen se realiza por medio de pruebas en agar PDA.

El diagrama de flujo optimizado (ver figura 4) fue aprobado por el director del laboratorio y por el personal de producción, con lo cual quedó como registro del método estandarizado de la producción del laboratorio.

1.6 CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS:

1.6.1 IMPORTANCIA, VARIABLES Y ESTANDARES INTERNACIONALES

Dentro de las necesidades de los agricultores orgánicos y aquellos que trabajan con una estrategia de manejo integrado de plagas se encuentra la preocupación por obtener productos biológicos que sean efectivos en el campo y que a la vez permitan obtener ganancias al productor que los usa. La forma correcta de asegurar la efectividad y eficacia de un producto es controlar la calidad del proceso productivo en sí mismo, desde su inicio hasta la salida del producto (Hnasen y Ghave, 1990). La aplicación de estos sistemas de control de calidad en las formulaciones biológicas se basan en análisis microbiológicos y pruebas de eficacia.

En la literatura (Rogg y Tovar, 1998; MAG-INIFAT, 1996; INIFA, 1993; Jenkins et al, 1998; Burges, 1981), sobresalen los sistemas con estándares cubanos y colombianos, así como modelos europeos y de Estados Unidos. El caso de Cuba como un país de gran avance y capacidad en investigación en el control biológico resulta de las presiones impuestas al régimen comunista, que obligaron a su gobierno a replantear los sistemas agrícolas y basarlos en sistemas de control biológico dentro de todo el territorio del país. Por esta razón su Ministerio de Agricultura dispuso la creación de centro de investigación y producción regionales de producto biológicos como apoyo a las agroempresas locales. De este modo en los últimos años Cuba se impuso como modelo mundial de control biológico en todos sus aspectos. Los principales estándares que utilizan en la evaluación de la calidad lo constituyen la concentración de conidios en los productos, la pureza de dichos productos, la germinación de las esporas, la eficacia en el campo, el sustrato adecuado, además del medio para la fermentación, ya sea líquido o sólido (Ciego de Avila, 1999).

El desarrollo de Colombia en cuanto a la aplicación de tecnologías baratas y novedosas para impulsar la producción cafetalera provocó la ola investigativa en cuanto al uso de microorganismos como mejoradores de cosechas y sustituyentes de insumos. El papel primordial lo ha jugado el Cenicafé (1997), en donde se mantiene la investigación y se impulsa la creación de centros locales para apoyo a la producción de café. Los principales estándares usados por ellos en la evaluación de la calidad lo constituyen la concentración de conidios en los productos, la pureza de dichos productos, la germinación de las esporas, las características físicas del crecimiento de dichos microorganismos y la patogenicidad.

En Europa sobresalen países como Alemania, Francia, Bélgica, Inglaterra y en Norteamérica los tres países (Estados Unidos, Canadá y México) trabajan con éxito en la producción de productos biológicos de excelente calidad. Los estándares mencionados en dichos países parecen ser los utilizados en todo el mundo para asegurar la calidad de cada formulación y para cumplir con los requisitos de las legislaciones de comercio biológico más importantes del mundo (Norteamérica y la Unión Europea). Esto queda demostrado en la actividad de diversas empresas e instituciones de investigación en todo el orbe (Mc Coy et al,.....; www.fao.org/docrep/t0533e/t0533e03.htm; Deshpande, 2001).

Las características constantes de estos sistemas comienzan con determinar el diagrama de flujo de producción en masa de un determinado hongo, con el fin de detectar los pasos críticos en la producción que podrían llevar al traste con los productos esperados. Después de ese primer paso se realizan pruebas para determinar las 5 características más importantes descritas: concentración de conidios, pureza del producto, germinación de esporas, patogenicidad y características físicas (Rogg y Tovar, 1998; MAG-INIFAT, 1996; INIFA, 1993; Cenicafe, 1997; Mc Coy et al,.....; www.fao.org/docrep/t0533e/t0533e03.htm; Deshpande, 2001). Es en estas variables que se centra la atención del control de calidad de las preparaciones de hongos en el Laboratorio de Fitoprotección de la Unidad Tecnológica en Agricultura Orgánica del INA.

2- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 LOCALIZACIÓN DE LA PRÁCTICA

La práctica se realizó en el Laboratorio de Fitoprotección del Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica del Instituto Nacional de Aprendizaje en la Chinchilla de Cartago. Se realizó de julio a noviembre del 2002.

2.2 REVISIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL DIAGRAMA DE FLUJO

Se realizó una revisión minuciosa el diagrama de flujo propuesto en los inicios de la producción del laboratorio. Esta revisión incluyó la observación directa del proceso productivo, así como la capacitación en las labores de producción por parte del personal técnico encargado. Con base en la revisión se optimizo el diagrama de flujo que mejor se ajuste al proceso de producción estándar de hongos antagonistas y entomopatógenos, el cual es el mismo para todos los hongos. Después se determinaron los puntos críticos en el proceso de producción de los productos fúngicos y se realizo por parte del personal encargado de la producción una corroboración del diagrama propuesto.

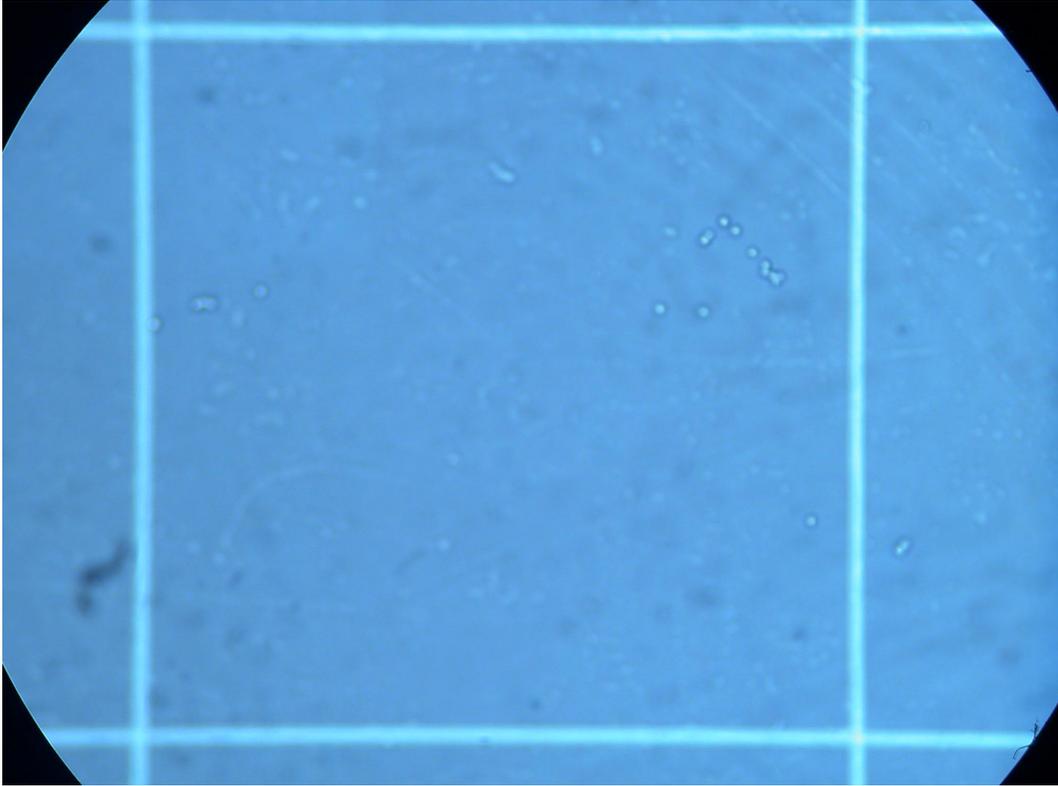
Los bioproductos elaborados son a base de los siguientes hongos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium lecanii* como entomopatógenos; y como género antagonista *Trichoderma sp.*

2.3 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PARA CONTROL DE CALIDAD

Todo el análisis de los resultados obtenidos en las siguientes pruebas será de manera descriptiva y no matemática debido a las recomendaciones sugeridas por varios centros de investigación para productos no certificados.

2.3.1 CONCENTRACIÓN DEL PRODUCTO

La concentración del producto se determinó mediante conteo directo del número de conidios presentes en un gramo del producto final con la cámara de Neubauer mejorada. Se realizaron medidas a tres muestras de diferentes ciclos de producción por hongo, y a cada muestra se le realizaban 6 lecturas a manera de repeticiones. Se escogió una bolsa por ciclo de producción tomada al azar, de ésta se tomaban 100 g del producto de manera aséptica y se preparó una solución con 300 ml de agua y 1 ml de Tween 80[®]. A partir de la solución madre se prepararon diluciones seriadas en décimas desde la dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-5} para obtener un factor adecuado de conteo. Antes de cada conteo se realizó una observación previa a las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} para determinar la dilución que presentara más facilidades para el conteo en microscopio (la cual variaba según la esporulación del hongo). Una vez seleccionada la dilución se procedió a preparar la cámara para el conteo. La cámara fue secada y se colocó un cubreobjetos sobre las áreas de conteo. Con la ayuda de una micropipeta se tomaron 10 μ l del tubo con la dilución escogida y se cargó con esta la cámara a través de capilaridad. Se llenaron las dos áreas de cada cámara para obtener dos repeticiones a la vez. Después se procedió al conteo usando primero el lente de 10 aumentos para enfocar el reticulado de la cámara. Usando el lente de 40 aumentos se realizó el conteo en el área correspondiente a los cuadrantes de las esquinas, cada uno con un área de 1mm^2 distribuidos en 16 cuadros pequeños. La próxima figura muestra uno de estos 16 cuadros usados en el conteo de conidios.



Microsoft Word

Figura 2. Muestra de una división (1/16) de un cuadrante esquinero de la cámara.

Se contaron todos los conidios presentes en los 16 cuadros de cada uno de los cuadrantes de las esquinas. Una vez leídos los cuatro cuadrantes de cada área de conteo se obtenía el promedio de lectura por repetición. Se calculó el número de conidios por ml y por gramo de muestra. El cálculo del número de conidios por ml de muestra se obtenía a través de la multiplicación del promedio de lecturas por la dilución empleada y multiplicado esto por el factor de la cámara:

Fórmula: $C \times F.C. \times D = CM$; donde:
C= Promedio de conidios contados
F.C.= Factor de la cámara empleada
D= dilución de la que se tomó la muestra
CM= Conidios por mililitro

El número de conidios contados por gramo del producto final se obtuvo multiplicando el número de conidios presentes en 1ml por el número de ml en que fue disuelta la muestra y dividiendo este resultado entre los gramos de muestra usados, de esta manera:

Fórmula:

$(CM \times B) / G = GM$; donde:

B= Cantidad de mililitros usados en la solución madre

G= Cantidad de gramos usados en la solución madre

GM= Conidios por gramo de muestra

Los resultados fueron comparados con los estándares internacionales aceptados para cada hongo en particular con el fin de evaluar la concentración del producto del laboratorio y determinar la calidad de éste.

2.3.2 EVALUACIÓN DE LA PUREZA DEL PRODUCTO

La evaluación de la pureza del producto se realizó por medio de la determinación de estructuras típicas de los hongos en cuestión mediante el microscopio óptico. Para esto se montaron preparaciones en agua sobre portaobjetos en donde se tomó una asa llena de las esporas del hongo contenidas en bolsas de producto escogidas al azar, a razón de una muestra (asa) por tipo de hongo para cada preparación. Se observaron los hongos y sus estructuras típicas, principalmente: micelio, conidióforos, conidios y esporas; usando los lentes de 40 y 10 aumentos. Empleando reportes existentes en la literatura (Barnett y Hunter, 1998; Streets, 1984) se compararon las observaciones hechas con el microscopio con el fin de comprobar la correcta identificación del hongo.

Como prueba adicional, dentro de este mismo paso se procedió a la medición de los conidios, donde por medio de análisis comparativos con lo reportado en la literatura científica se determinó la especie correspondiente. La medición del tamaño de la espora se realizó a través de la calibración del microscopio como lo indican Seeley y van Demark (1990) . Para esto se adaptó el ocular micrométrico al microscopio, después con el uso de un portaobjetos micrométrico se calibró de manera tal que las líneas arbitrarias del ocular micrométrico quedaron superpuestas a las líneas determinadas de 10 μm del portaobjetos micrométrico. A través de esto se pudo calcular el valor en micrómetros de las divisiones del ocular micrométrico, el cual resultó de la división del total de micrómetros del portaobjetos entre el número de líneas del ocular. Una vez realizada la calibración se procedió a la medición de esporas contando el número de líneas que ocupaban los conidios para convertir este valor a micrometros con la relación anteriormente establecida. Se contó un total de 50 conidios por tipo de producto a base de un hongo. Debido a que el producto que se obtiene de *Trichoderma sp* es una mezcla de tres especies: *T. harzianum*, *T. viride* y *T. hamatum* este paso no se le aplicó a este producto.

Con los datos obtenidos se determinaron las desviaciones estándar y el promedio de las mediciones para el largo y el ancho del conidio típico del hongo. Los dos parámetros (morfología del hongo y tamaño del conidio) fueron la base para la discusión y corroboración de la especie de hongo trabajada, así como para evaluar un poco la variabilidad presente en las dimensiones del conidio.

Siguiendo el diagrama de flujo y los puntos de control propuestos en él mismo, se le realizó un seguimiento al proceso productivo a través de la detección visual de contaminantes y por medio de muestreos realizados con bolsas de producto escogidas al azar y su siembra en medios de crecimiento estándar. Para esto se tomaron 10 gramos de cada producto y se diluyeron en 90 mililitros de agua destilada y estéril. A partir de esta dilución se realizaron diluciones posteriores hasta la concentración de 10^{-6} . Usando la dilución 10^{-3} y 10^{-6} se sembraron 0,2 mililitros de estas en un plato petri con medio PDA por cada placa. Las placas fueron revisadas a las 96 horas con el fin de determinar los contaminantes presentes. Se realizaron 3 repeticiones de este procedimiento por hongo en diferentes fechas. El porcentaje de pureza del producto se obtuvo al contar el total de colonias del hongo en producción, ente el total de colonias de microorganismos crecidas en la placa multiplicado esto por 100. Los resultados por cada dilución en las tres repeticiones de cada producto fúngico fueron promediados para efectos de la presentación de resultados.

2.3.3 EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN DEL PRODUCTO

Para lograr la determinación de este parámetro se realizó un ensayo sobre placas de agar. El método presentado fue el mismo para el examen de los 6 hongos en cuestión. El primer paso fue realizar diluciones seriadas en diez hasta obtener una donde fuera posible contar 100 esporas por separado. Esto se obtuvo con la dilución 10^3 . Posteriormente se prepararon placas con agar agua, en el fondo de las cuales se marcaron tres puntos (tres repeticiones por placa). Sobre cada punto se pusieron 5 μ l de la dilución escogida

Luego las placas fueron incubadas a condiciones de temperatura y humedad relativa controladas en una cámara de crecimiento. Con el uso del microscopio óptico se realizaron mediciones sobre 100 conidios, para los cuales se registró el número de conidios germinados y los no germinados. Las observaciones se realizaron a las 24 horas de incubación, al cabo de las cuales sobre cada punto se aplicó una gota de azul de lactofenol para detener la germinación y hacer más visibles los conidios con las hifas jóvenes. Con base en estos resultados se calculó el porcentaje de germinación de los conidios presentes en el producto final.

2.4 DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DEL PRODUCTO

2.4.1 PRUEBAS DE EFICACIA DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS



Microsoft PhotoEditor

Figura 3. Cámara húmeda preparada para las pruebas con *M. anisopliae* y *B. bassiana*

Para el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii* se usó el mismo procedimiento, excepto que los insectos escogidos fueron áfidos de rosa *Macrosiphum rosae*. En base a estos ensayos se determinaron los porcentajes de mortalidad y parasitación, y se examinó la relación mortalidad- parasitación.

Para *Paecilomyces lilacinus* se construyó un embudo de Baermann, tal como lo indica Ayaub para el IMP (1995), con el fin de extraer nematodos de raíces de tomate. Los nematodos fueron recolectados del embudo a las 24 horas y recogidos en un beaker de 200 ml. En base a observaciones al microscopio con lentes de bajo aumento y con el uso de la clave de identificación propuesta por Mai y Lion (1975) los nematodos fueron identificados como pertenecientes al género *Trichodorus*.

Posteriormente se cortaron discos finos de zanahoria de un diámetro de 4 cm, y sobre cada uno se colocó una gota del agua que contenía los nematodos extraídos. La misma fue colocada al microscopio para contar el número de nemátodos presentes en ella. Al final se colocaron 5 discos para sumar en total 30 nemátodos. Los discos fueron asperjados con una solución a base del producto de *Paecilomyces lilacinus* previamente preparada a una concentración de 300 g por cada 16 litros de agua. Los discos fueron puestos a incubar en una cámara húmeda a un temperatura de 25° C durante 10 días. Se realizaron observaciones para medir los parámetros de muerte y parasitación cada día durante los 10 días.

2.4.2 PRUEBAS DE EFICACIA DEL ANTAGONISTA *Trichoderma spp*

Para realizar estos ensayos se prepararon con una semana de antelación las placas del hongo *Trichoderma sp.* Además se prepararon placas de los hongos fitopatógenos utilizados comúnmente en el laboratorio: *Corticium sp*, *Phytophthora sp*, *Sclerotium rolfsii* y *Collectotrichum sp.* Estas placas fueron preparadas colocando un disco de medio de cultivo cubierto por cada uno de estos hongos en el centro de una placa del medio PDA. Se prepararon tres placas por hongo y se pusieron a incubar a 22° C durante 7 días con el fin de estandarizar la edad de cada uno de los hongos.

Pasado este tiempo, se cortaron discos de 1 cm de diámetro de cada tipo de hongo patógeno y antagonistas. Se tomó una placa petri por tipo de patógeno y dentro de ella se colocaron un disco del patógeno y un disco del antagonista. Cada disco fue colocado en direcciones opuestas a dos centímetros del centro de la placa. Las placas fueron incubadas a 25° C durante 7 días para observar el efecto antagonista de los hongos en cuestión.

Simultáneamente se montó un testigo por cada patógeno y cada antagonista que consistió de una placa con solamente el disco del patógeno o del antagonista en cuestión colocado a dos centímetros del centro de la placa, para simular la misma posición en la prueba real. Se incubó en iguales condiciones que las pruebas reales. Se tomaron mediciones del avance del frente del hongo a los 0,1, 4 y 7 días de montado el ensayo.

3-RESULTADOS

3.1 OPTIMIZACIÓN DEL DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRODUCCIÓN

Mediante la metodología propuesta se logró determinar un diagrama de flujo que muestra la realidad del proceso productivo. En este diagrama se incluyeron los pasos básicos fundamentales que conllevan al éxito en los biopreparados fúngicos.

Se muestra a continuación el diagrama de flujo optimizado, además se muestra el esquema de rastreo y determinación de contaminantes propuesto para el proceso productivo, alineado con el paso de la producción que se está realizando en ese momento.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y ANTAGONISTAS EN EL LABORATORIO DE FITOPROTECCIÓN DEL CNAO



MS Chart Organizer

Figura 4. Diagrama de flujo de la producción de hongos para combate biológico.

3.2 RESULTADOS DE LOS CONTEOS DE CONCENTRACIÓN DE CONIDIOS

Los cuadros siguientes son los propuestos por los investigadores del Cenicafe (1997) para resumir las evaluaciones sobre la concentración de los bioproductos. Las mediciones se expresan en base a cantidad de conidios por mililitro y por gramo como promedio de 6 mediciones por cada una de las muestras. Los siguientes cuadros muestran los resultados de los conteos realizados con el producto a base de los diferentes hongos utilizados.

Tabla 4. Resultados de conteos para: *Beauveria bassiana* (cantidad de conidios por ml y por gramo de producto).

MUESTRA	LECTURA EN CÁMARA						ESTADÍSTICA			
	1	2	3	4	5	6	sumatoria	Media	Con/ ml	Con/g
1	3.5	3.75	2.75	4.50	4.75	3.0	22.2	3.71	3.71 x 10 ⁸	1.11 x 10
2	3.0	1.25	1.25	2.75	2.0	3.25	13.5	2.25	2.25 x 10 ⁸	2.25 x 10 ⁸
3	8.5	10.5	7.0	5.75	4.75	6.75	43.25	7.21	7.21 X 10 ⁸	2.16 X 10 ⁹

Microsoft Word

Tabla 5. Resultados de conteos para: *Verticillium lecanii* (cantidad de conidios por ml y por gramo de producto).

MUESTRA	LECTURA EN CÁMARA						ESTADÍSTICA			
	1	2	3	4	5	6	Su ma	Me dia	Con/ ml	Con/ g
1	11.75	10.25	10.25	11.0	9.75	19.0	72.0	12.0	1.2 x 10 ⁸	3.6 x 10 ⁸
2	4.25	2.75	4.0	2.5	2.75	3.25	19.5	3.25	3.25 x 10 ⁸	9.75 x 10 ⁸
3	2.0	3.25	0.75	1.0	1.75	4.5	13.25	2.21	2.21 x 10 ⁸	6.63 x 10 ⁸

Microsoft Word

Tabla 6. Resultados de conteos para: *Paecilomyces lilacinus* (cantidad de conidios por ml y por gramo de producto).

MUESTRA	LECTURA EN CÁMARA						ESTADÍSTICA			
	1	2	3	4	5	6	Su ma	Me dia	Con/ ml	Con/ g
1	16.75	11.75	12.0	13.0	13.25	12.25	79.0	13.17	1.32 x 10 ⁹	3.96 x 10 ⁹
2	14.75	12.0	8.25	10.75	10.75	11.5	68.0	11.33	1.133 x 10 ⁹	3.34 x 10 ⁹
3	12.25	12.75	8.0	7.5	12.5	8.25	61.25	10.21	1.02 X 10 ⁹	3.06 X 10 ⁹

Microsoft Word

Tabla 7. Resultados de conteos para: *Metarhizium anisopliae* (cantidad de conidios por ml y por gramo de producto).

MUESTRA	LECTURA EN CÁMARA						ESTADÍSTICA			
	1	2	3	4	5	6	Su ma	Me dia	Con/ ml	Con/ g
1	4.25	8.0	4.75	3.75	3.25	4.50	28.50	4.75	4.75 x 10 ⁸	1.43 x 10 ⁹
2	7.5	6.75	6.5	6.0	7.0	7.0	40.75	6.8	6.8 X 10 ⁸	2.04 X 10 ⁹
3	11.25	15.0	11.25	12.25	9.5	13.0	72.25	12.04	1.2 X 10 ⁹	3.6 X 10 ⁹

Microsoft Word

Tabla 8. Resultados de conteos para: *Trichoderma spp* (cantidad de conidios por ml y por gramo de producto).

MUESTRA	LECTURA EN CÁMARA						ESTADÍSTICA			
	1	2	3	4	5	6	suma	media	Con/ ml	Con/g
1	5.25	2.75	3.0	3.75	6.25	8.75	29.5	4.92	4.92 x 10 ⁸	1.48 x 10 ⁹
2	3.75	5.0	4.25	6.0	5.0	3.75	27.75	4.63	4.63 x 10 ⁸	1.39 x 10 ⁹
3	9.25	10.0	11.75	10.75	6.75	7.75	56.25	9.38	9.38 x 10 ⁸	2.81 x 10 ⁹

Microsoft Word

3.3 PRUEBAS DE PUREZA

3.3.1 MEDICIÓN DE LAS ESPORAS

Los cuadros siguientes resumen los resultados obtenidos. Se incluyen los cálculos de la desviación estándar y el promedio de las medidas determinadas; con el fin de establecer una corrección sobre el promedio establecido a la hora de realizar una comparación con las medidas reportadas en la literatura.

Tabla 9. Medición del largo y ancho de los conidios* de *Paecilomyces lilacinus*.

Largo(L)	Frecuencia(F)	L*F	Ancho(A)	Frecuencia(F)	A*F
2.5	27	67.5	2.5	35	87.5
3.34	16	53.4	3.34	8	26.72
1.68	2	3.4	4.18	1	4.18
3.75	5	18.75	3.75	5	18.75
-	-	-	1.68	1	1.68
D.estándar 1.54	Promedio 2.86	Sumatoria 143.05	D.estándar 0.52	Promedio 2.78	Sumato ria 138.83

* Se contaron 50 conidios en total.

Microsoft Word

Tabla 10. Medición del largo y ancho de los conidios* de *Beauveria bassiana*

Largo(L)	Frecuencia(F)	L*F	Ancho(A)	Frecuencia(F)	A*F
3.75	12	45	3.34	13	43.42
3.34	27	90.18	2.5	24	65.0
4.18	2	8.36	1.68	4	6.72
5.00	3	15.0	3.75	9	33.75
2.5	6	15.0	-	-	-
D.estándar 0.55	Promedio 3.47	Sumatoria 173.54	D.estándar 0.62	Promedio 2.88	Sumatoria 148.89

* Se contaron 50 conidios en total.

Microsoft Word

Tabla 11. Medición del largo y ancho de los conidios* de *Metarhizium anisopliae*

Largo(L)	Frecuencia(F)	L*F	Ancho(A)	Frecuencia(F)	A*F
8.33	8	66.64	2.5	46	115.0
6.68	5	33.4	3.34	4	13.36
7.5	29	217.5	-	-	-
6.25	5	31.25	-	-	-
8.75	2	17.5	-	-	-
10.0	1	10.0	-	-	-
D.estándar 0.73	Promedio 7.53	Sumatoria 376.29	D.estándar 0.23	Promedio 2.57	Sumatoria 128.36

* Se contaron 50 conidios en total.

Microsoft Word

Tabla 12. Medición del largo y ancho de los conidios* de *Verticilium lecanii*

Largo(L)	Frecuencia(F)	L*F	Ancho(A)	Frecuencia(F)	A*F
3.75	4	15.0	2.5	40	100
5.0	23	115	1.68	9	15.12
6.25	6	37.5	3.34	1	3.34
6.68	3	20.04	-	-	-
5.83	5	29.15	-	-	-
4.18	6	25.08	-	-	-
7.5	3	22.5	-	-	-
D.estándar 0.97	Promedio 5.29	Sumatoria 264.27	D.estándar 0.34	Promedio 2.33	Sumatoria 118.46

* Se contaron 50 conidios en total.

Microsoft Word

A las muestras de los productos de *Trichoderma sp* no se les aplicó esta prueba por ser basado en una mezcla de tres especies de este género: *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum*.

3.3.2 RASTREO DE CONTAMINANTES

El rastreo de contaminantes realizados directamente sobre los productos elaborados en el laboratorio permitió obtener los resultados observados en el cuadro que sigue:

Tabla 13. Resultado de las pruebas de pureza de los productos fúngicos.

Producto	Total de colonias contadas	Colonias contaminantes	Colonias de interés	Porcentaje de pureza del producto
<i>Trichoderma sp</i>				
Dilución 10 ⁻³	Incontables	0	Incontables	100
Dilución 10 ⁻⁶	198	0	198	100
<i>Paecilomyces lilacinus</i>				
Dilución 10 ⁻³	Incontables	0	incontables	100
Dilución 10 ⁻⁶	114	1 (bacteria)	113	99
<i>Metarhizium anisopliae</i>				
Dilución 10 ⁻³	106	0	106	100
Dilución 10 ⁻⁶	2	0	2	100
<i>Verticillium lecanii</i>				
Dilución 10 ⁻³	Incontable	2 (bacteria)	Incontable	Incalculable
Dilución 10 ⁻⁶	52	1	51	98
<i>Beauveria bassiana</i>				
Dilución 10 ⁻³	incontables	0	incontables	100
Dilución 10 ⁻⁶	45	1(<i>Paecilomyces lilacinus</i>)	44	97.8

Microsoft Word

A manera de ilustración de los resultados se puede ver en la siguiente figura una ejemplificación de las pruebas de pureza.



Microsoft Word

Figura 5. Muestras de las pruebas de pureza sobre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Se observa en la placa de la izquierda una placa de colonias de *B. bassiana* contaminada con un a colonia de *P. lilacinus*; y a la derecha una placa con colonias puras de *M. anisopliae*.

3.4 PRUEBAS DE GERMINACIÓN

Las pruebas de germinación realizadas demuestran un parámetro importante de cualquier bioproducto. Para el caso de los del INA, los resultados se muestran en el siguiente cuadro.

Tabla 14. Porcentaje de germinación de los conidios de los hongos a las 24 horas.

Conidios de	<i>P. lilacinus</i>	<i>M. anisopliae</i>	<i>V. lecanii</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>Trichoderma spp</i>
Repetición 1	94	94	87	95	92
Repetición 2	93	90	86	88	89
Repetición 3	96	92	87	94	91
Promedio	94.3	92	86.7	92.3	90.7

Microsoft Word

El cuadro de resultados muestra que casi todos los productos presentan una germinación superior al 90%, excepto *V. lecanii*, sin embargo esto es muy dependiente de la temperatura a que se realice el ensayo y lo estricto del requerimiento de temperatura del metabolismo del hongo usado.

3.5 PRUEBAS DE EFECTIVIDAD DE LOS HONGOS

3.5.1 PRUEBAS DE EFECTIVIDAD DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los resultados obtenidos en estas pruebas ilustran la relación que se establece entre los dos organismos: una relación de parasitismo, donde uno de ellos saca provecho en detrimento del otro. Para el hongo *Metarhizium anisopliae* se obtuvieron los siguientes resultados:

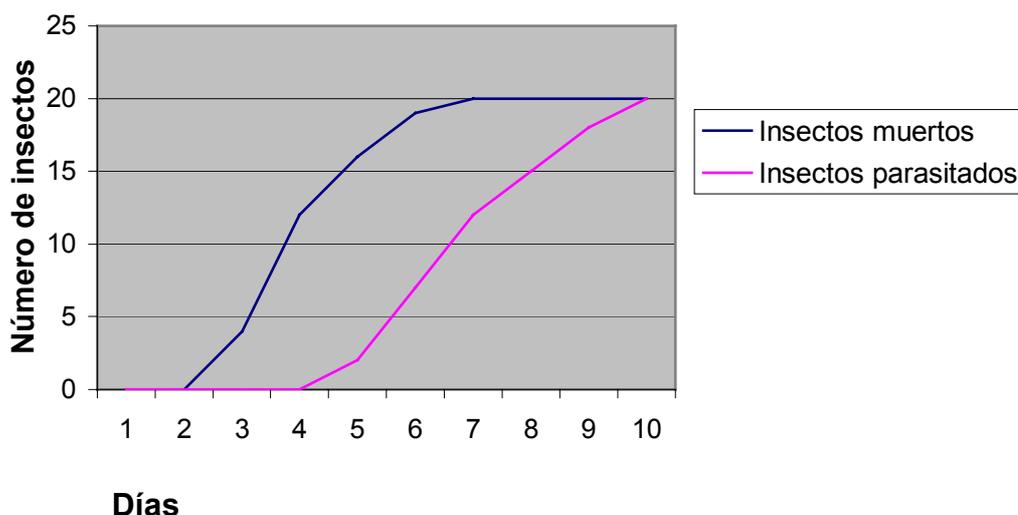
Tabla 15. Porcentaje de parasitación de *Metarhizium anisopliae* sobre el gorgojo del arroz

Sitophilus oryzae.

Día	Insectos muertos	Insectos parasitados	Porcentaje de parasitación en relación con los muertos
1	0	0	0
2	0	0	0
3	4	0	0
4	12	0	0
5	16	2	12.5
6	19	7	36.84
7	20	12	60.0
8	20	15	75.0
9	20	18	90
10	20	20	100

Microsoft Word

La siguiente figura ilustra las relaciones determinadas por los resultados anteriores.



Microsoft Excel

Figura 6. Comportamiento gráfico de las relaciones de mortalidad y parasitación de *M. anisopliae* sobre *Sitophilus oryzae* (L).

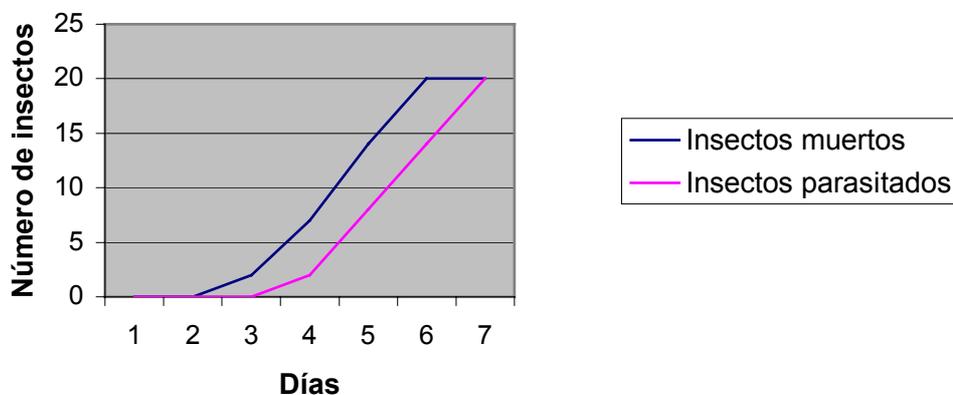
En cuanto a los resultados registrados en el ensayo con *Verticillium lecanii* sobre los áfidos de rosa los mismos muestran los siguientes valores:

Tabla 16. Porcentaje de parasitación de *Verticillium lecanii* sobre el *Macrosiphum rosae*.

Día	Insectos muertos	Insectos parasitados	Porcentaje de parasitación en relación con los muertos
1	0	0	0
2	0	0	0
3	2	0	0
4	7	2	28.6
5	14	8	57.1
6	20	14	70
7	20	20	100

Microsoft Word

La siguiente figura ilustra las relaciones establecidas por *V. lecanii* y el áfido de la rosa *Macrosiphum rosae*.



Microsoft Excel

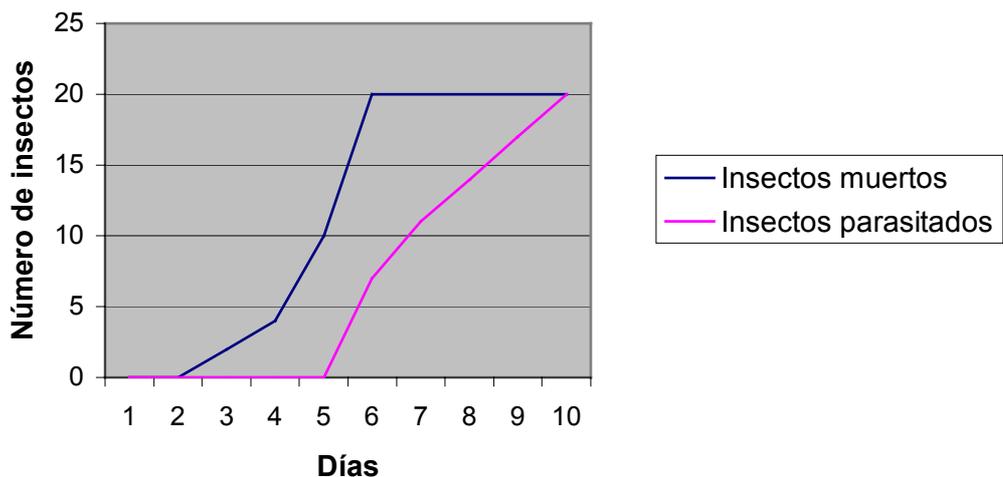
Figura 7. Comportamiento gráfico de la relación de mortalidad y parasitación de *V. lecanii* sobre el áfido *Macrosiphum rosae*.

Los resultados respecto a la eficacia de *Beauveria bassiana* en los ensayos son presentados en el próximo cuadro:

Tabla 17. Porcentaje de parasitación de *Beauveria bassiana* sobre el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae*

Día	Insectos muertos	Insectos parasitados	Porcentaje de parasitación en relación con los muertos
1	0	0	0
2	0	0	0
3	2	0	0
4	4	0	0
5	10	0	0
6	20	7	35
7	20	11	55
8	20	14	70
9	20	17	85
10	20	20	100

El comportamiento de los parámetros de muerte y parasitación se demuestra mejor en la figura construida con los datos anteriores:



Microsoft Excel

Figura 8. Comportamiento gráfico de las relaciones de mortalidad y parasitación de *Beauveria bassiana* sobre *Sitophilus oryzae* (L.).

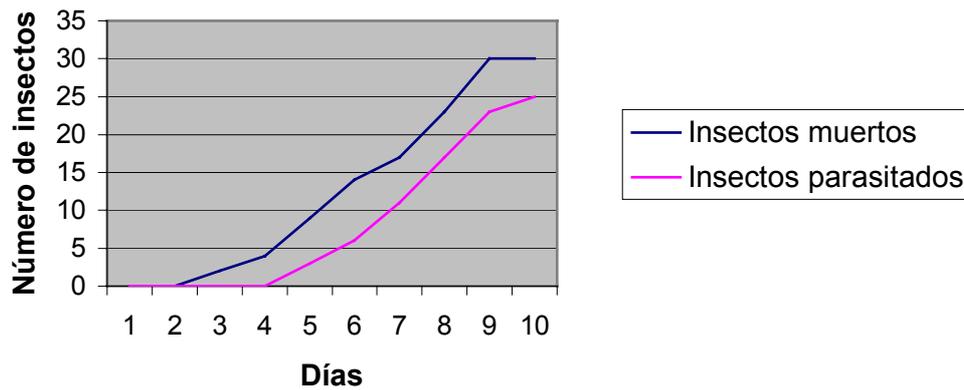
El cuadro presentado a continuación muestra los resultados de las pruebas de efectividad de *Paecilomyces lilacinus* contra el nematodo *Trichodorus spp.*

Tabla 18. Porcentaje de parasitación de *Paecilomyces lilacinus* sobre *Trichodorus spp.*

Día	Insectos muertos	Insectos parasitados	Porcentaje de parasitación en relación con los muertos
1	0	0	0
2	0	0	0
3	2	0	0
4	4	0	0
5	9	3	33.3
6	14	6	42.9
7	17	11	64.7
8	23	17	73.9
9	30	23	76.7
10	30	25	83.3

Microsoft Word

La figura 9 ilustra la relación establecida entre *P. lilacinus* y *Trichodorus spp.*



Microsoft Excel

Figura 9. Relaciones de mortalidad y parasitación de *Paecilomyces lilacinus* sobre *Trichodorus spp.*

3.5.2 PRUEBAS DE EFECTIVIDAD DE HONGO ANTAGONISTA

La prueba de antagonismo aplicada a el producto del género *Trichoderma* arrojó los siguientes resultados resumidos en este cuadro.

Tabla 19. Medición del crecimiento en centímetros del frente de expansión los hongos probados en el ensayo interactuando con *Trichoderma spp.*

PLACA	DÍA 1	DÍA 4	DÍA 7
Placa 1			
<i>Trichoderma spp</i>	0	3.0	4.0
<i>Corticium spp</i>	0	1.0	0
Placa 2			
<i>Trichoderma spp</i>	0	3.0	4.0
<i>Phytophthora spp</i>	0	1.0	0
Placa 3			
<i>Trichoderma spp</i>	0	2.5	2.5
<i>Sclerotinium rolsii</i>	0	1.5	1.5
Placa 4			
<i>Trichoderma spp</i>	0	3.2	3.5
<i>Collectotrichum spp</i>	0	0.75	0.5

Microsoft Word

4- DISCUSIÓN

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL DIAGRAMA DE FLUJO

La capacitación de un mes permitió observar las fortalezas y debilidades del proceso productivo, con lo cual se pudo optimizar un diagrama de flujo que se muestra en la figura 4.

Para el control de la contaminación se adicionó un diagrama paralelo de puntos de control el cual brinda la opción de determinar de manera rápida la introducción de contaminantes y así evitar desperdicio de materias primas en la fabricación de productos que lleven alto riesgo de salir contaminados.

4.2 CONTEO DE CONCENTRACIÓN DE CONIDIOS

Los resultados obtenidos en el cuadro 4 demuestran la eficiencia del método de producción sobre arroz para *B. bassiana*, donde la concentración de conidios se encuentra generalmente en el orden de 10^8 por mililitro de muestra. Este resultado es comparable con resultados de muchos otros investigadores que han realizado el control de calidad de su producción sobre sustrato sólido, por ejemplo el Cenicafe ha reportado una producción de conidios de *Beauveria bassiana* en concentraciones semejantes a las obtenidas (Cenicafe, 1997).

La empresa piñera de Cuba Ciego de Avila (1999) usa como estándar de buena producción un conteo de esporas no menor de 10^8 por mililitro de muestra. Con el empleo de formulaciones a esta concentración han obtenido resultados promisorios en el control de diversas plagas como el picudo negro del plátano, barrenadores de caña, picudo del arroz y *Trips palmi* dentro de las estrategias de control biológico de este país. El proceso estandarizado de producción del NCL y ETH formulado por Deshpande (2001) les permite obtener concentraciones cercanas a los $4.3 * 10^8$ durante todo el año cuando el producto proviene de una misma cepa madre.

Los resultados mostrados en el cuadro 4, demuestran la calidad del producto que sale del INA, el cual puede ser comparado con los productos de instituciones y empresas productoras de cualquier lugar del mundo. No obstante, existen reportes de concentraciones que han alcanzado incluso 10^{11} . Los expertos del Instituto Gabriel Rene Moreno (1998) han logrado obtener productos con concentraciones desde los 10^8 y hasta los 2 y $4 * 10^{11}$ conidios por ml de muestra de su producto. El Cenicafé (1997), reporta producciones del orden de 10^9 conidios por mililitro con algunas de sus cepas. Jenkins y sus colaboradores (1998), reportan producciones incluso de hasta concentraciones de $5 * 10^{10}$, pero hacen la observación de que esto es dependiente de la época del año en que se encuentran. Logran demostrar que obtienen esta concentración en los 8 primeros meses del año (de enero a agosto) pero que en los últimos cuatro meses la producción decae a concentraciones que rondan el estándar de 10^8 . Ellos proponen que las condiciones de humedad, temperatura y aireación del producto son los factores primordiales que afectan estos rendimientos y que un buen control de los mismos logra estabilizar la producción a concentraciones cercanas a $2.4 * 10^9$ (Heviefo y Jenkins, 1998).

Además de los mencionados parámetros ambientales es de esperar que la cepa madre de la producción juegue un papel importante en el aumento o disminución de la producción de conidios dentro de los laboratorios, esto por cuanto las experiencias de Ciego de Avila, del Vallecito, del Cenicafé, de la NCL (National Chemical Laboratory) de la India y el ETH de Suiza (Urs Tuor, 2001), y de muchos otros centro productores demuestran que, en condiciones de procesos de producción estandarizados y condiciones ambientales controladas, la producción sufre cambios en la concentración al rotar las cepas con que cuenta cada institución.

En nuestro país, para el año de 1993, los bancos de cepas del MIP, CATIE y DIECA reunían alrededor de 25 cepas de *Beauveria bassiana* que producían, bajo condiciones controladas y estandarizadas, concentraciones iguales o superiores a $1.0 * 10^9$ conidios por mililitro (García, 1993).

Los datos generados por los ensayos y mostrados en el cuadro 5, permiten determinar la calidad en cuanto a la concentración de conidios de los productos a base de *Verticillium lecanii*. La cepa productora con que cuenta el INA, ha permitido llegar a conteos en el orden de 10^8 conidios por mililitro de muestra de producto. Al ser comparado esto con los estándares internacionales se demuestra una calidad igual de producto. Los datos más ensayados a nivel latinoamericano para este hongo corresponden a los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREE) de Cuba (Pifferrer, 2002), donde se reportan concentraciones que van desde los 10^7 hasta los 10^9 de conidios por mililitro, pero se hace la observación que los productos que finalmente salen al mercado local, son los que llevan una concentración de $2.0 * 10^8$ obtenidos por fermentación en sustrato sólido sobre arroz. En este caso los reportes de otros centro de producción indican que esta especie es más homogénea en cuanto a producción y no dependen tanto de la cepa productora usada como fuente del inóculo inicial, sino que la concentración presenta oscilaciones débiles debido a la técnica de producción y al tipo de medio de cultivo y su agitación (IOBC/WPRS-EFPP, 2000).

En cualquier caso la concentración alcanzada por los productos biológicos del INA: son de excelente calidad en cuanto a este parámetro, al compararse con los niveles mundiales de producción.

El cuadro 6 nos presenta los resultados de los conteos en las muestras de productos a base de *Paecilomyces sp* del INA, los cuales presentan rendimientos muy elevados para producciones sobre sustrato sólido. El nivel de la concentración se ubica en un orden por encima de los 10^9 conidios por mililitro. Este hongo se trabaja en pocas zonas geográficas del mundo y los centros más confiables de producción proviene de Alemania, Suiza y de la India, donde para el caso de los países europeos mencionados las cepas trabajadas no son nativas sino que fueron producto de colectas en otras zonas tropicales. Los resultados de los conteos para el control de calidad en la NCL y la ETH brindan concentraciones máximas de $3.2 * 10^8$ (Burgess, 1981; Deshpande, 2001). Los CREE de Cuba mencionan trabajar el hongo pero no presentan datos de concentraciones alcanzadas en sus productos, y es de los pocos registros existentes para este hongo. La concentración de conidios en esta especie de hongo es la máxima alcanzada por los bioproductos del INA y brinda una categoría de excelente calidad para este parámetro evaluado en el producto, además que permite deducir mayores tasas de germinación de esporas y una permanencia o sobrevivencia alta del hongo en el campo.

Para el caso de este hongo los resultados observados en el cuadro 7 permiten observar una producción estable de conidios en todas las muestras de concentraciones que rondan el orden de 10^8 conidios por mililitro de muestra. Algunas zonas de Europa, India y América demuestran enormes oscilaciones en cuanto a las concentraciones obtenidas por el mismo método de producción. Por ejemplo en Suiza la ETH obtiene en sus productos concentraciones del orden de 10^6 , al igual que lo reportado por la NCL de India que contabiliza concentraciones promedio de $3.0 * 10^6$, mientras tanto la empresa Ciego de Ávila obtiene productos con concentraciones promedio de $2.0 * 10^8$.

La fermentación de este hongo parece ser altamente influenciada por la cepa usada en la elaboración de los productos, y al parecer por los datos recuperados los aislamientos de zonas cercanas presentan una producción de conidios similares (Burgess, 1981; Ciego de Avila, 1999; Cenicafe, 1997, Deshpande, 2001).

Estudios realizados sobre la fermentación de *Metarhizium anisopliae* demuestran una enorme complejidad de factores que determinan que la producción de conidios sea alta o baja. Se ha demostrado que los inóculos de partes vegetativas del hongo (micelio) tiene una mayor producción de conidios, así mismo se han obtenido concentraciones mayores con cultivos en sustrato sólido que los cultivos líquidos, aunque esto no sea constante. Dentro de los cultivos en fase líquida se ha demostrado que aquellos que crecen sin agitación producen más conidios (un promedio de $2.57 * 10^9$) que los que reciben agitación (un promedio de $1.97 * 10^9$). Además se reporta que dentro de los cultivos líquidos en agitación los que son agitados todo el tiempo producen más conidios que los que se someten a agitación parcial. Los cultivos bajo agitación parcial produjeron en promedio $1.09 * 10^9$ conidios por mililitro de producto (www.postgrad.cher.edu.au/research_groups/bioengineering). Estos factores demuestran la complejidad de la producción de conidios y esporas de este hongo, además de la variedad de resultados. No obstante la mayoría de centro de producción maneja como concentración estándar para fermentación en sustrato sólido concentraciones entre los 10^7 y 10^8 conidios por mililitro de muestra. El producto del INA cae dentro del estándar de calidad manejado y aceptado por lo que se puede considerar de buena calidad la producción de sus cepas.

El cuadro 8 muestra concentraciones muy estables de producción de conidios por mililitro de los productos biológicos a base de *Trichoderma spp* producidos en el laboratorio del INA. El estándar aceptado por los centro de producción para la fermentación en sustrato sólido oscila entre concentraciones de 10^8 y 10^9 conidios por mililitro. Los resultados cubanos generalmente promedian 10^9 o 10^{10} conidios por mililitro y se tiene como unas de las mejores producciones del mundo de este hongo. No obstante la concentración de conidios se ve influenciada por la especie con que se trabaja según datos generados por Rifai desde 1964, y por las cepas de cada especie, lo que demuestra una ligamen entre la variabilidad genética dentro de este género taxonómico y la producción de conidios, aunque las variaciones generalmente no son mayores a un factor de multiplicación de 10 cuando se usa el mismo método de producción.

Para el caso del producto manejado en el INA la estabilidad de la producción de conidios registrada en el cuadro 8, se puede atribuir a que el producto del hongo *Trichoderma spp* que se produce es una mezcla de 3 especies del género: *T. viride*, *T.harzianum* y *T.hamatum*. Esta mezcla es la que puede provocar la estabilidad de la producción, la cual impide alzas o bajas muy sensibles en los conteos; a través de la contribución que cada especie individual puede brindar al producto, así como los muy probables intercambios genéticos que se den durante el desarrollo de la reproducción del hongo hasta la fase de esporulación, que es donde el producto se congela y se detiene su reproducción (PHC, 2002). En todo caso el producto obtiene una calidad buena de acuerdo al estándar, aunque la misma puede ser mejorada con la obtención de productos provenientes de una misma cepa altamente productora seleccionada en ensayos de rendimiento.

4.3 RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE PUREZA

4.3.1 MEDICIÓN DE LAS ESPORAS

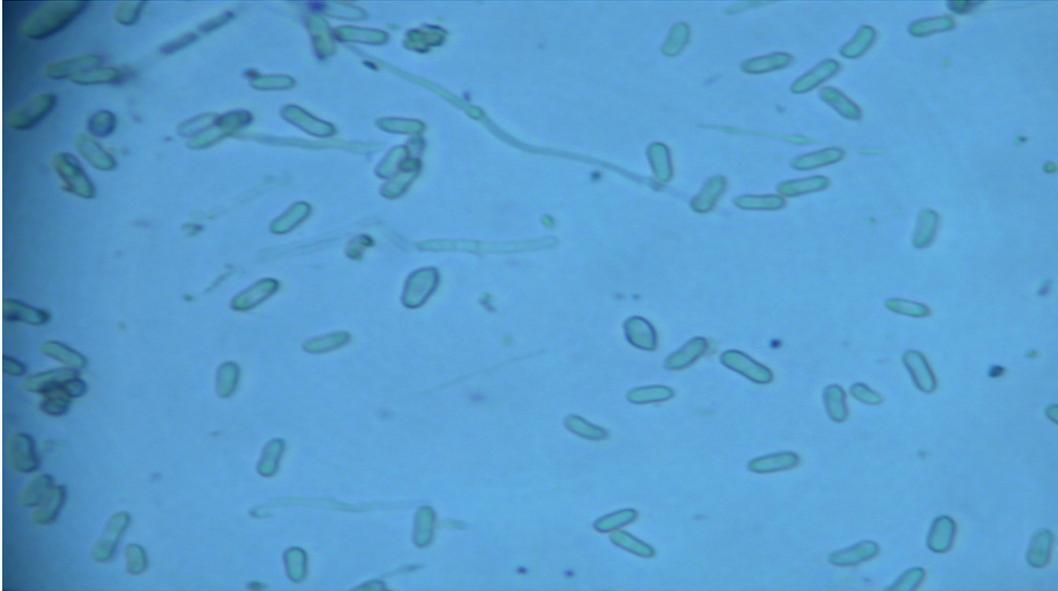
Las medidas realizadas sobre *Paecilomyces lilacinus* mostradas en el cuadro 9 revelan una alta desviación del promedio de las mediciones reportado como 2.86 para el largo del conidio, y 2.78 para el ancho, es decir que presentan conidios muy redondos (Cenipalma, 1992). Los grandes márgenes de desviación en cuanto a las medidas del largo de los conidios, son una medida indirecta de la variabilidad presente en las células del hongo. Ya que todas las células de los hongos son sometidas al mismo tratamiento y puestas a crecer bajo condiciones macroambientales idénticas, el factor de la interacción genotipo – ambiente debe ser de muy poca influencia y la única fuente posible de esta interacción se pueden atribuir a los microclimas dentro del empaque que contiene el producto. Por esta razón, es lógico pensar que el factor fuerte de la variabilidad se encuentre en el genotipo de las células madre de las colonias de los hongos. Esta alta variabilidad genética puede ser introducida por distintas cepas dentro de la misma especie, o por las modificaciones que sufre el genotipo de las células de hongos cuando son fortalecidas dentro de insectos como parte del proceso de producción evidenciado en el diagrama de flujo.

La variabilidad genética presente viene a ser confirmada por la comparación de las medidas encontradas con las medidas reportadas en la literatura. Se ha podido comprobar por medio de la investigación que el uso de células de microorganismos de manera frecuente en distintos procesos productivos conlleva a las mutaciones dentro de las cepas originales empleadas en el proceso, de manera tal, que después de cierto tiempo de uso se debe cambiar de cepa o de especie (Madigan et al., 1999).

Según el Cenipalma (1992) las especies de este género se dividen en dos secciones: *Paecilomyces* e *Isarioidea*. *P. lilacinus* pertenece a esta última sección y se han reportado medidas de diferentes tamaños, pero obteniendo una media de 3 a 4 x 1 a 2 μm , con conidios de forma globosa o bajamente fusiformes, pigmentados de púrpura a rosado violeta, que no produce clamidosporas. Para *P. fumoso roseus* se reportan medidas muy similares al promedio de la especie anteriormente citada, que presenta colonias rosadas con conidios fusiformes a cilíndricos. Otra especie de este género que tiene reportes es *P. javanicum* de conidios fusiformes con un tamaño de 4 a 6 x 1 a 1.5 μm con conidios de color blanco a crema, fusiformes o cilíndricos. Estas tres especies presentan la particularidad de que son entomopatógenas y su coloración según las condiciones ambientales puede resultar ser muy parecida: de color blancuzco hasta rosado o lila, además todas ellas poseen micelio septado (Barnett y Hunter, 1998).

Al establecer una comparación con las medidas reportadas se puede determinar que existe una relación altamente variable, no obstante tomando en cuenta la desviación estándar, las medidas correspondientes al largo se mantienen dentro del ámbito reportado. Para el ancho de los conidios, existe una mayor diferencia que comprueba una mayor variabilidad en esta medida. Examinando la morfología del hongo (ver figura 10) se puede ver su micelio septado y la forma globosa o fusiforme de sus conidios. En su crecimiento en la placa se nota el color morado o lila que le brindan sus conidios.

Dado lo anterior, las medidas más cercanas a lo encontrado y la descripción de la forma de los conidios permiten determinar al hongo trabajado como perteneciente a la especie *lilacinus*.



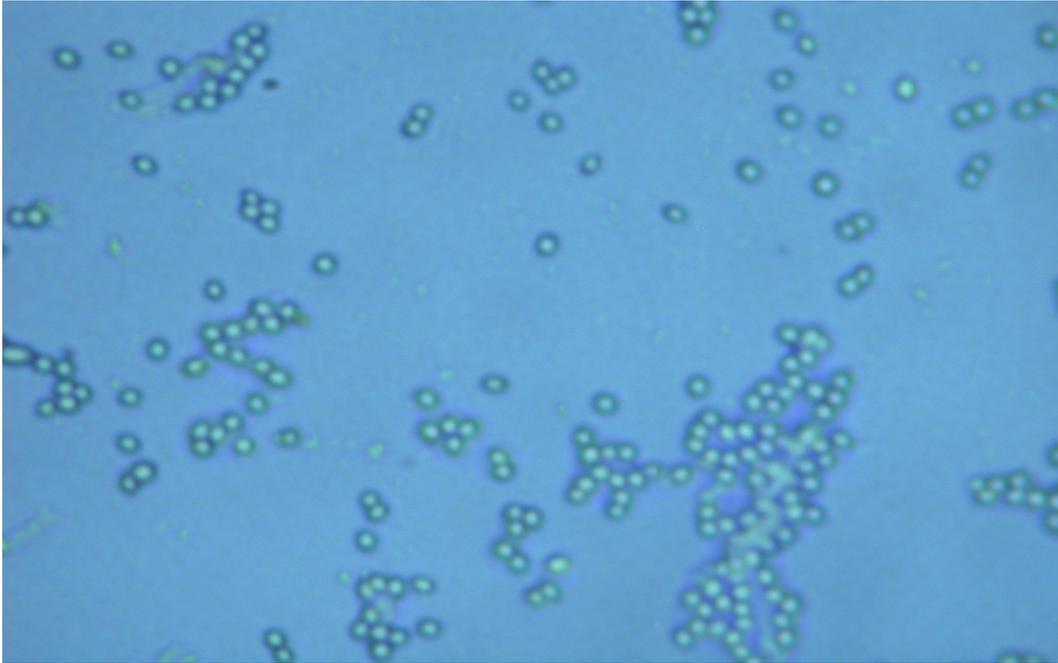
Microsoft Word

Figura 10. Conidios del hongo *P. lilacinus* observadas a 40 x en el microscopio de luz.
Obsérvese la forma levemente fusiforme de los conidios.

El cuadro 10 muestra que los conidios de *Beauveria bassiana* son de un tamaño regular, y que presentan una menor desviación en las medidas con respecto al promedio, lo cual sugiere índices de menor variabilidad genética que en el caso de *Paecilomyces lilacinus*. En este caso la relación del tamaño medido con la desviación encontrada en estas medidas, muestra que existe una mayor variabilidad en el ancho de los conidios que en el largo.

Al comparar las medidas encontradas en los productos con las medidas reportadas por Alves en 1986 (citado por García, 1993), se establece como medidas 2 a 3 x 2 a 2.5 μm . La comparación arroja una buena correspondencia de las medidas reportadas con las medidas encontradas y su desviación estándar. La descripción del hongo dada por Barnett y Hunter (1998), lo ubican como de conidióforos ramificados en zigzag con conidios esféricos y un micelio septado que forman colonias de color blanco crema en las placas de laboratorio.

Al observar la figura 11 y al ver la relación entre las medidas anteriormente establecida, se puede comprobar la especie de este hongo como *Beauveria bassiana*.



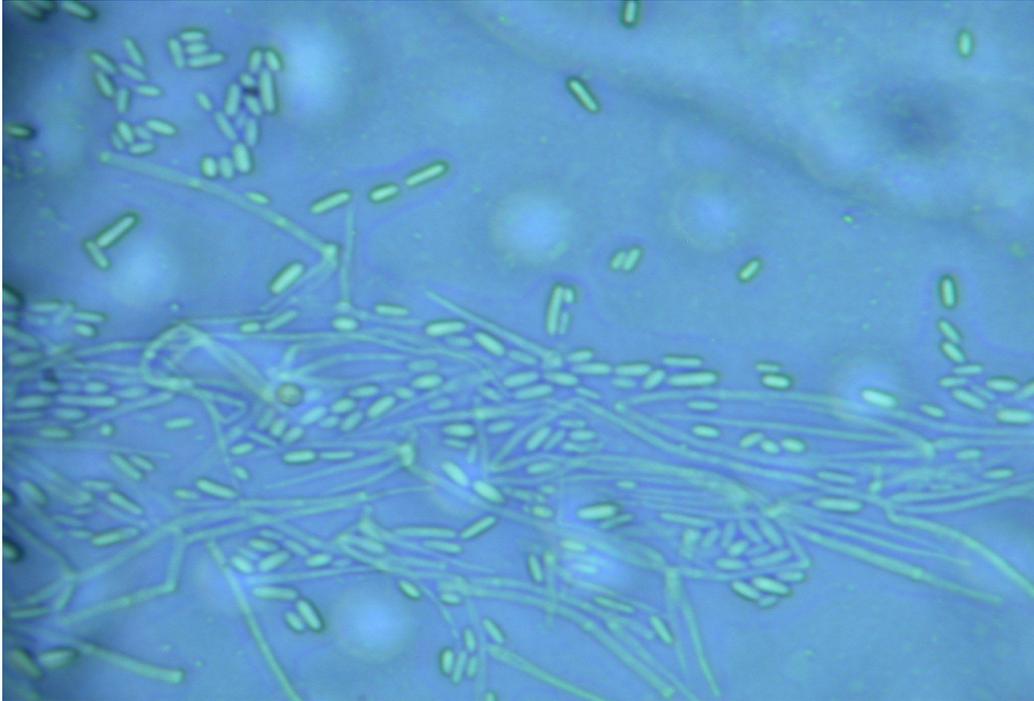
Microsoft Word

Figura 11. Conidios de *Beauveria bassiana* vistos a 40 x en el microscopio de luz. Obsérvense los conidios de forma esférica.

Los datos registrados en el cuadro 11, muestran otra relación de uniformidad en las medidas tomadas. La relación entre el largo y el ancho promedio ilustran la forma de óvalo estirado de los conidios de *M. anisopliae*. Además la relación entre las medidas promedio de el largo y el ancho en relación con sus correspondientes desviaciones estándar calculadas, muestran el equilibrio no sólo entre longitud y anchura, sino una proporción bien establecida en el perímetro de los conidios.

Los reportes recopilados por el Cenipalma (1992) para esta especie del género *Metarhizium* determinan que existen dos variedades de esta especie: la variedad *anisopliae* y la variedad mayor (Jhonston). Su diferenciación se debe al tamaño de sus conidios; para la variedad *anisopliae*, el largo se encuentra entre los 3.5 y los 9.0 μm con un promedio entre 5.0 y 8.0 μm . Para la variedad mayor (Jhonston), el largo se determina entre los 9.0 y los 18.0 μm , con un promedio entre los 10.0 a 14.0 μm .

Nuevamente la comparación y las medidas encontradas sugieren una pequeña variabilidad en cuanto a la longitud y anchura de los conidios. Las medidas encontradas calzan bien con los ámbitos determinados por otros investigadores para el largo de las medidas. Esta relación de una baja variabilidad, muestra lo idóneo de la especie usada en una producción estable, además del grado de uniformidad entre las distintas cepas de la misma variedad de esta especie, lo cual permite la rotación de los diversos aislados con que cuenta el laboratorio entre distintos ciclos de producción. Además, la descripción dada por el Cenipalma (1992) sobre esta especie la caracteriza como de esporas alargadas y en cadenas originadas en fálides, donde el conidio más joven es la base del conidióforo. Además los conidios presentan pigmentación verde oliváceo y su micelio es septado. La descripción anterior es muy adecuada para la morfología determinada en el laboratorio, lo cual es evidente en la figura 12. Las relaciones anteriormente establecidas entre las medidas y las descripciones reportadas con lo observado en el laboratorio, permiten corroborar la clasificación del hongo como *Metarhizium anisopliae* y ubicarlo dentro de la variedad *Anisopliae*.

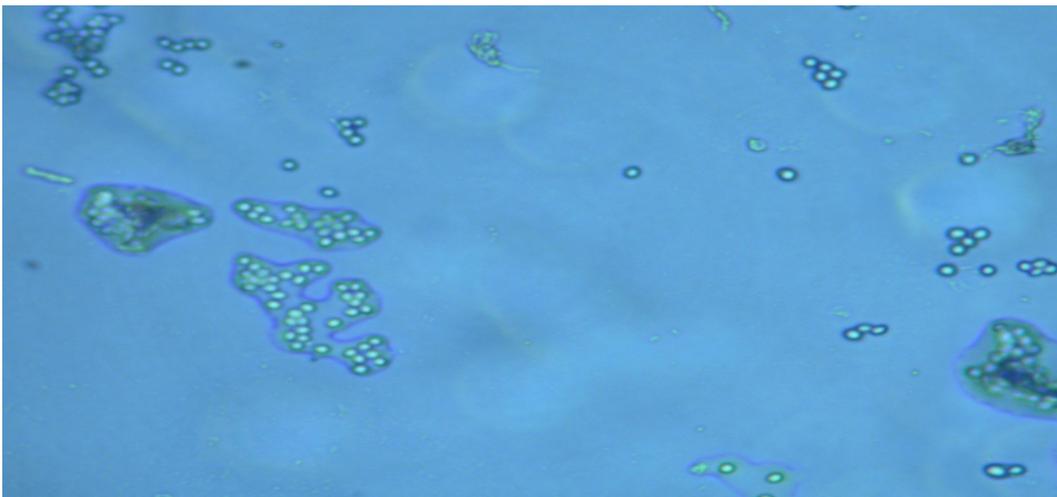


Microsoft Word

Figura 12. Conidios de *Metarhizium anisopliae* vistos a 40 x en microscopio de luz. Obsérvese la forma altamente fusiforme de los conidios.

La longitud de los conidios de *Verticilium lecanii* muestra una desviación estándar relativamente alta, pero al comparar la relación existente entre la magnitud de la desviación con la magnitud del tamaño del largo de los conidios, encontramos una buena proporción entre las medidas, o sea que, aunque la desviación pueda resultar grande, el gran tamaño del promedio de las medidas del largo amortigua los desequilibrios y brinda uniformidad en las mediciones. En cuanto al ancho de los conidios se debe decir que la desviación estándar presente, tomando en cuenta la relación que se establece entre el promedio de las medidas y la misma desviación, es de regular magnitud. Esta especie de hongo presenta una buena uniformidad en sus medidas, lo que es evidencia de poca variabilidad en cuanto a tamaño se refiere.

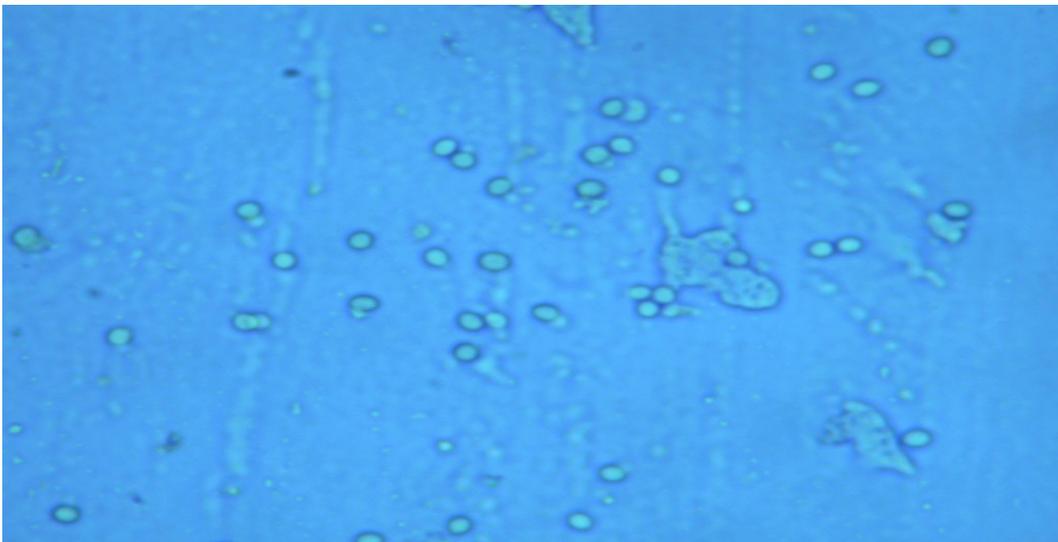
Los conidios de *Verticillium lecanii* son de aproximadamente 2.0 a 10.0 μm de largo por 1.0 a 2.0 μm de ancho (Hanson y Hilje, 1993). Al comparar estas medidas con las determinadas en el laboratorio se encuentra que el ancho promedio de los conidios es mayor que el reportado, no obstante, al aplicar la desviación estándar determinada, las medidas caen dentro del límite superior de 2 μm . En cuanto al largo, el promedio de lo determinado en el laboratorio cae perfectamente con y sin desviación estándar dentro del intervalo reportado por los mismos autores. Al comparar la morfología de los conidios del hongo que han sido dadas por diferentes autores se pueden describir sus conidios como pequeñas, ovaladas e insertadas en los extremos de conidióforos verticilados y delgados (Cenipalma, 1992). La descripción anterior coincide con la morfología del hongo trabajado en el laboratorio, lo cual es evidente en la figura 13. Todo lo anterior permite corroborar la identificación del hongo como *Verticillium lecanii*.



Microsoft Word

Figura 13. Conidios de *V. Lecanni* vistos a 40 x en microscopio óptico. Véanse los conidios esféricos y pequeños.

Las mediciones de las dimensiones de los conidios de *Trichoderma sp* no se realizaron porque el producto es una mezcla de las tres especies mencionadas al principio en la revisión de literatura. No obstante, es importante brindar una descripción de su morfología y compararla con los conidios obtenidos en el laboratorio. Rifai (1964), menciona en las características del género que sus colonias pueden ser flóculos disgregados o en forma de mechones compactos, con conidióforos complejos sumamente ramificados, cónicos o piramidales desalineados, con fialosporas de forma subgloboso, ovoide o elipsoide, con colores o tonos que varían desde verde grisáceo hasta verde claro, oscuro y amarillo. La siguiente figura ilustra los conidios vistos al microscopio en el laboratorio.



Microsoft Word

Figura 14. Conidios de *Trichoderma spp.* vistos a 40 x en el microscopio de luz. Nótese la forma subglobosa de los conidios (fialósporas en este caso) y su color verde.

4.3.2 RASTREO DE CONTAMINANTES

Los resultados mostrados en el cuadro 13 permiten comprobar la excelencia en el proceso que conlleva la elaboración de los bioproductos. Generalmente el grado de contaminación o el tipo de contaminantes presentes en este son un parámetro ideal para definir un producto como de buena o mala calidad. Todo tipo de producto existente que deba tener un amplio contacto con los seres humanos, en especial con la dieta, debe cumplir parámetros de inocuidad y pureza estrictos. En el caso de los bioproductos la variable de la pureza no es menos exigente y estricta en cuanto a la contaminación y la carga de microorganismos contaminantes que porta.

Las pruebas realizadas con cada uno de los productos sometidos al examen, demuestran la casi inexistencia de microorganismos contaminantes en el producto, pese a que el sustrato empleado en su fabricación y el factor de humedad dentro del empaque facilitan en gran manera el crecimiento de otros microorganismos. Los resultados demuestran un promedio de un 100% de pureza en el producto en cualquiera de las dos diluciones empleadas en los ensayos. La dilución 10^{-3} resalta el grado de pureza, pues es una dilución bastante baja que permite un marco de muestreo de contaminantes muy amplio dentro de un producto (Echandi, s.f.). La dilución 10^{-6} brinda un apoyo a la contaminación detectada con la dilución anterior, además de brindar una idea indirecta de la concentración del hongo en relación con posibles microorganismos invasores.

El grado de contaminación de un producto con otros microorganismos, es usado como un factor clave para introducir mejoras en los procesos que conlleva una determinada producción (OMS, s.f.). Al aplicar este principio en el caso de todos los productos fúngicos examinados se puede concluir que el proceso productivo además de barato, sencillo y eficaz es también adecuado para garantizar altos niveles de pureza y de inocuidad.

Los estándares adecuados para la pureza del producto varían del 85 al 100% según los centros de producción de los que se tome la información. Por ejemplo los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos distribuidos en Cuba brindan en sus productos una pureza del 100% y cualquier producto de los suyos que incumpla con el estándar determinado en su país, no puede ser comercializado ni distribuido a los agricultores (Ciego de Ávila, 1999). Los centros de reproducción en todo el mundo pertenecientes al proyecto LUBILOSA (Heviefo y Jenkins, 1998), descartan cualquier producto que presenta algún tipo de contaminación; su estándar es también el 100%. Para el caso de los productos del Cenicafé (1997), el estándar fijado es del 85%, pero a un así, la calidad de sus productos no es discutida en ninguna parte del continente a donde sus productos son adquiridos. En otras partes del mundo como Asia y Europa, los laboratorios reportan sus estándares que fluctúan entre el 90 y el 100 % de pureza (Jenkins y Heviefo, 1998; Ciego de Ávila, 1999; www.fao.org/docrep/t0533e/t0533e03.htm; Deshpande, 2001).

Otro factor importante lo constituye el hecho de que se debe examinar el tipo de microorganismos contaminante. Los centros y laboratorios de producción mencionados coinciden plenamente en que el producto debe ser inocuo para las plantas, animales y para el ser humano, por lo cual cualquier patógeno para estos, no debe encontrarse nunca en el producto; en caso contrario debe ser destruido con cuidados de aislamiento y esterilización. Toda la información recopilada favorece el resultado de que un producto considerado de calidad superior debe tener más de un 85% de pureza, debe estar libre de fitopatógenos y de patógenos para el ser humano y los animales, además de crecer sobre un sustrato que no presente desprendimiento de sustancias químicas nocivas para el hombre, animales o plantas (Acribia, 1992).

Los ensayos realizados con *Trichoderma spp* nos muestran un 100% de pureza en las preparaciones examinadas. El no desarrollo de otros microorganismos se puede atribuir además de lo adecuado de las técnicas de producción a su acción antagonista contra otros hongos de diferentes géneros. La enorme investigación desarrollada en el mundo entero durante casi todo un siglo, demuestran el poder que presentan los hongos pertenecientes a este género como productores de una amplia gama de antibióticos, y de sustancias con una amplia acción enzimática. Se han encontrado cerca de 10 sustancias con acción antibiótica no basada en enzimas, se conocen sustancias propias del metabolismo secundario con función desconocida y algunas otras con función bactericida (First international Trichoderma- Tricel Join Meeting, 2002). Además se han determinado muchos tipos de enzimas que abarcan una amplia gama de sustratos. Se conoce que las diferentes enzimas producidas por *Trichoderma spp* puede tener acción individual o a manera de una cascada conjunta. Entre estas enzimas sobresalen las quitinasas, las glucanasas, las GTPasas y las celulasas (IOBC/WPRS-EFPP, 2000). Esta capacidad de “ataque” permite que unas enzimas actúen justamente sobre los productos de degradación de otras anteriormente secretadas, lo cual multiplica la gama de sustratos que pueden ser susceptibles a la degradación.

Si sumamos a lo anterior la agresividad en la velocidad de crecimiento que presenta el micelio de este género, se obtiene una alta probabilidad de éxito en la colonización del sustrato empleado en la producción del bioproducto, en detrimento del crecimiento de otros microorganismos colonizadores, ya sean bacterias u hongos. Esto no quiere decir que siempre se tendrá éxito en la colonización o producción, debido a que una técnica deficiente en la elaboración de los productos, conlleva a un retardo en el ciclo de crecimiento del hongo, por lo cual los productos enzimáticos y antibióticos característicos del metabolismo secundario, tardarán más tiempo en aparecer sobre el sustrato, por lo cual otros microorganismos de crecimiento rápido quedan en ventaja competitiva y pueden llevar al traste con la producción.

Los hongos entomopatógenos presentan una baja o nula acción antibiótica, debido a que su especialidad es la producción de toxinas que afectan el sistema nervioso de insectos y de enzimas que degradan las células de los mismos; por lo cual existen una amplia posibilidad de invasión de otros microorganismos sobre productos a base de estos hongos, no obstante la contaminación registrada en algunos casos fue muy baja o inexistente.

Metarhizium anisopliae y *Beauveria bassiana* presentaron un 100% de pureza en las pruebas directas sobre los bioproductos en la dilución 10^{-3} , lo cual, a pesar de ser entomopatógenos, pone en evidencia que más que la acción antibiótica o enzimática de cada hongo, la pureza del producto se determina por la técnica empleada en su producción y nos permite comprobar lo adecuado de la misma a la hora de determinar la calidad de un producto.

Beauveria bassiana presentó un 97. % de pureza en la dilución 10^{-6} , ya que del total de colonias crecidas en las placas, en algunas se registró una colonia de *Paecilomyces lilacinus*, lo cual brinda evidencia de contaminación cruzada dentro del área de producción del laboratorio.

En el caso de *Paecilomyces lilacinus* la pureza determinada correspondió a un 99%, detectándose, de un total de 114 colonias, una colonia correspondiente a una bacteria en la dilución 10^{-6} , este porcentaje de pureza no obstante continua siendo muy alto y no tiene un valor significativo en la relación de este producto con los otros productos. La contaminación bacteriana en cuanto al tipo de bacteria encontrada, evidencia un proceso de contaminación cruzada. La bacteria encontrada fue *Erwinia herbicola*.

Al analizar la fuente de la cual pudo provenir la contaminación, es necesario indicar que el laboratorio cuenta con esta bacteria dentro de su colección y se está usando en ensayos preliminares para determinar el poder de algunas bacterias como controladores biológicos de otras enfermedades bacterianas, por lo cual es altamente probable que la contaminación sea producto de los trabajos rutinarios de investigación que se realizan muchas veces dentro de la misma área de producción, por lo cual se puede determinar como la causa de la contaminación el cruce en las actividades de producción y las de investigación.

Verticillium lecanii presentó una contaminación no calculable o cuantificable en la dilución 10^{-3} , en la cual del total de colonias (incontables) aparecieron tres colonias pertenecientes a bacterias que no se lograron identificar, únicamente se calificaron como bacilos gram positivos. En la dilución 10^{-6} apareció una colonia bacteriana idéntica del total de 52 colonias de microorganismos presentes, lo cual permitió calificar la pureza del producto a un 98% de presencia de *V. lecanii*, con una contaminación bacteriana del 2%. La razón más lógica para la contaminación es el metabolismo lento de *V. lecanii*, que permite el desarrollo de bacterias oportunistas o contaminantes microbianos que sean introducidos durante el proceso productivo dentro de la bolsa con el producto. A pesar de lo anterior, este producto también logra cumplir con los estándares establecidos y aceptados a nivel general. Las pruebas de pureza son ilustradas en la figura 5, donde se muestra una repetición de las pruebas realizadas en la dilución 10^{-3} . Aparecen en la fotografía de izquierda a derecha: *Beaveria bassiana* contaminada con una colonia de *P. lilacinus*; y *Metarhizium anisopliae* demostrando su pureza del 100%.

Todos los bioproductos examinados cumplen con los estándares planteados al inicio, es decir su pureza en cuanto a la cantidad de contaminantes, si no es de un 100% se encuentra en un porcentaje cercano a él. El tipo de contaminantes encontrados no son fitopatógenos o patógenos de animales o seres humanos y el sustrato usado (arroz) no es tóxico. Dado todo lo anterior, la conclusión de las pruebas de pureza, colocan los bioproductos del Laboratorio de Fitoprotección como de excelente calidad y altamente inocuos, lo cual garantiza seguridad económica y laboral para los agricultores que los emplean.

4.4 PRUEBAS DE GERMINACIÓN

Los resultados muestran claramente que casi todos los hongos excepto *V. lecanii* tiene porcentajes de germinación *in vitro* superiores al 90% dentro de 24 horas después de ser incubados a una misma temperatura de 25° C.

Los reportes internacionales que provienen de Cuba, México , Colombia, Canadá, Alemania, Suiza, España y Benin establecen para este parámetro dos valores significativos dependiendo del hongo en cuestión (Conway, 1981; Tamara Ltd, 1989; Ciego de Avila, 1999; Cenicafe, 1997; Mc Coy, ; Deshpande, 2001; IOBC/WPRS-EFPP, 2000): para *V. lecanii* se ha establecido como resultado aceptable de un 80 a un 85% de germinación alas 24 horas; y para el resto de los hongos trabajados en la práctica se ha establecido una germinación del 90% como mínimo para ser considerados de germinación adecuada. La germinación *in vitro* es un parámetro que permite obtener una proyección de cómo podrá ser el comportamiento del hongo *in vitro*, además de que condiciona los requerimientos para aplicar este tipo de productos en el campo (Cenicafe, 1997).

Generalmente se recomiendan las aplicaciones a las 4 de la tarde, esto con el fin de evitar la radiación ultravioleta que afecta la germinación de los conidios de casi todos los hongos existentes. Se han realizado estudios que determinan que un producto que germina *in vitro* bajo los valores establecidos anteriormente, cuando es aplicado en el campo generalmente a las 12 horas han germinado la mayoría de sus conidios, por lo cual si es aplicado en el campo al atardecer la germinación y el desarrollo del micelio no se verá afectado por las radiaciones ultravioleta en los estadíos de desarrollo más tempranos, que es cuando más daños ocasionan este tipo de espectros (Obregón, 2002).

Basados en los estándares mencionados y en los resultados obtenidos en las pruebas de germinación *in vitro* realizadas, se puede calificar los bioproductos generados como de una buena germinación y con resultados promisorios para las aplicaciones in vivo dentro de fincas, aunque se debe tener en cuenta el clima y las condiciones ambientales propias de cada región.

La división realizada en los estándares aplicables entre *V. lecanii* y el resto de los hongos se debe principalmente al rango de temperaturas en que estos pueden desarrollarse y la especificidad a que estos se apegan a dicha temperatura. Desde ese punto de vista se debe decir que *V. lecanii* disminuye su crecimiento si se encuentra a temperaturas mayores de 22° C y reduce su crecimiento y germinación hasta un 80% si crece a 28° C. Este es un hongo muy sensible al cambio de temperatura y decae notablemente pasando el umbral de los 22° C, razón por la cual es de mucha aplicación en climas fríos como la zona norte de Cartago, Coronado y las zonas altas del Barba de Heredia.

Por el contrario, los otros hongos de interés, trabajan a temperaturas generalmente mayores y no son tan exigentes en cuanto a temperatura, pues manejan con facilidad en su crecimiento un rango de entre 23 a 29° C. Debido a lo anterior, cuando se realizan pruebas de germinación de varios hongos a la misma temperatura (25° C) para todos, se hace la distinción de un valor más bajo para *V. lecanii* para calificarlo de calidad aceptable en cuanto a germinación. Las siguientes figuras muestran la germinación de algunos conidios de varios hongos a las 24 horas de incubación.

A-



Microsoft Photo Editor

Figura 15. Germinación de conidios de *V. lecanii* a las 24 horas de incubación.

A-



B-



Microsoft Photo Editor

Figura 16. Germinación de *P. lilacinus* (A), *B. Bassiana* (B) a las 24 horas de incubación.

A-



Microsoft Photo Editor

Figura 17. Germinación de conidios de *Trichoderma sp* a las 24 horas de incubación.

Todas las figuras muestran observaciones microscópicas realizadas con el lente de 40 aumentos. Las mismas muestran características importantes de lo que será el micelio de cada hongo en particular; así vemos como de la espora mostrada de *V. lecanii* salen 4 hifas principales que demuestran la capacidad de formación de un micelio abundante que este hongo tiene y que en cierto momento adquiere una apariencia algodonosa. La germinación de *P. lilacinus* muestra hasta 5 hifas saliendo de la misma espora que formarán otro micelio abundante y sumamente enredado sobre sí mismo. Por el contrario *M. anisopliae* que únicamente presenta una hifa saliendo de su espora dando apariencia de un organismo flagelado, esto corresponderá a su micelio escaso y de pequeño tamaño en relación con el desarrollo de los hongos anteriormente mencionados.

En las figuras anteriores, también se puede observar la deformación que sufren los conidios cuando entran en germinación, donde en general se puede decir que sufren alargamiento o prolongaciones en ciertas áreas; en las cuales aparecen bultos como pequeñas yemas las cuales se prolongan para formar las hifas y luego el micelio.

4.5 PRUEBAS DE EFECTIVIDAD DE LOS HONGOS

4.5.1 PRUEBAS DE EFECTIVIDAD DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

La especie escogida para ser parasitada en este ensayo fue el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae* (L.) o gorgojo negro, el cual es la plaga más destructiva a nivel de granos almacenados. Su importancia en países altamente consumidores de arroz como el nuestro es enorme y por eso fue escogido para el ensayo. El gorgojo adulto vive en promedio de 4 a 5 meses y cada hembra pone alrededor de 300 a 400 huevos dentro de los granos durante ese período a razón de un huevo por grano. Este es un insecto pequeño de color castaño, que mide aproximadamente de 3 a 5 mm de largo y la cabeza se le prolonga en forma de hocico delgado y largo al final del cual tiene un par de robustas mandíbulas. Los efectos del hongo sobre este insecto se pueden observar en el cuadro 15.

Existen muchos otros reportes de insectos infestados por *Metarhizium anisopliae*, donde por ejemplo en Cuba se usa como controlador del picudo acuático del arroz, el picudo negro del plátano, el falso medidor de pastos o mocas, los nematodos *Dolichotetranychus* y *Floridanus*, y larvas de *Phyllophaga sp.* y *Cosmopolitus sordidus* (Ciego de Avila, 1997). Con este último se han encontrado LT_{50} (tiempo letal medio) cercanas a los 10 días. En Ucrania y Benin se usa en el control de *Tenebrio spp* en donde se han obtenido LT_{50} que oscilan entre los 9 y los 13 días con dosis iguales a la ensayada en esta práctica con un concentración de 2.57×10^9 conidios por gramo de arroz (Deshpande, 2001).

En Colombia se ha encontrado atacando larvas de *Glena bisulca* Rindge, *Caligo sp*, *Aeneolamia varia*, *Ancognatha scarabaeoides* Burnmeiste, *A. Ustulata*, *Clavipalpus pos. Ursinos* y el gusano de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache) (Cenipalma, 1992). En el INA se ha demostrado su efectividad en contra de 40 tipos de abejones, 20 tipos de larvas de mariposas, mosca blanca, cucarachas, termitas, barrenadores de la caña de azúcar y garrapatas (Obregón, 2002).

La figura 6 construida con los resultados obtenidos, revela cosas interesantes. Entre ellas se debe hacer notar que para el segundo día después de la aplicación, se empieza a producir la muerte de algunos de los insectos más susceptibles de la población y que la LT_{50} se alcanza antes de los 4 días después de la aplicación. La idea generada por estos datos muestra la enorme rapidez con que dicho producto puede reducir el tamaño de una población plaga. La curva correspondiente a la muerte de insectos presenta varias fases bien definidas, además se nota que el crecimiento en la cantidad de insectos muertos se lleva a cabo a una tasa muy similar siempre. Se puede decir que existe una fase estacionaria (no se observa en el gráfico correspondiente) que dura aproximadamente tres días y que, según Rogg y Tovar (1998), corresponden a la entrada de los conidios del hongo dentro del cuerpo del insecto y la producción de toxinas que paralizan el sistema nervioso del insecto. Cerca del día tres se empieza a dar la muerte de los insectos, aquí es donde comienza una fase exponencial de muerte que culmina con el inicio de una fase lineal en el comportamiento del parámetro muerte en donde se alcanza la LT_{50} , una vez pasado este punto se empieza con una desaceleración progresiva de la muerte, no producto de baja en la efectividad, sino producto de la falta de insectos vivos en la cámara. La velocidad con que todos los insectos dentro de la cámara húmeda fueron eliminados es impresionante tomando en cuenta que se da por relaciones entre dos seres vivos, no entre un ser vivo frente a compuestos químicos sintéticos.

La muerte total de la población permite comparar en gran medida la efectividad biológico con la química. Resulta interesante que aunque los agroquímicos tiene tasas de velocidad más altas que logran la muerte de un insecto en minutos nunca alcanzan el control total de la población y se hacen necesarias nuevas aplicaciones después de algunos días de aplicado el producto por primera vez; debido a la degradación y pérdida del producto en el ambiente. En contraposición, las aplicaciones biológicas caen dentro de un rango de varios días para controlar un población, pero una vez hecha la aplicación, los conidios restante sirven como inóculo inicial para mantener baja la población de la plaga por más tiempo (Obregón, 2002).

En cuanto a la parasitación se refiere, la misma empieza a los cinco días, dos días después de la primera muerte de un insecto. Esta relación de dos días de diferencia posteriormente se amplía hasta a tres días de diferencia y se mantiene así hasta la parasitación total de los insectos. La diferencia entre el día de muerte del insecto y los días que pasan para su parasitación se obtiene mejor al comparar la LT_{50} de la muerte y de la parasitación, la cual corresponde a tres días. Estos tres días adquieren la significación de la velocidad en que el hongo es capaz de acabar las reservas alimenticias que obtenía en el cuerpo del insecto, desde el momento en que produce sus primeras toxinas dentro del insecto. Si tomamos como dosis letal recomendada la relación de 300 gramos del producto por cada 16 litros de agua, se obtiene como tiempo letal medio para esta dosis, casi 4 días para la muerte y casi 7 días para su parasitación. Es decir que en 7 días se alcanzaría un nuevo ciclo de infección de otros insectos con el mismo producto en una sola aplicación, pues la parasitación del insecto expone nuevos conidios al ambiente, que provocan la diseminación del hongo de manera muy efectiva (Obregón, 2002). Los insectos parasitados y no parasitados se pueden observar en la figura 18; en la cual la parasitación se evidencia por la esporulación del hongo dentro y sobre el cuerpo del insecto.



Microsoft Photo Editor

Figura 18. Gorgojo completamente parasitado y otro en proceso de parasitación por *M. anisopliae*. Es evidente el crecimiento del hongo y la esporulación sobre el insecto.

La diferencia entre los insectos totalmente parasitados y parasitados en forma parcial o no parasitados en el mismo tiempo de exposición e incubación a los conidios del hongo se presenta sobre el insecto en forma de micelio lleno de esporas característico de este hongo, es decir, abundante y de color verde oliva. Otra evidencia de la parasitación es la momificación del cuerpo, en la cual el insecto se vuelve de una dureza y una rigidez mayor que la normal, esto impide que el insecto a su muerte encoja las partes móviles de su cuerpo (extremidades, alas, mandíbulas y hocico) y que disminuya de tamaño y de volumen, por lo cual, el insecto parasitado, mantiene su tamaño original y se aprecia más grande que el insecto muerto pero no parasitado.

V. lecanii presenta en la literatura un amplio rango de hospederos entre los que sobresalen coleópteros, dípteros, homópteros, lepidópteros e insectos de la orden Collembola. *V. lecanii* se ha reportado en muchos países atacando diferentes insectos, entre ellos se encuentran reportes desde Colombia donde el Cenipalma (1992) lo menciona infestando escamas *Saissettia coffeae* (Walker), *Coccus viridis* (Green), el gusano de la yuca *Erinnys ello* (L.), el áfido *Myzus Persicae* (Sulzer) la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Se ha encontrado también que ataca ácaros, arañas, algunos nematodos como *Heterodera schachtii* (Persoon), la roya del geranio *Uromyces dianthi* (Persoon) y la del caféto *Hemileia vastatrix* Berk y Br. Otras especies susceptibles en Colombia son las escamas *Selenapsidus articulatus* (Morgan), *Unapsis citri* (Comstock), otras moscas blancas como *Dialeurodes citrifolii* (Morgan) y *Aleurothrixus floccosus* (Maskell).

La información obtenida de Ciego de Ávila en Cuba (1999) indica que este hongo es usado para el control biológico de mosca blanca, áfidos, garrapatas y *Trips palmi*, y en nuestro país el INA lo recomienda contra áfidos, mosca blanca, ácaros, arañas, nematodos; y como antagonista de royas y mildius polvosos (Obregón, 2002).

El parámetro de muerte generado en el ensayo (ver cuadro 16) da una idea clara de la efectividad del producto fúngico usado. Al observar la figura 7, la curva de acción sobre la muerte de los insectos demuestra la enorme velocidad y tasa de virulencia del hongo sobre este insecto. La curva parece reflejar solamente dos fases bien claras. Existe una fase de latencia correspondiente a los eventos de ingestión de conidios y producción de toxinas como se discutió anteriormente; esta fase duró aproximadamente tres días hasta que se produjo la primera muerte de un insecto. Posteriormente la segunda fase que refleja la curva corresponde a una fase lineal de una duración que se extiende desde el día 3 en que muere el primer insecto, hasta el día 6 en que muere el último áfido. La LT_{50} se alcanza antes de los 4 días y medio. Esto denota la velocidad con que se provoca la muerte de un insecto promedio de una población de dicha especie.

En cuanto a la relación de parasitación, se debe decir que presentó un comportamiento idéntico a la relación de muerte de los insectos. El primer indicio de la parasitación de un insecto se da a los 4 días, un día después de la primera muerte. La diferencia entre las LT_{50} de la muerte y la parasitación muestran la misma diferencia de un día de ocurrencia. Este período de un día, evidencia la velocidad con que el hongo agota las reservas de energía y alimento dentro del cuerpo del insecto hasta que deja solamente el exosqueleto de quitina. La parasitación total de los áfidos se da a los 7 días después de la aplicación del producto y como se explicó en las pruebas de efectividad de *Metarhizium anisopliae*, este paso aporta un inóculo secundario para controlar y mantener baja una población plaga en condiciones ambientales adecuadas. Las diferencias entre los insectos parasitados y no parasitados se muestran a través de la siguiente figura tomada en el laboratorio:



Microsoft Photo Editor

Figura 19. Afido parasitado y no parasitado por *Verticillium lecanii*. Nótese el crecimiento del micelio sobre el insecto de la izquierda.

En este caso, la parasitación del insecto no es tan abundante, pero las motas blancas propias del micelio de *V. lecanii* sobresalen en la figura donde empiezan a cubrir el cuerpo del insecto. En este caso la muerte y el proceso de descomposición propiciada por el hongo dentro del cuerpo del insecto conllevan a un fenómeno donde el cuerpo del insecto literalmente se deshace a medida que es parasitado, inclusive se puede apreciar la pérdida de la mayoría de las extremidades del insecto parasitado. Por lo anterior, el áfido parasitado aparece de un menor tamaño con respecto al áfido no parasitado.

Para *Beauveria bassiana* los gorgojos del arroz fueron los sujetos experimentales escogidos por las razones económicas expuestas anteriormente, además por los múltiples reportes que se tiene de este hongo parasitando y controlando poblaciones plaga de coleópteros.

El Cenipalma y el Cenicafé de Colombia tiene numerosos reportes (1992, 1997) y aislados de este hongo proveniente de insectos tales como *Loxotoma pos elegans*, *Monalonion dissimulatus* en cacaoteros donde se determinaron como dosis óptimas las aplicaciones de 2.5×10^8 conidios por mililitro. Se ha encontrado también en *Matamasius hemipterus sericeus* (Oliver), en el defoliador de la palma *Stenomacropis cecropia* Meyrick, *Brassolis sophorae lurida* Stickel. Además se han logrado la parasitación de *Sibine sp* y *Sibine fusca*.

En Rusia se ha recomendado su uso para más de 60 insectos, en Estados Unidos para 170 tipos diferentes de insectos, en Cuba, México, Brasil y Bolivia se recomienda para 50 tipos; en especial para controlar las plagas asociadas a la caña de azúcar, banano, hortalizas y en café como controlador de la broca. (Obregón, 2002).

Los resultados observados en el cuadro 17 muestran los datos obtenidos de la muerte y la parasitación de los insectos. Al analizar el comportamiento de los insectos muertos (ver figura 8) con respecto al número de días transcurridos, se puede determinar el día 5 como el LT_{50} , es decir, donde la mitad de la población murió bajo la misma dosis. Entre todos los hongos entomopatógenos controlados en esta práctica resulta ser el que tiene el LT_{50} más alto, incluso al ser comparado con la efectividad de *Metarhizium anisopliae* en el que utilizó la misma especie de coleópteros provenientes del mismo lugar. No obstante la muerte de la población total es muy rápida con una duración de 4 días, desde el día dos en el que se da la primera muerte hasta el día 6 en que muere el último insecto en la cámara. Este detalle es importante ya que la velocidad de muerte de la población total es igual que la obtenida en las pruebas con *Verticillium lecanii* y es aún más rápida en comparación con las pruebas de *Metarhizium anisopliae*, a pesar de tener un tiempo letal medio mayor que estos otros hongos.

Este detalle nos permite deducir que, después de alcanzada la muerte de la mitad de la población, *Beauveria bassiana* incrementa la velocidad con que provoca la muerte de los insectos, a diferencia de los otros hongos mencionados, los cuales desaceleran la velocidad con que provocan la mortalidad. Este detalle es más fácil de visualizar a través de la observación de la magnitud que presentan las pendientes de las líneas que describen el comportamiento de la mortalidad en las figuras 6,7 y 8.

El proceso de parasitación provocado, presenta un comportamiento inestable con aceleraciones y desaceleraciones en el ritmo alcanzado. El proceso empieza en el día 5 y dura menos de 2 días en alcanzar el LT_{50} y es el hongo que presenta en este caso, el menor tiempo de parasitación de la mitad de la población y el segundo en el caso del tiempo de parasitación de la totalidad de la población, pues *V. lecanii* se encuentra en primer lugar en este caso. A lo largo del comportamiento de la parasitación se nota como la diferencia entre los días en que el insecto muere y los días que tarda en ser parasitado es muy irregular pues inicialmente la diferencia es de 3 días, a medida que el tiempo avanza y se alcanza el tiempo de parasitación de la mitad de la población el tiempo disminuye hasta cerca de 1.5 días, para luego volver a ensancharse hasta alcanzar 4 días de diferencia en la parasitación de la totalidad de la población. Es importante notar la total oposición de la línea que describe el comportamiento de la mortalidad con respecto a la línea que describe el comportamiento de la parasitación, donde forman una especie de imagen de espejo claramente definida. La parasitación del gorgojo por *Beauveria bassiana* es muy evidente en la figura 20, la cual muestra como el cuerpo del insecto a sido cubierto por el micelio del hongo, a la vez que éste último empieza a entrar en la fase de esporulación al agotar las reservas del cuerpo del insecto.



Microsoft Photo Editor

Figura 20. Insecto parasitado y no parasitado por *B. bassiana*. Véase las dos fases del ciclo de vida que se presentan en el insecto parasitado.

El insecto parasitado presenta una particularidad que es importante hacer notar: presenta al hongo en dos fases de su crecimiento; la primera la observamos sobre el hocico en forma de cono del insecto en la cual se aprecia la forma algodonosa del micelio blanco propia de la fase estrictamente vegetativa; la segunda se presenta en la parte baja del insecto donde se observa la esporulación del hongo determinada por la coloración crema y apariencia polvorienta del hongo. Esto hace presumir que la colonización del cuerpo del insecto inició de primero o fue más rápida en la parte baja del cuerpo que en la parte superior correspondiente al hocico, por lo cual esta última presenta el hongo aún en etapas tempranas de su ciclo de vida.

La especie de nematodos usada en las pruebas de efectividad de *Paecilomyces lilacinus* fue identificada como perteneciente al género *Trichodorus* según la clave fotográfica de identificación de nemátodos de Mai y Lion, (1975). Este nematodo generalmente se encuentra atacando raíces suculentas y produce problemas de sistemas radicales poco desarrollados (Mai y Lion, 1975).

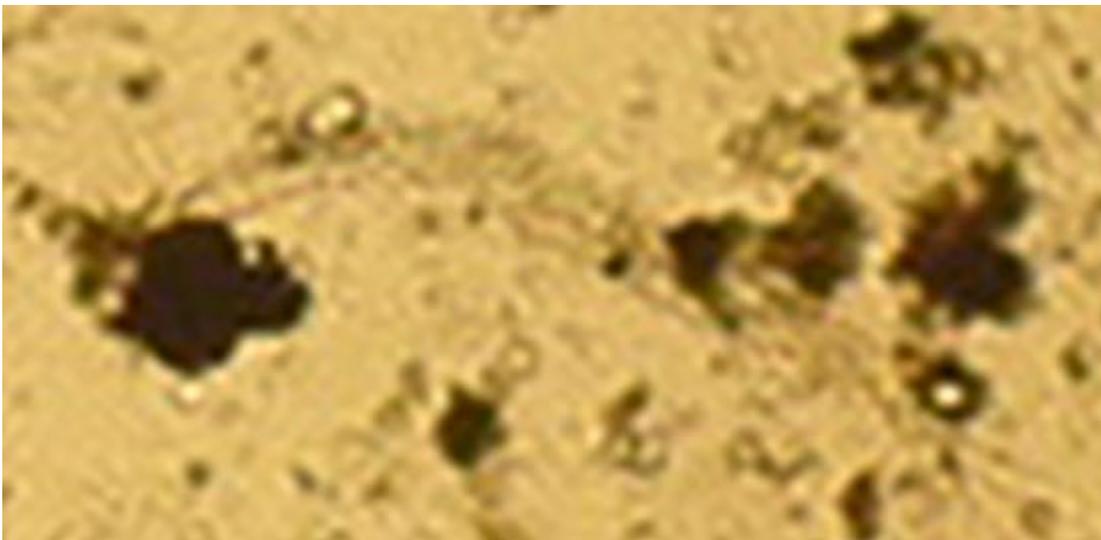
Se tienen reportes de la efectividad de *Paecilomyces lilacinus* actuando en Cuba, Colombia, Australia y algunos países europeos como Alemania, España, Ucrania, etc; contra nemátodos de diferentes especies y medios de vida (Obregón, 2000).

Al observar la figura 9, la cual muestra el comportamiento de la relación establecida, se puede ver como para el parámetro de mortalidad de insectos la primera muerte se da cerca del día 2 y se logra el exterminio total de la población antes del día 9, lo cual brinda un rango de una semana para controlar la población. El tiempo letal medio LT_{50} , es decir cuando se alcanza la muerte de la mitad de la población, se alcanza a los 6 días y medio, solamente 4 días después de iniciar la muerte del primer insecto, lo cual implica una velocidad aceptable de mortalidad. Si se observa la línea descrita en la figura, se puede apreciar lo sostenido del avance en la mortalidad de los insectos, no obstante se pueden apreciar que del día 2 al día 4, al igual que del día 7 al 9 se presentan dos fases muy lineales que representan una aceleración constante en la velocidad de muerte de los nematodos. El período comprendido entre el día 4 y el día 7 es muy irregular, incluso se puede observar una leve tendencia a la desaceleración del proceso de mortalidad cerca del día 6.

Para los procesos de parasitación desencadenados, la figura 9 muestra como el primer individuo parasitado aparece en el día 4, dos días después de la primera muerte. Al llegar el día 10 la parasitación no se ha dado en el 100% de los nematodos, sino que alcanza solamente a 25 de los 30 individuos, lo que corresponde, según el cuadro 18, al 83.3%. El tiempo de parasitación media (PT_{50}) obtenido es de 7.5 días, un día más tarde que el tiempo de mortalidad medio. Al comparar el tiempo medio de mortalidad y el tiempo medio de parasitación, se puede inferir que la aceleración fue mayor en el caso de la parasitación que en el caso de la mortalidad, lo que viene a ser corroborado por la figura 9 que muestra una pendiente mayor en la parasitación durante los primeros 7.5 días.

Esta pendiente observada es muy constante durante casi todo el período de la prueba, lo que indica una mayor estabilidad en la velocidad y aceleración del proceso de parasitación en comparación con el proceso de mortalidad. A pesar de eso, en el día 9, la línea de parasitación sufre un quiebre muy sensible donde pierde mucha de la velocidad, lo que parece indicar la entrada a una fase estacionaria o de decadencia, de la cual no se tiene evidencia debido al límite de tiempo de la prueba.

La figura 3 ilustra la parasitación de un nematodo, el cual ha sido prácticamente despedazado por la salida de las hifas y las esporas del hongo.



Microsoft Photo Editor

Figura 21. *Trichodorus spp* parasitado por *Paecilomyces lilacinus*. Los acumulos negros corresponden a agrupaciones de conidios, y en el fondo se observa el nematodo en un estado muy degradado debido a la germinación del hongo dentro de su cuerpo. Obsérvese el ano completamente degradado y con algunas hifas saliendo de él.

4.5.2 PRUEBAS DE EFECTIVIDAD DE HONGO ANTAGONISTA

Los datos mostrados en el cuadro 19 permiten observar el crecimiento que presenta *Trichoderma spp* con respecto a la mayoría de los hongos patógenos de plantas probados en el ensayo. Dadas las condiciones de igualdad con que cada hongo inicia su crecimiento, es sorprendente la velocidad que desarrolla este hongo para extender su micelio aún en presencia de otros hongos. Al analizar el desarrollo del crecimiento del micelio de cada hongo, es importante hacer notar el poco desarrollo que tiene los patógenos, excepto por *Sclerotium rolfsii*, hongos como *Phytophthora spp* son de una velocidad muy lenta como para competir con *Trichoderma spp*, de tal manera que para el día 4 ya este hongo alcanza más de la mitad de la distancia disponible para extenderse.

El papel en la naturaleza de estos patógenos es muy importante, ya que constituyen la causa de algunas de las enfermedades más severas de las plantas, o son la causa de variadas enfermedades en un amplio rango de hospederos, por lo cual se consideran patógenos muy importantes y de efectos negativos a escala mundial.

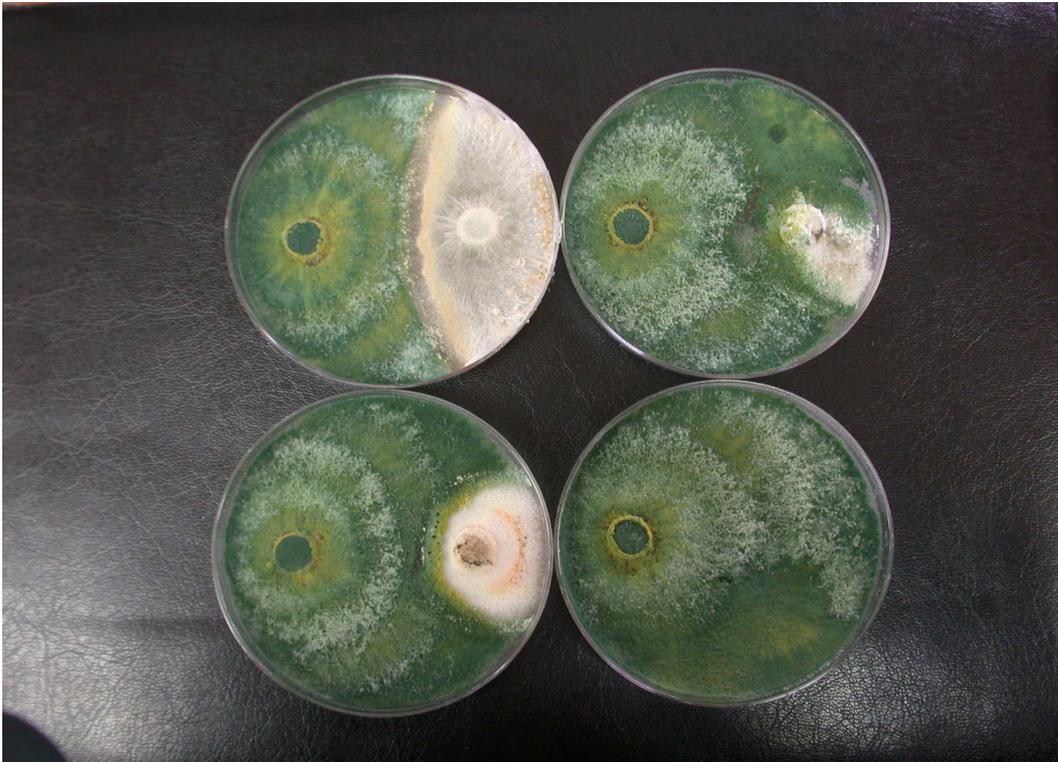
Empezando por *Phytophthora spp*, a este género pertenecen por lo menos 15 especies fitopatógenas; algunas de las cuales son muy específicas en cuanto a sus hospedantes, pero la mayoría tiene un amplio rango de hospederos a los que pueden infectar. Se le puede encontrar atacando desde plántulas de hortalizas anuales o de ornato hasta árboles forestales y frutales ya maduros. Los principales síntomas de las enfermedades que producen en la mayoría de los casos son pudriciones de la raíz, ahogamiento de plántulas, pudriciones de tubérculos, cormos y bases de tallos. Algunas especies causan pudriciones de frutos, yemas, e incluso tizones que atacan follaje, ramitas jóvenes y frutos. Para nuestro país, es de especial importancia el tizón tardío de la papa ocasionado por *P. infestans*, donde los síntomas se manifiestan primero como manchas en los bordes de las hojas, luego se extienden formando zonas de color café y poco a poco avanzan pudriendo folíolos, pecíolos y si no se ejerce algún tipo de control se termina en una pudrición de la planta, en especial de los órganos tiernos y aéreos (Agrios, 1998).

Collectotrichum spp es reconocido mundialmente como productor de varios tipos de antracnosis, la cual es una lesión necrótica que parece una úlcera profunda en tallos, frutos, hojas y flores. Las plantas hospedantes principales para ese hongo son los cereales, los pastos, cucurbitáceas, berenjena, tomate, pimiento, espinaca, nabo, coliflor, cítricos, higuera, olivo, aguacate, y de especial interés en nuestro país para la cebolla y el frijol (Agrios, 1998).

Corticium spp es un patógeno de mucha importancia no tanto a nivel agrícola como a nivel pecuario, debido a que produce la enfermedad del filamento rojo de los pastos, sin embargo es un patógeno muy difícil de eliminar de los suelos. Con respecto al último patógeno ensayado *S. rolfsii*, el género al cual pertenece está vinculado a enfermedades que producen el ahogamiento de plantas, la cancrrosis del tallo, el tizón de la corona y las pudriciones de la raíz, corona, bulbos, tubérculos y frutos. Debido al ataque de estos se producen enormes pérdidas en hortalizas y frutos carnosos. *S. rolfsii* reviste especial importancia en nuestro país como patógeno muy efectivo del tomate. La infección comienza con una mancha café que aparece sobre el tallo suculento y por debajo de la superficie del suelo, el tallo comienza a marchitarse junto con las hojas y éstas empiezan a desprenderse, por último el micelio blanco comienza a extenderse hacia las lesiones y hacia las raíces donde destruye el sistema radical y los tejidos que llega a cubrir (Echandi, s.f., IOBC/WPRS-EFPP, 2000; Agrios, 1998). Este hongo sorprende por su velocidad de infección y el crecimiento agresivo de su micelio sobre una planta.

Pese a la agresividad atribuida mundialmente a los patógenos usados en el ensayo los resultados en las pruebas de efectividad permiten colocar a *Trichoderma spp* como un hongo antagonista de importancia y aplicación en el caso de muchas enfermedades.

La siguiente figura muestra inhibiciones parciales y totales provocadas por *Trichoderma spp* al interactuar con cada uno de los patógenos.



Microsoft Word

Figura 24. Inhibición del crecimiento del micelio de los hongos por *Trichoderma spp* cuando se encuentran en la misma placa bajo las mismas condiciones de crecimiento.

La placa petri que contiene la prueba contra *S. rolfsii* es la que se ubica arriba a la izquierda; donde se puede decir que la inhibición causada por *Trichoderma spp* durante los 7 días de crecimiento logró disminuir el crecimiento del hongo en un 60%, si tomamos los testigos como el 100% del crecimiento miceliar. No obstante la verdadera significación de la prueba se asume que en realidad *Trichoderma spp* solamente consigue un crecimiento del 60% de la placa, mientras que *S. rolfsii* consigue un 40 % del total del espacio disponible en la placa. Esto significa que los dos hongos presentan el crecimiento más parejo de los ensayados, y que *S. rolfsii* es bastante resistente al ataque de *Trichoderma spp*.

La figura muestra que justo entre el frente de expansión del micelio de *Trichoderma spp* y *S.rolfsii* se encuentra una zona de inhibición que se puede presumir en disputa, lo cual es una evidencia de lo fuerte de la lucha enzimática y antibiótica que están librando las hifas de colonización de ambos hongos. De los hongos probados *S. rolfsii* resultó ser el más resistente a los mecanismos de antagonismo de *Trichoderma spp*.

La placa de arriba a la derecha (figura 24) es la imagen de la prueba contra *Corticium spp*. Se puede apreciar como se ha dado una inhibición de cerca del 90 % del patógeno con respecto al crecimiento de su correspondiente testigo. El área que ocupa el patógeno es de cerca del 10% del área de placa, lo cual lleva a concluir que fue seriamente afectado por el antagonismo de *Trichoderma spp*. Inclusive se nota como las hifas de *Trichoderma spp* empiezan a subirse ya sobre el disco que contenía el inóculo inicial del patógeno, por lo cual es presumible que de haber dejado la placa unos días más en la incubadora *Trichoderma spp* terminaría eliminando completamente a *Corticium spp*. Este resultado es una muestra promisorio de lo que el antagonista producido en el INA podría hacer con el hongo aplicado en el campo para el saneamiento de áreas pastosas.

La prueba contra *Collectotrichum spp* se muestra en la placa de abajo a la izquierda (figura 24), donde se podría calcular un 85% de inhibición del crecimiento del patógeno en el área de la placa. Es notorio como las hifas del hongo antagónico tiene completamente rodeado al patógeno el cual empieza a padecer de una especie de ahogamiento. Se nota como el frente de expansión de *Trichoderma spp* se encuentra muy activo por medio de la evidencia que brinda la coloración amarilla, clásica del crecimiento vegetativo inicial de las hifas en desarrollo de este hongo, por lo cual es también posible prever la eliminación total del hongo en unos pocos días más.

Con respecto a la prueba realizada contra *Phytophthora spp*, los resultados se exponen de manera evidente en la figura 24. Toda la placa está completamente cubierta por *Trichoderma spp* y no queda rastro del patógeno, ni siquiera en el disco del inóculo inicial. La contundencia con que *Trichoderma spp* logró eliminar completamente al patógeno brindan una visión clara del potencial de este antagonista en la lucha contra las enfermedades producidas por este patógeno y expuestas anteriormente. Debido a estos ensayos *Phytophthora spp* se colocó como el género patógeno más susceptible al ataque de las enzimas y antibióticos del género *Trichoderma spp*.

La eficacia del hongo *Trichoderma spp* producido por el INA tiene numerosas razones de ser en el metabolismo de las especies de este género que son antagonistas. Dentro de este género las principales son *T. viride*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. reesei*, *T. lignorum*, *T. konigii*, y *T. polysporum*; pero existen muchas especies pertenecientes al género *Trichoderma spp*, muchas de las cuales se clasifican como antagonistas, y otras que no tiene efecto alguno sobre otros hongos (Obregón, 2002).

Todas las especies antagonistas comparten su capacidad de fabricación en metabolismo secundario de sustancias antibióticas con acción enzimática que degradan carbohidratos estructurales de otros organismos (Madigan et al, 1999).

Se han logrado aislar sustancias antibióticas tales como Trichodermin, Suzukacilina, Alamecicina, Dermadina, Penicilina, Trichotecenosa, Tricorzianinos y Gliotoxina. Iida y sus colaboradores (1995), han dividido estas sustancias de las especies de *Trichoderma sp* en dos tipos principales: los compuestos aromáticos simples entre los que sobresalen los pyrones (Hanssen and Hurbasch, 1990) y los butenolidos; y como segundo tipo los isocianometabolitos que son compuestos de bajo peso molecular. La capacidad de producción de estos tipos de compuestos se evidencia por la cantidad aislada hasta el momento, donde ya se contabilizan un poco más de 125 sustancias extraídas de los géneros *Trichoderma spp* y *Gliocladium spp* (Harman y Kubicek, 1998).

La antibiosis es un proceso que conlleva al antagonismo entre especies por diferentes y complicadas vías, no obstante para *Trichoderma spp* se han descrito mecanismos basados en algunos casos en la liberación de toxinas de *Trichoderma spp* que estimulan centros receptores especiales no identificados en el hospedero lo cual desencadena una respuesta de liberación de enzimas autolíticas por parte del hongo hospedero, lo cual conduce a su autoeliminación (Obregón, 2002). Este proceso se podría caracterizar como un suicidio estimulado.

Otra vía desencadenada por la antibiosis en *Trichoderma spp*, y al parecer la más común y eficiente es realizada de manera heterolítica por sustancias altamente cargadas de enzimas que degradan la pared celular del hospedero. El proceso se puede llevar a cabo por diferentes antibióticos de manera que los antibióticos volátiles tiene un efecto fungistático debilitando paredes del hospedero y haciéndolo más sensible y permeable a antibióticos solubles (Harman y Kubicek, 1998).

Un mecanismo opcional a la antibiosis es el micoparasitismo, donde *Trichoderma spp* ejerce presiones mecánicas y enzimáticas sobre las hifas y esclerocios del hongo fitopatógeno, esto gracias a un sistema de reconocimiento inicial de los azúcares de la pared del antagonista donde se supone interviene un ordenamiento especial de las lecitinas de la pared del patógeno, lo cual desencadena una cascada enzimática que conlleva a la hidrólisis de hifas y esclerocios patógenos (Obregón, 2002).

Sea cual sea la vía usada para establecer la relación de antagonismo del *Trichoderma spp* con respecto a algún hongo patógeno es de vital importancia el papel que juegan las enzimas liberadas. Los tipos más abundantes y comunes en las especies antagonistas de este hongo como ya se ha mencionado son las celulasas, xilasas, quitinasas, pectinasas, glucanasas y glucosidasas (PHC, 2002).

Estudios bioquímicos realizados por Wood y García en 1990 sobre *T. reesei* proponen que la celulosa y la quitina de la pared de los hongos patógenos es degradada debido a la acción de las celulasas que atacan los enlaces $\beta - 1,4$ glucosídicos, pero que la degradación la realizan dos tipos específicos de celulasas que actúan en conjunto y de manera ordenada, donde el sustrato de una es el producto de la reacción enzimática anterior; de esta manera proponen dos tipos de estas, las endoglucanasas y las exoglucanas, que difieren con respecto a si atacan solo en los extremos de las cadenas del carbohidrato (exo) o si realizan los cortes en cualquier sitio dentro de la cadena del mismo (endo). La figura 25 muestra la estructura de una exoglucanasa según la Dr. C. Divne (1991).

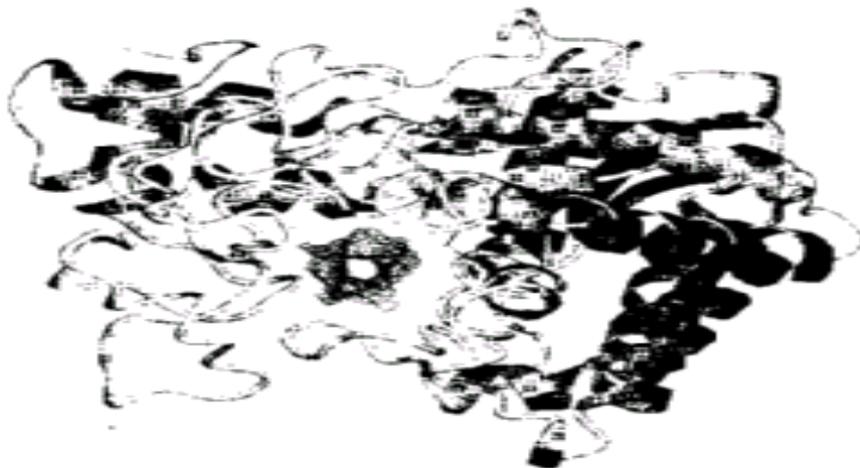


Imaging para Windows

Figura 25. Estructura simplificada de la proteína exoglucanasa CBH I de *T. reesei*. Tomado de Divne et al. (1994).

Divne y sus compañeros en 1994, al igual que la investigadora Ana Koivula en el 2000 (PHC, 2002) con base en estudios de cristalización de la enzima dilucidaron su estructura y propusieron un modelo que liga la estructura con su función. La estructura propuesta se basa en una proteína compuesta de tres porciones peptídicas: un dominio catalítico que ocupa la mayor parte del volumen de la proteína, un dominio de menor tamaño el cual es denotado como CBD y un linker o péptido de unión de ambos dominios. El dominio catalítico se le achacan las funciones catalíticas de la degradación de celulosa y hemicelulosa, el CBD es el dominio encargado de unirse a la celulosa que posteriormente será degradada en el dominio catalítico. El péptido de unión ha mostrado como única función mantener la estructura integral de la proteína.

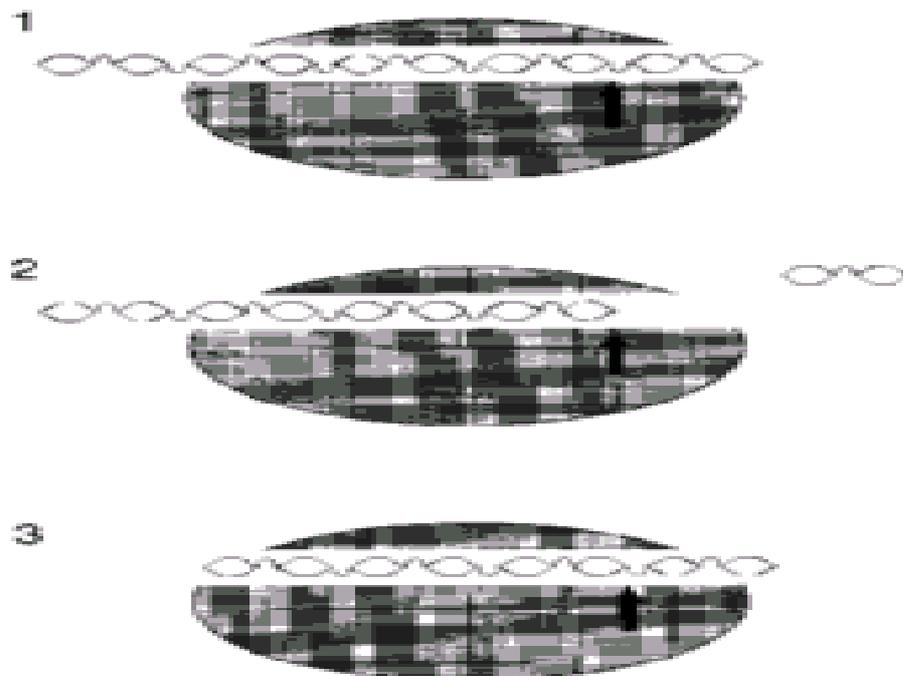
La característica principal del dominio catalítico es que posee un túnel donde en realidad los dímeros de celobiosa son catalizados de la cadena de glucosa. Se ha demostrado que en las dos principales celulasas de *T. reesei* la Cel 6A y la Cel 7A el dominio catalítico poseen un túnel para la unión y catálisis de moléculas de sustrato. El túnel del dominio catalítico de Cel 6A presenta 4 cavidades internas en el túnel para unidades individuales de glucosa, además de sitios adicionales a la entrada del mismo. El túnel del dominio catalítico de Cel 7A presenta sitios internos para más de 10 unidades de azúcar. La posición del túnel, su configuración y las entradas a él determinará la proteína como exo o endoglucanasa. En la figura 25 el túnel aparece representado como un asterisco. Para observar su configuración tridimensional en el dominio catalítico de la CBHI de *T. reesei* es conveniente observar la próxima figura, donde el túnel aparece en el centro del dominio catalítico.



Imaging para Windows
Figura 26. Túnel tridimensional en el dominio catalítico de la CBHI. Tomado de Divne et al. (1994).

El modelo general para la degradación de celulosa propuesto se ha estudiado sobre estructuras de celulosa cristalinas por Stahlberg y su grupo (1996), lo cual confirmó y completó lo que Wood y McCroe habían propuesto en 1979, entre otros importantes investigadores.

El modelo implica un ataque ordenado y múltiple de exoglucanasas y endoglucanasas. Se ha propuesto que el primer ataque es realizado por la glucanasa 1,4- β - D- glucancelobiohidrolasa que ataca los finales de las cadenas de celulosa dentro de su túnel. Después la endoglucanasa 1,4- β - D- glucan – 4- glucanohidrolasa realiza cortes amplios en el medio de las cadenas formadas de manera que se producen nuevos extremos para el ataque de las exoglucanasas. Finalmente los residuos de celobiosa y otros oligosacáridos son degradados y convertidos por inversión de enlaces hasta glucosa por las β -glucosidasas. La degradación de la cadena de glucosa en dímeros por las exoglucanasas correspondiente al primer paso de este modelo general se puede profundizar aún más a través de la siguiente figura.



Imaging para Windows
Figura 27. Esquema de la acción de las glucosidasas sobre cadenas de celulosa. Las figuras presentan la enzima con su túnel abierto y con una cadena de celulosa siendo catalizada en su interior. El modelo simplifica enormemente el proceso real.

En el paso 1 se da la hidrólisis del primer enlace β - 1,4-glucosídico, el dímero resultante es celobiosa o un trímero nombrado celotriosa que ha sido hidrolizado del final de la cadena. En el paso 2 el disacárido resultante es liberado mientras que el resto de la cadena permanece unida a la enzima a través de interacciones con los subsitios del túnel. En el paso 3 el final de la cadena es movido hacia adentro del túnel por un mecanismo desconocido para un nuevo proceso hidrolítico. De esta manera se continua hasta formar dímeros de fácil ataque por β - glucosidasas.

Las enzimas glucosidasas de esta especie son las mejor estudiadas hasta el momento pero es muy probable que enzimas presentes en otras especies de este género funciones de igual manera. Es importante decir que existen otros muchos tipos de enzimas involucrados en la degradación de diferentes carbohidratos estructurales de paredes celulares de hongos y vegetales, ejemplo claro de esto son los hallazgos de xilosidasas, arabinofuranosidasas, glucuronidasas, esterases, manasas, galactosidasas y acetilglucomanasaesterases. Sin embargo por el momento es desconocida las vías de reacción de estas enzimas y su bioquímica estructural y de funcionamiento (Harman y Kubicek, 1998).

Las pruebas efectuadas permiten colocar los productos de *Trichoderma spp* pertenecientes al laboratorio de Fitoprotección del INA como provenientes de especies eficientes en el control de algunos hongos patógenos de plantas como los ensayados en la prueba, aunque se debe tener en cuenta que estas especies antagonistas son recomendados para el control de muchos otros hongos fitopatógenos.

Si bien no existe un estándar internacional sobre pruebas de efectividad de este tipo es importante reconocer el control que el producto ejerce sobre patógenos muy problemáticos y eso es digno de tener en cuenta en los ensayos de control de calidad de bioproductos realizados en cualquier estudio.

5- CONCLUSIONES

1- La elaboración de bioproductos a base de hongos entomopatógenos y antagonistas es una tecnología de fácil acceso y producción, que si se ejecuta de manera correcta permite obtener un producto de calidad aceptable para ser aplicado en el control biológico. Esto constituye una opción barata para los productores interesados.

2- El apego por parte del personal involucrado en la creación de dichos productos al diagrama de flujo propuesto y su revisión periódica, permiten obtener estándares de producción altos con bajas tasas de productos contaminados y materias primas desperdiciadas.

3- La concentración de conidios en los productos del INA se encuentra en un buen nivel, lo que podría significar la inoculación eficiente con los microorganismos bajo condiciones normales a la hora de ser probados en los campos de cultivo.

4- Las pruebas de pureza evidencian productos que cumplen estrictos estándares de producción a nivel mundial, no obstante se deben buscar opciones para disminuir los riesgos de contaminación cruzada que constituye la principal fuente de contaminación de los productos dentro del laboratorio.

5- La viabilidad de los productos demuestra parámetros de calidad elevados. La rápida germinación observada coloca al producto en una ventaja competitiva contra las condiciones ambientales normales del país.

6- La eficiencia de los hongos en contra de los organismos que sirvieron de blanco, demuestran la calidad y la patogenicidad contra ese organismo en particular bajo las condiciones dadas.

7- Las pruebas de eficiencia demuestran que los productos biológicos no pueden compararse en efectividad en cuestión de tiempo con los pesticidas, pues estos últimos son más rápidos en su acción. A pesar de eso, la parasitación de un solo individuo plaga brindará un inóculo permanente del hongo, lo cual ayudará de manera preventiva nuevos ataques de la misma plaga.

8- Dado que el producto es basado en la acción de seres vivos, los productores deben ser capacitados en cuanto a transporte, almacenamiento, manejo y aplicaciones de estos bioproductos; esto con el fin de aumentar la eficiencia que podrían mostrar en el campo.

6- RECOMENDACIONES

1- Para facilitar los muestreos y los controles de calidad de los productos se deberían crear códigos y registros de la producción. Dichos códigos pueden incluir el nombre de la cepa, el número de cambios que sufre en el banco de cepas, la placa madre de la que se obtiene las matrices y el número de bolsa.

2- Con una revisión en las técnicas de producción y un mejoramiento en el control de la temperatura en el cuarto de crecimiento, es posible mejorar la concentración de conidios dentro del producto que se mantiene en las bolsas.

3- Es conveniente separar las áreas de producción e investigación; esto para disminuir los riesgos de contaminación cruzada.

4- El escalado en el uso de las cepas con que cuenta el laboratorio, permitirá disminuir la variación genética y la mezcla de cepas que se puede dar en el producto.

5- Se puede programar la producción realizada en un mismo día, de manera que se trabajen primero los hongos y las cepas menos contaminantes para otros hongos.

6- Sería conveniente medir en futuras pruebas de germinación la velocidad de germinación. Esto se lograría mejorando la metodología empleada en la prueba y tomando mediciones a intervalos cortos de tiempo.

7- Un parámetro deseable de obtener es la efectividad de los productos in vivo, para lo cual se recomienda realizar un programa de ensayos de campo cada cierto tiempo.

7- BIBLIOGRAFIA:

- ACUÑA, R. 1998. El Mundo de la Naturaleza Tropical. San José, CR. EUNED. 106 p.
- AGRIOS, G. 1998. Fitopatología. Segunda edición.. México, D.F. UTEHA Noriega Editores. 838 p.
- ALTIERI, MIGUEL A. 2001. Biotecnología Agrícola: mitos, riesgos ambientales y alternativas. Oakland, California. CIED/ PED-CLADES/ FOOD FIRST. 90 p.
- AUGE, R. 1976. Mecánica Agrícola: el monocultivo, tractores y sembradores, riegos y abonos. Madrid. Paraninfo. 140 p.
- AYAUB, SADEK. 1995. Baermann Funnel Technique. Tomado de Planta Nematology and Agricultural training aid. California. IMP/DFA P. s.p.
- BARNETT, H.; HUNTER, B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. 241 p.
- BURGES, H., Editor. 1981. Microbial Control of Pest and Plant Diseases. London. Academic Press. 949 p.
- CATIE. 1989. Bibliografía sobre Manejo Integrado de Plagas. Turrialba, CR. 77 p.
- CENICAFE. 1997. Boletín Técnico No 17: Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Caldas, Colombia. Centro Nacional De Investigaciones en Café "Pedro Uribe Mejía". 33 p.
- CENIPALMA: CENTRO DE INVESTIGACIONES EN PALMA DE ACEITE. 1992. Control microbiano de insectos. Santa Fé, Colombia. 136 p.
- CIEGO DE ÁVILA. 1999. Conferencias. Cuba. Empresa de Piña Ciego De Ávila - CREE.. 43 P.
- CONWAY, R. Editor. 1984. Pest and Pathogen Control: strategic tactical, and policy models. John Wiley, USA. Chichester. 488 p.
- COSTA RICA. CÁMARA DE INSUMOS AGROPECUARIOS. 1990-1998. Importación de agroquímicos de nuestro país entre 1989-1998. San José, CR. Ventanilla Unica del COMEX. s.p.
- COSTA RICA. CÁMARA DE INSUMOS AGROPECUARIOS. 1991. Importación de agroquímicos de nuestro país entre 1989-1998. San José, CR. Dirección de Sanidad Vegetal del MAG. s.p.

- COSTA RICA. MINISTERIO DE SALUD. 1993. Intoxicaciones reportadas por plaguicidas en Costa Rica. San José, CR. Departamento de Estadísticas. s.p.
- CUBA. MAG. 1996. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro Humboldt". Curso- taller de gestión de medio ambiente de desarrollo rural: La Sostenibilidad como Vía Alternativa en las Unidades de Producción Agropecuarias. Cuba . INIFAT. 182 p.
- DAVIES,G.; TOLLEY, S.; HENRISSAT, B. ; HJORT, C. ; SCHULEIN, M. 1995. Structure of oligosaccharide-bound forms of the endoglucanases V from *Humicola insolens* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 34: 16210 – 16220.
- DESHPANDE, M. 2001. Microbial control of pests: Entomopathogenic fungi as mycoinsecticides. Pune, India. National Chemical Laboratory, Biochemical Sciences División. 7 p.
- DIVNE, C.; STAHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; PETTERSSON, G.; KNOWLES, J.; TEERI, T.; JONES, A. 1994. The Three Dimensional Structure of Cellobiohydrolase 1 from *T. reesei*. *Science*. 265:524-528.
- ECHANDI, E. s.f. Fitopatología General. México D.F. Herrero Hermanos, Sucesores, S.A. 59 p.
- EUNA. 1999. Manual de plaguicidas : guía para América Latina. Heredia, CR. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. 395 p.
- FAO. 2000. El Estado mundial de la agricultura y la alimentación 2000. Roma, Italia. 329 p.
- GARCÍA-CAMPAYO, V.; WOOD, T. 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1. p. 147- 161 .
- GARCÍA, G. 1993. Evaluación de diferentes aislados de *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill y *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. en el control de *Hyalymenus tarsatus* (F) (Hemiptera: Alydidae) en macadamia (*Macadamia integrifolia*). Tesis de Licenciatura presentada a la Sede del Atlántico de la UCR. Turrialba, Costa Rica. 53 p.
- GUARDIAN SOLA, X. 1989. Control DE la contaminación en la fabricación y aplicación de pesticidas: efectos sobre la salud. Madrid, España. Instituto Nacional de Salud e Higiene en el Trabajo. 64 p.
- HANSON, P.; HILJE, L. 1993. Control biológico de insectos. Turrialba, C.R. CATIE. 40 p.

- HANSSEN , H.; URBASCH, I. 1990. 6- Pentyl- alpha- pyrone: A fungal metabolic product of *T. spp.* (Deuteromycotina). En: Proceedings of the Fourth International Mycological Congress. (IV. 1990. Regensburg, Germany). 260 p.
- HARMAN, G. ; KUBICEK, C. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* II. London, England. Taylor e Francis Ltd. 393 p.
- HEVIEFO, G.; JENKINS, N. 1998. Development of masss production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *News and Information*. 19(19). 10 p.
- HNASSEN, B., Y GHAVE, P. 1990. *Control de calidad: teoría y aplicaciones*. Madrid, España. Díaz de Santos Editorial. 549 p.
- Http:// www.fao.org/docrep/t0533e/t0533e03.htm. General introduction to processing of microbial pesticides.2002.
- [Http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm](http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm). Destinos y efectos de los plaguicidas.
- Http://www.postgrad.cherue.uq.edu.au/reseach_groups/bioengineering/People/Alum... Fermentation studies of conidia production by *Metarhizium anisopliae*. 2 P.
- IIDA, ET AL . 1995. Fungal Metabolites. XVIII New membrane- modifying peptides, trichorozins I-IV, from the fungus *T. harzianum*. *Chem. Pharm. Bull.* 43:392-397 p.
- INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIAS (INIFA). 1993. *Información Agropecuaria y Forestal: disco compacto*. Colima, México. CENEDIC. s.p.
- IOBC/WPRS-EFPP. 2000. Sixth Workshop of the IOBC/WPRS Phytopatogens WG: Biocontrol agents; modes of action and their interactions with other means of control. Sevilla, España. IOBC/WPRS-EFPP. 168 p.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J. Y PARKER, J. 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. Octava edición revisada. Madrid, España. Prentice Hall Iberia. 1064 p.
- MC COY, C., QUINTELA, E., DE FARIA, M. s.f. Environmental persistence of entomopathogenic fungi. <http://www.agctr.1su.edu./s265/mccoy.htm>. University of Florida.
- MC CROE, S.; WOOD, T. 1979. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Adv. Chemistry Ser.* 181. p. 181-209.
- MORALES, E. Editor. 1992. *Agroecología e información*. Bolivia . CIDAÉ.. 184 p.

- OBREGÓN GOMÉZ, M. 2002. Seminario: Uso y Manejo de Bioprotectores en la Agricultura. Cartago, CR. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica del INA. 42 p.
- OLIVERA BRAVO, S Y RODRÍGUEZ, D. 2000. Pesticidas, salud y ambiente. Laboratorio de Neurociencia Molecular (PEDECIBA). Departamento De Neuromiología: Instituto Clemente Estable.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. s.f. Guidelines for quality assurance in Microbiology. Van Drieste, Bélgica. s.p.
- PIFFERRER , A. 2002. La biotecnología vegetal en Cuba : presente y futuro. En: Seminario El estado actual de la biología molecular y la biotecnología en Centroamérica (I, 2002, San Carlos, CR.). SSC-TEC/ UNAM. s.p.
- PLANT HEALTH CARE (PHC). 2002. First International Trichoderma-Tricel Joint Meeting/ Seventh International Trichoderma- Gloiocladium Workshop: Book of abstracts. Cancún, México. 74 p.
- RIFAI, M. 1964. A revisión of genus *Trichoderma*. Mycological papers No. 116. University of Sheffield, England. 56 p.
- ROGG, H., TOVAR, N., ET AL. 1998. Guía práctica de producción del entomopatógeno *Beuaveria bassiana* para el control biológico de insectos plaga y vectores en Bolivia. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Universidad Autónoma "Gabriel René Moreno"-Instituto de Investigaciones Agrícolas"El Vallecito". 36 p.
- SALMERON DE DIEGO, J. 1977. Intoxicaciones producidas por pesticidas. Segunda edición. Madrid, España. Ministerio de Agricultura de España. 195 p.
- SEELEY, H., VAN DEMARK P. 1990. Microbios en acción. Traducido bajo la dirección de J.R. Villanueva. Madrid, España. Universidad de Cornell. Editorial Blume. 361 p.
- STAHLBERG, J.; DIVNE, C.; KOIVULA, A.; PIENS, K.; CLAEYSSSENS, M.; TEERI, T.; JONES, T. 1996. Activity studies and crystal structures of catalytically deficient mutants of cellobiohydrolase 1 from *T. reesei*. Journal of Molecular Biology. 264: 337-349.
- STEPHENSON y SOLOMON. 1993. Cronología del desarrollo de los plaguicidas. Tomado de www.fao.org/docrep/W25985/w2598s06.htm.
- STREETS, R. 1984. The diagnosis of plant diseases. Tucson, Arizona. The University of Arizona Press. s.p.

- TÁMARA LTDA. PALMIRA. 1989. I Simposio Nacional sobre Control Biológico en Colombia: historia, avances y proyecciones. Palmira, Valle del Cauca; Colombia. Támara Ltda. 282 p.
- TOUR, U. 2001. Microbial Control of Pest: Entomopathogenic fungi as mycoinsecticides. Zurich, Switzerland. ETH. 7 p.
- UNIVERSIDAD NACIONAL. 1998. International Conference on Pesticide Use in Developing Countries: Impact on Health and Environment; Book of Abstracts. San José, CR. Pesticide Program: Development, Health and Environment. 272 p.