

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA**



**“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE PELETIZACIÓN
PARA *Beauveria bassiana* CON INSUMOS PERUANOS”**

Presentada por:

DAVID ADRIAN HIDALGO MATA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN ENTOMOLOGÍA**

Lima - Perú

2019

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA**

**“DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE PELETIZACIÓN
PARA *Beauveria bassiana* CON INSUMOS PERUANOS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

DAVID ADRIAN HIDALGO MATA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

M.Sc. Andrés Casas Díaz

PRESIDENTE

Dr. Alexander Rodríguez Berrio

PATROCINADOR

Dr. Javier Vásquez Castro

CO-PATROCINADOR

Dr. Jorge Castillo Valiente

MIEMBRO

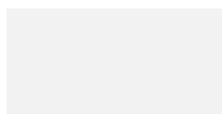
Mg.Sc. Guillermo Sánchez Velásquez

MIEMBRO

DEDICATORIA

A mis padres y hermanas, quienes han sido mi apoyo incondicional a lo largo de mi vida, su apoyo ha sido determinante para lograr la consecución de esta meta

A todos mis amigos y docentes dentro de la Universidad Nacional Agraria La Molina, quienes han contribuido en distintos periodos de mi vida académica.



AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) del Ecuador, quienes me brindaron la oportunidad para seguir la maestría y me respaldaron brindándome el tiempo y recursos para ejercer mis estudios.

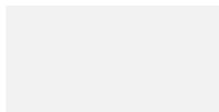
Al Dr. Jackson Trevor (Nueva Zelanda), y mis compañeros INIAP Francisco Báez y William Viera, quienes me brindaron conocimientos concernientes al área de formulación de microorganismos.

Al Dr. Alexander Rodríguez Berrio, mi profesor y asesor, quien ha sido la persona que más me ha guiado y apoyado a lo largo de mi periodo estudiantil.

Al Mg. Sc. Dr. Javier Alberto Vásquez Castro por su colaboración y apoyo en el laboratorio de toxicología de la UNALM.

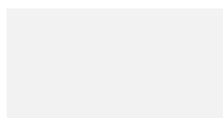
A la Dra. Hilda Gómez y al personal SENASA en Vitarte, quienes brindaron conocimiento y apoyo en el laboratorio de entomopatógenos.

Al Mg. Sc. Guillermo Sánchez y al Ing. Mg.Sc. Julio Rivadeneira, quienes me apoyaron en la revisión del presente documento.

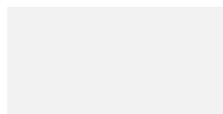


ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Control biológico. Contexto mundial y latinoamericano.....	3
2.2 Hongos entomopatógenos.....	8
2.2.1 Aislamiento e identificación.....	9
2.2.2 Postulados de Koch y reactivación de cepas.....	11
2.2.3 <i>Beauveria bassiana</i>	11
2.3 Pruebas de laboratorio para el desarrollo de biopesticidas.....	12
2.3.1 Caracterización de la cepa.....	12
2.3.2 Control de calidad.....	13
2.3.3 Formulación.....	15
2.4 Diseño de un biopesticida comercial.....	16
2.4.1 Fase 1.....	19
2.4.2 Fase 2.....	25
2.4.3 Fase 3.....	28
2.4.4 Fase 4.....	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1 Materiales.....	35
3.2 Métodos.....	35
3.2.1 Preparación de materiales de laboratorio.....	35
3.2.2 Control de calidad.....	36
3.2.3 Caracterización macroscópica de la cepa.....	36
3.2.4 Prueba de susceptibilidad.....	37
3.2.5 Formulación.....	38
3.2.6 Prensado y secado.....	40
3.2.7 Humectabilidad.....	41
3.2.8 Concentración de esporas.....	44
3.2.9 Unidades formadoras de conidias (UFCs).....	45
3.2.10 Porcentaje de germinación de esporas (%)......	46
3.2.11 Bioensayos.....	49
3.2.12 Diseño experimental.....	49



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1 Susceptibilidad.....	50
4.2 Humectabilidad.....	50
4.3 Concentración de esporas.....	51
4.4 Unidades formadoras de conidias (UFCs).....	51
4.5 Porcentaje de germinación de esporas (%).....	54
4.6 Bioensayos.....	56
4.7 Análisis grupal.....	57
4.8 Comparación del mejor pelet de <i>B. bassiana</i> (Talco sin ácido) frente a otros biopesticidas ofertados en Perú y el mundo.....	58
4.8.1 Fase 1: Cepas.....	58
4.8.2 Fase 2: Espectro de hospederos.....	59
4.8.3 Fase 3: Formulación.....	60
VI. CONCLUSIONES.....	63
VII. RECOMENDACIONES.....	64
7.1 Pelets.....	64
7.2 Tecnología de formulación.....	64
7.3 Manejo de laboratorio.....	64
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
IX. ANEXOS.....	76

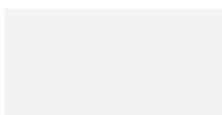


ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Plagas atacadas por hongos entomopatógenos.....	8
Figura 2: Representación de especies importantes de hongos entomopatógenos.....	10
Figura 3: Cultivo de <i>B. bassiana</i> en placa Petri.....	12
Figura 4: Esquema de desarrollo de biopesticidas empleado por el programa lubilosa (Dent, citado por Ravensber. 2010).....	17
Figura 5: Fases para diseño de un bioinsecticida comercial y tiempo estimado.....	18
Figura 6: Contornos colonias bacterianas: A) Forma, B) Elevación y C) Margen.....	22
Figura 7: Esquema de monitoreo de salud para bioformuladores (Sardui 2011).....	26
Figura 8: Preparación de materiales.....	36
Figura 9: Caracterización de la colonia de <i>B. bassiana</i>	37
Figura 10: Prueba de susceptibilidad en <i>G. melonella</i>	38
Figura 11: Comparación pupas sanas/enfermas.....	38
Figura 12: Componentes inertes para peletización.....	39
Figura 13: Elaboración de pelets.....	39
Figura 14: Secado de pelets.....	41
Figura 15: Observación de humectabilidad.....	42
Figura 16: Disolución de pelets en 30s.....	43
Figura 17: Cámara de Neubauer y reticulado.....	44
Figura 182: Selección de campos para conteo.....	44
Figura 19: Conteo de UFCs.....	45
Figura 20: Errores en el conteo de UFCs.....	46
Figura 21: Prueba de germinación de conidias.....	46
Figura 22: Consideraciones a tomar para conteo de conidias.....	47
Figura 23: Unidades Formadoras de Conidias (10^{-3}).....	48
Figura 24: Bioensayos realizados.....	49
Figura 25: Cantidad de Unidades Formadoras de Conidias (UFCs).....	52
Figura 26: Interacción Plot para valor.....	52
Figura 27: Distribución de valor del porcentaje de germinación.....	54
Figura 28: Porcentaje de mortandad.....	56
Figura 29: Fase 1.....	58
Figura 30: Fase 2.....	59
Figura 31: Fase 3.....	60

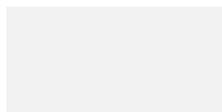
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de microorganismos comercializados (fuente OMRI).....	20
Tabla 2: Características de propágulos según el tipo de producción (Sepulveda 2017)	24
Tabla 3: Clasificación de las formulaciones. García (1999)	29
Tabla 4: Formulas evaluadas mediante prueba de humectabilidad (Modificado de Burges 2012).....	40
Tabla 5: Formulas seleccionadas para evaluar por control de calidad (Modificado de Burges 2012).....	42
Tabla 6: Mortalidad registrada en el ensayo de susceptibilidad.....	50
Tabla 7: Resultados análisis SAS.....	51
Tabla 8: Agrupamiento de valores en Unidades Formadoras de Conidias (UFCs).....	53
Tabla 9: Agrupamiento de valores en porcentaje de germinación de conidias.....	55



ÍNDICE DE ANEXOS

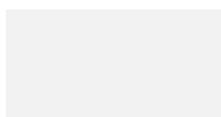
Anexo 1: Germinación de conidias en pelet nuevo.....	76
Anexo 2: Germinación de conidias en pelet 2 meses después.....	77
Anexo 3: Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) en pelet nuevo.....	78
Anexo 4: Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) en pelet de 2 meses.....	79
Anexo 5: Mortandad de insectos.....	79



RESUMEN

La investigación buscó desarrollar una metodología para seleccionar fórmulas de almacenamiento y transporte (peletizado) de esporas con hongos entomopatógenos. Se plantearon 4 objetivos. 1) Caracterizar la cepa del hongo (*Beauveria bassiana*) y realizar prueba de susceptibilidad, 2) Preseleccionar 9 fórmulas de peletización con capacidad de disolverse en agua (humectabilidad) en 30 segundos, 3) Determinar las condiciones del pelet al momento de la formulación y posterior a dos meses de almacenaje mediante control de calidad, 4) Determinar la virulencia del pelet al momento de su elaboración y transcurridos 2 meses mediante bioensayos. La tecnología debe ser accesible y barata, por lo cual se trabajó con insumos locales (Bentonita, caolinita, diatomea, talco chino), para mantener la forma del pelet (cementante) se empleó maicena. Adicionalmente se incluyó ácido cítrico para alargar la viabilidad de esporas (sinergizante) y albumina de huevo como protector solar de conidias. Para el análisis experimental se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial (Kuehl 2001). Basados en la concentración y viabilidad de las esporas transcurridos 2 meses el mejor material de formulación fue el Talco chino, seguido de la tierra de Diatomea. La acidez no fue considerada para este estudio, sin embargo fue notoria la disminución de supervivencia de conidias al acidificar el medio. A la par que se verificó la validez de las metodologías se planteó un esquema de trabajo partiendo desde la creación de un banco de cepas hasta la formulación de un biopesticida comercial y su respectivo registro.

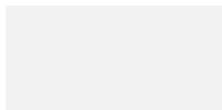
Palabras claves: Formulación, bioensayo, humectabilidad, germinación de conidias, concentración de conidias.



ABSTRACT

The research sought to develop a methodology to select storage and transport (pelletized) formulas for spores with entomopathogenic fungi. 4 objectives were raised. 1) Characterize the strain of the fungus (*Beauveria bassiana*) and carry out a susceptibility test, 2) Preselect 9 pelleting formulas capable of dissolving in water (wettability) in 30 seconds, 3) Determine the conditions of the pellet at the time of formulation and after two months of storage by quality control, 4) Determine the virulence of the pellet at the time of preparation and after 2 months by bioassays. The technology must be accessible and cheap, so we worked with local inputs (Bentonite, kaolinite, diatom, Chinese talcum), to maintain the shape of the pellet (cement) was used cornstarch. Additionally citric acid was included to extend the viability of spores (synergist) and egg albumin as a conidial sunscreen. For the experimental analysis, a completely random design with a factorial arrangement was used (Kuehl 2001). Based on the concentration and viability of the spores after 2 months, the best formulation material was Talc chino, followed by Diatomea soil. The acidity was not considered for this study, however it was notorious the decrease in conidial survival when acidifying the medium. At the same time that the validity of the methodologies was verified, a work scheme was proposed starting from the creation of a bank of strains to the formulation of a commercial biopesticide and its respective registry.

Key words: Formulation, bioassay, wettability, germination of conidia, concentration of conidia.



I. INTRODUCCIÓN

Los primeros registros del uso de microorganismos entomopatógenos para controlar plagas de insectos se remontan al siglo XIX, considerada como una tecnología eficiente, sustituida parcialmente por insecticidas sintéticos debido a que estos presentan mortandad instantánea.

El desarrollo de la industria agroquímica desembocó en la “revolución verde” en la década de los 70’s, brindando un incremento de producción nunca antes visto y sin la cual no sería sostenible la actual población humana. Lastimosamente, la seguridad alimentaria alcanzada acarrió el deterioro de la calidad de vida debido a la contaminación, producto de sustancias acumuladas y metabolitos secundarios existentes en agroquímicos.

El empleo de microorganismos vuelve a tomar vigencia por el mínimo impacto ambiental, pues con una adecuada selección de cepas se puede alcanzar especificidad. Para el efecto surge la necesidad de crear mecanismos que permitan almacenarlos y evaluar su efectividad en campo de manera que permita un control de la plaga objetivo.

La presente investigación busca estructurar en una secuencia lógica las distintas metodologías empleadas por centros de investigaciones y trabajos particulares (tesis) relacionadas al tema de hongos entomopatógenos, sirviendo como orientación para el desarrollo de biopesticidas.

Para este fin se ha contado con el apoyo de los siguientes centros de investigación:

- La Universidad Nacional Agraria “La Molina”, maestría en entomología, cuyo pensum educativo brindo las bases para organizar dichos conocimientos, junto con la participación directa del laboratorio de toxicología.
- El Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria del Perú (SENASA) quien brindo las técnicas y apoyo del laboratorio de control de calidad de hongos entomopatógenos.

- El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP) quien ha trabajado en desarrollar medios de transporte del microorganismo (formulaciones).

Se emplea como método didáctico el desarrollo de un prototipo de “granulo soluble en agua” (WG) en una presentación conocida como “Pelet” empleando insumos locales de bajo costo. Partiendo de 20 fórmulas potenciales, se ejecutó un proceso de selección por supervivencia de esporas y tiempo de almacenamiento.

El análisis de este proceso, logros alcanzados y comparación con los avances realizados en investigaciones de esta área permite comprender el camino a recorrer para lograr una formulación exitosa acorde a los requerimientos de campo, para lo cual se buscó:

- Caracterizar la cepa del hongo de *B. bassiana* mediante observación macroscópica a 25°C sobre PDA y realizar una prueba de susceptibilidad en larvas de *Galleria mellonella* con 5 concentraciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) con 5 repeticiones (individuos).
- Preseleccionar 9 fórmulas de peletización para *B. bassiana* a partir de 20 fórmulas elaboradas con componentes nacionales de bajo costo, con capacidad de disolverse en agua (humectabilidad) en 30 segundos.
- Determinar las condiciones del pelet al momento de la formulación y posterior a dos meses de almacenaje (25°C bajo sombra) mediante técnicas de control de calidad llevados por el laboratorio de entomopatógenos de SENASA en Vitarte.
- Determinar la virulencia del pelet al momento de su elaboración y transcurridos 2 meses mediante bioensayos sobre *G. mellonella* empleando un diseño completamente al azar con arreglo factorial.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Control biológico. Contexto mundial y latinoamericano

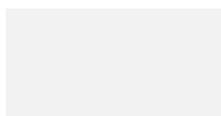
La comercialización de productos agropecuarios entre países presenta inconvenientes debido a la variación entre legislaciones nacionales en el contexto de regular los límites permitidos de residuos de agroquímicos, así como impedir el ingreso de plagas.

Por este motivo, la Food and Agriculture Organization (FAO), organización filial de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) tiene registrado (en su página oficial) nueve Organizaciones Regionales de Protección Fitosanitaria (ORPF) cuya función es la coordinación de las Organizaciones Nacionales de Protección Fitosanitaria (ONPF) de los distintos países miembros, siendo estas:

- Comisión de Protección Vegetal de Asia y Pacífico (APPC)
- Comunidad Andina (CA)
- Comité de Sanidad del Cono Sur (COSAVE)
- Organización Europea y Mediterránea de protección de plantas (OEPP)
- Consejo Fitosanitario Interafricano (IAPSC)
- Organización de Protección de las Plantas del Cercano Oriente (NEPPO)
- Organización Norteamericana de Protección de Plantas (NAPPO)
- Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA)
- Organización de Protección Fitosanitaria del Pacífico (PPPO)

La FAO se encuentra estableciendo un sistema de certificación de productos virtual para facilitar la comercialización entre países de las distintas regiones, buscando un consenso respecto a la residualidad de agroquímicos y basándose en metodologías de laboratorio estándar para la medición de los mismos.

Como referencia al límite máximo de residuos de agroquímicos (trazas) permitido para el consumo humano, la FAO establece el código alimentarius, elaborando tablas que son



revisadas anualmente y determinando en ciertos casos la prohibición de los mismos ([http://bit.ly/ 2VplF9y](http://bit.ly/2VplF9y)).

Por otra parte, el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) el 23 de mayo del 2001 impulsó el “Convenio de Estocolmo”, regulando originalmente la prohibición de 12 productos químicos conocidos como la “docena sucia” (DDT, aldrin, clordano, dieldrin, endrin, heptacloro, mirex, toxafeno, hexaclorobenceno, policlorobifenilos - dioxinas/furanos y organoclorados). El convenio ha sido ratificado por 181 países y se ha incrementado el listado de sustancias prohibidas.

En lo concerniente al ingrediente activo de los insecticidas químicos, existen entidades internacionales encargadas de su identificación, clasificación y manejo, estas son:

- **IRAC:** Insecticide Resistance Action Commite. Registro mundial de materias activas para control de insectos. Sede en Israel (<https://bit.ly/2PxcPRW>).
- **MSDS:** Material Safeti Data Sheet. Ficha de datos de seguridad, indica particularidades y propiedades de una sustancia; señala los procedimientos ordenadamente para trabajar con las sustancias de una manera segura (<https://bit.ly/2VrUSJG>).
- **CAS:** Chemical Abstract Service. Registro numerado de compuesto químico (<https://bit.ly/2UANRqu>).
- **ISO:** International Organization of Standardization. Nombre de Ingrediente Activo (<https://bit.ly/2vIB6Ru>).
- **IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemestri. Nombre Internacional (<https://bit.ly/2VmsxEB>).
- **OECD:** Organization for Economic Cooperation and Development. Protocolos (libres en internet) para pruebas toxicológicas. Existe un listado de animales en los que se hacen las pruebas ([https://bit.ly/ 2DrKmYT](https://bit.ly/2DrKmYT)).

Los excipientes inertes que se emplean para su formulación varían acorde al país de fabricación y casa comercial, siendo el motivo por el cual la calidad y eficiencia varía entre los productos comercializados a pesar de tener la misma concentración de ingrediente activo.

Para el empleo del Control Biológico, y más específicamente el desarrollo de biopesticidas, el panorama es distinto puesto que los consensos son recientes y no existe una coordinación aceptada a nivel mundial como se observa en los agroquímicos.

En esta línea, durante el 2013 la African Agriculture Technolog Foundation (AATF) con asesoramiento del ITTA, USAID y USDA publicó un marco para el registro y producción de biopesticidas en africa subsariana bajo el título de “A Guide to the Development of Regulatory Frameworks for Microbial Biopesticides in Sub-Saharan Africa”

La World Health Organization (2018) de la FAO publicó una guía para registro de este tipo de insumos bajo el nombre de “Guidelines for the registration of microbial, botanical and semiochemical pest control agents for plant protection and public health uses”

A nivel de los países anglosajones se han creado una serie de instituciones que buscan el registro de productores de insumos para producción biológica, cuyos listados incluyen fertilizantes, extractos botánicos, tecnologías y servicios, hasta la producción de Agentes de Control Biológico (ACBs), correspondientes a predadores, parasitoides, virus, bacterias y nematodos. Entre estas instituciones se tiene:

- **BCPC Manual of Biocontrol Agents.** Base de datos con información precisa y comprensiva sobre 200 sustancias activas disponibles comercialmente, donde se detalla el ingrediente activo, productos, toxicología y códigos de resistencia.
- **OMRI Listado de productos.** Lista de productos permitidos para su uso en concordancia con estándares del National Organic Products (NOP-USDA), incluido nombres de productos comerciales y compañías.
- **ECOCERT Input List.** Lista de productos revisados y testeados por Ecocert como sustentables para cultivos orgánicos internacionales, acorde a regulaciones europeas, americanas, canadienses y japonesas.
- **European Input List.** Website desarrollado por Fibl para servir como tienda para agricultores orgánicos, productores y distribuidores, así como legisladores en producción orgánica. Esta herramienta gratuita se enfoca en la Unión Europea (EU), encontrándose en desarrollo para cubrir toda la zona.

- **IFOAM. Lista de insumos aprobados para la producción orgánica.** Lista de ingredientes permitidos en la agricultura orgánica. No incluye productos comerciales o compañías.
- **Trading agricultural service database.** Base de datos de las más importantes compañías de biocontrol y compañías de comercio que se mantienen en contacto.
- **AG Biopesticides 2016 Report.** Estudio de mercado del 2016 sobre el sector global de biopesticidas. Una buena introducción en el campo de los agentes de biocontrol y su modo de acción. Contiene una lista de productos comerciales y compañías, incluyendo aquellas con aplicaciones de patente pendientes.

Estas instituciones están siendo tomadas como referencia para la comercialización de productos orgánicos en países anglosajones, y en sus listados no existen insumos de producción latinoamericana registrados.

Al 2018 en el listado de la OMRI (<https://bit.ly/2JsJEya>) solo constan tres países latinos (Argentina, Chile y Panamá) con el producto “Cal agrícola”, mientras que en la European Input List se reporta una compañía en Buenos Aires y dos en Santiago de Chile, comercializando azufre y *Trichoderma* spp (<https://bit.ly/2P9qS>).

La comercialización de productos orgánicos con países anglosajones se está llevando a cabo mediante empresas certificadoras que controlan que los procesos productivos cumplan con estándares como ISO guía 65 (European market, rule CE 834/2007), Demeter (international market), USDA/NOP (North American market) e INMETRO/MAPA (mercado Brazileño).

Entre ellas, las siguientes empresas:

- ECOCERT con filiales en Perú, Ecuador, Colombia y México.
- IBD con sede en Brasil ofrece sus servicios a nivel de la región
- Tradin Organic ofrece servicios en el mercado peruano y se encuentra expandiendo a nivel regional.

El desarrollo de productos para control biológico a nivel latinoamericano, establecen diferencias marcadas respecto a la disponibilidad de estas tecnologías para el agricultor dependiendo del país.

Ecuador no dispone de una organización pública centralizada para producción de Agentes de Control Biológico (ACBs), sin embargo a nivel privado existen laboratorios para producción de hongos (entomopatógenos y benéficos) cuyos procesos productivos son mejorados (Noboa *et al.* 2015).

La red de investigación establecida entre el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y Universidades coordinó la presencia del Dr. Trevor Jackson (Agresearch - Nueva Zelanda) quien transfirió la técnica de peletización de hongos, siendo actualmente línea de investigación (Viera *et al.* 2018). Los avances en este campo están siendo patentados con el objetivo de a corto plazo disponer de presentaciones comerciales de formulados de microorganismos.

En Colombia, el empleo de *B. bassiana* se lleva a gran escala debido a los requerimientos de la federación de caficultores (Cenicafe) para el control de la broca (*Hypothenemus hampei*), existiendo 10 productos registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y 4 laboratorios para análisis de calidad de formulaciones (Góngora *et al.* 2009).

Cuba posee un programa nacional de lucha biológica coordinado por el Instituto Nacional de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), junto con una red de 208 Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREEs) y cuatro plantas industriales de producción de microorganismos para biocontrol (<https://bit.ly/2vXbye1>).

En Chile, BioINIA produce comercialmente toda una gama de Agentes de Control Biológico (ACBs) como son predadores y parasitoides, así como cepas de hongos y nematodos entomopatógenos, bacterias y virus, con registros sobre el tipo de plaga en la que han sido validados (Sepúlveda 2017)

Perú dispone de una red nacional para producción a Agentes de Control Biológico (ACBs) repercutiendo en ventajas para exportación de sus productos (Cueva 2012). Como miembro

del COSAVE presenta los mayores avances en la implementación del control biológico como parte de sus prácticas culturales, ya que posee 22 especies de insectos, 5 hongos entomopatógenos y 4 *Trichoderma* spp en producción y aplicación en campo. Los otros miembros presentan los siguientes avances:

- Argentina. 12 especies de insectos, 2 ácaros, 1 virus, 1 hongo entomopatógeno
- Brasil. 21 especies de insectos, 1 ácaro, 2 hongos entomopatógenos, 3 bacterias entomopatógenas
- Chile. 15 especies de insectos
- Paraguay. 4 hongos entomopatógenos, 1 bacteria entomopatógena.
- Uruguay. 2 virus, 2 hongos entomopatógenos, 1 hongo benéfico y 2 bacterias entomopatógenas.

A lo largo de su historia, Perú ha introducido 139 especies benéficas, de las cuales 51 se han establecido, 12 están en proceso de acondicionamiento y 13 se han establecido con un control muy importante de las plagas para las que fueron introducidas (COSAVE 2018).

2.2 Hongos entomopatógenos

Según Cañedo y Ames (2004) se considera a un microorganismo “Entomopatógeno” cuando ocasiona enfermedad y muerte de insectos (Figura 1) siendo los primeros microorganismos empleados, gracias a su crecimiento macroscópico (algunos no presentan crecimiento superficial).



Figura 3: Plagas atacadas por hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos por lo general no afectan a mamíferos, aves, reptiles y peces (Cañedo y Ames 2004). Carloza *et al.* (2015) en sus pruebas sobre ratones solo logró

recuperar conidias de los pulmones luego de tres días de aplicar gotas nasales; no encontró conidias en otros tejidos ni observó cambios de comportamiento o alteraciones anatomopatológicas.

Ventajas y Desventajas (Cañedo y Ames 2004, Sepúlveda 2017)

Ventajas:

- No contaminan el medio ambiente ni afectan a aves, reptiles, peces, anfibios y mamíferos, incluido el hombre.
- Presentan grados variables de especificidad, siendo específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas.
- Se reproducen de manera continua, es decir, se vuelve persistente.
- Se pueden aplicar mezclas de hongos con dosis sub letales de insecticidas para lograr efectos sinérgicos.
- Sus variados medios de acción impiden que los insectos se adapten y/o generen resistencia a diferencia de los agroquímicos.

Desventajas:

- En general, los microorganismos entomopatógenos no matan instantáneamente
- Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas
- Requieren condiciones de almacenamiento más exigentes que los insecticidas químicos

2.2.1 Aislamiento e identificación

El material debe ser etiquetado con información geográfica del lugar de la colecta y guardado bajo refrigeración en una placa o frasco de vidrio o plástico, no se debe emplear papel o medios líquidos para este propósito. En caso de no observarse claramente el micelio sobre el insecto se puede optar por colocar la muestra en una cámara húmeda que consiste en una placa petri con papel humedecido y dejar unos días hasta que el posible hongo entomopatógeno desarrolle sobre el insecto (Cañedo y Ames 2004).

La identificación de hongos entomopatógenos es relativamente fácil observando el color, diámetro y contorno de crecimiento de la colonia purificada diferenciándose de contaminantes como *Trichoderma* y *Penicillium* (color verde), *Fusarium* (color morado a rosado) y *Aspergillus* (color verde amarillento), pero en caso de duda la identificación de géneros de hongos entomopatógenos se da microscópicamente (Figura 2) en base a su morfología (Samson *et al.* 2013).

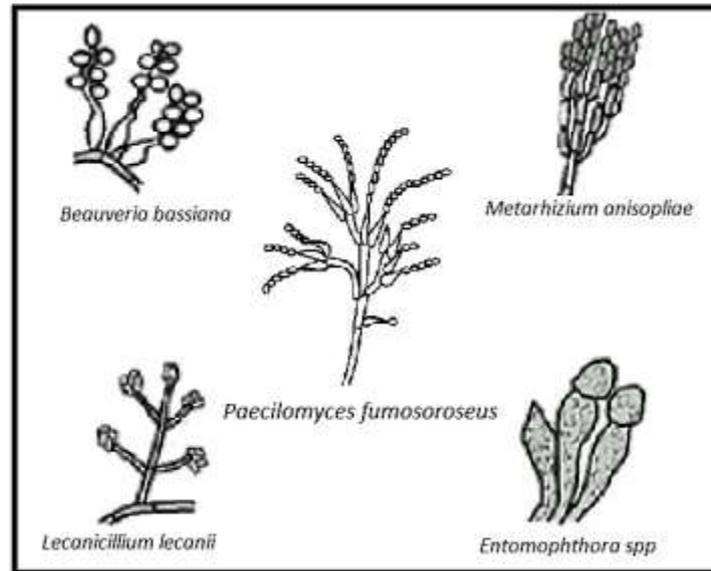


Figura 2: Representación de especies importantes de hongos entomopatógenos

Posteriormente se procede a coleccionar con una aza esterilizada una porción de espora donde se encuentre un área pura y se inocula en una placa petri con PDA, con lo cual se logra purificar el cultivo. (Samson *et al.* 2013).

Cañedo y Ames (2004) describe el siguiente procedimiento:

- Remojar al insecto por 1 minuto en hipoclorito de sodio al 1%.
- Enjuagar de 3 a 4 veces con agua destilada
- Picar con un palillo esterilizado la esporulación del hongo. De no poder realizarse este procedimiento se coloca la muestra sobre una placa Petri estéril y parte en pedazos mediante un bisturí y pinzas esterilizadas.
- Sembrar las muestras en PDA.
- Incubar la muestra a 20°C durante 7 días

2.2.2 Postulados de Koch y reactivación de cepas

Según Volcy (2008) para determinar si un microorganismo es causante de una enfermedad debe seguir los postulados de Koch, que enuncian:

- El agente patógeno debe estar presente en cada caso de la enfermedad en las condiciones apropiadas y ausente en las sanas.
- El agente no debe aparecer en otra enfermedad de manera fortuita o saprófita.
- El agente debe ser aislado del cuerpo en un cultivo puro a partir de las lesiones de la enfermedad.
- El agente debe provocar la enfermedad en un individuo susceptible al ser inoculado.
- El agente debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en el individuo de experimentación.

Se inician las pruebas aplicando los postulados sobre la especie de la cual fue aislado el posible entomopatógeno. De cumplir los postulados se procede a verificar la especificidad de la cepa repitiendo el proceso con otras familias, géneros y especies de insectos. Para el control biológico se busca cepas que sean altamente específicas y virulentas donde la cría de insectos plaga para su refrescamiento sea fácil de realizar. (Ravensber 2010).

2.2.3 *Beauveria bassiana*

Agostino Bassi di Lodi (1835) demostró por primera vez que un hongo puede causar enfermedad en insectos, observando la enfermedad de la “muscardina blanca” en larvas de *Bombix mori* (L.).

El naturalista Giuseppe Gabriel Bálamo Crivelli (1835) le dio el nombre de *Botrytis bassiana* al hongo causante de tal enfermedad; finalmente estudios taxonómicos determinaron como nombre científico *B. bassiana*.

Infecta a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de gran importancia agrícola, entre las que están la broca del café, la palomilla del repollo y el picudo del plátano (Monzón 2001). Su máxima capacidad de penetración e infección se ve favorecida a los 20°C y 92% de humedad relativa (Isfèr, 2006).

El crecimiento de *Beauveria* en PDA muestra un desarrollo óptimo a 25°C con pH 7, a los 14 días forma una colonia algodonosa a polvorienta, blanca y a medida que va pasando el tiempo se vuelve amarillenta y cremosa (Figura 3). El revés es de color rojizo al centro y amarillento alrededor (Cañedo y Ames 2004).



Figura 3: Cultivo de *B. bassiana* en placa petri

El conidióforo puede ser simple o ramificado, aproximadamente de 1-2 μ de diámetro, de allí nacen las células conidiógenas. Las conidias miden aproximadamente de 2 a 3 X 2 a 2.5 μ y se originan en forma simpodial, es decir, forma un raquis en zigzag (denticulas), siendo ésta su característica distintiva. Adicionalmente, las conidias son hidrofóbicas (Valencia 2015).

2.3 Pruebas de laboratorio para el desarrollo de biopesticidas

2.3.1 Caracterización de cepas

Cultivo monospórico

Este proceso antecede a cualquier prueba. Consiste en la generación de una colonia pura a partir de una sola espora. Se procede a realizar la cantidad de diluciones necesarias, usualmente en productos comerciales se llega a emplear diluciones 10^{-6} . Se siembra de PDA y se monitorea diariamente hasta identificar la formación de colonias (Cañedo y Ames 2004)

Crecimiento radial

Consiste en transferir mediante un aza o aguja estéril una pequeña cantidad de hifa en el centro de una placa Petri con PDA en cuyo envés se dibujó una cruz. Se incuba a una temperatura y tiempo determinado, siendo estos parámetros fijos como parte de un protocolo para identificación de cepas (Valencia 2015).

Colorimetría

El sistema de colores de Munsell (1920), fue adoptado para suelos por el departamento de agricultura de los EEUU basado en 3 atributos (matiz, intensidad y croma) permite la identificación exacta de la tonalidad de cualquier color.

Esta tonalidad es identificada en el haz y envés de la colonia del hongo a un periodo de tiempo de crecimiento establecido con una temperatura fija (Espín y Guerra 2016).

Hidrofobicidad

La hidrofobicidad es la característica de repelencia de una sustancia al agua. Ejecutando una dilución a la 10^{-1} , tomando una alícuota de 1 ml y depositándolo en un tubo con 1ml de tolueno. Se centrifuga a 500 rpm durante 40 minutos, posteriormente se ubica el tubo en posición vertical, se deja decantar y se extrae 1 μ l para depositar en Cámara de Neubauer. Se realiza el conteo de conidias y se lo compara con un conteo de conidias de la dilución a la 10^{-1} . Se realizan 5 repeticiones (Valencia 2015).

Patogenicidad inhalatoria

Mediante gotas nasales se inocula una concentración conocida de conidias sobre ratones. Se llevan registros clínicos y de comportamiento, con estudios histopatológicos a los 3, 7 y 14 días (Cazorla *et al.* 2015).

2.3.2 Control de calidad

Concentración de esporas

Determina el número de unidades infecciosas en una determinada unidad de peso o volumen, sirviendo de base para la dosificación de un producto. Mediante técnica de dilución se procede al conteo de esporas en Cámara de Neubauer, posteriormente se aplica una fórmula para determinar la concentración del producto original (Vélez 1997).

Germinación de esporas

Establece la viabilidad del hongo, se emplea en conjunto con la prueba de concentración de esporas permite calcular la cantidad de esporas viables en un producto. Empleando una dilución 10^{-3} se siembra 5 alícuotas en una placa Petri con agar agua, señalando la ubicación donde fueron inoculados, transcurridas 15 horas se paraliza el crecimiento mediante azul de lacto fenol a cada alícuota y se observa a través de microscopio contabilizando germinadas de un total de 100 conidias al azar (Vélez 1997).

Pureza

Establece la proporción del agente biológico en el producto e identifica los microorganismos contaminantes. Similar a la metodología de Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) se procede mediante conteo a cuantificar los contaminantes frente a las colonias del hongo a producir, determinando la relación en porcentaje (Vélez 1997).

Dosis Letal Media (DL50)

Consiste en determinar la concentración de esporas necesaria para matar al 50% de los individuos de un ensayo. Para su ejecución se procede a realizar diluciones en concentraciones conocidas, las cuales posteriormente son aplicadas sobre el insecto proveniente de una crianza de laboratorio. Este es transferido a contenedores con una temperatura controlada, donde se le brinda alimento (Aliaga 2009).

La metodología con mayor reporte de uso en productos formulados de hongos es el empleo de larvas de *G. mellonella* en último estadio, las cuales son sumergidas en la dilución por intervalo de hasta 1 minuto.

Tiempo Letal Medio (TL50)

Consiste en identificar mediante un cronómetro el tiempo entre la primera y la última mortandad de los insectos luego de la exposición al hongo entomopatógeno formulado (Blanford *et al.* 2012).

2.3.3 Formulación

pH

Esta prueba se realiza mediante la toma de datos con un phmetro a la formulación del compuesto y durante los intervalos de control de viabilidad del producto. El pH neutro es favorable para el crecimiento de todo tipo de microorganismos, sin embargo, la alteración del mismo puede favorecer a algunos al inhibir el crecimiento de otros (Viera *et al.* 2018).

Actividad de agua (aw).

Cantidad de agua libre que posee una sustancia y que puede ser utilizada por los microorganismos para desarrollar su metabolismo, si un microorganismo se encuentra en actividad en agua inferiores a su valor óptimo detiene su crecimiento, manteniéndose en latencia. Para la ejecución de esta prueba se requiere un equipo medidor de agua, siguiendo el protocolo del equipo para su medición. En productos a base de hongos se considera valores de actividad de agua entre 0.5 y 0.8 como adecuados para este tipo de microorganismos (Perdomo 2018)

Test de radiación ultravioleta.

Rodríguez *et al.* (2016) brinda un protocolo de pruebas exponiendo las conidias ante una fuente conocida de UV con diferentes intervalos de tiempo La relevancia de este test radica en la supervivencia de la espora ante la exposición a luz UV solar, factor importante para lograr la supervivencia de la misma en campo.

Suspensibilidad

Determina la concentración de esporas del producto en suspensión luego de transcurrido un tiempo. Mediante Cámara de Neubauer al momento de la ejecución y dejándola decantar 50 minutos después, tomando 4 muestras y sacando el promedio. Las muestras son puestas en una probeta de 10ml y se obtienen del líquido sobrenadante de los primeros 1,5ml. Se aplica la fórmula $\text{Concentración final} \times 100 / \text{Concentración inicial}$ para obtener un porcentaje de esporas suspendidas luego de 50 min (Vélez 1997).

Esta prueba permite establecer criterios para homogenizar la aplicación en campo, ya que 50 minutos corresponde al tiempo que demora un aspersor de 10 litros para evacuar su contenido con una boquilla de 190 cc/min de descarga.

Taponamiento de boquillas

Evalúa si la formulación origina taponamiento de boquillas en equipos de aspersión. Determinando la presión del equipo y el tipo de boquilla a utilizar, se procede a preparar el producto acorde a la recomendación del fabricante observando la cantidad de líquido descargado por minuto al momento de formulación, transcurridos 25 y 50 minutos. Posteriormente se revisa la presencia de sedimento en la boquilla (Vélez 1997).

2.4 Diseño de un biopesticida comercial

Ravensber (2010) para el desarrollo de biopesticidas emplea el esquema de la ilustración dos. Para esto, se debe tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- Mantener la actividad biológica durante la producción, procesado y almacenado
- Aplicar una concentración suficiente para obtener la actividad deseada (características del mezclado)
- Que el producto contacte al agente blanco
- Que resista la inactivación
- Que prevenga la fototoxicidad (en ocasiones causada por la formulación)

La complejidad del sistema expuesto no permite una explicación didáctica sencilla (Figura 4), pero en el capítulo dos presenta un esquema simplificado de tamizado de cepas para investigación. El presente trabajo modifica este esquema en un sistema de cuatro fases para la producción de un biopesticida comercial (Figura 5).

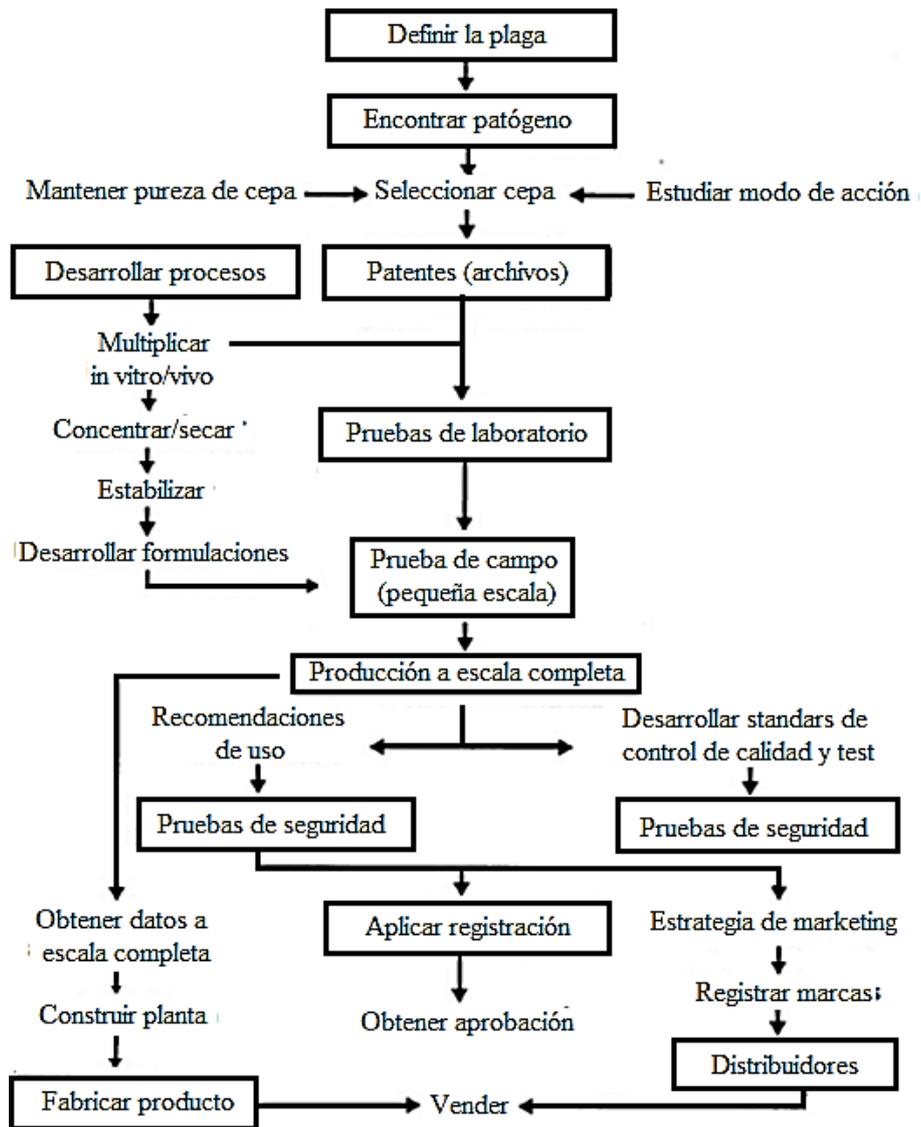


Figura 4: Esquema de desarrollo de biopesticidas empleado por el programa lubilosa (Dent, citado por Ravensber. 2010)

SENASA y los productores particulares que conforman la red de laboratorios del Perú comercializan hongos entomopatógenos producidos sobre sustrato sólido (arroz) en bolsas de 800 gramos luego de secadas. No existen formulaciones a nivel de mercado y usualmente las cepas producidas han sido provistas por SENASA.

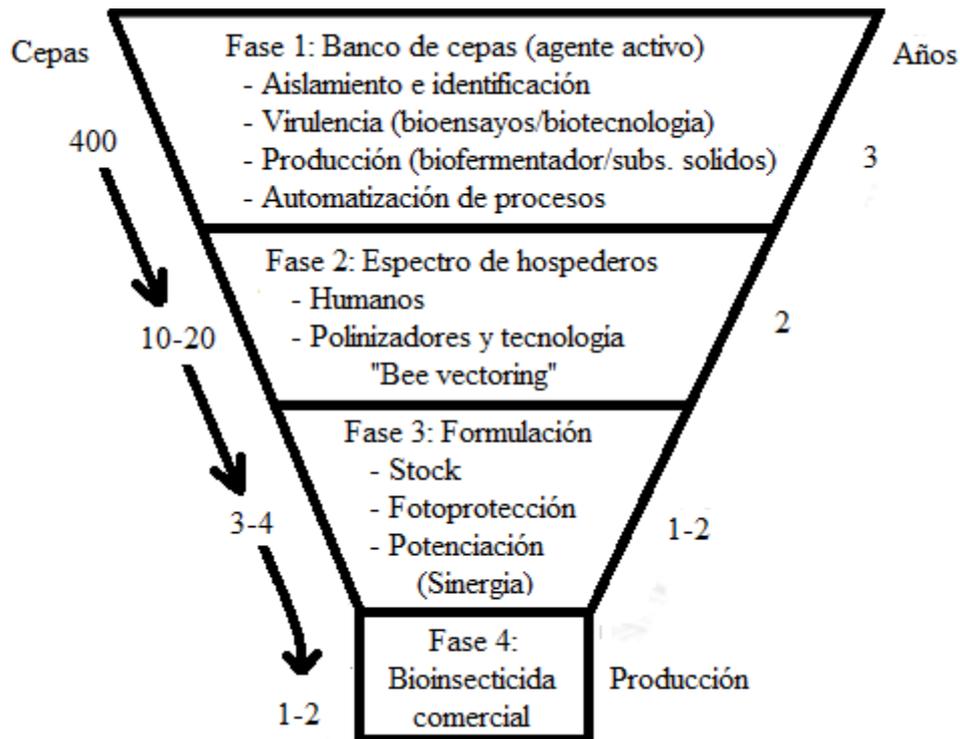


Figura 5: Fases para diseño de un bioinsecticida comercial y tiempo estimado

La viabilidad de las esporas de *B. bassiana* producidas mediante esta tecnología fue evaluada en laboratorio por De León *et al.* (2014) sobre *Hypothenemus hampei* bajo 3 tratamientos a 4°C y 30°C

- Esporas en sustrato de arroz
- Esporas separadas del sustrato de arroz
- Esporas separadas del sustrato de arroz, en aceite de maíz.

El ensayo demostró que la viabilidad de las esporas aumenta al separarse del sustrato y secarse, duplicando el tiempo mediante refrigeración. Aún bajo estas condiciones, la tecnología no permite un almacenamiento mayor a un mes.

Blanford *et al.* (2012) logró almacenar esporas de *B. bassiana* por un periodo de hasta 165 días a 22°C y 585 días en refrigeración. La metodología empleada fue el secado de las mismas junto con un sellado hermético en láminas de 5x5cm.

Se debe destacar que al abrirse los sobres, la entrada de humedad influía inmediatamente en la pérdida de viabilidad, por lo que los largos periodos de almacenamiento solo se lograban en refrigeración, con láminas herméticamente selladas.

Comparando las metodologías productivas y de control de calidad del Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria (SENASA) de Perú, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador, así como los protocolos de laboratorio de instituciones afines de México, Colombia, Cuba y Chile, se constató que se encuentra estandarizada la tecnología de producción de hongos sobre sustrato sólido (arroz).

2.4.1 Fase 1

Banco de cepas (Agente activo)

Se debe trabajar de preferencia con colecciones del país y de ser posible, aisladas del sitio donde se emplearán. Latinoamérica posee legislaciones y organismos de control para ingreso de plantas, animales e insectos por el riesgo que representa importar una plaga con potencial de colapsar la industria agrícola del país.

No sucede lo mismo con los biopesticidas, pues no hay una normativa clara y común que permita el comercio entre países de la región, lo cual repercute en muchas veces la libre importación de microorganismos de distintos países registrándolos para otros fines, por ejemplo como fermentos.

La primera consideración es determinar en base al organismo a controlar, cual o cuales microorganismos ejercen control sobre el mismo y establecer una colección base. Como referencia en la tabla 1 se ha resumido los distintos microorganismos que existen en el mercado y los organismos sobre los que son empleados.

Tabla 1: Resumen de microorganismos comercializados (fuente OMRI).

Microorganismo	Plagas	DL50
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Díptera, coleóptera, larvas de lepidóptera defoliadores y ácaros	
<i>Beauveria bassiana</i>		2,5 x 10 ⁵
(Nota: Tiene registro CAS)	Coleóptera, lepidóptera, homóptera, hemípteras, orthoptera, etc.	UFCs
<i>Metarhizium anisopiae</i>		
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Mosca blanca, trips, aphidos	
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Hemiptera, nematodos (<i>Radopholus sp</i> ,	
(Nota. Variante <i>Purpureum lilacinus</i> puede enfermar a humanos)	<i>Meloidogine sp</i> , <i>Helicotylenchus sp</i> , <i>Pratylenchus sp</i>)	2,5 x 10 ⁶ UFCs
<i>Arthrobotrys sp</i>	Nematodos (<i>Radopholus sp</i> ,	
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	<i>Meloidogine sp</i> , <i>Helicotylenchus sp</i> , <i>Pratylenchus sp</i>)	
<i>Trichoderma sp</i>	Hongos patógenos (Damping off). Pudriciones de tallos y raíces.	
<i>Gliocladium sp</i>	<i>Rhizoctonia sp</i> , <i>Phytium sp</i> , <i>Fusarium sp</i> , <i>Sclerotinia sp</i> , <i>Botrytis sp</i> .	3 x 10 ⁶ UFCs
<i>Ulocladium oudemansii</i>	<i>Botrytis cinérea</i> , <i>Sclerotinea sclerotium</i> , <i>Monilia sp</i> .	

Para evaluar a los microorganismos se debe tomar en cuenta que el modo de acción difiere de los agroquímicos porque no mata inmediatamente. El ingreso se da por contacto o ingestión, ocurriendo la germinación del micelio a partir de 6 horas en condiciones de alta humedad. Los efectos se observan a partir de las 72 horas (García 1999).

Otro factor a tomar en cuenta es la importancia del refrescamiento del microorganismo sobre su hospedero, ya que de omitirse este paso y solo dedicarse a la réplica se pierde la virulencia del mismo (Santoro 2014).

La variación entre aislados/cepas de especies se dan por características inherentes enumeradas a continuación (Ravensber 2010):

- Morfología
- Virulencia
- Espectro de hospederos
- Metabolitos
- Producción de esporas
- Tolerancia a temperaturas
- Tolerancia a UV
- Tolerancia a condiciones ligeramente secas para germinación
- Persistencia en suelos
- Tolerancia a pesticidas

Aislamiento e identificación de cepas

Las metodologías de aislamiento, identificación y control de calidad de hongos entomopatógenos son de libre acceso por internet y se encuentran estandarizadas. (Vélez 1997, Cañedo y Ames 2004, Pereira y Mora 2004, Embrapa 2014, Rosas 1999)

Para la clasificación de cepas se emplea el protocolo de cultivo monospórico sobre un medio de producción (PDA) y tiempo preestablecido (Castillo *et al.* 2014).

Si bien la identificación de familias y géneros de hongos entomopatógenos es relativamente fácil, la identificación de especies y cepas incrementa su complejidad. Villamil y Martínez (2014) brinda un ejemplo de organización de un banco de cepas:

Inicialmente se emplea una clasificación macroscópica tomando como referencia la morfología colonial bacteriana (Figura 6), los días de crecimiento y el diámetro de la colonia. Para el color del haz y envés de la colonia se emplea la cartilla de colores de Munsell.

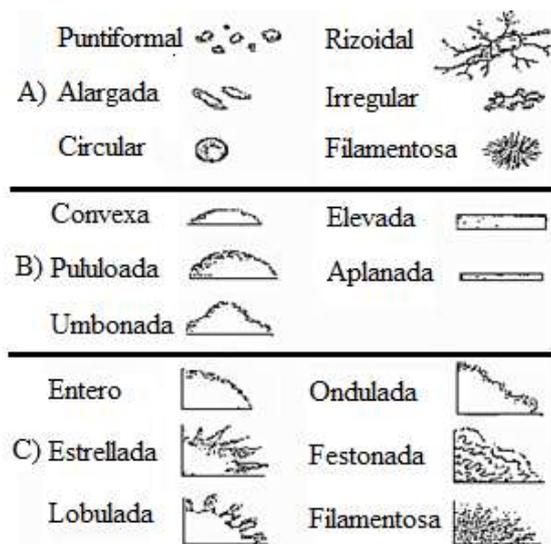


Figura 6: Contornos colonias bacterianas: A) Forma, B) Elevación y C) Margen

La caracterización microscópica consiste en la descripción de la forma de los conidioforos, conidias, fialides, raquis y tamaño de conidias (μm), sin embargo, no se emplea debido a las variaciones que puede presentar. Imoulan *et al.* (2017) al referirse al límite morfológico en la identificación de especies de *Beauveria* spp, menciona cambios en la morfología microscópica de conidias al variar el medio de crecimiento.

Holder *et al.* (2007) menciona diferencias en las características de la superficie de tres tipos de célula simple (Conidia aérea, conidia sumergida y blastospora) para *B. bassiana*, e inclusive menciona variabilidad en la virulencia.

Imoulan *et al.* (2017) menciona la existencia de 17 especies de *Beauveria* a nivel mundial existiendo especies crípticas para las que se requirió medios biotecnológicos de identificación. También indica que algunas cepas presentaron pigmentos rojizos por la presencia de oosporeina dibenzoquinona en ciertos medios de cultivo.

Como metodologías moleculares de caracterización se cita el trabajo de Espin y Guerra (2016) mediante marcadores moleculares ITS y EF1- α de aislados de *Beauveria* spp y el trabajo de Echeverría (2006) con el empleo de microsatélites como herramienta de identificación. Ambas metodologías se encuentran descritas permitiendo su empleo en la caracterización de colecciones.

Virulencia

El método convencional para determinar la virulencia consiste en verificar la mortandad del 50% (DL50) o más (DL90) de una población de insectos criados en laboratorio frente a una concentración determinada del patógeno (Aliaga y Cruz, 2009), pero al desarrollarse la biotecnología se cuenta con nuevas metodologías expuestas a continuación.

Berreta (2001) señala dos nuevos genes de *B. bassiana*: Una quitonasa y una proteína de transporte que podrían estar relacionados con la patogenicidad.

La oosporeína benzoquinona, responsable de la pigmentación roja en cepas de *Beauveria* sp, también muestra importancia en la evasión del sistema inmunológico de los insectos (Feng *et al.* 2013)

Fan *et al.* (2017) demostró que la producción de oosporina en *B. bassiana* está directamente relacionada en la inhibición de colonias bacterianas, permitiendo eliminar la competencia dentro del cadáver del insecto.

También identificó un nuevo factor de transcripción para la síntesis de oosporina, BbSmr1 (regulador de metabolito secundario de *B. bassiana* 1) en una pantalla sobre producción de oosporeína dibenzoquinona. La eliminación de Bbsmr1 dio lugar a una regulación al alza del grupo de genes biosintéticos de la oosporeína dibenzoquinona (genes OpS) y a la producción constitutiva de la oosporeína dibenzoquinona.

Arboleda (2004) expone un método de detección de beauvericina (toxina cicloheptadepsipeptida) en el hongo entomopatógeno *B. bassiana* mediante anticuerpos clonales para cuantificación inmunológica, empleando ELISA y Dot – blot como pruebas serológicas.

Producción

Básicamente existen 3 métodos de producción de hongos benéficos:

- Conidias sobre sustrato sólido (artesanal), donde Babul (2016) demostró que el mejor sustrato productivo es arroz.

- Método mixto (semi industrial) donde el propagulo inicial son blastosporas, para posteriormente producir conidias sobre sustrato sólido.
- Blastosporas en biofermentación (industrial).

Tabla 2: Características de propágulos según el tipo de producción (Sepúlveda 2017)

Característica	Blastospora	Conidia
Pared celular	Delgada	Gruesa
Resistencia a la deshidratación	Baja	Alta
Resistencia a la radiación solar	Menor	Mayor
Hidrofobicidad	Hidrófilas	Hidrófobas
Adherencia a tejidos vegetales	Ninguna	Alta
Adherencia a otros hongos	Ninguna	Alta
Almacenaje	Pocas horas	Hasta 1 año
Estabilidad de suspensión	Inestable	Estable

De manera general se comparan las características de las conidias (sustrato sólido) con las blastosporas (Biofermentación) en la tabla 2, sin embargo, se está desarrollando una nueva metodología de biofermentación que produce un tercer tipo de estructura llamado microesclerotia, la cual posee características superiores a los métodos convencionales (Villamizar *et al.* 2018).

El Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria del Perú (SENASA) posee una plataforma virtual donde se pueden descargar normativas de laboratorio y protocolos de producción de Agentes de Control Biológico (ACBs), siendo una importante fuente de consulta para conocer el desarrollo de la tecnología peruana en esta área. Los biopesticidas son comercializados sobre sustrato sólido.

Ecuador también produce biopesticidas sobre sustrato sólido, sin embargo se encuentra avanzando hacia el cambio de tecnología (Jiménez *et al.* 2013)

Cuba y Colombia, tienen mayor experiencia en el uso del método industrial de biofermentación. Cruz (2007) describe los distintos tipos de fermentación (líquida, por lotes/Batch, sólida y bifásica), bioreactores (Sólido de bandejas, airlif de lazo interno), componentes, cálculos, así como pruebas de viabilidad y germinación de conidios.

Se ha desarrollado tecnología para automatizar los procesos de control de calidad, consistentes en 4 pruebas estándar (Concentración de esporas, Germinación de esporas, Unidades Formadoras de Conidias y Bioensayos), así por ejemplo Naranjo (2016) presenta un mecanismo automatizado que puede emplearse para las pruebas de Unidades Formadoras de Conidias (UFCs).

2.4.2 Fase 2

Espectro de hospederos

Para la aprobación de uso de insecticidas químicos en un país se ejecutan una serie de pruebas para conocer los efectos sobre seres humanos respecto a intoxicaciones agudas, subcrónicas y crónicas. Las pruebas consisten en DL50 (oral y dermal), CL50 inhalatoria, irritación ocular, sensibilización, carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad. Adicionalmente se debe conocer los efectos en el medio ambiente (residualidad, percolación, degradación por rayos ultravioleta, fijación en el suelo) y pruebas en otras especies como aves, peces, crustáceos (*Daphnia magna*), abejas y lombrices de tierra (<https://bit.ly/2DrKmYT>).

Para el caso de los biopesticidas, este tipo de pruebas no aplican ya que para la formulación se emplean microorganismos que presentan especificidad para la clase insecta, y en caso de una buena selección de los mismos, pueden tener un alta especificad para una plaga como en el caso de los virus. Tampoco existe una legislación ambiental ya que se considera no presentan los problemas de residualidad, aunque se sabe que una mala selección podría afectar a agentes polinizadores, sin embargo, la World Health Organization en el 2018 presento un sistema de registro que será de aplicación internacional.

Afecciones en seres humanos

La respiración de partículas de polvo como en el caso de los excipientes empleados en la formulación posee consecuencias negativas similares a los problemas al respirar humo, pero al adicionar microorganismos como hongos entomopatógenos se presenta una reacción alérgica que daña los alveolos pulmonares junto con un cuadro agudo de fiebre, la cual se conoce como “alveolitis alérgica extrínseca” o “neumonitis por hipersensibilidad” (Sarduy *et al.* 2014).

Sarduy *et al.* (2014) identifica 5 grandes grupos de afecciones: enfermedades crónicas del aparato respiratorio, afecciones crónicas de vías respiratorias superiores, procesos energizantes, enfermedades de la piel y afecciones oftálmicas. Este conocimiento es empleado en el chequeo médico pre empleo, así como en el chequeo periódico que se realiza a los trabajadores de los Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos (CREEs) de Cuba. Sarduy (2011) plantea el esquema de la Figura 7.

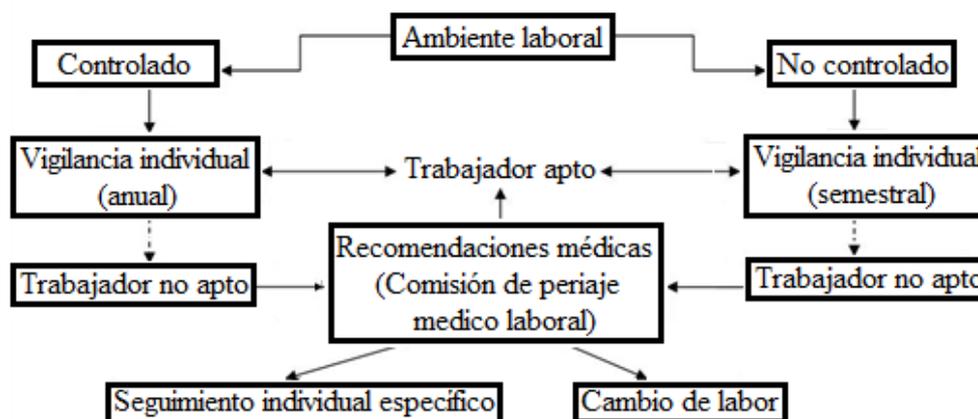


Figura 7: Esquema de monitoreo de salud para bioformuladores (Sarduy 2011)

En base a la vigilancia médica dada al personal, se aplica el siguiente protocolo:

- Enfermo tipo I:
 - 1) Separación temporal del puesto de trabajo y/o valoración por comisión de peritaje médico laboral (CPML), y
 - 2) Reintegro laboral previa alta médica y/o valoración por la CPML.
- Enfermos tipo II, III y IV:
 - 1) Se recomienda cambio definitivo de labor / valoración por la CPML , y
 - 2) Seguimiento por un especialista de neumología.

Cazorla *et al.* (2015) establece un protocolo de pruebas mediante gotas nasales, realizando observaciones clínicas y de comportamiento.

La “Organisation for Economic Cooperation and Development” (2018) en su publicación sobre pesticidas N.98 publicó un anexo al documento de trabajo sobre la evaluación de riesgos de metabolitos secundarios de Agentes de Biocontrol Microbiano donde se menciona metabolitos secundarios de distintos hongos entomopatógenos que tienen posibles repercusiones para la salud humana, incluyendo adicionalmente a la conjuntivitis debido su afectación sobre la córnea humana.

Polinizadores y tecnología “Bee vectoring”

Espinosa *et al.* (2011) demuestra que existen variabilidad en la virulencia de las cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre abejas, mientras *P. fumosoroseus* no presento virulencia.

Esto implica que con una adecuada selección de cepas de hongos entomopatógenos es posible ejercer control sobre órdenes específicos de insectos sin daños colaterales para las abejas, por ejemplo, Meikle *et al.* (2008) empleó una cepa de *B. bassiana* altamente específica para controlar al acaro de la *Varroa* obteniendo los mejores resultados al formularla sobre polvo de cera.

El desarrollo de cepas que no afecten a abejas no solo ha servido para evitar el impacto ecológico por perdida de este importante polinizador, sino que ha creado una nueva tecnología para la aplicación de microorganismos benéficos (bacterias, hongos antagonistas y hongos entomopatógenos) llamada “Bee vectoring”, existiendo varios trabajos llevados por la Universidad de Guelph en Canada (Kevan *et al.* 2007, Kapongo *et al.* 2008, Dedej *et al.* 2004).

Al-Mazra'awi *et al.* (2007) investigo la cantidad de conidias transportadas por abeja al exponerlas a formulaciones en polvo usando como excipientes harina de trigo, almidón de papa, sémola de trigo duro, harina de maíz, hojuelas de patata, harina de avena y harina de cebada. Los mejores resultados los obtuvo sobre harina de trigo.

2.4.3 Fase 3:

Formulación

Basándose en el trabajo de Ravensber (2010), una formulación es una mezcla estable de ingredientes activos e inertes que hace al producto seguro y más eficaz para su transporte y aplicación sobre la peste objetivo. Entre los factores que afectan la persistencia (eficacia) de la conidia en campo se tiene:

- Lluvia y excesiva irrigación
- Luz solar (UVA y UVB)
- Alta temperatura (>35°C)
- Residuos de algunos fungicidas e insecticidas

Basándose en el mismo trabajo, las principales consideraciones para la formulación de entomopatógenos son:

- Estabilidad durante el almacenado
- Mantener la actividad biológica para su aplicación en campo
- Tolerar la desecación
- Resistir la degradación
- Mejorar la virulencia

Respecto a la formulación de los agroquímicos existe un consenso respecto a las presentaciones, la cual se presenta resumida en la tabla 3 (García 1999).

Tabla 3: *Clasificación de las formulaciones. García (1999)*

Formulación	Cod	Propiedades
Formulaciones diluidas en agua		
Concentrado emulsificable	EC	Emulsión formada en tanques de aspersión
Emulsión agua en aceite	EO	Emulsión pre formada
Emulsión aceite en agua	EW	Emulsión pre formada
Concentrado en suspensión	SC	IA insoluble suspendido
Suspensión en cápsulas	CS	IA suspendido en cápsulas
Concentrado soluble	SL	Utilizado para IA solubles en agua
Polvo soluble en agua	SP	Polvo soluble que puede contener inertes
Gránulo soluble en agua	SG	Utilizado para IA solubles en agua
Tabletas	TB	
Braquetas	BR	Formulaciones de liberación controlada
Polvo humectable	WP	Tiene IA, acarreador de arcilla y surfactantes
Gránulo dispersable en agua	WG	IA disperso, pero no disuelto en agua
Formulaciones aplicadas sin diluir		
Polvo para espolvoreas	DP	IA acarreado en polvo libre
Gránulo	GR	Aplicado a tierra y agua
Granulo encapsulado	CG	Gránulo de liberación controlada
Microgránulo	MG	Diámetro debajo de 0.6 mm
Líquido electrocargable	DE	Usado con equipo de rocío electrostático
Aceite para esparcir	SO	Aplicado a superficie de agua
Líquido ultra bajo volumen	UL	Aplicado con rociadores de UBV
Suspensión ultra bajo volumen	SU	Igual al anterior
Tratamiento para semillas		
Polvo para Tratamiento seco de semilla	DS	
	FS	Suspensión líquida
Fluido concentrado	LS	
Solución para tratamiento de semillas	PS	
Semilla cubierta	SS	
Polvo dispersable en agua	WS	Aplicado como suspensión

Miscelaneo

Concentrado de cebo	CB	Cebo diluido antes de la aplicación
Cebo	RB	
Generador de humo	FU	

Basados en el trabajo de Gasic y Tavonic (2013) junto con el listado OMRI sobre biopesticidas formulados, se expone las formulaciones de biopesticidas mas importantes.

Concentrados Emulsificables

- Material hidrofóbico (aceite acarreador) + emulsificante
- Pueden emplearse en productos de fermentación o extractos de plantas
- Suspensión de gotas adecuada en el tanque de aspersión
- No empleadas en forma típica para agentes particulados

Dispersables o Líquidos

- Concentrados líquidos o sólidos finamente molidos solubles en agua
- Forman soluciones claras que no precipitan
- Pueden emplearse en productos de fermentación o extractos de plantas

Polvos humectables

- Común en microbios/agentes encapsulados y “Bee vectoring”
- Agente activo + arcilla/talco + detergente/jabón + espesante
- El agente activo no es soluble en agua
- Espesante evita la precipitación

Gránulos solubles en agua

- Partículas grandes para evitar polvo,
- Agentes adherentes + dispersantes
- Características similares a los polvos humectables

Viera *et al.* (2018) en Ecuador probó distintos tipos de formulaciones (gránulos, polvo, líquidos) con hongos de los géneros *Trichoderma* y *Purpureocillium* registrando su variabilidad, pureza y concentración, observando mejores resultados en formulaciones secas que en líquidas en ambos casos, mientras que el tiempo de almacenaje de *T. asperellum* fue mayor que el de *P. lilacinum*.

García (1999) efectuó un proceso de Formulación en gelatina, pectina, gelatina/pectina y capsul. De las conclusiones destaca:

- El proceso de secado afecta la viabilidad y toxicidad del micoinsecticida
- La viabilidad se ve disminuida en los formulados almacenados a temperatura ambiente frente al almacenaje a 4°C.
- El secado por aspersión elimina una gran cantidad de conidias por lo que no era recomendable su uso.

Alternando excipientes con distintas propiedades es factible formular el producto de manera que no solo libere las esporas al disolverse en agua, sino que las acompañen en su diseminación en campo mediante aspersión (Gasic y Tanovic 2013).

Bastidas *et al.* (2009) evaluó 5 fórmulas donde varió las concentraciones de Tween 80 (Tensoactivo), glicerina (retenedor de humedad), carboximetilcelulosa (viscosante), goma arábica (espesante y adherente), alginato (viscosante), veguun (desagregante) y almidón hidratado (suspensión coloidal). Los resultados muestra la bondad de la preformulación sobre productos que no la poseen.

Bustillo (2000) evaluó por un lapso de 6 años un producto recién elaborado de un conjunto de marcas formuladas en polvo mojable, liofilizado + proteína, granulo dispersable en diatomea, así como producciones en arroz de cepa Cenicafe y artesanales.

Tiempo de almacenamiento (Stock)

Basado en Ravensberg (2010), los factores que afectan el tiempo de almacenamiento en formulación se resumen en:

- Diferencias entre especies y aislados

- Nutrición del hongo durante la producción
- Velocidad de secado durante la cosecha de conidias
- Excipientes empleados en la formulación

Villamizar *et al.* (2018) han producido estructuras de resistencia (microesclerotia) mediante biofermentación (medio líquido) para las especies *Beauveria pseudobassiana* y *B. brongniartii*, cuya producción resulta más barata que sobre sustrato sólido y alarga considerablemente el tiempo de almacenaje. Anteriormente estas estructuras fueron descritas en *Trichoderma harzianum* y *Metarhizium* spp, siendo un avance para el desarrollo de biopesticidas.

Fotoprotección

La luz UV se caracteriza por destruir microorganismos, motivo por el cual limita al uso de estos en campo. Edgington *et al.* (2000) evaluó 22 sustancias (ac. Ascorbico, levadura de cerveza, extracto de levadura, caseína, choline chloride, albumina de huevo, ac. fólico, leche en polvo, melasa, negro naphthol, sucrosa, tinopal LPW, dióxido de titanio, almidón, ac. úrico, óxido de zinc) como protectantes para esporas de *B. bassiana*. La relación beneficio/costo refleja que la fórmula más efectiva fue una mezcla de 3% de albumina de huevo y 4% de leche en polvo.

Basado en el trabajo de Rodríguez *et al.* (2016) se enumera a continuación un listado de posibles protectores UV:

- Alginato de sodio (encapsulación)
- Amarillo acridina
- Amarillo FDC
- Benzophenonas
- Carbon (carbon negro)
- Lignina hidrosoluble
- Lignosulfonatos
- Naranja metil
- Reflector ultravioleta: TiO₂
- Rojo congo

- Rojo FDC
- Tintes
- Verde malaquita
- Verde metil
- Verde brillante
- Verde FDC

Potenciación (Sinergia)

Si bien los biopesticidas se basan en el uso de microorganismos como agente activo, la adición de otros componentes en el formulado pueden incrementar la efectividad del mismo al debilitar el sistema inmunológico del insecto o cumplir otras funciones, así por ejemplo el Imidacloprid incrementa la adherencia de las conidias sobre el insecto, repercutiendo en un incremento en la virulencia (Quintela y McCoy 1997).

Dentro del listado de la OMRI se mencionan productos que poseen potencial para adicionarse en los formulados y con ello incrementar la eficacia del producto, tales como:

- Lure. Atrayente de insectos
- Extracto de ajo/manzanilla/ruda. Insecticida
- Sal potásica. Insecticida
- Extracto de *H. annuus/A. sativum/ L. graveolens*. Insecticida chupadores (Afidos, escamas, mosca blanca, barrenadores, cortadores, enrolladores y medidores.
- Extracto de higuera. Nematicida e insecticida.
- Extracto de *Tageles erecta*. Nematicida
- Extracto de pino/orégano/higuera. Nematicida.
- Extracto de canela. Fungicida y repelente
- Bicarbonato de potasio. Fungicida foliar.

2.4.4 Fase 4

Normativas para bioinsecticidas en Latinoamérica

La normativa FAO se encuentra vigente desde el 2017, sin embargo, Latinoamérica no se acoge a ella debido al desconocimiento de la misma y al retraso que se tiene en este campo. En la revisión bibliográfica realizada solo se encontró las siguientes referencias latinoamericanas como normativa:

De León *et al.* (2014) menciona que la norma fitosanitaria 2000 establecida para los laboratorios que participaron del programa de control contra la broca del café debían proveer un producto del hongo *B. bassiana* con una concentración de $1,3 \times 10^{12}$ esporas viables/ml.

Chiriboga *et al.* (2015) establecen en su manual de protocolos para la formulación para *B. bassiana* que el tiempo de almacenaje (stock) de un producto está determinado por la viabilidad del mismo; la cual debe estar por sobre el 80% de la concentración original al momento de formulación, así como en la germinación de esporas.

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) del Ecuador está planteando para sus formulados como tiempo límite la concentración 10^8 , de manera que al disminuir de este parámetro se considerará al producto caducado. Actualmente dicho criterio se encuentra en proceso para ser oficializado por “Agrocalidad” del Ecuador, para ser normativa nacional.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

La investigación fue ejecutada en dos localidades. Laboratorio de toxicología de la Universidad Nacional Agraria La Molina ubicado en la avenida “La Molina” s/n, y Laboratorio de entomopatógenos de SENASA ubicado en la calle “Los Diamantes” s/n, Urb. Los Topacios, Ate Vitarte.

Se empleó microondas, cámara de flujo laminar y cámara de crecimiento donde se controló las condiciones ambientales sin luminosidad (*G. mellonella* es plaga de almacén) a 25°C.

Como sujeto de peletización se empleó la cepa de *B. bassiana* producida por SENASA, que es comercializada en bolsas de 800 gramos con un costo de 13.3 soles equivalente a \$4 USD (<https://bit.ly/2Hhu7yP>).

La materia prima fue adquirida en el mercado peruano, siendo los componentes base de la pasta de peletizado en la primera fase talco industrial, bentonita sódica, caolinita y tierra de diatomeas.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de materiales de laboratorio

Las placas Petri y frascos de vidrio fueron empaquetados en papel kraft y puestos a 200°C durante 2 horas, dejando enfriarse dentro de la estufa (Figura 8).

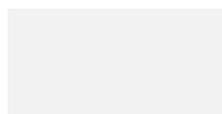




Figura 8: Preparación de materiales

Para materiales que no resisten 200°C como por ejemplo puntas o tapas de plástico, se empaquetaron en fundas de polipropileno selladas herméticamente y se esterilizaron en autoclave.

3.2.2 Control de calidad

Los protocolos de control de calidad y evaluación que se emplearon sobre los pelet corresponden a la metodología SENASA para control de calidad de hongos entomopatógenos, la cual se encuentran homologada con protocolos de centros de producción e investigación a nivel latinoamericano (Vélez 1997, Cañedo y Ames 2004, Pereira y Mora 2004, Embrapa 2014, García 1999).

3.2.3 Caracterización macroscópica de la cepa.

Basados en el trabajo de Espín y Guerra (2016), para la descripción macroscópica de la cepa se evaluó su crecimiento radial en medio PDA. Para este fin se preparó 10 placas Petri de 90mm de diámetro.

En el envés de las placas se dibujó una cruz proyectando 4 radios de 45mm y marcando en el centro de la placa, luego se inoculó *B. bassiana* mediante una punta previamente esterilizada con la cual se raspó la cepa esporulada y posteriormente se transfirió el material al centro de la placa. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 5 días.

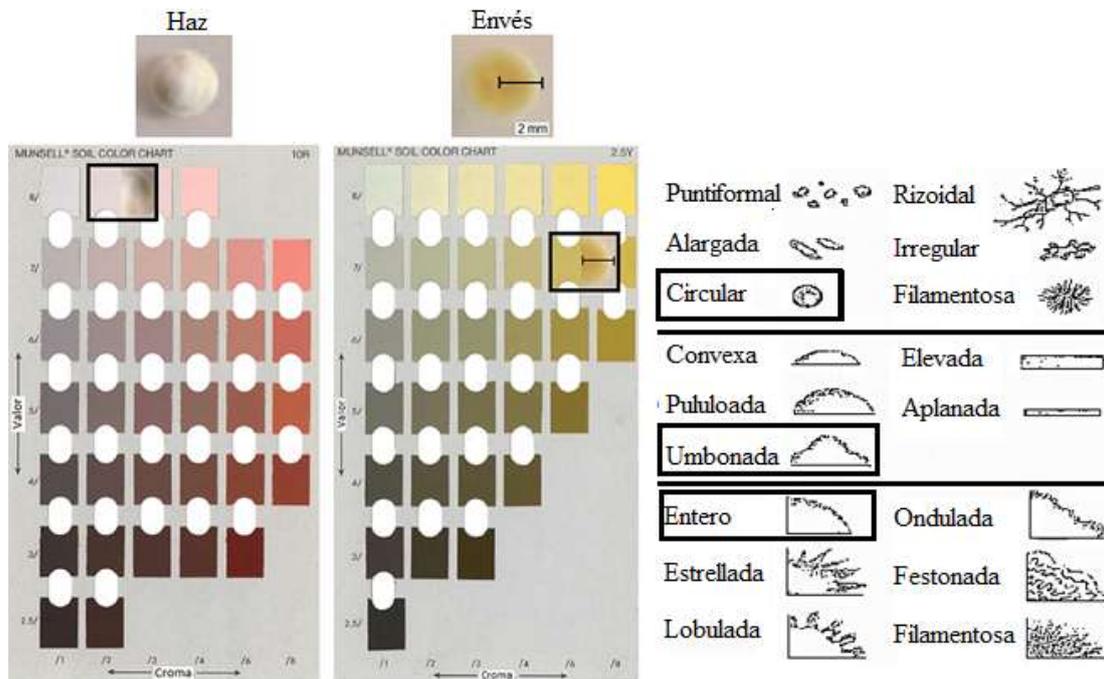


Figura 9: Caracterización de la colonia de *B. bassiana*

En la Figura 9 se observa que la colonia adquirió forma circular, elevación umbonada y margen entero. Respecto al color de la cepa, basados en las tablas Munsell el haz posee un color blanco rosáceo 10R 8/2, mientras el envés posee un color amarillo 2.5Y 7/6.

3.2.4 Prueba de susceptibilidad

SENASA (2018) ofrece un producto consistente en bolsas de 800 gramos en sustrato de arroz, con una concentración de 4.6×10^{10} por gramo con un porcentaje de germinación del 100% a las 18 horas y un porcentaje de pureza del 100%

Se realizó diluciones de 1g de producto comercial (Arroz/conidias) realizando diluciones de -1 a -5 para observar su efecto sobre larvas de sexto estadio de *G. melonela*. El bioensayo de susceptibilidad se realizó en el laboratorio de toxicología de la UNALM.

Se inoculó las larvas mediante método de inmersión con 5 larvas por dosis durante un minuto (Figura 10). Posterior a la inoculación las larvas fueron puestas sobre papel toalla para su secado y posteriormente se distribuyó 1 larva por vaso junto con papel y se procedió a cubrir la boca de los vasos con papel aluminio. Los insectos se almacenaron durante 4 días dentro de una cámara de condiciones controladas a 25°C en oscuridad.



Figura 10: Prueba de susceptibilidad en *G. melonella*

Debido a la carencia de alimento, las larvas inmediatamente procedieron a empupar. A los 4 días después de la inoculación se rompió la exuvia pupal, observándose las pupas muertas con un oscurecimiento en suturas y porciones de escleritos (Figura 11).



Figura 11: Comparación pupas sanas/enfermas

Se procedió a guardar las pupas dentro de cámara húmeda, permitiendo observar 3 días después el desarrollo de hifas, lo cual confirma la muerte por la enfermedad.

3.2.5 Formulación

Se empleó en la elaboración de pelets cuatro tipos de arcillas (Figura 12: Bentonita, Caolinita, Talco chino y Diatomea) mezcladas con almidón de maíz como cementante. Se adicionó junto a las esporas cuatro concentraciones de Albumina de huevo (protectante) y Ac. Ascórbico (Sinergizante) más testigo (agua destilada sola) dando un total de 20 fórmulas.

En base a la recomendación de Burges (2012), el ácido cítrico y la albúmina de huevo fueron disueltas en 800 ml de agua tibia (40°C) hasta adquirir una consistencia homogénea junto con ocho gotas de tween 20.



Figura 12: Componentes inertes para peletización

En una bolsa de *B. bassiana* se vierte 800 ml de agua junto con la solución anterior, homogenizándolo dentro de las fundas antes de verter el agua y lavar hasta lograr el desprendimiento de todas las conidias.



Figura 13: Elaboración de pelets

La arcilla y almidón de maíz se homogenizaron aparte previo su mezcla con la solución de esporas (Figura 13), en una proporción de 50% líquido con 50% sólido en base al volumen ocupado por los mismos en centímetros cúbicos (Tabla 4).

Tabla 4: *Formulas evaluadas mediante prueba de humectabilidad (Modificado de Burges 2012).*

FORMULAS	1	2	3	4	5
Componente (para 100 gramos)					
Base 1					
Talco Industrial	84	84	84	84	84
Almidón de maíz	16	16	16	16	16
Base 2					
Bentonita sódica	90	90	90	90	90
Almidón de maíz	10	10	10	10	10
Base 3					
Caolinita	90	90	90	90	90
Almidón de maíz	10	10	10	10	10
Base 4					
Tierra de Diatomea	90	90	90	90	90
Almidón de maíz	10	10	10	10	10
Aditivos (gr) para 100cc de mezcla arcilla – almidón.					
Albumina de huevo	10	10	10	10	0
Ácido cítrico	10	20	30	40	0

3.2.6 Prensado y secado

Para las pruebas preliminares de peletización se empleó como prensa una pistola de cremallera para silicona, junto con los tubos vacíos de la misma cuya dimensión es de cuatro cm de diámetro y 20cm largo, dando un volumen de 80cm³ y una presión máxima de 3.5 kg/cm². El diámetro de salida de la masa fue de 0,8 cm (Figura 14).



Figura 14: Secado de pelets

Para la segunda etapa se utilizó una prensa manual de repostería cuyo orificio de salida fue de 0,3 cm. Para lograr un secado en menos de 6 horas, los pelets fueron elaborados sobre papel Craft y se empleó un ventilador.

3.2.7 Humectabilidad

Las características de textura de un buen pelet es que mantenga su forma en condiciones ambientales secas, pero se disuelva rápidamente (fracción de partículas) al exponerse a la humedad.

Para la determinación de fracción de partículas se elaboraron pelets de 0,5cm de diámetro vertiendo el contenido sobre papel Craft que absorbía el excedente de agua, demorando en secarse 2 días. Estos pelets fueron puestos en placas Petri con agua donde se observó luego de 5 minutos la disolución total del pelet a excepción de la Bentonita Sódica, la cual mostró ser una arcilla pesada que mantuvo su forma (Figura 15).

En el caso de los aditivos (Ac. Cítrico y albúmina de huevo) si bien aumentaban la dureza del pelet, no se observó que altere la solubilidad; pero si no se da un secado rápido se observa el crecimiento de hongos contaminantes sobre el pelet.



Figura 15: Observación de humectabilidad

Para la segunda etapa se repitió el proceso (Tabla 5).

Tabla 5: Formulas seleccionadas para evaluar por control de calidad (Modificado de Burges 2012).

FORMULAS	1	2	3
Componente (para 100 gramos)			
Base 1			
Talco Industrial	84	84	84
Almidón de maíz	16	16	16
Base 2			
Caolinita	90	90	90
Almidón de maíz	10	10	10
Base 3			
Tierra de Diatomea	90	90	90
Almidón de maíz	10	10	10
Aditivos (gramos)			
Albumina de huevo	0	10	10
Ácido cítrico	0	10	40

En esta ocasión el orificio de salida de 3mm de diámetro, lo mismo que se requiere para que el secado se realice en menos de 6 horas, vertiendo el contenido sobre papel Craft que absorbía el excedente de agua y adicionando un ventilador para agilitar el proceso.

El manual de protocolos para la formulación del IICA (Chiriboga *et al.* 2015) propone para productos comerciales formulados en polvo (talcos, bentonitas, diatomeas, leche, etc) una prueba de “humectabilidad” consiste en determinar el tiempo que tarda un polvo mojable en humedecerse completamente.

Para esto se pesan 5 g de la formulación que se va a evaluar y se depositan en un punto fijo en la superficie de un vaso de precipitado de 250 ml, que contiene 200 ml de agua destilada y con un cronómetro, se mide el tiempo transcurrido entre el momento de agregar la muestra y el instante en el que ésta desaparece de la superficie (Figura 16).



Figura 16: Disolución de pelets en 30s

Sin embargo, como parte del desarrollo de la tecnología se ajustó las fórmulas para que se desintegren en 30 segundos al ser inmersas en agua, observándose durante el proceso un burbujeo por la liberación del aire contenido.

Esto garantiza una pronta disseminación al emplearse el pelet directamente sobre el suelo, así como una rápida liberación de las esporas por la decantación de arcilla, permitiendo la obtención de éstas en una solución acuosa para su aplicación a través de aspersores.

3.2.8 Concentración de esporas

Para determinar la concentración de esporas en el producto se realizó diluciones a concentración 10^{-6} , dispensando en una Cámara de Neubauer una muestra de $5 \mu\text{l}$ de la solución por bloque, estando constituida la cámara por 2 bloques.

En la cámara se observa 2 bloques, cada uno dividido en nueve cuadrados de 1 mm^2 , cubriendo un área total de 9 mm^2 . Adicionalmente, el cuadrado del centro está subdividido en cinco por cinco cuadrados agrupados de 0.2 mm de lado y una superficie de 0.04 mm^2 cada uno. Los cuadrados del centro a su vez están subdivididos en 16 cuadrados más pequeños de 0.0025 mm^2 cada uno. Cinco de estos cuadrados se utilizan para el conteo de las conidias (Figura 17).

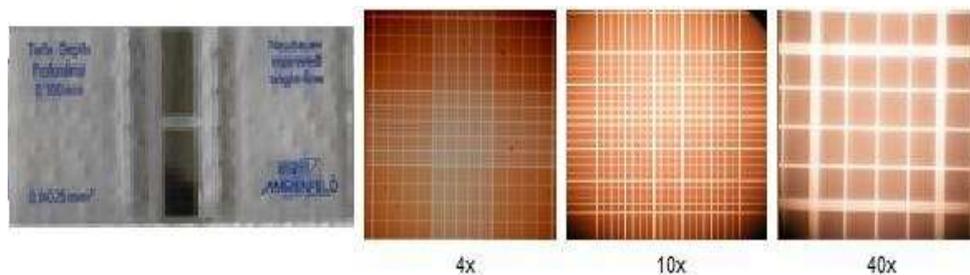


Figura 17: Cámara de Neubauer y reticulado

La cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados. Se debe contar las conidias que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no así las conidias que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda (Figura 18).



Figura 18: Selección de campos para conteo

Para contar las conidias presentes en los cuadrados elegidos se puede escoger los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro, o en forma diagonal empezando por el primero de la

parte superior izquierda. Se cuentan en total 10 cuadrados, cinco en cada cámara [cinco arriba y cinco abajo)

Para identificar el número de conidias por ml y el número total de conidias utilizando la siguiente fórmula (Cañedo y Ames 2004):

- Conidias / (ml o g) = # de conidias contadas x 250.000 x factor de dilución
- Conidias total = conidias / ml x Vol. De la suspensión original de conidias

Otra característica observable es que se requiere que la muestra sedimente al menos un minuto, ya que al ser observada inmediatamente no se observan las conidias siendo imposible el conteo.

3.2.9 Unidades Formadoras de Conidias (UFCs)

Se procedió a realizar diluciones en concentración de 10^{-3} para posteriormente depositar 50 μ l por placa petri con PDA y proceder a dispersar la gota mediante un asa triangular de vidrio Drigalsky previamente esterilizada mediante flameo, siendo muy importante que el asa se encuentre frío para evitar la muerte de las esporas.



Figura 19: Conteo de UFCs

Posteriormente se realizó el conteo marcando con un punto cada colonia observada en una contadora de conidias. Para efectos de constatación visual se puede incubar la muestra por 72 horas donde es fácilmente observable el desarrollo de las colonias (Figura 19).

Si el agar presenta precipitaciones como por ejemplo cuando se prepara PDA con pure de papa, estas pueden ser confundidas con colonias recién germinadas, en estos casos se espera a los 5 días donde se observa el crecimiento pleno de la colonia cuando la densidad de colonias permita esto (Figura 20).

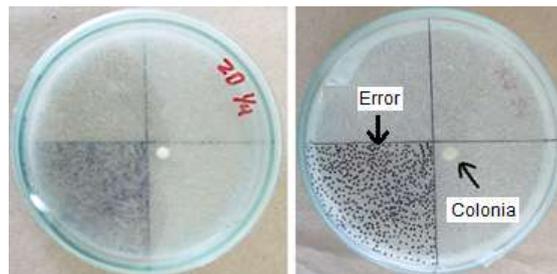


Figura 20: Errores en el conteo de UFCs

Pereira *et al.* (2004) describe una prueba de pureza que consiste en contabilizar las colonias contaminantes y luego se aplica la fórmula: $\text{Colonias puras} \times 100 / (\text{colonias puras} + \text{colonias contaminantes})$. Sin embargo, se considera que al formular un producto no deben haber contaminantes, motivo por el cual no fue tomada en cuenta (la pureza fue del 100%).

3.2.10 Porcentaje de germinación de esporas (%)

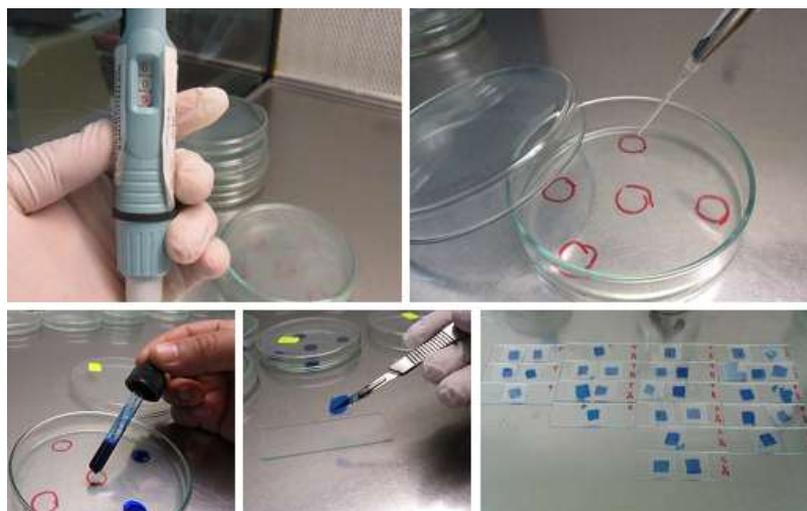


Figura 21: Prueba de germinación de conidias

Para la determinación de la germinación se utilizó el sistema de control de calidad empleado en el laboratorio de entomopatógenos del Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria (SENASA 2018).

Se dispuso PDA en capas finas dentro de placas Petri (Figura 21). En el envés de la placa se dibujó 5 círculos que sirvieron como marca para la siembras de alícuotas. Se procedió a realizar una dilución de 10^{-3} y mediante micropipeta se tomaron 5 microlitros de la misma para depositar una en el centro de cada marca, esta actividad se realizó a las 5 de la tarde.

Las placas Petri se sellaron con parafilm y a las 8am de la mañana siguiente (15 horas) se paralizó el crecimiento de las conidias mediante la adición de azul de metileno. Posteriormente se recortaron en cuadrado cubriéndolos con cubre objetos, posteriormente se procedió al conteo de las conidias registrando las no germinadas de las germinadas.

Las esporas vivas absorben el colorante azul en sus paredes celulares, lo cual permite diferenciarlos de los restos de arcilla y esporas muertas, las mismas que muestran otros colores. Para poderlas distinguir es necesario acercar y alejar el objetivo con el fin de observar el contraste, ya que a una misma profundidad no se observan todas las esporas.

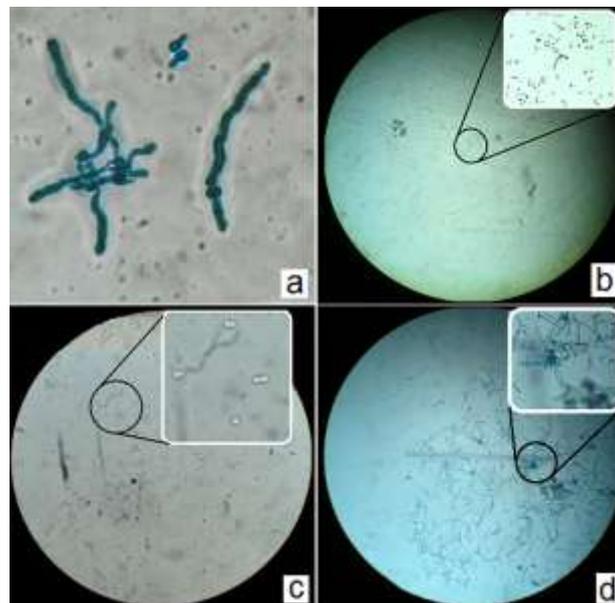


Figura 22: Consideraciones a tomar para conteo de conidias

La Figura 22 muestra como diferenciar las conidias para el conteo y cuando la muestra no sirve para este fin:

- Esporas vivas (color azul) en contraste con material inerte; para fines del conteo se considera espora germinada a aquellas cuyo tubo germinativo excede al diámetro de la conidia.
- Dos esporas germinadas en medio de todo un campo visual donde son las únicas esporas viables.
- Esporas hinchadas cerca a germinar, mismas que se observan a las 14 a 15 horas de siembra.
- Esporas germinadas en donde han transcurrido más de 16 horas desde la siembra; el desarrollo de los tubos germinativos no permite el conteo de las mismas.

En la Figura 23 se puede observar los resultados de las pruebas de germinación de conidias llevado a los pelets al momento de la formulación y a los 2 meses de almacenamiento de pelets.

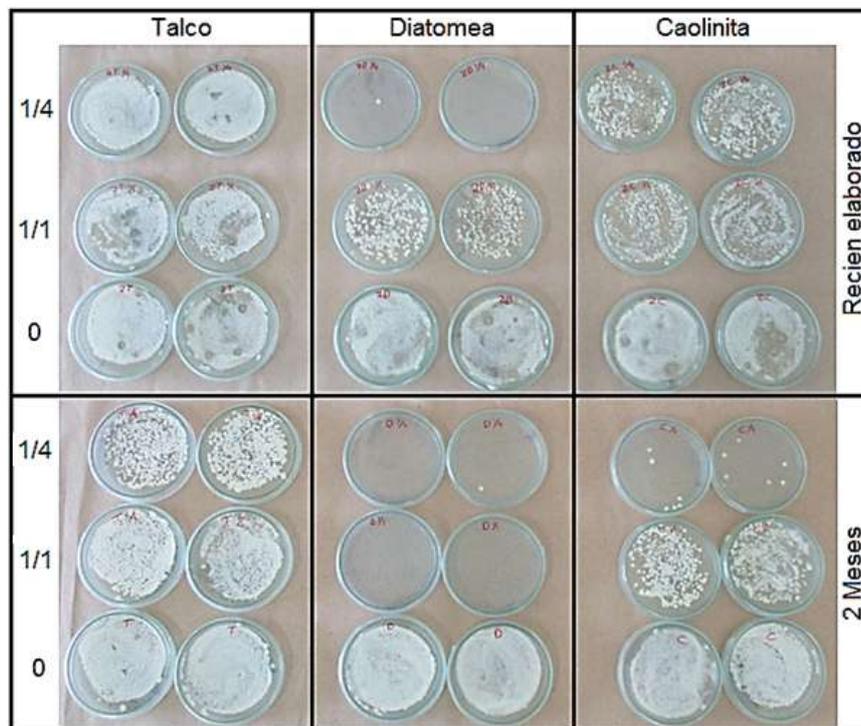


Figura 23: Unidades Formadoras de Conidias (10^{-3})

3.2.11 Bioensayos

Empleando la metodología expuesta se procedió a realizar diluciones a 10^{-3} y se procedió a inocular 5 repeticiones (larvas) mediante inmersión.

Se realizó un primer ensayo bajo condiciones de humedad ambiental existente sin observarse mortandad, motivo por el cual se repitió el mismo esta vez adicionando un algodón humedecido.



Figura 24: Bioensayos realizados

Luego de 5 días se colectó las larvas (Figura 24), observándose 3 tipos de condiciones:

- A. Larvas vivas. De color crema claro con manchas de melanización producto del encapsulamiento de esporas como defensa a la exposición de esporas.
- B. Larvas muertas. De color oscuro con manchas de melanización y presentando endurecimiento por rigor mortis.
- C. Larvas muertas. Con esporulación evidente.

El manual de protocolos para la formulación del IICA (Chiriboga *et al.*, 2015) establece como uno de los parámetros técnicos para la elaboración de un producto comercial es tener una mortandad sobre el 80% en la prueba de patogenicidad (bioensayos), siendo este el criterio para determinar el tiempo de almacenamiento que puede alcanzar el producto formulado.

3.2.12 Diseño experimental

Para el análisis experimental se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial (Kuehl 2001).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Susceptibilidad

Los datos reportados en la tabla 4 muestran la mortalidad de la mitad de los insectos (DL₅₀) en la dilución -5 (4.6×10^5).

Tabla 6: Mortalidad registrada en el ensayo de susceptibilidad

Dilución	Muertos	Vivos
-1 (4.6×10^9)	5	
-2 (4.6×10^8)	5	
-3 (4.6×10^7)	4	1
-4 (4.6×10^6)	4	1
-5 (4.6×10^5)	3	2

Basándonos en el manual de protocolos para la formulación del IICA (Chiriboga *et al.* 2015) que establece que un producto comercial debe tener una mortandad sobre el 80%, el cumplimiento de dicho parámetro se da en la dilución -3 (4.6×10^7) y -4 (4.6×10^6).

Por fines prácticos se realizó los bioensayos con los pelets a la dilución -3 para observar en el transcurso de los 2 meses los materiales que conservaron este índice de mortandad y descartar a aquellos que no cumplieran esta característica.

4.2 Humectabilidad

La formulación de gránulo aplicado a tierra y agua (GR) tiene como prueba base la humectabilidad en un periodo no mayor a 1 minuto. Esta característica no fue cumplida por

los pelets formulados con base de Bentonita, que requirieron más de 5 minutos, siendo este el criterio de selección para eliminar dichas fórmulas.

Los pelets con base de Caolinita, Talco industrial y Diatomea presentaron humectabilidad en 30 segundos demostrando que estos materiales son aptos para este tipo de formulación, el talco presentó características inferiores pues se mantuvo levemente adherido y una pequeña parte del material flotó sobre el agua en vez de hundirse.. Se continuó la siguiente etapa empleando diferentes concentraciones de ácido cítrico/albumina (Tabla 5).

4.3 Concentración de esporas

El protocolo de conteo de conidias fue ejecutable gracias a que solo la pared celular de éstas absorbió el tinte, diferenciando a las mismas de los sedimentos. Un punto a notar es que luego de dispensar la alícuota en la Cámara de Neubauer, se requiere esperar alrededor de 1 minuto para que decante, y las conidias sean visibles al microscopio. La concentración de conidias alcanzada por los pelets de talco fue de 9×10^{11}

4.4 Unidades formadoras de conidias (UFCs)

Siguiendo el protocolo de prueba de Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) se procedió al conteo de las colonias observadas. Las tablas 7 muestran los resultados obtenidos mediante el análisis con el programa SAS.

Tabla 7: Resultados análisis SAS

Número de medias	2	3	4	5	6	7	8	9
Rango crítico	11.32	11.81	12.10	12.28	12.39	12.46	12.51	12.54
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media		F. Valor	Pr > F		
Modelo	8	7469.908	933.739		37.31	<0.001		
Error	9	225.255	25.0.28					
Total corregido	17	7695.163						

R-cuadrado	Coef. Var	Raíz MSE	Valor media
0.971	8.771	5.003	57.039

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F.Valor	Pr > F
Fórmula	8	7469.908	933.739	37.31	<0.001

Los datos obtenidos del conteo de Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) fueron analizados mediante prueba de rango múltiple de Duncan obteniendo datos en un rango entre 8 a 1331 UFCs. Se reflejan los resultados en la distribución de valor (Figura 25).

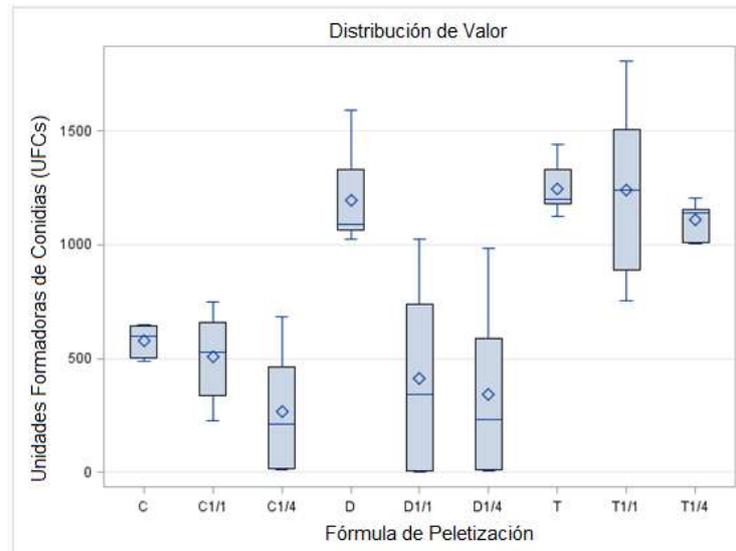


Figura 25: Cantidad de Unidades Formadoras de Conidias (UFCs)

Al proyectar los datos comparados de ambos periodos de tiempo se observa las siguientes curvas (Figura 26).

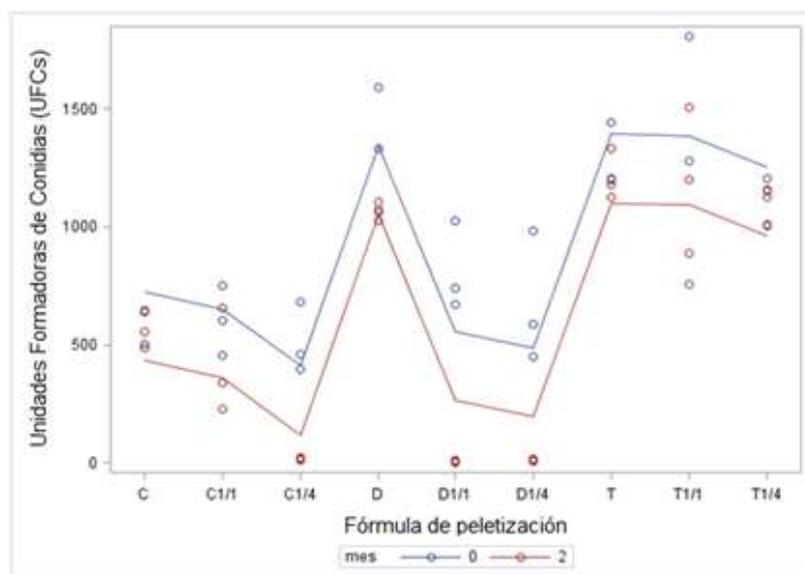


Figura 26: Interacción Plot para valor

Al comparar las Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) mantenidas por el Talco Industrial, Diatomea y Caolinita como base para peletizar en el transcurso de 2 meses se obtiene:

- El Talco Industrial sin aditivos muestra una reducción de 1282 a 1212 UFCs (5.5%), al adicionar albúmina de huevo y ácido cítrico en proporción 1:1 cae de 1282 a 1199 UFCs (6.5%), mientras que en proporción 1:4 cae de 1121 a 1096 UFCs (2.2%).
- La Diatomea sola muestra una reducción de 1331 a 1064 UFCs (20.7%), sin embargo al interactuar con albumina y ácido cítrico en proporción 1:1 la cantidad de UFCs decae de 830 a 8 UFCs (99%), mientras que en la proporción 1:4 cae de 675 a 8 UFCs (98.5%).
- En el caso de la Caolinita disminuye de 597 a 564 UFCS sola (5.5%), mientras que al adicionar albumina de huevo en proporción 1:1 reduce de 603 a 408 UFCs (32.3%) y en proporción 1:4 reduce de 514 a 16 UFCs (97%).

Analizando datos con el programa SAS se obtuvo los siguientes agrupamientos (Tabla 8).

Tabla 8: *Agrupamiento de valores en Unidades Formadoras de Conidias (UFCs)*

Agrupamiento	Duncan	Media	N	Fórmula
	A	1246.8	6	T
	A	1240.3	6	T 1/1
	A	1197.2	6	D
	A	1108.3	6	T ¼
	B	580.2	6	C
	B	505.3	6	C 1/1
C	B	410.3	6	D 1/1
C	B	342.3	6	D ¼
C		265.0	6	C ¼

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

Las Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) cuantificadas muestran 3 grupos que indican diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Duncan. A comprende todas las formulaciones con Talco y la formulación con diatomea pura, B comprende las formulaciones con C, C 1/1 y las formulaciones en diatomea con

ácido; finalmente C comprende a las formulaciones de cal coloidal y diatomea a las que se les adicionó ácido cítrico.

- El grupo A se mantienen a lo largo de 2 meses con promedios sobre las 1100 UFCs correspondiendo a la mayor concentración de las 9 formulaciones
- El grupo B presenta rangos promedio entre 340 a 580 UFCs, lo cual representa menos de la mitad de la capacidad del grupo A.
- El grupo C se encuentra rangos promedio entre 265 a 505 UFCs con cal coloidal y diatomea más la adición de ácido cítrico.

En base al agrupamiento de Duncan para las Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) y al porcentaje de germinación (%) para los grupos A y B, se observa que ambas relaciones muestran claramente una diferencia en la mortandad de conidias producto del sustrato base. Tomando esto como base se realiza el siguiente análisis:

- En ambos casos se observa como mejor sustrato de formulación al talco, el cual puede interactuar con ácidos sin que esto altere la supervivencia de las conidias.
- El talco con ácido junto con la tierra de diatomea sin ácido presentan comportamiento muy similar pero inferior al del talco solo, por lo cual se podría pensar en descartarlos y trabajar con la base de talco sin ácido.

4.5 Porcentaje de germinación de esporas (%)

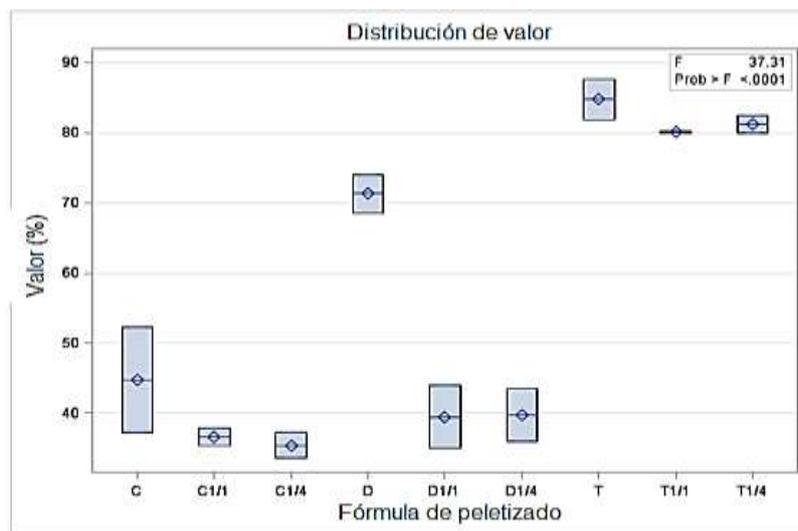


Figura 27: Distribución de valor del porcentaje de germinación

Los datos obtenidos en las pruebas de germinación de esporas fueron analizados mediante prueba de rango múltiple de Duncan obteniendo datos en un rango entre 35.8% a 87.7% los resultados son reflejados en la distribución de valor porcentual de la Figura 27.

Las fórmulas de peletización en base a Talco Industrial, Diatomea y Caolinita en el transcurso de 2 meses mostraron el siguiente comportamiento en su porcentaje de germinación:

- La Caolinita sola decae del 52.3% al 32.3% con una media de 44,8%, mientras que al adicionar albumina de huevo en proporción 1:1 sube del 35.4% al 37.8% con una media de 36.6%, y en proporción 1:4 sube de 33.6% a 37.2% con media de 35.4%.
- La Diatomea sola muestra un alza del 68.8% al 74% con una media del 71.3%, pero al interactuar con albumina y ácido cítrico en proporción 1:1 decae del 43.9% al 35% con una media de 39.4%, mientras que en la proporción 1:4 cae de 43.5% a 35.4% con una media de 39.7%.
- El Talco Industrial sin aditivos muestra una caída del 87,7% al 81,8% con una media del 84.8%; al adicionar albúmina de huevo y ácido cítrico en proporción 1:1 sube de 80% a 80,3% con una media de 80.2%, mientras que en proporción 1:4 cae de 82.4% al 80% con una media del 81.2%.

Tabla 9: Agrupamiento de valores en porcentaje de germinación de conidias

Agrupamiento	Duncan	Media	N	Fórmula
	A	84.75	2	T
B	A	81.20	2	T ¼
B	A	80.15	2	T 1/1
B		71.30	2	D
	C	44.80	2	C
	C	39.70	2	D ¼
	C	39.45	2	D 1/1
	C	36.60	2	C 1/1
	C	35.40	2	C ¼

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes

En base al programa SAS se obtuvo los agrupamientos reflejados en la Tabla 9. El porcentaje de germinación muestra 3 grupos que registran diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Duncan. A comprende a Talco, B comprende a Talco 1/1 y Talco 1/4 con Diatomea, y C que comprende todas las fórmulas de cal y las fórmulas de diatomea con adición de ácido.

- El grupo A presenta una germinación sobre el 80% luego de 2 meses, siendo este el porcentaje mayor en la formulación.
- El grupo B presenta una germinación entre 71% a 81%, siendo un rango cercano al grupo A.
- El grupo C presenta una germinación entre 35,4 al 44,8%

4.6 Bioensayos

Los datos obtenidos se reflejan en el anexo 5, en la cal la relación 1/1 (Ac. Cítrico/Albumina de huevo) a los 2 meses presenta una menor mortandad que en la relación 1/4, lo cual no sigue la relación observada de decrecimiento en UFCs y Germinación de conidias.

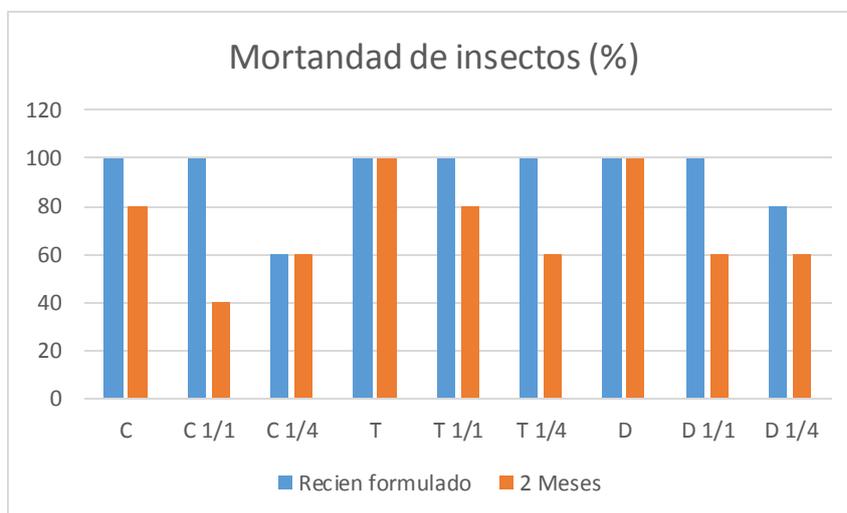


Figura 28: Porcentaje de mortandad

Los bioensayos presentan mortandades (Figura 28) con pelets recién formulados del 100% en los tratamientos recién formulados sin ácido cítrico (C, T y D) y con aquellos que se les adiciono 10g de ácido cítrico a la fórmula (C 1/1, T 1/1 Y D 1/1); los tratamientos T 1/4

presenta mortandad del 100%, C 1/4 del 60%, mientras que D ¼ del 80%. Luego de 2 meses la mortandad se mantiene en 100% para D y T; reduce al 80% para C y T 1/1; al 60% para C 1/4, T 1/4, D 1/1 y D 1/4; y finalmente al 40% para C 1/1.

Como los datos no cumplen igual distribución que las otras pruebas de laboratorio, se utilizó chi cuadrado para ver si existe dependencia entre dos variables cualitativas (ácido cítrico y tiempo transcurrido).

Se observa que hay dependencia ($P < 0.05$) de la arcilla en la mortalidad al analizar los datos en conjunto del pelet recién formulado y de dos meses.

- Data: $\chi^2 = 26.733$, $df = 10$, $p\text{-value} = 0.00287$

Sin embargo, al analizar la mortandad con respecto a la adición de ácido de manera independiente entre pelets recientemente formulado y de dos meses, no existe diferencia ($P > 0.05$).

- Data: $\chi^2 = 7.1795$, $df = 4$, $p\text{-value} = 0.1267$

De estos resultados destaca:

- Existe dependencia ($P < 0.05$) de la arcilla en la mortalidad
- No existe diferencia ($P > 0.05$) entre la adición de ácido y la mortalidad

La dependencia reflejada por la mortalidad ante las arcillas representa que la viabilidad de las esporas depende del sustrato empleado como base.

La acides no fue representativa respecto a mantener la viabilidad de las conidias que sobreviven al proceso de formulación hasta transcurrido 2 meses.

4.7 Análisis grupal

Analizando en conjunto las pruebas de porcentaje de germinación (%), Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) y bioensayos, el mejor pelet fue el de talco sin ácido.

Se podría cuestionar que los efectos ocasionados por el ácido son en realidad provocados por la albumina de huevo, sin embargo es sabido que la acidez afecta a los microorganismos, siendo el motivo por el que existen las pruebas de pH, adicionalmente Edgington *et al.* (2000) la consideró, junto con la leche en polvo el mejor protectante solar de las 22 sustancias evaluadas.

4.8 Comparación del mejor pelet de *B. bassiana* (Talco sin ácido) frente a otros biopesticidas ofertados en el Perú y el mundo

4.8.1 Fase 1: Cepas

Para la investigación presente se empleó la cepa SENASA CCB-LE265 producida sobre sustrato sólido (arroz). Mediante bioensayos se determinó la dosis letal media (DL_{50}) sobre *G. melonella* se dio en la concentración 4.6×10^5 . Si se compara este valor con la virulencia reportada en productos comerciales de otras partes del mundo ($DL_{50} 2,5 \times 10^5$) se puede señalar que la cepa presenta una mortandad levemente menor.

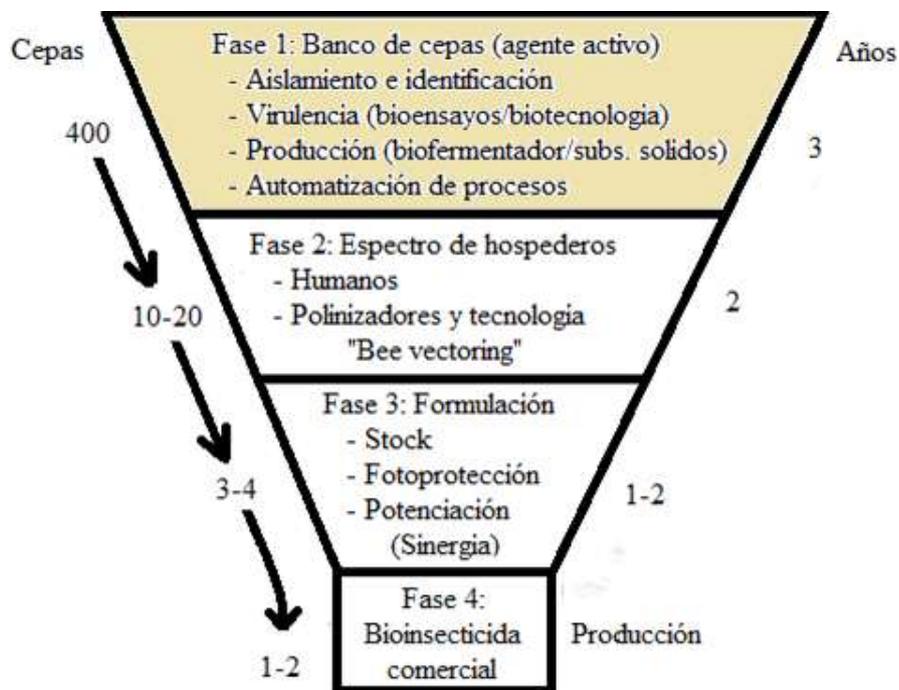


Figura 29: Fase 1

Sin embargo, de quererse comparar la virulencia frente a otros productos se requeriría establecer un banco de las cepas comerciales a evaluar, una cría de los insectos plaga y previamente al bioensayo se debe reactivar las cepas sobre la plaga para partir en igualdad de condiciones.

4.8.2 Fase 2: Espectro de hospederos

La ficha técnica de la cepa CCB-LE265 reporta su uso sobre las plagas “Broca del café”, (*Hypothenemus hampei*) “gorgojo negro del plátano”, (*Cosmopolites sordidus*), “gorgojo rayado del plátano” (*Metamasius hemipterus*), “polillas de la col” (*Plutella xylostella*, *Diaphania hyalinata*), “pulgones”, (*Myzus persicae*), “picudo del algodón” (*Anthonomus vestitus*), “gallinita ciega” (*Bothynus* sp., *Anomala* sp.) “Trips” y “arañita roja”.

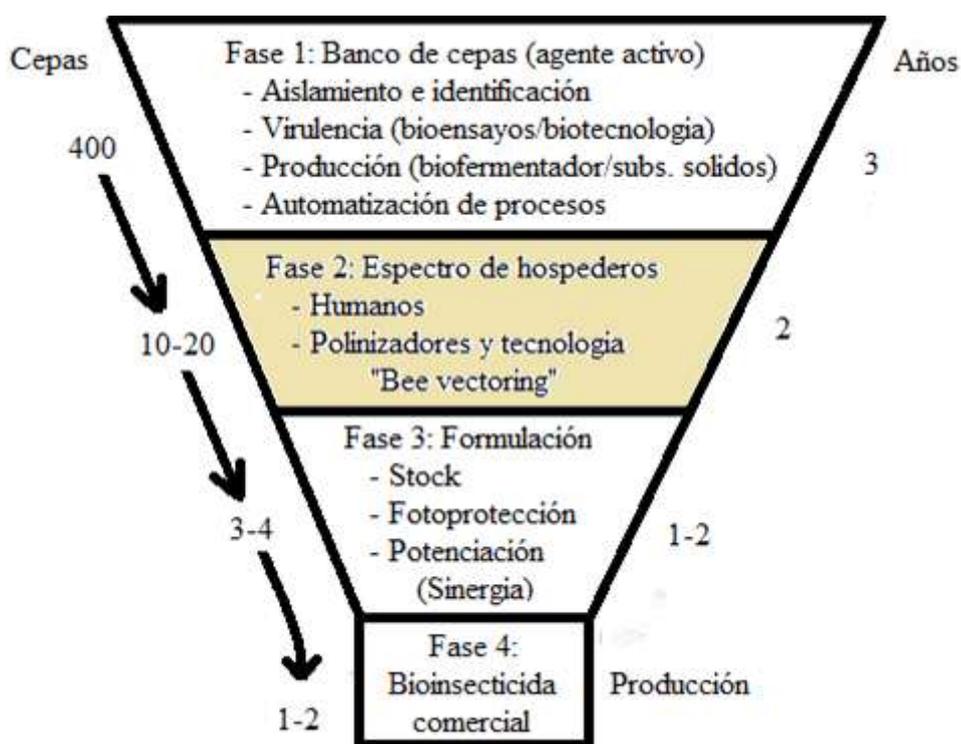


Figura 30: Fase 2

Respecto a la agresividad que presentó el cuadro de *alveolitis alérgica extrínseca*, por experiencia particular con cepas de *Beauveria* spp de mayor virulencia se constató que los efectos (fiebre el primer día) son los mismos, pero las secuelas (dolor de pulmón) no se presentaron.

No se han realizado pruebas de la cepa CCB-LE265 sobre abejas, motivo por el cual no es posible hablar de su utilidad para la tecnología "Bee vectoring".

4.8.3 Fase 3: Formulación

En toda la literatura revisada no se ha encontrado antecedentes respecto a formulación de hongos entomopatógenos en Perú, comercializándose en este país *B. bassiana* en bolsas de 800gr con una garantía de 15 días.

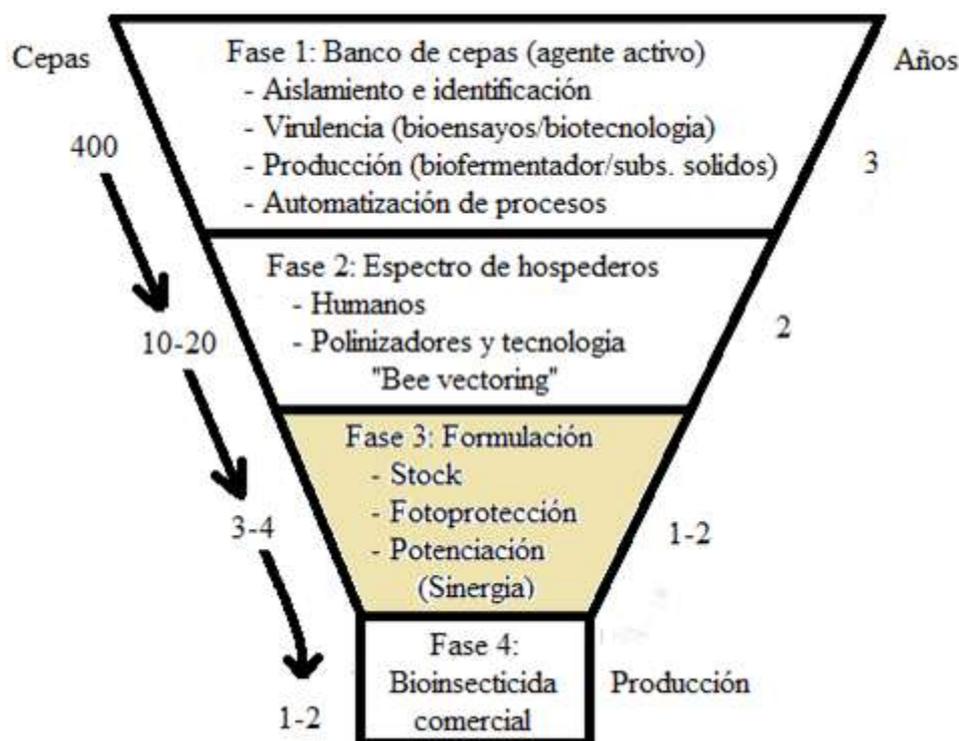


Figura 31: Fase 3

La concentración del producto en esta presentación es de 4.6×10^{10} conidias/gramo con un porcentaje de pureza del 100%, así como un porcentaje de germinación del 100% a las 18 horas. A temperatura ambiental (20-25°C) la garantía del producto es 1 mes

Los pelets de talco producidos tuvieron una concentración de conidias de 9×10^{11} y mantuvieron la germinación de conidias sobre el 80% por 2 meses, lo que demuestra esta metodología duplica el tiempo de viabilidad y permite concentrar una mayor cantidad de esporas.

Humectabilidad

Para un formulado sólido como por ejemplo un polvo humectable, se considera que el tiempo para disolverse en agua no debe pasar de 1 minuto.

En el trabajo realizado se descartó la bentonita debido a que el tiempo de disolución transcurrido fue mayor, y se modificó la concentración del cementante (almidón de maíz) para lograr la disolución del pelet en 30 segundos.

El talco industrial no presenta características similares a la tierra de diatomea y la caolinita, requiriendo el doble de almidón para conservar la forma.

El talco industrial difiere también al disolverse por no presentar una disgregación que sedimenta en el fondo del recipiente, muchas veces conservando parcialmente la forma del pelet y formándose un sobrenadante de talco sobre el agua.

Al observar el agrupamiento Duncan con los resultados obtenidos de las UFCs, se formó un grupo entre los pelets con talco y el pelet con tierra de diatomea sin acidificantes, por lo que el problema de textura se puede corregir con una mezcla de ambos sustratos.

Concentración de conidias

La concentración de conidias obtenida en el pelet de talco al momento de la formulación fue de 9×10^{11} , de haber contado con equipos como una tamizadora o mico harvester, la concentración puede elevarse.

Si determinamos como tiempo de almacenaje en la concentración 10^8 , el tiempo de almacenamiento se alarga conforme se aumente la concentración inicial.

Unidades formadoras de conidias (UFCs)

En la agrupación de Duncan, el grupo A (pelets de talco, y pelet de tierra de diatomea sin acidificante) presentó inicialmente sobre 1108 UFCs, mientras que la mortalidad a los 2 meses no fue mayor al 7%. La mortalidad inicial y posterior a 2 meses es marcada frente a

los grupos B y C, siendo estos últimos descartados ya que sus rendimientos son menores al 50% de los obtenidos por el grupo A.

Nuevamente, al comparar al grupo A con los parámetros de los hongos comercializados sobre sustrato seco (arroz), estos duplican su tiempo de viabilidad, justificando el empleo de esta tecnología para alargar el tiempo de almacenaje de las conidias.

Porcentaje de germinación de esporas

El agrupamiento Duncan mostró luego de 2 meses como grupo A (germinación sobre 80%) las formulaciones con talco en general, siendo el grupo que cumple la normativa IICA hasta 2 meses posteriores a la formulación.

Bioensayos

La concentración original calculada para los pelets se encontró en 9×10^{11} , y para los bioensayos se realizó diluciones a la -3 , lo cual representa una concentración teórica de 8×10^8 conidias/gramo recién formuladas.

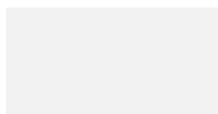
Referencias de otros trabajos con *B. bassiana* sitúan la DL_{50} en $2,5 \times 10^5$, pero en la prueba preliminar de susceptibilidad para la cepa CCB-LE265 se encontró una DL_{50} en 4.6×10^5 , junto con una DL_{80} entre 4.6×10^6 - 10^7 .

Al estar la concentración inicial al momento de la formulación en 8×10^8 , se explica porque los pelets mostraron mortandades del 100% o cercanas.

La correlación mostrada por la prueba de Chi respecto al excipiente base corrobora al talco industrial como mejor medio evaluado de peletizado. La no correlación con la acidez indica que este factor no influyó en la muerte de los insectos, aunque si tomamos en conjunto los resultados del porcentaje de germinación de esporas, ahí un efecto indirecto del medio al matar esporas al momento de la formulación.

VI. CONCLUSIONES

- La clave de descripción de crecimiento bacteriano junto con las tablas de Munsell representan una metodología práctica para diferenciar cepas al permitir una descripción detallada de las mismas.
- En la prueba de susceptibilidad, la muerte de la mitad de la población de los insectos se situó en el rango de 10^6 (concentración 10^{11} del pelet recién formulado y la mortalidad se alcanza con la dilución -5), concordando con la DL50 establecida para *B. bassiana* que está en el rango de $2,5 \times 10^5$.
- Se descartó la Bentonita como material para su uso para pelets de liberación inmediata debido a no pasar la prueba de humectabilidad en 30 segundos.
- El control de calidad efectuado a los pelets en su momento de formulación y dos meses después reflejan como el mejor material para conservar la viabilidad de las esporas al talco industrial.
- La Diatomea muestra una viabilidad aceptable si no se acidifica el medio, la prueba de humectabilidad muestra una liberación limpia de las conidias, haciéndolo idóneo para aplicación foliar al decantarse al fondo de los tanques, quedando las conidias en el líquido sobrenadante.



VII. RECOMENDACIONES

7.1 Pelets

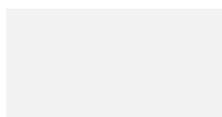
- Definir la forma idónea en que el microorganismo llegue a la plaga para determinar el tipo de formulación a emplear.
- Campo: Incrementar otras características como fotoprotección (Edgington *et al.* 2000), adicionando sustancias que brinden resistencia de las conidias a la luz.

7.2 Tecnología de formulación

- Seleccionar cepas que no afecten a las abejas, permitiendo dispersar los microorganismos mediante tecnología “bee vectoring”.
- Incorporar medios biotecnológicos y automatización.
- Aplicar normativas internacionales para registro de biopesticidas.
- Establecer vínculos con instituciones latinoamericanas afines para compartir conocimientos y evitar la duplicación de esfuerzos en biopesticidas.

7.3 Manejo de laboratorio

- Implementar protocolos de seguridad laboral para patologías de trabajo tomando como base la experiencia de otros países como Cuba.
- Formar bancos de cepas nativas priorizando su investigación y uso.
- El objetivo más deseable junto con la productividad es la selectividad.
- La automatización de procesos es clave para poder acelerar la investigación y disminuir errores.



VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aliaga J. & Cruz J. 2009. Determinación de las CL50 y CL90 del hongo *B. bassiana* CBLE-265 para el control de las plagas *Spodoptera frugiperda* y *Aphis craccivora*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú. Obtenido de: <https://bit.ly/2TzSOil>
2. Al-Mazra'awi, M, Kevan, P. & Shipp L. 2007. Development of *B. bassiana* dry formulation for vectoring by honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to the flowers of crops for pest control. *Biocontrol science and technology*, 17(7), 733-741. Obtenido de: <https://bit.ly/2O07P7i>
3. Arboleda, V. J. W., Delgado, B. F., & Valencia, J. A. 2004. Detección de beauvericina en el hongo entomopatógeno *B. bassiana* mediante el uso de anticuerpos policlonales. *Revista Colombiana de Entomología*, 30(2), 125-130. Obtenido de: <https://bit.ly/2VZ5EE9>
4. Bastidas, A., Velásquez, E., Marín, P., Benavides, P., Bustillo, A., & Orozco, F. J. 2009. Evaluación de preformulados de *B. bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, para el control de la broca del café. *Agronomía*, 17, 44-61. Obtenido de: <https://bit.ly/2u5ZAOe>
5. Black, R. 2013. A guide to the development of regulatory frameworks for microbial biopesticides in Sub-Saharan Africa. Obtenido de: <https://bit.ly/2TGOwFA>
6. Blanford, S., Jenkins, N. E., Christian, R., Chan, B. H., Nardini, L., Osae, M., ... & Thomas, M. B. 2012. Storage and persistence of a candidate fungal biopesticide for

- use against adult malaria vectors. *Malaria Journal*, 11(1), 354. Obtenido de: <https://bit.ly/2SWJf8t>
7. Berretta, M. F. 2001. Dos nuevos genes de *B. bassiana*: Una quitonasa y una proteína de transporte que podrían estar relacionados con la patogenicidad. Obtenido de: <https://bit.ly/2TxcG68>
 8. Burges H. 2012. Formulation of Microbial Biopesticides. Kluwer Academic Publishers. Springer Science & Business Media. Netherlands. Obtenido de <https://bit.ly/2VU22GP>
 9. Bustillo, Alex. 2000. Calidad biológica de formulaciones de *B. bassiana* usadas en el control de la broca del café. Revista colombiana de entomología. 26. 17-23. Obtenido de <https://bit.ly/2GPHHLU>
 10. Cañedo V. & Ames T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. International Potato Center. Centro Internacional de la Papa. Obtenido de: <https://bit.ly/2FgeN7d>
 11. Cazorla Perfetti, D., Acosta Quintero, M., & Morales Moreno, P. 2015. Evaluación de la patogenicidad inhalatoria del micoinsecticida *Beauveria bassiana* LF14 en ratones. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 26(4), 565-576. Obtenido de: <https://bit.ly/2TkkXoZ>
 12. Castillo, C. E., Cañizalez, L. M., Valera, R., Godoy, J. C., Guedez, C., Olivar, R., & Morillo, S. 2014. Caracterización morfológica de *B. bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo – Venezuela. Universidad de los Andes. Obtenido de: <https://bit.ly/2NZLBT8>
 13. Céspedes Reynaga, M. K. 2009. Efectividad de *Trichoderma spp.* formulado en pellets de alginato de sodio para el control de *Rosellinia bunodes* en el cultivo de

- cacao (*Theobroma cacao*) (No. H20 C42-T). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú). Facultad de Agronomía.
14. Chiriboga, H., Gómez, G., & Garcés, K. 2015. Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo *B. bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (yasaú) (No. IICA H01 11). IICA, Asunción (Paraguay). Obtenido de <https://bit.ly/2u4A6Rf>
 15. Cueva, F. D. 2012. El control biológico como estrategia para apoyar las exportaciones agrícolas no tradicionales en Perú: un análisis empírico. Contabilidad y Negocios: Revista del Departamento Académico de Ciencias Administrativas, 7(14), 81-100. Obtenido de: <https://bit.ly/2NYuZLu>
 16. Cruz Martínez, L. C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias). Obtenido de: <https://bit.ly/2BbaVk8>
 17. Dedej, S., Delaplane, K. S., & Scherm, H. 2004. Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent *Bacillus subtilis* to blueberry flowers to suppress mummy berry disease. *Biological Control*, 31(3), 422-427. Obtenido de: <https://bit.ly/2ChjSbY>
 18. De León, A. D. M., Gálvez, R. J., Ruiz, J. G., Gómez, O. D., & Sánchez, J. M. 2014. Evaluación de un formulado de aceite vegetal de *B. bassiana* en condiciones de laboratorio para el control de la broca del café. *Fitosanidad*, 18(1), 5-14. Obtenido de: <https://bit.ly/2Jk9c0p>
 19. Echeverría-Beirute, F. 2006. Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *B. bassiana* (bálsamo) Vullemin. Obtenido de: <https://bit.ly/2T0Ytt9>
 20. Edgington, S., Segura, H., De la Rosa, W., & Williams, T. 2000. Photoprotection of *B. bassiana*: testing simple formulations for control of the coffee berry borer.

- International Journal of Pest Management, 46 (3), 169-176. Obtenido de: <https://bit.ly/2ChQMci>
21. Embrapa. 2014. Evaluación de calidad de productos a base de *Trichoderma*. Universidad de Concepción. Concepción – Chile. Obtenido de <https://bit.ly/2T06MVW>
22. Espín M y Guerra K. 2016. Caracterización morfológica y molecular mediante los marcadores ITS y EF1- α de aislados de *Beauveria spp*, como potencial controlador de *Cosmopolites sordidus*. Sangolquí – Ecuador.
23. Espinosa Ortiz, E., Lara Reyna, J., Otero Colina, G., Alatorre Rosas, R., & Valdez Carrasco, J. 2011. Susceptibilidad de larvas, pupas y abejas adultas a aislamientos de *B. bassiana* (Bals.) Vuill., *M. anisopliae* (Sorokin) y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize). Interciencia, 36(2). Obtenido de: <https://bit.ly/2VWqnse>
24. Fan, Y., Liu, X., Keyhani, N. O., Tang, G., Pei, Y., Zhang, W., & Tong, S. 2017. Regulatory cascade and biological activity of *B. bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114 (9), E1578-E1586. Obtenido de: <https://bit.ly/2VX4usJ>
25. Feng, P., Shang, Y., Cen, K., & Wang, C. 2015. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112 (36), 11365-11370. Obtenido de: <https://bit.ly/2UsqWtg>
26. García, R. 1999. Desarrollo de formulados asperjables de *B. bassiana* (Bálsamo Vuillemin) utilizando diversos polímeros (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León). Obtenido de <https://bit.ly/2tICixI>

27. Gasic S y Tanovic B. 2013. Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. Institute of Pesticides and Environmental Protection. DOI: 10.2298/PIF1302097G. Belgrado-Servia. Obtenido de: <https://bit.ly/2HsbOs9>
28. Góngora, C. E., Marín, P., & Benavides, P. 2013. Claves para el éxito del hongo *B. bassiana* como controlador biológico de la broca del café. Obtenido de: <https://bit.ly/2J8Ec5f>
29. Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., & Lumbsch, H. T. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547. Obtenido de: <https://bit.ly/2UxRadZ>
30. Holder, D. J., Kirkland, B. H., Lewis, M. W., & Keyhani, N. O. 2007. Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* (Cordyceps). *Microbiology*, 153 (10), 3448-3457. Obtenido de: <https://bit.ly/2VV8GvA>
31. Hudson H & Ingold C. 1984. The biology of fungi. Scientific publishers. Obtenido de: <https://bit.ly/2CrgPhB>
32. Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P. M., El Meziane, A., & Yao, Y. J. 2017. Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20 (4), 1204-1212. Obtenido de: <https://bit.ly/2Htqx67>
33. Isfer, A. 2006. Utilizacao dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* para o controle de muscideos em estambulos na regioao de Blumenau. Universidad regional de blumenau. Obtenido de <https://bit.ly/2Jbwwz4>
34. Jiménez Monte, P. E., Ponc, P., & Elizabeth, V. 2013. Diseño y construcción de un fermentador rotatorio de fase sólida para la multiplicación del hongo *Trichoderma sp* (Bachelor's thesis). Obtenido de <https://bit.ly/2J3U8oA>

35. Kapongo, J. P., Shipp, L., Kevan, P., & Sutton, J. C. 2008. Co-vectoring of *Beauveria bassiana* and *Clonostachys rosea* by bumble bees (*Bombus impatiens*) for control of insect pests and suppression of grey mould in greenhouse tomato and sweet pepper. *Biological Control*, 46 (3), 508-514. Obtenido de: <https://bit.ly/2TwIN5L>
36. Kevan, P. G., Sutton, J., & Shipp, L. 2007. Pollinators as vectors of biocontrol agents—the B52 story. *Biological Control—A Global Perspective*, eds. C. Vincent, MS Goettel & G. Lazarovits, CABI International, Oxfordshire, UK, 319-327. Obtenido de: <https://bit.ly/2J7fcLB>
37. Kuehl, R. O. 2001. *Diseño de experimentos: principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones*. Thomson Learning, Obtenido de: <https://bit.ly/2VTXHDw>
38. Lacey, L. A. (Ed.). 2012. *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Academic Press. Obtenido de <https://bit.ly/2XrGVK8>
39. Lopez-Llorca, L. V., & Carbonell, T. 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista iberoamericana de micología*, 16, 136-142. Obtenido de <https://bit.ly/2TDVsTW>
40. Lloret M. 2006. El ciclo biológico de la polilla grande de la cera. IES Escola Municipal del Treball Granollers. Obtenido de: <https://bit.ly/2F6N1Z8>
41. Meikle, W. G., Mercadier, G., Holst, N., Nansen, C., & Girod, V. 2008. Impact of a treatment of *B. bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on honeybee (*Apis mellifera*) colony health and on *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae). *Apidologie*, 39(2), 247-259. Obtenido de: <https://bit.ly/2F5rX57>
42. Miranda J. 2012. Proceso de elaboración de gránulos peletizados a base de hongos endomicorrízicos recubiertos con arcillas minerales y su composición. Obtenido de: <https://bit.ly/2Hg95me>

43. Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica), 63, 95-103. Obtenido de: <https://bit.ly/2uki6SO>
44. Moore E. 1996. Fundamentals of the fungus. Fourth edition. Prentice Hall. Obtenido de: <https://bit.ly/2NX6Uot>
45. Jiménez Monte, P. E., Ponc, P., & Elizabeth, V. 2013. Diseño y construcción de un fermentador rotatorio de fase sólida para la multiplicación del hongo *Trichoderma* sp (Bachelor's thesis). Obtenido de: <https://bit.ly/2TOHAWO>
46. Naranjo Silva, J. L. 2016. Diseño e implementación de un sistema para la contabilización automática de unidades formadoras de colonias bacterianas: coliformes, mesófilos aerobios, bacilos, estafilocos y levaduras usando técnicas de visión artificial (Bachelor's thesis, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Carrera de Ingeniería en Electrónica, Automatización y Control.). Obtenido de: <https://bit.ly/2HhuN9t>
47. Noboa Guerra, G. P., & David, A. 2015. Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación de *B. bassiana* y *T. harzianum* como aporte a los productos de café orgánico de la asociación Río Intag cantón Cotacachi (Bachelor's thesis). Obtenido de: <https://bit.ly/2HtFWDw>
48. Organisation for Economic Cooperation and Development. 2018. Annex to the Working Document on the Risk Assessment of Secondary Metabolites of Microbial Biocontrol Agents. Environment directorate joint meeting of the chemicals committee and working party on chemicals, pesticides and biotechnology. Series of pesticides No. 98. Obtenido de: <https://bit.ly/2UDmubm>

49. Perdomo Quishpe, C. E. 2018. Desarrollo de cuatro prototipos de bioformulaciones en base a conidias de *Trichoderma asperellum* (Bachelor's thesis, Quito: UCE). Obtenido de: <https://bit.ly/2Cj1VcU>
50. Pereira, P. G., & Mora, J. M. 2004. Guía para la producción de *M. anisopliae*. Guayas, Ecuador: CINCAE. Obtenido de: <https://bit.ly/2XTDbBi>
51. Petch, T. 1925. Notes on Ceylon Clavariae. Annals of the Royal Botanic Gardens Peradeniya. 9(3):329-338. Obtenido de: <https://bit.ly/2VV8s4Z>
52. Posada-Flores, F. J. 2008. Production of *B. bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. Journal of Insect Science, 8 (1), 41.
53. Quintela, E. D., & McCoy, C. W. 1997. Pathogenicity enhancement of *M. anisopliae* and *B. bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. Environmental Entomology, 26(5), 1173-1182. Obtenido de: <https://bit.ly/2EV9yH5>
54. Ravensberg, W. J. 2010. The development of microbial pest control products for control of arthropods: a critical evaluation and a roadmap to success. Universidad de Wageningen. Obtenido de: <https://bit.ly/2uce7rL>
55. Rodríguez, I. W., Forim, M. R., da Silva, M. F. G. F., Fernández, J. B., & Batista Filho, A. 2016. Effect of ultraviolet radiation on fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae*, pure and encapsulated, and bio-insecticide action on *Diatraea saccharalis*. Advances in Entomology, 4 (03), 151. Obtenido de Scientific research Publishing: <https://bit.ly/2XVJLHh>
56. Samson, R. A., Evans, H. C., & Latgé, J. P. 2013. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer Science & Business Media. Obtenido de: <https://bit.ly/2VaWun7>

57. Santoro, P. H., Zorzetti, J., Constanski, K. & Neves, P. 2014. Conidial production, virulence, and stress tolerance of *B. bassiana* conidia after successive in vitro subculturing. *Revista Colombiana de Entomología*, 40 (1), 85-90. Obtenido de: <https://bit.ly/2CgyW9I>
58. Sarduy, N. L., Roque, I. Á., Manso, J. E. O., Ruiz, H. P., Lafargue, B. L. F., Andreu, M. E. G., & Padrón, H. D. 2014. Afecciones limitantes para trabajar en la elaboración de bioplaguicidas fúngicos producidos sobre sustratos sólidos. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*, 15 (1), 21-4. Obtenido de: <https://bit.ly/2J8TiaU>
59. Sarduy, N. L., Roque, I. Á., Fernández, T. M. L., Ruiz, H. P., Andreu, M. E. G., Padrón, H. D., & Lafargue, B. L. F. 2011. Guía para el control y seguimiento de la salud en los trabajadores de los centros de reproducción de entomófagos y entomopatógenos. *Revista Cubana de Salud y Trabajo*, 12 (3), 64-70. Obtenido de: <https://bit.ly/2CfP4rS>
60. SCHÜBLER, A., Schwarzott, D., & Walker, C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological research*, 105 (12), 1413-1421. Obtenido de: <https://bit.ly/2NZBUEn>
61. Sepulveda M. 2017. Control biológico de plagas usando hongos entomopatógenos BioINIA. INIA. Chillan – Chile. Obtenido de: <https://bit.ly/2U0E385>
62. Valencia C. 2015. Caracterización de hongos entomopatógenos d asociados a insectos plaga de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia). Obtenido de: <https://bit.ly/2UJCqc8>
63. VanEngelsdorp, Dennis & Meixner, Marina. 2009. A Historical Review of Managed Honey Bee Populations in Europe and the United States and the Factors that May Affect Them. *Journal of invertebrate pathology*. 103 Suppl 1. S80-95. 10.1016/j.jip.2009.06.011. Obtenido de: <https://bit.ly/2HfV1cy>

64. Vega, F. E., & Kaya, H. K. 2012. Insect pathology (second edition). Academic Press. Obtenido de: <https://bit.ly/2CggaPV>
65. Vélez, P. E., Posada, F. J., Marín, P., González, M. T., Osorio, E., & Bustillo, A. E. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Obtenido de: <https://bit.ly/2EYsHaW>
66. Vidal, C., Fargues, J., Lacey, L. A., & Jackson, M. A. 1998. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycopathologia, 143 (1), 33-46. Obtenido de: <https://bit.ly/2XPBRiJ>
67. Viera, W., Noboa, M., Bermeo, J., Báez, F., & Jackson, T. 2018. Parámetros de calidad de cuatro tipos de formulaciones a base de *Trichoderma asperellum* y *Purpuricillium lilacinum*. *Enfoque UTE*, 9(4), 145-153. Obtenido de: <https://bit.ly/2NYf6Vi>
68. Villamil, J. E., & Martínez, W. 2014. Evaluación de aislamientos nativos de *Beauveria spp.* sobre *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in vitro. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 31(1), 92-105. Obtenido de: <https://bit.ly/2EZVts5>
69. Villamizar, L. F., Nelson, T. L., Jones, S. A., Jackson, T. A., Hurst, M. R., & Marshall, S. D. 2018. Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. *Biocontrol Science and Technology*, 28(12), 1097-1113. Obtenido de: <https://bit.ly/2VnwF8c>
70. Volcy, C. 2008. Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115.

71. World Health Organization. 2018. International code of conduct on pesticide management: guidelines for the registration of microbial, botanical and semiochemical pest control agents for plant protection and public health uses. Food & Agriculture Org. Obtenido de: <https://bit.ly/2O1791F>

IX. ANEXOS

Anexo 1: Germinación de conidias en pelet nuevo

		1		2		3		4		5		Total		
		G	NG	G	NG	% G								
C		5	7	4	5	4	1	7	3	3	2	23	18	52,33
		7	1	5	9	7	4	5	3	13	8	37	25	
		3	4	3	5	4	5	4	7	4	8	18	29	
		1	2	2	8	7	4	8	2	5	4	23	20	
C 1/1		4	3	1	3	2	3	3	1	1	1	11	11	35,37
		1	9	1	5	2	6	2	2	3	3	9	25	
		2	8	4	8	3	2	1	7	1	9	11	34	
		4	8	7	7	2	7	1	6	13	8	27	36	
C 1/4		10	5	8	6		12	2	7	1	8	21	38	33,58
		1	8	10	20	6	2	0	6	1	12	18	48	
		3	8	5	14	3	7	1	8	13	8	25	45	
		3	8	5	15	3	12	2	4	12	6	25	45	
T		7	1	18	2	15	3	12	1	7	1	59	8	87,71
		28	1	8	1	9	1	6	2	11	1	62	6	
		10	3	9	2	19	5	18	4	11	3	67	17	
		19	1	42	2	19	5	24	3	22	2	126	13	
T 1/1		3	2	6	2	6	2	4	1	3	1	22	8	80,00
		10	2	4	2	3	1	13	2	13	2	43	9	
		12	1	6	1	7	1	6	1	8	2	39	6	
		4	1	5	2	7	2	8	3	4	2	28	10	
T 1/4		12	1	13	1	11	2	5	1	9	1	50	6	82,35
		13	3	8	2	15	4	9	2	11	2	56	13	
		10	2	12	6	9	1	10	5	6	1	47	15	
		15	5	13	0	5	2	9	1	15	3	57	11	

D	8	2	6	0	5	4	7	4	8	4	34	14	68,60
	9	2	13	4	11	3	7	5	7	1	47	15	
	6	7	6	5	15	6	7	0	19	11	53	29	
	21	12	8	2	8	2	14	9	16	9	67	34	
D 1/1	1	4	2	4	2	6	7	9	1	8	13	31	43,87
	2	3	2	8	3	9	0	9	4	12	11	41	
	5	2	0	2	4	1	8	1	7	1	24	7	
	3	2	4	2	6	2	4	1	3	1	20	8	
D 1/4	5	4	7	2	3	7	8	1	5	8	28	22	43,54
	8	10	3	7	2	8	3	7	3	9	19	41	
	4	7	3	1	2	2	2	9	1	4	12	23	
	13	1	8	5	2	9	4	9	5	8	32	32	

Anexo 2: Germinación de conidias en pelet 2 meses después

	1		2		3		4		5		Total		% G
	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	
C	3	8	2	7	3	8	3	6	2	5	13	34	37,32
	2	5	2	4	3	5	1	3	4	3	12	20	
	4	2	4	5	2	6	5	7	3	1	18	21	
	1	3	1	2	2	2	3	5	3	2	10	14	
C 1/1	0	4	0	7	2	5	1	3	1	4	4	23	37,80
	4	7	4	4	1	3	1	5	2	4	12	23	
	0	2	2	3	2	6	8	2	5	1	17	14	
	3	4	1	4	3	5	4	3	4	3	15	19	
C 1/4	1	4	2	4	2	6	5	7	4	1	14	22	37,23
	1	8	5	4	5	1	7	9	4	2	22	24	
	1	2	5	3	0	4	0	7	2	3	8	19	
	2	8	3	4	0	3	1	4	1	2	7	21	
T	8	1	7	1	9	3	8	1	8	2	40	8	81,82
	5	0	7	2	6	2	8	1	7	1	33	6	
	5	1	8	0	8	1	9	1	6	4	36	7	
	7	4	11	3	9	2	9	3	8	1	44	13	

T 1/1	7	1	4	2	3	2	6	2	4	1	24	8	80,30
	4	1	3	1	2	2	72	3	7	2	88	9	
	2	1	2	4	7	0	5	2	5	1	21	8	
	5	4	7	3	6	2	4	3	4	2	26	14	
T 1/4	2	1	5	4	7	2	5	1	6	1	25	9	80,00
	4	0	3	1	8	2	7	3	5	1	27	7	
	5	0	7	2	6	1	8	1	7	1	33	5	
	7	1	6	2	5	1	7	2	6	2	31	8	
D	7	4	11	3	15	2	9	0	8	1	50	10	74,05
	5	4	27	2	9	5	7	9	11	5	59	25	
	11	5	11	4	8	1	9	2	9	3	48	15	
	16	8	7	3	12	4	14	6	8	4	57	25	
D 1/1	2	12	7	8	2	10	21	2	2	22	34	54	34,96
	1	8	8	10	3	2	1	6	1	12	14	38	
	7	8	5	9	3	25	4	8	8	9	27	59	
	5	4	2	4	2	6	5	7	4	1	18	22	
D 1/4	5	9	7	3	6	12	4	13	4	12	26	49	35,86
	4	10	6	10	5	16	18	15	8	19	41	70	
	10	5	8	6	1	12	2	7	1	8	22	38	
	2	13	7	8	3	5	5	9	3	3	20	38	

Anexo 3: *Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) en pelet nuevo*

Nuevo	R1	R2	R3	Media
T	1200	1204	1442	1282,0
T 1/1	1808	756	1282	1282
T 1/4	1154	1204	1004	1120,7
D	1590	1072	1330	1330,7
D 1/1	673	1025	741	813,0
D 1/4	587	452	985	674,7
C	639	648	503	597
C 1/1	602	750	456	602,7
C 1/4	397	462	682	514

Anexo 4: *Unidades Formadoras de Conidias (UFCs) en pelet de 2 meses*

2 meses	R1	R2	R3	Media
T	1180	1125	1330	1212
T 1/1	890	1507	1199	1198,7
T ¼	1008	1156	1124	1096
D	1103	1024	1064	1063,7
D 1/1	3	12	8	7,7
D ¼	6	9	15	10,0
C	557	645	489	563,7
C 1/1	338	228	658	408,0
C ¼	18	21	10	16,3

Anexo 5: *Mortalidad de insectos*

Fórmula	0		1/1		1/4		
	V	M	V	M	V	M	
Recién formulado	C	5		5	2	3	
	T	5		5		5	
	D	5		5	1	4	
Dos meses	C	1	4	3	2	3	
	T		5	1	4	2	3
	D		5	2	3	2	3