

METODOS ARTESANALES DE PRODUCCIÓN DE BIOPLAGUICIDAS A PARTIR DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y ANTAGONISTAS

LOW TECHNOLOGY SYSTEMS FOR MASS PRODUCTION OF BIOPESTICIDES BASED ON ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND FUNGAL ANTAGONISTS



ORESTES ELÓSEGUI CLARO

e.mail: oelesegui@inisav.cu

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV)

Ciudad de La Habana, Cuba

2006

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento por la ayuda brindada:

- Al colectivo de CIDISAV y en especial a la Ing. Nery Hernández.
- A la Dra. Orietta Fernández-Larrea, colega y amiga.
- A la MSc. Aidanet Carr por su dedicación y amistad.
- A los colegas de la División de Bioplaguicidas del INISAV.
- Al Dr. Dave Moore, CABI-BIOSCIENCE, Reino Unido.
- Al Dr. Rasoul Zare, Universidad de Teherán, Irán.

CONTENIDO

1

1. Control Biológico de plagas	4
1.1. Bioplaguicidas. Generalidades. Principales especies de hongos Entomopatógenos y Antagonistas.	4
1.2. Rango de hospedantes	7
1.3. Características macroculturales y microculturales de algunos hongos ampliamente usados como agentes de biocontrol	7
1.4. Modo de acción.....	10
1.5. Caracterización de aislados fúngicos para el biocontrol	11
1.6. Métodos de aislamiento	13
1.7. Métodos de conservación.....	14

2

2. Tecnologías para producciones de hongos.	15
2.1. Tecnologías básicas.....	15
2.2. Descripción del proceso productivo artesanal (“baja tecnología”). Parámetros clave.....	16

3

3. Control de calidad en la producción de microorganismos fúngicos para el control biológico.....	19
3.1. Panorámica general.....	19
3.2. Puntos críticos de controles de calidad.....	20
3.3. Principales ensayos	22

4

4. Proceso de recobrado en las producciones sólidas de hongos para biocontrol en la agricultura. Almacenaje. Registro Elementos de bioseguridad.....	23
4.1. Recobrado de producciones sólidas de hongos.....	23
4.2. Almacenamiento de los bioproductos.....	24
4.3. Registro de bioplaguicidas microbianos	25
4.4. Elementos de bioseguridad en la producción de bioplaguicidas. Buenas Prácticas de producción y diseño de instalaciones	27
4.4.1. Conceptos	27
4.4.2. Grupos de riesgos y particularidades	28
4.4.3. Contención	30
4.4.4. Buenas Prácticas de Producción.....	30
4.4.5. Liberación microorganismos al medio ambiente.....	34

5

5. LITERATURA CONSULTADA.....	34
-------------------------------	----

6

6. ANEXOS.....	43
----------------	----

1. Control Biológico de plagas.

1.1. Bioplaguicidas. Generalidades. Principales especies de hongos

Entomopatógenos y Antagonistas.

La agricultura por su propia naturaleza es antiecológica y en parte con el uso y abuso de agroquímicos (incluidos los antibióticos) dirigidos contra plagas y enfermedades, se han originado profundas modificaciones biológicas. Esto se ha adjudicado a la toxicidad y/o amplio espectro de estos productos lo que ha contribuido a una disminución de la biodiversidad y por tanto a una pobre regulación de las poblaciones macro y microbianas. Además, el interés creciente sobre la salud humana, que ha conllevado a fuertes restricciones sobre el uso de plaguicidas químicos, ha hecho necesario implementar estrategias más saludables, insertados en los sistemas de producción orgánica y sistemas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) donde el uso del control biológico, con los bioplaguicidas microbianos incluidos, viene a ofrecer una solución viable.

En la actualidad se conocen más de 1500 especies de microorganismos entre hongos, bacterias y virus que son patógenos de artrópodos y controladores de otras poblaciones microbianas directamente. Sin embargo, solo unos pocos se usan rutinariamente en los programas de control de plagas.

Los productos bioplaguicidas representaron en el mercado el 2.5% del total de ventas de plaguicidas en el 2005, lo que representó 672 millones USD. Se espera que en el 2010 estos alcancen el 4.2% con un promedio de crecimiento de sus ventas de un 9.9% anual (Tabla 1). Prevalecen los productos a base de microorganismos o metabolitos de estos directamente, que tienen las ventajas, en contraposición con muchos químicos, de una mayor seguridad al hombre, vertebrados e invertebrados y mayor especificidad por lo que su impacto es menor sobre la biodiversidad. Su baja residualidad y en general una menor probabilidad de desarrollo de resistencia por parte del organismo diana debido a su complejo modo de acción los hacen muy atractivos. Cerca del 90% de estos bioplaguicidas están representados por *Bacillus thuringiensis* (Bt) debido a su forma relativamente fácil de obtención, su rápida acción y más fácil registro debido a que el ingrediente activo está constituido por un metabolito o metabolitos (toxinas) que son las de acción controladora.

Tabla 1. Mercado de bioplaguicidas y plaguicidas sintéticos hasta el 2010

(\$ Millones USD)

Tipo	2003	2004	2005	2010	Crec. Anual % 2005-2010
Bioplaguicidas	468	562	672	1,075	9.9
Plaguicidas sintéticos	27,144	26,600	26,076	24,205	-1.5
Total	27,612	27,162	26,748	25,280	-1.1
Bioplaguicidas % del Total	1.69	2.07	2.51	4.25	

Fuente: BCC, Inc. y datos históricos de la EPA

Sin embargo, los productos a base de hongos van tomando un lugar importante por el desarrollo de resistencia al Bt en algunos casos, lo que es consecuencia del mecanismo de acción por ingestión donde la toxina (Delta endotoxina) se activa y se unen muy específicamente a receptores en las células peritróficas del intestino medio del organismo diana. En otros casos el establecimiento de plantas transgénicas con toxinas de Bt incorporadas que se expresan en los diferentes órganos de la planta a niveles muy superiores que los que se encuentran en la naturaleza y de forma muy heterogénea, favorecen también la aparición de resistencia relativamente rápida. Además, hay nichos donde el Bt no puede actuar o no se cuenta con aislados patogénicos para determinada especie diana como es el caso de los locústidos y muchos otros ortópteros y coleópteros. Otra restricción es la imposibilidad de un control a mediano y largo plazo al no provocar epizootias donde los hongos entomopatógenos ejercen un control mucho más efectivo.

También el uso de hongos antagonistas ha revolucionado el control de enfermedades de naturaleza fúngica en plantas, y se está investigando activamente en el efecto contra otros patógenos, debido a la capacidad de estos hongos de estimular el crecimiento de las plantas y activar los mecanismos de defensa locales y sistémicos, lo que hace posible su uso a una escala mucho más amplia. En este caso también se está investigando en el desarrollo de plantas transgénicas con la incorporación de genes de estos hongos para lograr resistencia de amplio espectro contra patógenos. Los antagonistas de naturaleza

fúngica dominan alrededor del 90% del mercado para biocontrol de hongos fitopatógenos representados en gran extensión por *Trichoderma spp.*

En general, entre las desventajas de los bioplaguicidas sobresalen un control menos rápido, requisitos de aplicación muchas veces engorrosos para el productor ordinario y una marcada sensibilidad a la baja humedad relativa, las altas temperaturas y la radiación UV lo que hace que la mayor parte de los programas contra plagas aún sitúen al biocontrol (y específicamente al control microbiano) en el último peldaño después que han fracasado otras opciones, lo que limita fuertemente el nivel de conocimiento que se puede adquirir a través de su uso.

Entre los microorganismos de naturaleza fúngica de más amplio uso contra especies de invertebrados plaga en la agricultura están los hifomicetos donde sobresalen *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii*, *Lecanicillium lecanii*, *L. longisporum* y *L. muscarium* (anteriormente *Verticillium lecanii*), *Pochonia chlamidosporia* (*V. chlamidosporium*), *Paecilomyces spp.* con *P. lilacinus* y *P. fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi*. Para el control de enfermedades fúngicas y también para nemátodos se encuentra *Trichoderma spp.* donde sobresalen *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. pseudokoningii*. Todos ellos presentan una estabilidad genética y fenotípica aceptable para el escalado en procesos de producción, son seguros al hombre y otras especies no diana del ecosistema y su rango de hospedante no es tan estrecho para hacerlos demasiado específicos en su uso. Es en este último aspecto donde los virus fallan para controlar varias plagas pues son altamente especie-específicos conjuntamente con la necesidad de replicación *in vivo* (necesitan hospedantes para reproducirse). Sin embargo, su impacto en los agroecosistemas es muy bajo y son fáciles de registrar.

Como ejemplos de productos fúngicos exitosos en el mercado tenemos a Mycotrol a base de *B. bassiana* desarrollado por Mycotech Corporation para controlar a *Leptinotarsa decemlineata*, Vertalec (*Lecanicillium longisporum*) y Mycotal (*L. muscarium*), ambos desarrollados en Reino Unido para áfidos y mosca blanca respectivamente, GrenMuscle desarrollado por CABI, Reino Unido, a base de *Metarhizium anisopliae* para el control de langostas, Binab T y Rootshield de *Trichoderma* desarrollados por Bio-Innovation de Suecia y Bioworks, Inc. en EEUU respectivamente Soilgard, es un producto efectivo comercializado por Bioscape Inc. y Gliomix comercializado por la firma finesa Kemira Agro Oy, ambos a partir de *Gliocladium*.

1.2. Rango de hospedantes

El rango de hospedantes sobre los que tienen efecto patogénico es dependiente de la especie y del aislado en cuestión. En general *Metarhizium* y *Beauveria* actúan sobre varios órdenes de insectos que agrupan varias especies de lepidópteros (*Mocis*, *Spodoptera*), coleópteros (*Cosmopolites*, *Pachnaeus*), ortópteros (*Locusta*, *Schistocerca*), *Paecilomyces fumosoroseus* actúa sobre lepidópteros (Spodoptera, y especies de áfidos (*Aphis*, *Myzus*) y mosca blanca (*Bemisia*), *Lecanicillium lecanii*, *L. longisporum* y *L. muscarium* sobre especies de áfidos (*Myzus*, *Aphis*) y mosca blanca (*Bemisia*), *Pochonia chlamidosporia* (*Verticillium chlamidosporium*) parasita quistes de nemátodos (*Globodera*) u ootecas de nemátodos agalladores (*Meloidogyne*), *Trichoderma spp.* sobre patógenos fúngicos de suelo y foliares (*Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerotium*, *Alternaria* y sobre nemátodos (*Meloidogyne*, *Globodera*).

1.3. Características macroculturales y microculturales de algunos hongos ampliamente usados como agentes de biocontrol

En general estos hongos no forman cuerpos fructíferos, tienen alta producción de esporas, son relativamente fáciles de cultivar fuera del hospedante.

Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin:** colonias en PDA o MEA con aspecto aterciopelado a polvoriento, raras veces formando sinemas; blancas en los bordes que se vuelven amarillo-pálidas, algunas veces rojizas, incoloras al reverso, amarillas o rojizas. Conidioforos abundantes, que se levantan a partir de las hifas vegetativas sosteniendo grupos de células conidiógenas que se pueden ramificar para originar más células conidiógenas, globosas a forma de botella, con un raquis bien desarrollado. Conidios hialinos, lisos, globosos a ligeramente elipsoidales, Clamidosporas ausentes. Difiere de ***B. brongniartii en que tiene las células conidiógenas más agrupadas y los conidios globosos (Anexo 1).

***Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch:** colonias en PDA o MEA blancas, aspecto aterciopelado a polvoriento, con el tiempo se vuelven amarillo-pálido o rosado pálido, raramente rojo o púrpura. Al reverso incoloras, amarillas o rosadas. Células conidiogénicas solitarias o en pequeños grupos, con fiálides subglobosas, y un raquis largo; Conidios hialinos, lisos, elipsoidales. Clamidosporas ausentes (Anexo 2).

Estas dos especies causan las muscardinas blancas.

Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin.** Colonias en PDA con un margen micelial blanco. Conidioforos con aspecto de "terrones" que se colorean con el desarrollo de las esporas. El color varía desde oliváceo hasta amarillo-verde o verde yerba oscuro. Pero en raros casos rosados o vináceos. Esporas formadas sobre hifas columnares, a veces discretos esporodoquios, como costras. Al reverso incoloras o color miel. Conidióforos abundantes, usualmente con 2-3 ramificaciones por nodo. Fiálides cilíndricas o clavadas que se adelgazan abruptamente hacia el ápice. Conidios en cadena formados en los ápices de las fiálides, estrechos, cilíndricos, delgados y truncados en ambos extremos, hialinos a oliváceos o verdes, lisos, aseptados. Las técnicas de biología molecular ha logrado una separación más allá de la clásicas variedades ***Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae y ***Metarhizium anisopliae* var. *major***. Es el agente causal de las muscardinas verdes (Anexo 3).

***Metarhizium flavoviride* (Gams) Rozsypal.** Difiere de *M. anisopliae* fundamentalmente por el color de la colonia (más tonalidades verde pálidas) y forma de los conidios (más ampliamente elipsoidales) (Anexo 4).

***Verticillium lecanii* (Zimmermann) Viegas.** Colonias blancas o cremas, algodonosas delicadas, incoloras al reverso, amarillo pálido o amarillo oscuro. Células conidiógenas en parejas o grupos de 3 ó 4, en conidióforos con pobre desarrollo. Son delicadas, de tallas muy variables dependiendo de la cepa y la edad del cultivo. Conidios no en cadenas, agregados formando cabezuelas en las puntas de las fiálides. Conidios elipsoidales a cilíndricos con extremos redondeados. Clamidosporas ausentes. Parasita todos los estadios de desarrollo de insectos y arácnidos. Hiperparasita hongos del tipo de las royas y hongos superiores. Se puede encontrar en restos de cosecha, suelo, etc. No crece a 33 grados C.

En el 2001 los Drs. Walter Gams (Holanda) y Rasoul Zare (Irán) conjuntamente y basados en estudios moleculares forman 3 especies a partir de ***Verticillium lecanii***. Estas son: *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm.) Zare & Gams, *L. muscarium* (Petch) Zare & Gams y *L. longisporum* ((Petch) Zare & Gams). Las diferencias fundamentales entre las especies están dadas por rango de hospedantes y la talla de los conidios y su uniformidad. En *Lecanicillium lecanii* los conidios son ligeramente elipsoidales, muy homogéneos en forma y talla y parasitan insectos tropicales solamente, en *L. muscarium*

son más largos y delgados y en *L. longisporum* son elipsoidales a ovales, raramente con un septo.

***Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson.** Colonias de lento crecimiento en PDA o Agar Malta, afieltradas, con conidioforos muy complejos que se ramifican a intervalos regulares que se levantan erectos y muy densamente agrupados que dan lugar a conidios verde muy pálido que forman a veces costras, que con la edad cambian a tonalidades hasta verde malaquita. Hifas vegetativas lisas, hialinas. Los conidioforos son cortos y anchos, casi de la misma longitud el ancho y el largo. Fiálides cortas y redondas, cilíndricas a globosas con una base muy ancha. Conidios aseptados, catenulados, elípticos a cilíndricos. Parasitan larvas y pupas de lepidópteros y coleópteros (Anexo 5).

***Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith-** Colonias en MEA o PDA crecen moderadamente rápido, muchas veces la colonia basalmente tiene aspecto de fieltro o puede tener un aspecto polvoriento, granular. Producen coremios definidos que son polvorientos cuando el hongo es aislado por primera vez. Al principio blancas, que pueden permanecer así o cambiar con el tiempo a tonalidades rosadas y grisáceas. Algunas veces se produce un micelio aéreo anaranjado-amarillo, velloso. Al reverso son incoloras o amarillo pálido o anaranjado pálido. No tiene olor ni exuda. Sobre insectos produce conidióforos simples mononematosos y sinemas poco "apretados". Hifas vegetativas hialinas, de paredes lisas, Las estructuras conidiales tienden a ser complejas con conidioforos erectos que se originan de hifas aéreas. Los conidioforos se producen solo o en grupos, de paredes lisas, hialinas, con verticilos ramificados con grupos de 3-6 fiálides. Algunas veces el patrón verticilado se rompe y sobre el conidioforo se producen ramas sencillas. Fiálides con una base ancha que se adelgaza a un cuello delgado y largo. Conidios cilíndricos a fusiformes, con extremos redondeados, lisos, hialinos, en cadenas (Anexo 6).

***Paecilomyces lilacinus* Samson.** Colonias en MEA o PDA con tonalidades violáceas; al reverso incoloro o vináceo. Conidioforos erectos, mayormente solitarios del micelio horizontal, raramente sinematoso, amarillo a púrpura, paredes rugosas con fiálides agrupadas densamente. Conidios fusiformes a elipsoidales, paredes lisas a suavemente. Puede producir conidioforos mononematosos o sinemas en insectos. Es un hongo típico de suelo. Tiene alguna actividad antagonista contra bacterias y hongos. Producen el

antibiótico peptídico leucinostatina, efectivo contra un amplio rango de hongos y bacterias Gram positivas y también el lilacinin.

***Pochonia chlamidosporia* (Goddard) Zare & Gams var. *catenulata* (= *Verticillium chlamidosporium*).** Colonias blancas al inicio, color blanco que con el tiempo pasan a crema, polvorientas por la aparición de las dictioclamidosporas que se engruesan con la edad (estructura de sobrevivencia pedunculada generalmente, hialinas, pared gruesa, multicelulares). Reverso crema, amarillo pálido o naranja. Fiálides que se levantan de hifas postradas, hasta 5 por nodo. Conidios producidos en cadenas, en cabezuelas, globosos a subglobosos, base ligeramente apiculado. No crece a 33 grados C.

***Trichoderma harzianum* Rifai.** Colonias de rápido crecimiento en PDA, 7-9 cm diámetro después de 3 días, micelio aéreo flucoso, blanco a ligeramente gris o raramente amarillo, conidiación que cubre con frecuencia toda la superficie de la placa que produce pústulas aplanadas hasta de 8 mm en diámetro, concéntricas o cerca de las márgenes de la placa, polvorienta o granular y de varios tonos verdes incluso en el mismo cultivo, con frecuencia rodeado por micelio blanco estéril. Al reverso colonias incoloras o amarillas, pardas, ocráceas o en algunos aislados ferruginosas. Pocos aislados producen abundantes cristales amarillos. Exudados incoloros a ámbar o amarillo verdoso. Hifas hialinas. Clamidosporas abundantes, solitarias, subhialinas a amarillo pálido o carmelitoso con la edad, subglobosas a elipsoidales o piriformes. Conidioforos hialinos, paredes lisas, rectos o doblados, muy ramificados, primeras ramas nacen formando ángulos rectos o dobladas un poco hacia el ápice, en grupos de 2 o 3 que se vuelven más largos hacia la base, complejos con ramas secundarias en grupos de 2-4, la estructura completa es más o menos piramidal con un ápice estéril cuando está creciendo aún el hongo. La conidiación comienza por la base de este patrón de conidioforo y las ramas jóvenes son estériles. Fiálides ampuliformes a subglobosas; muy constreñidas en la base, muy hinchadas en el medio y abruptamente estrechas en el ápice en número hasta de 6. Conidios subglobosos a ovoides o ligeramente elipsoidales con ápice ampliamente redondeado, pared lisa o ligeramente rugosa, subhialinos a verde pálido (Anexo 7).

1.4. Modo de acción

Los hongos entomopatógenos actúan principalmente por contacto, cuando el hongo es capaz de penetrar el insecto e invadirlo, provocándole la muerte por micosis.

La mayoría de los autores aborda ampliamente el ciclo infectivo de estos hongos dividiéndolo en dos fases: una parasítica y otra saprofítica. La primera incluye la adhesión

del conidio a la cutícula del insecto, la germinación (estimulada por los lípidos cuticulares del hospedante en calidad y proporción), penetración (complejos multienzimáticos con enzimas secretadas como lipasas, quitinasas y proteasas activadas secuencialmente) y multiplicación del hongo (por blastosporas fundamentalmente) con la consiguiente producción o no de toxinas, en dependencia de la cepa presente, que finaliza con la muerte del insecto. La segunda fase se caracteriza por una colonización total con melanización y momificación del individuo, emergencia del hongo y su esporulación, cuando la humedad relativa microambiental sea alta. Estos conidios pueden diseminarse mediante el viento, el agua, otros organismos y el hombre, para así iniciar un nuevo ciclo infeccioso.

En el caso de los hongos antagonistas para el control de plagas (patógenos de plantas) se encuentran, dentro de los más empleados, especies del género *Trichoderma*. Este hongo tiene la capacidad de parasitar a otros hongos lo que se conoce como hiperparasitismo o micoparasitismo, hacia diferentes patógenos de plantas. Su modo de acción es complejo donde están incluidos el quimiotaxismo, la antibiosis y el parasitismo. La interacción inicial entre el parásito y el hospedero parece ser del tipo quimiotrófico. La hifa del micoparásito crece directamente hacia el hospedero en respuesta a las lectinas secretadas por este, las que se unen a los residuos de galactosa en la pared celular de *Trichoderma* siendo la señal que permite dirigir el crecimiento hacia esa zona. *Trichoderma* secreta enzimas que actúan como un complejo con acción sinérgica sobre el patógeno debilitando la pared y permitiendo la difusión de los antibióticos hacia este. Después del contacto físico microscópicamente se observa la presencia de haustorios, enrollamiento de la hifa del biocontrol sobre la del patógeno, vacuolización, formación de gránulos, desintegración del citoplasma y lisis celular. Este género actualmente se estudia a profundidad por la respuesta sistémica inducida al ataque de otros patógenos y por ser fuente de genes que codifican para proteínas (enzimas como glucanasas, proteasas)) y metabolitos (fitohormonas) con acción estimuladora y defensiva en la planta, los que se están usando en protocolos de transgénesis en especies de plantas de importancia económica con resultados muy alentadores.

1.5. Caracterización de aislados fúngicos para el biocontrol

El mero hecho de identificar al microorganismo taxonómicamente hasta especie implica datos que tienen importancia en la caracterización del aislado. Sus características

morfométricas y culturales son importantes y básicos para estudios posteriores y más reproducibles. Estos deben incluir estudios bioquímicos (actividad exoenzimática, perfiles isoenzimáticos específicos como patrón de esterasas, lipasas, fosfatasa alcalina. etc.). Los análisis isoenzimáticos pueden tener como desventaja que los perfiles estudiados no sean suficientemente diferentes y/o las isoenzimas expresadas no aparezcan en un aislado determinado por cuestiones fisiológicas.

Los estudios más altamente reproducibles son los que se realizan a nivel de ADN (moleculares). Actualmente para que un aislado sea reconocido como apropiadamente caracterizado requiere de al menos un método molecular que lo identifique como tal y en la fase de registro de un producto internacionalmente esta condición es exigida en países líderes en biocontrol.

Los estudios moleculares más usados en hongos para la caracterización son los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) en los cuales se generan cortes por enzimas de restricción en el ADN dando lugar a fragmentos de diversas tallas, los que son puestos en contacto con sondas específicas marcadas con un cromógeno o con un isótopo radiactivo, que pueden o no acoplarse al o los fragmentos producidos por complementariedad de bases (hibridización) y luego de una electroforesis en gel de agarosa se genera un patrón de bandas en dependencia de la sonda de hibridización, el aislado y la enzima empleada en el corte del ADN, lo cual logra discriminar aislados aparentemente iguales como diferentes cepas.

Otro análisis molecular mucho más barato pero menos reproducible entre laboratorio son los análisis genéticos del tipo PCR-RAPD (**P**olymerase **C**hain **R**eaction- **R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**N) los que consisten en un PCR clásico donde los "primers" (por ejemplo cebadores universales) suministrados para la amplificación son conocidos como buenos para detectar variabilidad entre poblaciones (razas, cepas, etc.). En el método se necesita ADN aislado del hongo mediante un proceso de purificación clásico (el método de extracción debe ser suave para no desnaturalizar el ADN). Este ADN se lleva junto al "primer" a varios ciclos de amplificación donde se tiene una ADN polimerasa resistente al calor y los nucleótidos para la polimerización además de cofactores y soluciones buffer. Se realiza una electroforesis y los fragmentos de ADN amplificados se visualizan en el gel. Los patrones de bandas para cada "primer" probado pueden ser iguales o diferentes. Se pueden probar tantos "primers" como se dispongan. La mayor desventaja del PCR-RAPD es que no tiene muy buena reproducibilidad entre laboratorios aunque sí tiene el

mismo poder de resolución entre laboratorios cuando se trabaja con las mismas poblaciones, o sea, los patrones de bandas son los que pueden cambiar.

1.6. Métodos de aislamiento

Los métodos para aislamiento que se usan más ampliamente son métodos clásicos. Para hongos antagonistas se usan raíces jóvenes, por ejemplo, de plantas libre de síntomas tomadas de una zona donde pueda existir algún síntoma de una enfermedad fúngica. Las raíces se lavan abundantemente y se desinfectan muy ligeramente, se trituran y se siembra en medios generales para hongos con antibacterianos añadidos. Se trata de obtener colonias únicas y por observación al estereoscopio y microscopio óptico se seleccionan las posibles especies controladoras. También se procesa suelo de estas zonas donde se encuentran sorpresivamente plantas sanas o de zonas donde no se observan síntomas de enfermedades producidas por hongos lo cual resulte aparentemente inexplicable. Se realizan diluciones decimales en placa (siembra para obtener unidades formadoras de colonia). Se incuban entre 23-28 grados C y se evalúan a partir de las 48 horas). Estos métodos precisan de experiencia (Anexo 8).

Para el caso de los entomopatógenos se traen del campo insectos micosados o sospechosos de micosis (insectos melanizados y/o momificados). Se realizan siembras en medios para hongos (PDA, SDA) con antibióticos y se incuban a 23-27 grados C revisando el material luego de 72 horas y hasta 14 días posterior a las siembras. Igualmente se procesan ootecas o quistes de nemátodos. En todos los casos se desinfectan suavemente en etanol 70% o hipoclorito sódico por 1 minuto al 0.5% y/o alcohol 70%.

Las muestras de suelo también son interesantes para aislar entomopatógenos con insectos "trampeadores" , o sea, especies altamente susceptibles a los hongos entomopatógenos como es el caso de larvas de lepidópteros. Ejemplo de ello tenemos en Cuba el aislamiento de hongos entomopatógenos con larvas de *Galleria mellonella* o *Corcyra cephalonica* procedentes de crías certificadas de laboratorio, los que rutinariamente se usan para enriquecer las colecciones de cultivos (Anexo 9).

Es importante destacar que los estudios no deben realizarse en zonas donde se hayan aplicado o se apliquen microorganismos de las especies que estamos tratando de aislar y siempre debe obtenerse un aislado monospórico para lograr mayor homogeneidad genética.

1.7. Métodos de conservación

El objetivo de la conservación es mantener el aislado con las características genéticas y fenotípicas originales. Siempre debe conservarse por 2 métodos diferentes y uno de ellos a largo plazo. Los protocolos de conservación son muy regulares y se pueden obtener fácilmente desde libros clásicos de Microbiología o desde INTERNET.

A largo plazo tenemos la liofilización que se basa en la desecación extrema al vacío del cultivo del hongo por congelación profunda de forma que el agua pase rápidamente de sólido al estado gaseoso. También se cuenta con conservación en Nitrógeno líquido pero este método es engorroso pues precisa de tanques metálicos para el N que alcanzará 196 grados C bajo cero. Siempre en los métodos de congelación se usan agentes crioprotectores (DMSO, leche descremada, glicerol, etc).

Métodos como conservación en suelo previamente esterilizado y luego inoculado y desecado son útiles así como la conservación en sílica gel no indicadora (sin cobre) inoculada previamente con una suspensión del cultivo en leche descremada 5% y luego desecada. Ambos son baratos y de fácil ejecución. También el aceite mineral sobre cultivos previamente esporulados es un método muy efectivo a mediano plazo. El método más usado a corto plazo es el de cultivos sobre cuñas de medio agarizado nutritivo.

En Cuba se han optimizado medios para producir masivamente las esporas (conidios, clamidosporas, etc) en alta concentración en el cultivo según los requerimientos de cada aislado, el que luego será llevado a uno de los métodos explicados anteriormente para su conservación.

2. Tecnologías para producciones de hongos.

2.1. Tecnologías básicas

En el mundo se realizan desde muy puntuales y pequeñas producciones de agentes de biocontrol como la tecnología desarrollada sobre medio agarizado para la producción de *Phlebiopsis gigantea*, hongo antagonista basidiomiceto del también basidiomiceto *Heterobasidion annosum*, que es el agente causal de la enfermedad que más afecta la raíz de las coníferas en el hemisferio norte, hasta producciones a escala industrial como las desarrolladas por Mycotech Corporation que pueden llegar a varias toneladas de *Beauveria bassiana* anualmente.

Los métodos de producción varían considerablemente. Muchos están basados en fermentaciones sobre sustrato sólido con granos de cereales donde el arroz es el más universal. Otros usan sustratos no nutritivos como gránulos de arcilla. Algunos rinden conidios aéreos en la superficie de cultivos líquidos estáticos. Otras tecnologías se desarrollan en tanques de fermentación para obtener productos a base de micelio, blastosporas o conidios sumergidos.

Las 4 formas de producción fundamentales para hongos son:

1-cultivos bifásicos, donde se desarrolla el inóculo en cultivo líquido agitado (de forma rápida) o líquido estático (más lento) y luego se pasa al soporte sólido. En los sistemas bifásicos siempre se debe optimizar el cultivo de la fase líquida para que promueva un rápido crecimiento del aislado. Es el más usado a nivel mundial por obtenerse estructuras infectivas de alta calidad y acortarse el tiempo cuando la fase líquida se hace por cultivo líquido agitado. Son semiartesanales (Anexo 10).

2-cultivos sobre soporte sólido, siendo una forma de producción donde se requiere menos equipamiento y se realizan muchas operaciones manuales pero se obtiene estructuras infectivas de alta calidad a concentraciones altas. Son artesanales (Anexo 11).

3-cultivos líquidos agitados o fermentaciones líquidas con un grado de automatización del proceso que puede ser muy alto, son muy rápidos, pero tienen como desventaja el que muchos aislados tienden a crecer como pellets miceliales discretos y/o forman abundantes blastosporas (esporas formadas propagadas por gemación a partir de fragmentos de micelio originalmente), propágalos estos que no son apropiados por la baja estabilidad intrínseca y poseer *per se* bajo o nulo poder infectivo. En estos sistemas se logra un óptimo aprovechamiento de los nutrientes. Pueden llegar hasta niveles industriales (Anexo 10 y Anexo 12).

4-cultivos líquidos estáticos, los que constituyen una forma de producción donde se requiere menos equipamiento y se realizan muchas operaciones manuales pero se obtiene estructuras infectivas de alta calidad a concentraciones bajas pues solamente hay formación de estructuras deseadas en la interfase líquido- gaseosa. Son artesanales (Anexo 13).

Una forma especial de cultivo sólido con tecnología avanzada lo constituyen las fermentaciones en estado sólido las que han dado la oportunidad a la industria de desarrollar producciones de bioplaguicidas en biorreactores sellados con un grado alto de automatización, con principios similares a aquellos de la fermentación líquida, lo que reduce costos de mano de obra y permite un control eficiente del proceso de producción donde se logra biomasa de alto valor infectivo y más resistente a condiciones ambientales adversas. En estos sistemas también se logra un óptimo aprovechamiento de los nutrientes pero la inversión de capital inicial es muy alta.

Para los países del tercer mundo esta tecnología presenta menos posibilidades de aplicación debido a las dificultades económicas y el alto costo de capital de estos procesos automatizados. La presencia de mano de obra barata y un mercado que es regional y pequeño hace a los sistemas de producción artesanales (baja tecnología) viables económicamente a pesar de requerir muchas operaciones manuales.

2.2. Descripción del proceso productivo artesanal (“baja tecnología”). Parámetros clave

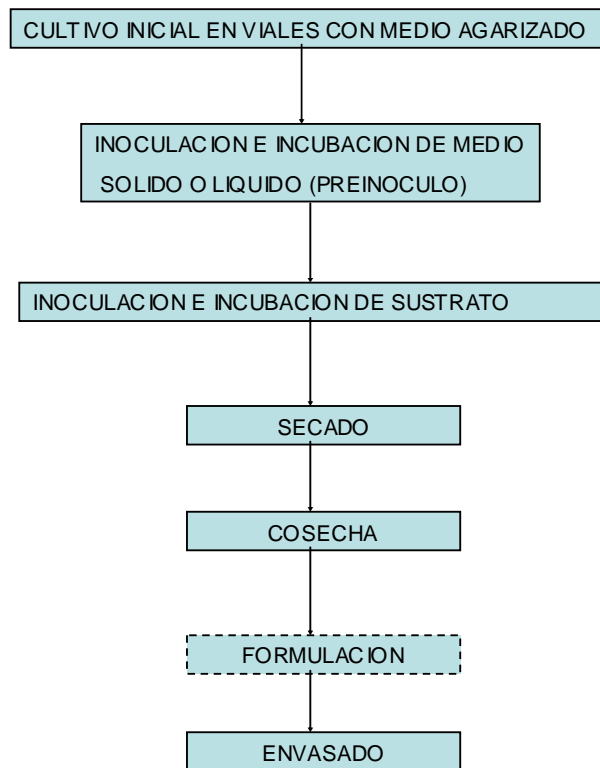


Figura 1. Diagrama de flujo general del proceso de producción de hongos por vía artesanal.

En los sistemas artesanales para la producción de hongos se establecen de manera general los pasos enunciados en la figura 1.

En toda producción de bioplaguicidas microbianos se parte de un aislado con características deseadas como agente de biocontrol, el cual es conservado previamente y subcultivado durante el escalado.

Los preinóculos pueden desarrollarse sobre sustratos sólidos (grano arroz, grano trigo, cáscara de trigo, cáscara de arroz, harina de maíz, etc) incluyendo los medios agarizados de cultivo o por cultivos líquido estático o agitado (compuestos por combinaciones de materias primas carbonadas y nitrogenadas como melaza de caña de azúcar, licor de maíz, almidón de maíz, sacarosa, extracto de levadura torula, extracto de levadura cervecera, etc.) siendo el objetivo fundamental la obtención de una biomasa homogénea. La relación carbono (C) : Nitrógenos (N) es esencial y de este balance en lo fundamental

dependerá el que se logre la formación de los propágulos deseados. En los hongos, se necesita que la fuente C esté en exceso en el medio y el contenido de N sea el factor limitante del crecimiento, lo que desencadena el proceso esporulativo.

Los inóculos se preparan a partir de subcultivos de preinóculos a una concentración final en el sustrato inoculado de $10(5)$ - $10(7)$ propágulos/g

La elección de los sustratos sobre los que se realizará la inoculación, previa esterilización, dependerá de la disponibilidad local y costo de estos así como de las características del aislado a reproducir. Se han usado cereales como agentes nutritivos (arroz, trigo, cáscara de trigo, cáscara de arroz, maíz etc.) y como agentes inertes de soporte la vermiculita, gránulos de minerales arcillosos, tela, etc. Con el uso de sustratos inertes las soluciones nutritivas en los que estos se embeben pueden ser balanceados cuidadosamente para asegurar una casi completa utilización de los nutrientes y acá despliegan un papel clave también el balance C:N.

El sustrato puede ser humedecido previa esterilización o previa inoculación dependiendo del tipo de materia prima o combinación de estas y ajustes realizados. Un exceso de humedad provocaría baja disponibilidad de oxígeno y por ende pobre desarrollo del microorganismo. Además compactaría el sustrato impidiendo una colonización total de su superficie. Por otro lado, una baja humedad podría inhibir el desarrollo del microorganismo al no poner la suficiente cantidad de nutrientes en solución para ser usado por este además de la poca resistencia a la desecación que tienen los hongos en el periodo activo de crecimiento micelial.

Durante la incubación se debe regular el régimen luz-oscuridad. La luz es estimulante en determinadas especies y aislados por lo que este parámetro es ajustable solamente a través de la experimentación.

Cuando se obtiene la biomasa conidial óptima sobre toda la superficie del sustrato se pasa al proceso de secado para que los conidios permanezcan viables en almacenamiento por mayor tiempo. Este proceso se optimiza con deshumidificadores o aires acondicionados o acelerando la ventilación con ventiladores lo que depende de las condiciones locales.

Posterior al secado y previo al paso final de envasado en el flujo de producción se realiza la cosecha. Es en este momento que comienza la etapa de formulación donde se prepara una combinación de ingredientes de forma que el principio activo (esporas) se mantenga estable, efectivo y fácil de aplicar.

Durante todo el proceso la regulación de la temperatura ambiental es esencial la que debe ser lo más próxima posible a la temperatura óptima de desarrollo del microorganismo.

3. Control de calidad en la producción de microorganismos fúngicos para el control biológico. Principales ensayos.

3.1. Panorámica general

Un requisito esencial para la producción de cualquier agente de control microbiano es un sistema de control de la calidad efectivo.

La calidad se define como el conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que lo hacen apto para satisfacer las necesidades a las cuales va dirigida. Las normas y procedimientos para el control de calidad de los productos y procesos conjuntamente con los registros, constituyen la garantía para la validación de las producciones de bioplaguicidas.

Un producto con especificaciones bien definidas y con los consiguientes procedimientos de control de calidad asegura su buen funcionamiento y su seguridad, promueve la estandarización de los costos de producción y garantiza su estabilidad en el mercado lo que conlleva a la ganancia de confianza en el consumidor. En el caso de los productos a base de hongos su funcionamiento no confiable por falta de calidad ha limitado su éxito en países en desarrollo donde estos requerimientos son mínimos o no existen.

Una producción con un sistema de calidad establecido tiene un control estricto sobre la salida de su producto al poder analizar la calidad en cada punto crítico implicado en la elaboración de este.

En 1992, en la Reunión del Grupo Activo de Control de Calidad de la Organización Internacional de Control Biológico, se estableció llevar un control de las producciones que implique el seguimiento de la ejecución de todas las operaciones, procedimientos, equipos y condiciones ambientales de estas con el objetivo de mantener el rendimiento.

También se planteó controlar el proceso de forma que se le dé seguimiento a la calidad del producto no terminado, incluido la detección de contaminantes, además de un sistema que controle la calidad del producto final. Esto es muy significativo para el caso de los agentes microbianos fúngicos de control ya que para que sean efectivos precisan de que culminen exitosamente un complejo proceso de infección. Comparados con los agroquímicos, los sistemas de calidad para la producción de bioplaguicidas microbianos deben ser más exhaustivos y especializados.

Aún no existen protocolos estandarizados internacionalmente lo que ha traído como consecuencia que los productores o países desarrollen sus propios procedimientos de control de calidad.

3.2. Puntos críticos de controles de calidad

El primer punto donde se controla la calidad en cualquier sistema de producción es en el **subcultivo de la cepa del hongo** del cual se parte. Esto incluye los subcultivos de trabajo y los de conservación. En ambos casos se tienen que establecer métodos de conservación y mantenimiento que garanticen la estabilidad genética y fenotípica del aislado los que deben ser verificables a través de pruebas bioquímicas y moleculares. Las transferencias sucesivas en medios agarizados deben evitarse. Se debe verificar **la pureza del cultivo y la actividad biológica** con la frecuencia necesaria.

En el control del proceso de producción se requiere una descripción completa de este con los correspondientes controles de calidad y monitoreo de cada paso. El registro de todos los parámetros como temperatura, contenido de humedad del sustrato, pH y monitoreo de la contaminación debe tenerse por lote de producción para facilitar el examen de todos los pasos críticos de la producción desde el producto final hasta el inicio del proceso (trazabilidad).

En la preparación de **inóculos** se debe tener en cuenta su **concentración y pureza**. Todos los **medios de cultivo** deben ser verificados para su **esterilidad segura antes y después de la inoculación**.

En el caso de los sustratos desafortunadamente no siempre se tienen materias primas certificadas por lo que cada nuevo lote de materia prima debe ser sometido a un análisis físico-químico y a un chequeo del nivel de esterilidad pre y post inoculación. Para que la esporulación sea máxima se necesita una buena área superficial en relación al volumen.

Las partículas del sustrato individuales deben estar separadas después de la hidratación y esterilización porque las que quedan pegadas reducen el área superficial con respecto al volumen cuando se adiciona el agua, limitando el espacio efectivo en que ocurrirá la esporulación.

El contenido de humedad del sustrato debe ser ajustado para el crecimiento micelial y la conidiogénesis teniendo en cuenta cada **combinación sustrato-aislado** y su optimización puede ser compleja. El rango de humedad 35-60% v/p es usualmente usado. Incrementos en el contenido de humedad del sustrato tienden a disminuir la disponibilidad de oxígeno lo que se puede agravar en el escalado debido a la compactación de grandes masas de este.

La aeración en la producción es otro parámetro que determina la calidad de las producciones partiendo de que todos los hongos mitospóricos (hifomicetos) son aerobios y requieren oxígeno para el crecimiento y la conidiación. En los sistemas de producción artesanales es difícil determinar el requerimiento de oxígeno de un determinado hongo y la evaluación se hace muy cualitativamente. La mayoría de los sistemas de producción de América Latina, China y del programa internacional LUBILOSA, están basados en el intercambio del aire entre la cámara de crecimiento y el ambiente externo.

Otro factor crítico es la **temperatura de incubación**, la que varía según el tipo de crecimiento requerido no solo entre especies sino también para el aislado en cuestión. Este parámetro debe ser monitoreado cuidadosamente en el escalado, debido a que el calor que se produce durante el metabolismo puede provocar áreas con temperaturas por encima de la óptima en el cultivo.

También se debe tener en cuenta el **régimen luz-oscuridad** cuando se selecciona el sistema de producción.

En la etapa de post-cosecha, previo envasado, se precisan métodos para extraer y/o formular los propágulos (conidios generalmente). Por ejemplo, si se necesitan conidios para aplicación a volúmenes ultrabajos se requiere de un fino polvo con partículas uniformes por lo que la extracción debe ser eficiente y selectiva para los conidios garantizando su viabilidad.

Con respecto al **monitoreo de la contaminación del proceso** se sabe que todas las producciones microbianas tienen el riesgo de contaminarse y en las artesanales esto

puede ocurrir con más frecuencia si no se cumplen las buenas prácticas de producción debido al gran número de operaciones manuales. Las contaminaciones pueden conducir a una pérdida de eficacia del ingrediente activo por la dilución con los microorganismos que han competido, además del posible efecto inhibitorio de los metabolitos secundarios producidos por los contaminantes donde el reconocimiento y la cuantificación del grado de contaminación son importantes para determinar cualquier posible riesgo a la salud humana y demostrar que no haya entrada de patógenos humanos. Por ello se deben registrar todos los pasos críticos del sistema de producción y el resultado de los análisis de contaminantes para identificar la fuente y tomar medidas preventivas. Esto incluye el subcultivo del que se parta para preparar los pre-inóculos, los inóculos, el sustrato antes y después de esterilizado y el producto final.

Las especificaciones para el nivel permisible de contaminantes en el producto final dependerán de los métodos de producción y el procesamiento del producto en la cosecha, post-cosecha y la formulación, etapas últimas que se realizan en ambientes no estériles. Por tanto se debe establecer un nivel base de entrada de contaminantes a través de un estudio bien controlado, chequeando los controles en las primeras etapas del proceso para demostrar que el nivel de contaminantes del producto final es debido inevitablemente a las últimas fases.

3.3. Principales ensayos

En general, el control de calidad del producto final es el punto más importante que garantiza el funcionamiento de éste y su aceptación a largo plazo. Si el producto tiene una viabilidad alta al igual que una adecuada virulencia, se maximiza la probabilidad de que actúe bien en el campo. De ahí que las pruebas de más amplia aceptación para los productos bioplaguicidas a base de hongos sean:

- 1- *la prueba de viabilidad*, donde se evalúa si la célula está o no viva. Esto puede hacerse a través de una prueba de germinación conidial a un tiempo y temperatura determinados en medios nutritivos agarizados o líquidos o por conteo de viables en placa (ufc/g o ml de producto) (Anexo 14).
- 2- *los bioensayos* donde se comprueba la estabilidad de la patogenicidad y la virulencia del aislado producido masivamente. Se usan individuos de la especie plaga hacia la cual va dirigido el producto. En nuestro caso, el insecto para los entomopatógenos o el hongo fitopatógeno para el caso de los hongos antagonistas como *Trichoderma*.

- 3- *la determinación del nivel de contaminantes (pureza)* que se realiza tomando determinada cantidad del producto y realizándose conteo de viables posteriores a la siembra en medios nutritivos generales para hongos y bacterias
- 4- *la concentración de unidades infectivas* que se determina por conteo directo en cámara de Neubauer o por conteo de viables en medios agarizados
- 5- *la determinación de la estabilidad del producto en almacenaje* lo que constituye un factor crítico considerando la no necesidad de refrigeración o algún tratamiento especial. Los métodos de secado y cosecha, la formulación y el embalaje deben tenerse en cuenta para preservar la calidad del conidio.

4. Proceso de recobrado en las producciones sólidas de hongos para biocontrol en la agricultura. Almacenaje. Registro. Elementos de bioseguridad.

4.1. Recobrado de producciones sólidas de hongos

Cuando se obtiene la biomasa conidial óptima sobre toda la superficie del sustrato se pasa al proceso de secado para que los conidios permanezcan viables en almacenamiento por mayor tiempo. Este proceso se optimiza con deshumidificadores o aires acondicionados o acelerando la ventilación con ventiladores lo que depende de las condiciones locales (Anexo 15 y Anexo 16).

Posterior al secado y previo al paso final de envasado en el flujo de producción se realiza la cosecha. Es en este momento que comienza la etapa de formulación donde se prepara una combinación de ingredientes de forma que el principio activo se mantenga estable, efectivo y fácil de aplicar. Aquí entran los métodos de separación de propágulos para realizar las formulaciones que varían considerablemente de producto a producto donde los procedimientos que se llevan a cabo dependerán del uso al que vayan dirigidos estos. Así los propágulos separados pueden mezclarse con aceites vegetales, minerales, kerosene, agua, con aditivos como protectores UV, materiales como arcillas que den volumen y sirvan para hacer un producto más manipulable. En el caso de los conidios, si

el uso aconsejado es para plagas del suelo, estos se pueden dejar sobre el sustrato que se obtuvieron y la aplicación hacerse directamente.

En muchos casos, posterior a la cosecha y antes de ser formulados los propágulos, se realiza un proceso de extracción y concentración (Anexo 17). En este paso es decisivo lograr una humedad del biopreparado menor de 15% y poca particulación del sustrato. Si se necesitan conidios para aplicación a volúmenes ultrabajos se requiere de un fino polvo con partículas uniformes por lo que la extracción debe ser eficiente y selectiva para los conidios. Esto clásicamente se ha logrado con tamices que permitan seleccionar a través de un tamaño de poro crítico la mayor parte de los conidios y separarlos del resto del sustrato, lo cual es engorroso, consume mucho tiempo, genera gran cantidad de aerosoles y no garantiza uniformidad en las partículas obtenidas aunque es factible en sistemas de producción de muy bajo costo para almacenar esporas y/o formularlas.

Sin embargo, en la última década se encuentran en el mercado equipos que se recomiendan para la separación de esporas de hongos entomopatógenos y antagonistas a partir de sustratos como arroz, trigo, etc u otros que con determinadas modificaciones ingenieriles se pueden adaptar para estos fines. Estos cosechadores de esporas permiten la eliminación de “partículas grandes” menores que 100 μm las que pueden bloquear los orificios de los aspersores y filtros en los equipos de aplicación, una alta calidad de la separación de esporas, lo cual mejora la estabilidad física de las formulaciones y una operación segura ya que la generación de aerosoles es mínima. Por ejemplo, CABI-BioScience de Reino Unido comercializa un cosechador de esporas bajo el nombre de Mycoharvester (MH). Con el modelo industrial MH-3 se logra un procesamiento de media tonelada diaria de sustrato lo que optimiza también espacio para el almacenamiento por el nivel alto de concentración de esporas que se logra. Entre las desventajas de equipos muy especializados en el mercado figuran el alto precio y la poca eficiencia en la separación de las esporas para algunos aislados y especies fúngicos. Habitualmente los conidios concentrados son secados con sílica gel hasta valores menores de un 5% humedad relativa. Para *Metarhizium* se ha logrado una sobrevivencia mayor del 90% al año sin refrigeración y hasta 3 años en frío a 5 grados C (Anexo 18).

4.2. Almacenamiento de los bioproductos

Actualmente no se han logrado productos para biocontrol formulados de forma estable por más de dos años sobre una base económica racional. Sin embargo, la opción tecnológica de concentrar y separar esporas desarrolladas sobre sustratos sólidos está siendo cada

vez usada. El empaque es esencial, de forma que se garantice una humedad relativa baja del producto y una temperatura menor de 20 grados C para por al menos tener un preparado viable por 3 -6 meses. Estos dos parámetros son los que más influyen en la viabilidad de los propágulos durante el almacenaje. La refrigeración de las esporas a 5 grados C y humedades relativas menores del 1% en el producto, tecnológicamente son posibles pero económicamente no, de ahí que se ajusten estos parámetros según el coste real para cada productor, de acuerdo a la sobrevivencia lograda, a niveles superiores.

La biodegradabilidad del producto también está muy influenciada por la humedad y la temperatura de forma que se debe ajustar un rango permisible de contaminantes que sea tolerable. Además, hay formulaciones que son dañinas en almacenaje a mediano plazo como es el caso de los aceites vegetales que dañan la pared de la espora y la vuelven no viable en pocas semanas.

Muchos productores reconocidos almacenan esporas y formulan de acuerdo a la demanda del mercado pero en las pequeñas granjas (fincas) el método más aconsejable es extraer con aceites vegetales las esporas y vender este formulado al productor agrícola o comercializar el preparado seco y empaquetado sin ningún otro proceso posterior listo para aplicar en solución acuosa con algún agente tensoactivo no agresivo (tween, agral, triton, detergente botánico, etc.).

4.3. Registro de bioplaguicidas microbianos

Los productos a base de microorganismos o metabolitos obtenidos para el biocontrol deben ser seguros, virulentos a las especies diana, libres de patógenos humanos y de calidad consistente y reproducible.

Los hongos usados en el biocontrol de plagas agrícolas afortunadamente pueden ser propagados masivamente sin la intervención directa de un hospedante vivo, lo que evita contaminaciones bacterianas adicionales, el mantener crías de insectos u otro hospedante sanitariamente adecuadas, laboratorio. Estos aspectos facilitan su registro.

No obstante, en el mundo existe una marcada diferencia entre países desarrollados y en desarrollo en cuanto a los requisitos para registrar un producto. De esta forma en muchos países en desarrollo la industria de productos biocontroladores de plagas no está

regulada o muy pocas exigencias existen al respecto lo que hace que salgan al mercado productos de pobre calidad. Esto se debe a que las pruebas de calidad incluyen mayores gastos de capital y de mano de obra calificada y al desconocimiento y/o ausencia parcial o completa de protocolos de calidad con amplia aceptación internacional. De hecho,, no se cuenta con normas internacionales de calidad aprobadas. Todo esto puede desacreditar el prestigio de los bioproductos por parte de los productores y endentece la adopción de los nuevos métodos de trabajo con bioplaguicidas.

En países donde se exige una rigurosa información del producto que se quiere registrar las autoridades reguladoras (en países desarrollados y en desarrollo que son muy exigentes a la hora de registrar un producto) demandan pruebas poco realistas por desconocimiento sobre estos productos, a los que muchas veces tratan de aplicarle los mismos requerimientos que a las moléculas sintéticas químicas. Otras veces exigen pruebas económicamente inaceptables.

En los últimos años han surgido grupos de trabajo fuertes donde se han asociado importante productores de biológicos, instituciones de investigación prestigiosas y organismos reguladores para lograr una mejor armonización y resolución más efectiva de estos problemas.

Hoy día se cuentan con instituciones líderes que tienen establecidos protocolos para control de calidad y toxicidad e impacto ambiental de estos bioproductos. Se trabaja arduamente para lograr establecer estas pruebas en los laboratorios que se dedican a estas producciones. Una vez que se logre un acuerdo general el siguiente paso será la implementación de sistemas de acreditación externos (tales como ISO 9000, Buenas prácticas de producción [BPP ó GMP]), los que corroborarán la calidad de los productos y su inocuidad en los países desarrollados. En los subdesarrollados, los protocolos y entrenamientos se pueden ofertar a través de organismos de cooperación internacional especializados como el IBCD (International Biopesticide Consortium for Development) o el IBMA (International Biocontrol Manufacturers Association).

Sin embargo, en los últimos 5 años la industria de bioplaguicidas se ha fortalecido con productos de más calidad conjuntamente con la prohibición en muchos países, especialmente desarrollados, de moléculas químicas plaguicidas y la certificación de sistemas orgánicos donde se contempla el uso de productos bioplaguicidas.

Por ejemplo, la EPA (Environmental Protection Agency of USA) obtiene la información de una Oficina adjunta (Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, United States Environmental Protection Agency) que se dedica a la evaluación de pruebas de plaguicidas y sustancias tóxicas, las que se envían a la EPA para su revisión bajo las regulaciones federales. En general se exigen estudios que identifiquen a nivel molecular el aislado, estudios toxicológicos (teratogénicos, toxicidad crónica, subcrónica y aguda) incluyendo genotoxicológicos o carcinogénicos en dependencia del producto. A continuación se listan requerimientos exigidos en los países líderes en biocontrol desarrollados y en algunos en desarrollo como Cuba.

Para el registro del producto se necesitan conocer los siguientes datos:

Nombre genérico (científico), tipo de plaguicida (insecticida, fungicida biológico, etc.), datos completos del grupo que lo produce, usos y formulaciones (plaga que controlará, tipos de cultivo, tipos de formulaciones (polvos humedecibles, concentrados líquidos), métodos de aplicación (preparado disuelto en agua con adyuvantes, equipos de aplicación, cantidad que se aplica, etc.), literatura científica que apoye seguridad de uso, estudios de patogenicidad en especies no diana, baterías de ensayos con animales de laboratorio que incluyan mamíferos por diferentes vías: oral, inhalación, tópica, intravenoso, etc). Algunos estudios se pueden evadir por el análisis de vías de exposición más probables a que se expone el productor del biocontrol o el usuario final producto además de un estudio médico riguroso de voluntarios expuestos a este. Determinar los pasos críticos del proceso productivo para evaluar posible contaminación microbiana y cuando esta ocurra asegurar que en ningún lote hay patógenos humanos ni a animales. Estudios ecotoxicológicos (seguros a peces, aves, reptiles, abejas, otras especies de plantas, etc.), algunos de los cuales no se aplican según el uso al que va dirigido el producto. Destino del producto en el ambiente (por ejemplo si contamina estuarios, ríos, etc). Características físicas y químicas (pH, densidad, color, olor). Además de las pruebas de calidad biológicas,

4.4. Elementos de bioseguridad en la producción de bioplaguicidas. Buenas Prácticas de producción y diseño de instalaciones

4.4.1. Conceptos

La bioseguridad es un conjunto de medidas científico-organizativas y técnico-ingenieriles destinadas a proteger al trabajador directamente, a la comunidad y al ambiente, de los riesgos que entraña el trabajo con estos agentes.

El desarrollo de la biotecnología a nivel mundial ha incrementado el número de personas que manipulan o están en contacto con agentes biológicos, de ahí que haya aumentado la preocupación por el riesgo al que pueden estar expuestos.

Al trabajo con microorganismos se asocian riesgos biológicos, físicos, químicos y psicofisiológicos.

El riesgo biológico es la probabilidad de que ocurra un daño sobre el personal del laboratorio, los animales o el ambiente asociado a la producción, uso y manipulación general de los agentes biológicos.

4.4.2. Grupos de riesgos y particularidades

La exposición al riesgo biológico puede ser directa o indirecta. No todos los trabajos con microorganismos tienen igual nivel de riesgo, ya que éste depende de la peligrosidad del agente para las personas y el ambiente. La clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo se realiza considerando varios criterios:

- 1.- Capacidad del microorganismo para producir daño.
- 2.- Modo de transmisión o diseminación.
- 3.- Gama de hospedantes del microorganismo.
- 4.- Disponibilidad de tratamiento eficaz.
- 5.- Disponibilidad de medidas eficaces para eliminar riesgo en la comunidad y el ambiente.
- 6.- Concentración y volumen que se trabaja.

Atendiendo a lo anterior se establecen cuatro grupos de riesgo para microorganismos potencialmente patógenos al hombre, a los animales y al ambiente. Los de biocontrol están agrupados en los grupos de riesgo más bajos que son el Grupo 1 y el grupo 2 de 4 grupos que existen en total.

Grupo 1.- Escaso riesgo, pocas probabilidades de ser patógenos al hombre y animales. Por ejemplo: microorganismos de la industria láctea, de vinos, para producción de antibióticos, así como los que se emplean en el control biológico de forma general.

Grupo 2.- Riesgo individual moderado y bajo para la comunidad. Pueden provocar enfermedades en el hombre y animales. Pocas probabilidades de afectar al personal del laboratorio y al medio ambiente. Cuando ocurre la exposición el laboratorio puede provocar infección grave, pero existen medidas para eliminarlo y la propagación a la comunidad es limitada.

En el trabajo con microorganismos deben realizarse análisis de riesgo

Los análisis de riesgo tienen dos etapas:

- 1.- Estimación del riesgo
- 2.- Manejo del riesgo.

1.- La estimación del riesgo interpreta y evalúa la información, e identifica el posible peligro y las consecuencias asociadas.

2.- El manejo del riesgo determina la política de mercado para decidir cómo eliminar el riesgo estimado.

Por otra parte, la percepción pública del riesgo y los beneficios de una tecnología influyen en la regulación, por lo que los alcances del riesgo y sus regulaciones se deciden frecuentemente considerando la percepción pública en relación con las bases científicas correspondientes. El análisis de riesgo, teniendo en cuenta solo los aspectos científicos, probablemente no son del todo acertados, de ahí que los criterios de la opinión pública pueden ser muy importantes.

Los riesgos principales de los bioplaguicidas son:

- 1.- Patogenicidad sobre organismos no diana (blanco).
- 2.- Toxicidad.
- 3.- Competitividad por espacio con otros microorganismos.
- 4.- Alergia.

Las pruebas de seguridad deben estar dirigidas a:

- Seguridad sobre vertebrados mediante pruebas toxicológicas de laboratorio.
- Efecto sobre invertebrados mediante bioensayos.

Para evitar el escape de los microorganismos se han desarrollado una serie de procedimientos, mecanismos y adecuaciones físicas que se conocen con el término de contención.

4.4.3. Contención

Todo lo que implique un control sobre la diseminación del agente biológico está relacionado con la contención. En general, hay dos tipos de contenciones:

Biológica: conjunto de procedimientos que alteran genéticamente al ciclo de vida de los organismos y sólo pueden producirse artificialmente en condiciones controladas.

Física: técnicas, procedimientos de laboratorio, operaciones, equipos de seguridad, diseño de instalaciones.

4.4.4. Buenas Prácticas de Producción

Las **Buenas Prácticas de Producción (BPP)** son una herramienta básica para la obtención de productos seguros que se centralizan en la higiene y forma de manipulación. Los elementos más importantes son el cumplimiento de las técnicas y prácticas adecuadas en instalaciones adecuadas.

1. Son útiles para el diseño y funcionamiento de las biofábricas que incluyen proceso productivo y productos finales.
2. Contribuyen al aseguramiento de una producción de bioproductos segura.
3. Son indispensables para la aplicación del Sistema HACCP (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) de un programa de Gestión de Calidad Total (TQM) o de un Sistema de Calidad como ISO 9000.
4. Se asocian con el Control a través de inspecciones del establecimiento.

Para aplicar las BPP se necesita tener en cuenta:

1. Materias Primas

La calidad de las Materias Primas no debe comprometer el desarrollo de las Buenas Prácticas.

Hay que tener en cuenta medidas para evitar contaminaciones química, física y/o microbiológica.

2. Establecimientos

Hay que tener en cuenta dos ejes:

a. Estructura

b. Higiene

La biofábrica tiene que estar **ubicada** en zonas seguras, no inundaciones, humo, polvo, gases, luz y radiación que pueden afectar la calidad del producto que se elabora.

En las instalaciones, las **estructuras** deben ser sólidas y sanitariamente adecuadas. Las **aberturas** deben impedir la entrada de animales domésticos, insectos, roedores, moscas y contaminantes del medio ambiente como humo, polvo, vapor. Asimismo, deben existir **separaciones (barreras de contención)** para impedir la contaminación cruzada. Existirán habitaciones para la inoculación, incubación, secado, empaçado, almacenaje y esterilización y descontaminación. El **espacio** debe ser amplio y los empleados deben tener presente qué operación se realiza en cada habitación, para impedir la contaminación cruzada. Además, debe tener un **diseño** que permita realizar eficazmente las operaciones de limpieza y desinfección.

El **agua** utilizada debe ser potable, ser provista a presión adecuada y a la temperatura necesaria. Asimismo, tiene que existir un desagüe adecuado.

Los **equipos** y los **utensilios** para la manipulación de alimentos deben ser de un material que no transmita sustancias tóxicas, olores ni sabores. Las **superficies** de trabajo no deben tener hoyos, ni grietas. Se recomienda evitar el uso de maderas y de productos que puedan corroerse.

La pauta principal consiste en garantizar que las **operaciones** se realicen higiénicamente desde la llegada de la materia prima hasta obtener el producto terminado.

. Higiene fuera y dentro de la producción

Todos los utensilios, los equipos y la instalación debe mantenerse en buen estado higiénico, de conservación y de funcionamiento.

Durante la producción de un biopreparado hay que tener en cuenta varios aspectos para garantizar su calidad:

Debe prevenirse la **contaminación cruzada** que consiste en evitar el contacto entre productos elaborados y en proceso de producción con materias primas o productos contaminados. Si se sospecha una contaminación debe aislarse el producto en cuestión y ejecutar procedimientos contemplados para tales casos en cada laboratorio.

El **agua** utilizada debe ser potable y debe haber un sistema independiente de distribución de agua recirculada.

La **producción** debe ser llevada a cabo por empleados capacitados y supervisados por personal técnico. En cada zona deben respetarse los requisitos de BPP establecidos. Por ejemplo, en la cosecha se deben usar caretas protectoras con filtros contra partículas 0.2 micrómetros.

Deben mantenerse **documentos** y **registros** de los procesos de elaboración, producción y distribución y conservarlo durante un período superior a la duración mínima del producto.

Para la limpieza y la desinfección es necesario utilizar productos reconocidos por su poder biocida o desinfectante. Para organizar estas tareas, es recomendable aplicar los **Procedimientos Operativos Estandarizados de desinfección y limpieza** que describen qué, cómo, cuándo y dónde limpiar y desinfectar, así como los registros y advertencias que deben llevarse a cabo.

Las **sustancias tóxicas** (solventes u otras sustancias que pueden representar un riesgo para la salud y una posible fuente de contaminación deben estar rotuladas con un etiquetado bien visible y ser almacenadas en áreas exclusivas. Estas sustancias deben ser manipuladas sólo por personas autorizadas.

3. Personal

Aunque todas las normas que se refieran al personal sean conocidas es importante remarcarlas debido a que son indispensables para lograr las BPM.

Se aconseja que todas las personas que produzcan biopreparados reciban **capacitación**. Esta es responsabilidad de la empresa y debe ser adecuada y continua.

Debe controlarse el **estado de salud** y la aparición de posibles **enfermedades contagiosas** entre los trabajadores. .

Por otra parte, ninguna persona que sufra una **herida** puede manipular agentes biológicos hasta su alta médica.

Es indispensable el **lavado de manos** de manera frecuente y minuciosa con un agente de limpieza autorizado, con agua potable y con cepillo. Debe realizarse antes de iniciar el trabajo, inmediatamente después de haber hecho uso de los retretes, después de haber manipulado material contaminado y todas las veces que las manos se vuelvan un factor contaminante. Debe haber indicadores que obliguen a lavarse las manos y un control que garantice el cumplimiento.

Todo el personal que esté de servicio en la zona de manipulación debe mantener la **higiene persona**, debe llevar ropa protectora, calzado adecuado y gorros. Todos deben ser lavables o desechables. No debe trabajarse con anillos, aretes, relojes y pulsos durante la manipulación de agentes biológicos (Anexo 19).

La higiene también involucra **conductas** que puedan dar lugar a la contaminación, tales como comer, fumar, aplicarse cosméticos u otras prácticas antihigiénicas. Asimismo, se recomienda usar ropa adecuada para la producción y cambiarse antes de la salida del centro.

4. Control de Procesos en la Producción

Para tener un resultado óptimo en las BPM son necesarios ciertos controles que aseguren el cumplimiento de los procedimientos y los criterios para lograr la calidad esperada en un alimento, garantizar la inocuidad y la calidad de los biopreparados. Estos fueron ya explicados en la conferencia anterior de controles de calidad.

Los **controles** sirven para detectar la presencia de contaminantes microbiológicos. Para verificar que los controles se lleven a cabo correctamente, deben realizarse análisis que monitoreen si los parámetros indicadores de los procesos y productos reflejan su real estado.

5. Documentación

La documentación es un aspecto básico, debido a que tiene el propósito de definir los procedimientos y los controles.

Además, permite un fácil y rápido rastreo de productos ante la investigación de productos defectuosos. El sistema de documentación deberá permitir diferenciar números de lotes, siguiendo la historia de los alimentos desde la utilización de insumos hasta el producto terminado, incluyendo el transporte y la distribución.

Un sistema adecuado de documentación que permita seguir los pasos de un bioproducto desde el inicio (materia prima) hasta el producto final garantiza la implementación de las BPP. **En esto consisten las BPP.**

4.4.5. Liberación microorganismos al medio ambiente.

Otro aspecto de la bioseguridad concierne a la liberación de microorganismos al ambiente, como es el caso de los usados para el control de plagas agrícolas.

Hay que establecer diferentes categorías:

- Microorganismos modificados genéticamente- riesgo más elevado
- Microorganismos autóctonos – menor riesgo
- Microorganismos exóticos- evaluación del riesgo, puede ser variable el nivel de riesgo.

Si comparamos los riesgos de los bioplaguicidas con el de muchos agroquímicos que actualmente se emplean en el control de plagas, los agentes microbiológicos disponen de una mayor seguridad, de ahí que puedan estimarse como alternativas más seguras. Se deben tomar a nivel de nación regulaciones para su uso, y siempre estos bioproductos deben ser analizados bajo un punto de vista diferente a los químicos, lo que facilitaría su uso para el control de plagas agrícolas.

5. LITERATURA CONSULTADA

1. Alves, S.B. and Pereira, R.M. (1989). Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. in Plastic Trays. *Ecossistema* 14:188-192.
2. APS Biological Control Committee. (2002) Commercial Biocontrol Products Available in the U.S.A. for Use against Plant Pathogens. On line: <http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/productlist2003USA.htm>.
3. Avis, T.J.; Hamelin, R.C. and Belanger, R.R. (2001) Approaches to Molecular Characterization of Fungal Biocontrol Agents: Some Case Studies. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 8-12.
4. Azevedo, J.L.; Maccheroni, W.; Pereira, J.O. and Araújo, W.L. (2000) Endophytic Microorganisms: A Review on Insect Control and Recent Advances on Tropical Plants. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 Vol.3 No.1.
5. Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. The American Phytopathological Society, 4th Edition, Minnesota, USA. 218 pp.
6. Bateman, R. (2003) Large-scale Spore Extraction Unit (Mycoharvester MK-III). <http://www.mycoharvester.info>.

7. Bateman, R.; Carey, M.; Batt, D.; Prior, C.; Abraham, Y.; Moore, D.; Jenkins, N. and Fenlon, J. (1996). Screening for Virulent Isolates of Entomopathogenic Fungi Against Desert Locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Bicontrol Science and Technology* 6: 549-560.
8. BINAB Bio-Innovation Products. AB-SWEDEN. (2003) On line: <http://www.agrobiologicals.com/company/C635.htm>.
9. BIOSCAPE, Inc. Products. (2003) Product Information. On line: <http://www.bioscape.com/asccustompages/products>.
10. Bocourt, Y.; López, M.O. (2006). Especies del Género *Trichoderma* en Cuba y sustratos más frecuentes. En: Memorias del Taller Latinoamericano "Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y otros Antagonistas", 28-31 Marzo 2006, INISAV, Ciudad de la Habana, Cuba. ISBN:959-7194-03-1.
11. Bridges, P.D. and Arora, D.K. (1998) PCR for Species Definition *In*: Application of PCR in Mycology. (Bridge, P.D.; Arora, D.K.; Reddy C.A. and Elander, R.P., Eds.) CAB International Wallingford, pp. 63-84.
12. Carmichael, J.W., W.B. Kendrick, I.L. Connors, and Sigler, L. (1980) Genera of Hyphomycetes. University of Alberta Press, Edmonton, AB., pp. 386.
13. Carr, A. (2001). Dos aislamientos de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith. Aspectos Morfofisiológicos y Patogénicos para su Utilización como Biocontrol. Tesis Presentada en Opción al Título Académico de Master en Sanidad Vegetal. Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez", 52 p.
14. De Riso, R.J. (1986) Sterilization Concepts and Methods of Sterilization Employed by the Hospital and Industry. *In* Sterilization of Medical Products. (Gaughran, E.R.L., Morrissey, R.F. and Wang, You-sen, Eds). Vol. IV, Polyscience Publications Inc., Montreal, Canada, pp. 16-31.
15. Dent, D. R. and Jeff Waage. (2000) Wanted: Investors in Biological Control. *Pesticides News* No.45, September, pp. 10-11.
16. Dent, D.R. (1999) Development and Use of a Biopesticide *In*: Proceedings of the EMPRES Regional Workshop on Biological Control of Desert Locust, 27-29 August 1999, Cairo, Egypt, Food and Agriculture Organisation, pp.29-34.
17. Douthwaite, B., Langewald, J. and Harris, J. (2001) Development and Commercialization of the Green Muscle Biopesticide. Edited by IITA and Meg-Comm Network. International Institute of Tropical Agriculture, 23p.
18. Elósegui, O; Nieves, C.; Díaz, R.; Padrón, N; Carr, A. (2003). Comportamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Cepa LBb-1 en Agar Sabouraud dextrosa producido en Cuba. *Fitosanidad*: Vol. 7 (2).

19. Elósegui, O., Carr, A. (2003). Hongos entomopatógenos y antagonistas. Principales grupos. Características. Aislamiento, identificación y caracterización de hongos entomopatógenos y antagonistas. Métodos de conservación. En: Memorias del Curso Internacional "Producción y uso de Bioplaguicidas en Diferentes Agroecosistemas, INISAV, La Habana, Nov. 2003.
20. Elósegui, O. (2004) Influencia de la calidad de la material prima y los parámetros de esterilización en la producción de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum*. Tesis presentada en Opción al Título Académico de Master en Microbiología. Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
21. Elósegui, O.; Jiménez, J. y Carr, A. (2005). Aislamiento, identificación y caracterización morfológica de cepas promisorias de hongos mitosporicos para el control de especies de insectos plaga. En: III Conferencia Internacional "Desarrollo Agropecuario y Sostenibilidad", 14-16 Junio 2005, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba. ISBN:959-250-207-2 .
22. Elósegui, O.; Fernández-Larrea, O.; Carr, A. (2005). Influencia de la carga microbiana contaminante inicial del sustrato en la calidad final de biopreparados de *Trichoderma harzianum* RIFAI y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Fitosanidad: Vol 9 (1).
23. Elósegui, O.; Fernández-Larrea, O.; Ponce, E.; Borges, G.; Jiménez, J.; Rovesti, L. (2006). Separación y concentración de conidios aéreos de *Trichoderma harzianum* cepa A-34 mediante dos equipos presentes en el mercado: Mycoharvester MH-1 (CABI, Reino Unido) y Tamiz Vibratorio (Cuccolini, Italia). En: Memorias del Taller Latinoamericano "Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y otros Antagonistas", 28-31 Marzo 2006, INISAV, Ciudad de la Habana, Cuba. ISBN:959-7194-03-1.
24. Fdez-Larrea O. (1995) Microorganismos Entomopatógenos y Antagonistas. Posibilidades de Producción. Boletín Técnico #1 INISAV. La Habana, Cuba, 15 p.
25. Fdez-Larrea, O. (1993). Norma de Especificaciones para el Control de la Calidad de *Trichoderma*. CEN. Normas Cubanas 1993.
26. Fdez-Larrea, O. (2003.) Los Microorganismos en el Control Biológico. Producción en CUBA En: Manejo Integrado de Plagas en la Producción Agraria Sostenible. Curso taller para Agricultores y Extensionsistas. Eds. Vazquez, L.L. y Paz, I. Ciudad Habana, 23-27 Junio 2003. p. 83-93.
27. Fdez-Larrea, Orietta. (2001a) Temas Interesantes Acerca del Control Microbiológico en Cuba. La Habana: INISAV, 138 p.

28. Fernández-Larrea, O. Microorganismos Antagonistas en el Control Fitosanitario. (2001b) Revista de Manejo Integrado de Plagas de Costa Rica, 62:96-100.
29. Fernández-Larrea, O. (2006). Registro de productos biológicos para el control de fitopatógenos y nemátodos. Un reto para su producción y uso. Situación en Cuba. En: Memorias del Taller Latinoamericano "Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y otros Antagonistas", 28-31 Marzo 2006, INISAV, Ciudad Habana, Cuba. ISBN: 959-7194-03-1.
30. Fernández-Larrea, O.; Elósegui, O. (2006). Alternativas de producción de *Trichoderma* en Cuba. En: Memorias del Taller Latinoamericano "Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y otros Antagonistas", 28-31 Marzo 2006, INISAV, Ciudad de la Habana, Cuba. ISBN:959-7194-03-1.
31. Feng, M.G; Poprawski, T.J. and Khachatourians, G.G. (1994). Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. Review Article. Biocontrol Science and Technology, 4:3-34.
32. Foster, J.W. (2001) On The Goals of the New Biopesticide Industry Alliance. Branch-Smith Publishing. On line: <http://www.greenbeam.com/features/>
33. Fravel, D.R.; Rhodes, D.J. and Larkin, R.P. (1999) Production and Commercialization of Biocontrol Agents. In: Integrated Pest and Disease Management in Green House Crops. Y. Elad. Kluwer Academia Publishers. Dordrecht. pp. 365-376.
34. Gelernter, W. D. and Lomer, C.J. (2000) Measures of success in biological control of insects by pathogens. In "Measures of Success in Biological Control", ed. G. Gurr and S. Wratten, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.97-103.
35. Goral, V.M. (1979). Effect of Cultivation Conditions on the Entomopathogenic Properties of Muscardine Fungi. pp. 217-228. In: Ignoffo, C.M. (Ed.), Proceedings of the First Joint US/USSR Conference on the Production, Selection and Standardization of Entomopathogenic Fungi of the US/USSR Joint Working Group on the Production of Substances by Microbial means. National Science Foundation, Washington, D.C.
36. Guerra, P. T.; Galán, L.J.; Medrano, H.; García, C.; Rodríguez, C. ;Gómez, R.A. y Támez, R.S. (2001) Bioinsecticidas: su Empleo, Producción y Comercialización en México. Ciencia UANL Vol. IV (2).
37. Guillon, M. (1997). Production of Biopesticides: Scale up and Quality Assurance. In: BCPC Symposium Proceedings No.68. Microbial Insecticides: Novelty or Necessity? Farham, UK; The British Crop Protection Council, pp.151-162.

38. Hall, R.; Colectivo de Investigadores LPSV Villa Clara y Subdirección Protección Vegetal CNSV. (2000). Metodología para la Reproducción de Hongos Entomopatógenos con Calidad Alta y Estable de Forma Artesanal. CNSV, La Habana, Cuba.
39. Hallsworth, J.E. and Magan, N. (1994) Effects of Carbohydrate Type and Concentration of Polyhydroxy Alcohol and Trehalose contents in Conidia of Three Entomopathogenic Fungi. *Microbiology* 140: 2705-2713.
40. Harman, G.E.; Jin, X.; Stasz, T.E.; Peruzzotti, G.; Leopold, A.C. and Taylor, A.G. (1991) Protection of Conidial Biomass of *Trichoderma harzianum* for Biological Control. *Biological Control* 1:23-28.
41. Harris, J.G. (1997) Microbial Insecticides—an Industry Perspective. *In: Microbial Insecticides: Novelty or Necessity. BCPC Symposium Proceedings*, 68, 41–50.
42. Hong, T.D.; Jenkins, N.E. and Ellis, R.H. (2000) Effect of Duration of Development and Drying Regime on the Longevity of Conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycological Research* 104, 662-665.
43. Hong, T.D.; Jenkins, N.E.; Ellis, R.H. and Moore, D. (1998) Limits to the Negative Logarithmic Relationship between Moisture Content and Longevity in Conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Annals of Botany* 81, 625-630.
44. Hong, T.D.; Jenkins, N.E. and Ellis, R.H. (1999) Fluctuating Temperature and the Longevity of Conidia of *Metarhizium flavoviride* in Storage. *Biocontrol Science and Technology* 9: 165-176.
45. Humphreys, A.M.; Matewale, P. and Trinci, A.P.J. (1989). Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed- batch culture. *Mycol. Res.* 92: 257-264.
46. IBCD. (1999) International Biopesticide Consortium for Development. BIOPESTICIDES. On line: <http://www.biopesticide.org>.
47. Jackson, A.M.; Whipps, J.M.; Lynch, J.M. and Bazin, M.J. (1991). Effects of Some Carbon and Nitrogen Sources on Spore Germination, Production of Biomass and Antifungal Metabolites by Species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* Antagonistic to *Sclerotium cepivorum*. *Biocontrol Science and Technology* 1: 43-51.
48. Jakubikova, L.; Nemcovic, M.; Subikova, V. (2006) Drimal, J.; Farkas, V. Selection of natural Isolates of *Trichoderma spp.* and submerged production of spores in a stirred-tank fermentors. *En: Memorias del Taller Latinoamericano “Biocontrol de Fitopatógenos con Trichoderma y otros Antagonistas”, 28-31 Marzo 2006, INISAV, Ciudad de la Habana, Cuba. ISBN:959-7194-03-1.*

49. Jenkins, N. (1996). Mass Production of Fungal Pathogens for Insect Control. LUBILOSA Technical Bulletin. Eds. Lomer, C. and Lomer C., Number 7, March. 26 pp.
50. Jenkins, N.E. and Goettel, M.S. 1997). Methods for Mass Production of Microbial Control Agents of Grasshoppers and Locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada, 171: 37-48.
51. Jenkins, N.E. and Grzywacz, D. (2003) Towards The Standardization of Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents. Chapter 18. *In*: Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures (ed. J.C. van Lenteren), CAB International.
52. Jenkins, N.E. and Prior, C. (1993) Growth and Formation of True Conidia by *Metarhizium flavoviride* in a Simple Liquid Medium. Mycol. Res., 97 (12):1489-1494.
53. Jenkins, N.E.; Heviefo, G; Langewald, J.; Cherry, A.J. and Lomer, C.J. 1998. Development of Mass Production Technology for Aerial Conidia for Use as Mycopesticides. Biocontrol News and Information 19(1): 21N-31N.
54. Jiménez, J. (2001). Buenas Prácticas de Producción para los Bioplaguicidas. Pp. 63-87. *En* Memorias 1er Taller de Tecnologías de Producción y Calidad de los Medios Biológicos de los CREE. San Antonio de los Baños, La Habana.
55. Jones, K.A. and Burges, H.D. (1998) Technology of Formulation and Application. *In*: Formulation of Microbial Biopesticides (Burges, H.D., Ed.). Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 7-30.
56. Kemira Agro Oy Biotechnical Division. (2002) Products Produced by *Kemira Agro Oy* in Section: [Fungal and Disease Control](#) , FINLAND.
57. Kern, M. and Vaagt, G. (1996). Pesticide Quality in Developing Countries. Pesticide Outlook, October, 7-10.
58. Lane, B.S.; Trinci, A.P. and Gillespie, A.T. (1991). Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon and nitrogen limited batch cultures. Mycol. Res. 95: 821-828.
59. Lecuona, R. (1996) Microorganismos Patógenos Empleados en el Control de Insectos Plaga (R. Lecuona, Ed.). Talleres Gráficos Mariano Mas. Buenos Aires, Argentina, 338 p.
60. Lisansky, S. (1997) Microbial Biopesticides. *In*: Microbial Insecticides. Novelty or Necessity? British Crop Protection Council Proceeding Monograph Series No. 68, pp. 3-10.
61. López, M.O.; Sandoval, I. (2006). Selección de cepas antagónicas del género *Trichoderma* PERSOON. *En*: Memorias del Taller Latinoamericano "Biocontrol de

- Fitopatógenos con *Trichoderma* y otros Antagonistas”, 28-31 Marzo 2006, INISAV, Ciudad de la Habana, Cuba. ISBN:959-7194-03-1.
62. López, Miriam. (1995) *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson: Caracterización, Reproducción y Obtención de un Biopreparado con Efecto Nematicida. Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. INISAV, Ciudad Habana, 80 p.
63. Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma*, phytopathogenic fungi and plants: Opportunities for developing novel disease control methods. En: Memorias del Taller Latinoamericano “Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y otros Antagonistas”, 28-31 Marzo 2006, INISAV, Ciudad de la Habana, Cuba. ISBN: 959-7194-03-1.
64. Lorito, M.; Peterbauer, C.H. and Harman, G.E. (1993) Synergistic Antifungal Activity of Cell Wall Degrading Enzymes Produced by Biocontrol Fungi of Genera *Trichoderma* and *Gliocladium*” In Abstracts 6 th International Congress of Plant Pathology, July 28-August 5, Palais de Montreal, Canada, p.265.
65. Luján, M. (1988). Importancia del hongo *Metarhizium anisopliae* como insecticida microbiológico en el control de plagas nocivas. Boletín de reseñas. Protección de plantas, 27-28: 5-26.
66. Mc Clatchie, G.V.; Moore, D.; Bateman, R.P. and Prior, C. (1994) Effects of Temperature on the Viability of Conidia of *Metarhizium flavoviride* in Oil Formulations. Mycological Research 98: 749-756.
67. McClintock, J.T. (1999). The Federal Registration Process and Requirements for The United States. In: Hall, F.R. and Menn, J.J. (Eds) Methods in Biotechnology, Vol 5, Biopesticides: Use and Delivery. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 453-471.
68. McSpadden, G.B. and Fravel, D.R. (2002) Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization and Application in The USA. On line. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.http: www.planthealthprogress.org.
69. Melo, I.S. and Azevedo, J.L.(1998) Controle biológico I. Editora EMBRAPA, Jaguariuna, São Paulo, Brazil. 262 p.
70. Moore, D. and Caudwell, R.W. (1997) Formulations of Entomopathogens for the Control of Grasshoppers and Locusts. pp.49-67 In: Goettel, M.S. and D.L. Johnson (Eds.), Microbial Control of Grasshoppers and Locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada, 171, 400 p.

71. Moore, D. and Higgins, P.M. (1997). Viability of Stored Conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal, Produced under Differing Culture Regimes and Stored with Clays. *Biocontrol Science and Technology* 7: 335-343.
72. NC 72-02. (1993) Norma Cubana para Biopreparados de Entomopatógenos. Métodos de ensayo. Biotecnología Agrícola. Cuba.
73. NC 72-03. (1993). Norma Cubana Biopreparado del Entomopatógeno *Verticillium lecanii*. Especificaciones. Biotecnología Agrícola. Cuba.
74. NC 72-04. (1993.) Norma Cubana Biopreparado del Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Especificaciones. Biotecnología Agrícola. Cuba
75. NC 72-05. (1993). Norma Cubana Biopreparado del Entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Especificaciones. Biotecnología Agrícola. Cuba.
76. Neal, M. and Newton, P. (1999). Registration/ Regulatory Requirements in Europe. *In*: Hall, F.R. and Menn, J.J. (Eds) *Methods in Biotechnology*, Vol. 5, *Biopesticides: Use and Delivery*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 453-471.
77. Perez, C.J. and Shelton, A.M. (1997) Resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America, *Journal of Economic Entomology*, 90, 87-93.
78. Pflug, I.J. Wet Heat Sterilization, Including Both the Design of the Process and Equipment Used to Sterilize Product. (1986) *In*: *Sterilization of Medical Products*. (Gaughran, E.R.L.; Morrissey, R.F. and Wang, You-sen, Eds). Vol. IV, Polyscience Publications Inc., Montreal, Canada, pp. 40-65.
79. PharmacomTM Transgenic Effect Detection Microsystems (2005). <http://www.pharmacom.us>
80. Prospecto para Bioindicadores. (2002) EPB Carlos J. Finlay, IMEFA, La Habana.
81. REG2002-01. (2002) Regulatory Note- Pest RootShield Biological Fungicide *Trichoderma harzianum* Rifai strain KRL-AG2. Pest Management Regulatory Agency Health Canada, Ottawa, Canada, 25p.
82. Sánchez, Miriam. (1997) Estudio Socio-económico para la Introducción de Nuevas Formas de Organización del Trabajo en los Centros Productores de Bioplaguicidas. INISAV, MINAG, 25 p.
83. Sandoval, I. y López, M.O. (2001) Hiperparasitismo de *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *T. pseudokoningii* sobre Diferentes Hongos Fitopatógenos. *Fitosanidad* 5(1): 41-44.
84. Stefanova, M. (2003) Manejo de las Enfermedades Fúngicas del Suelo en la Producción Agraria Sostenible, pp. 141-150. *En* *Memorias del Curso-Taller para*

Agricultores y Extensionistas: Manejo Integrado de Plagas en la Producción Agraria Sostenible. L. L Vázquez e I. Paz (Eds.) La Habana, INISAV.

85. Stefanova, M.; Sandoval, I. y Fernández-Larrea, O. (1993) Empleo de Biopreparados de *Trichoderma* en el Control de Hongos Fitopatógenos de Suelo en Tabaco, Pimiento y Tomate de Hidropónico. *En: I Encuentro Nacional de Bioplaguicidas, VIII Forum Nacional de Ciencia y Técnica, Palacio de Convenciones, La Habana, Dic. 16-18.*
86. Stephens, D. (1997). Fungus Factory- Mycotech Produces Biopesticides to Control Whitefly, Thrips, and Aphids. *Farm Chemicals*, September, 30, Washington, D.C.
87. Sterikon Plus Bioindicator. (2002) KGaA, Darmstadt, Germany. <http://www.merck.de/english/services/chemdat/catalogs.Merck>
88. Tatchell, G.M. (1997) Microbial Insecticides and IPM: Current and Future Opportunities for the Use of Biopesticides. *In: Microbial Insecticides: Novelty or Necessity? BCPC Symposium Proceedings 68*, 191–200.
89. Tong-Kwee, I. and Boonkeng, T. (1990) Antagonism in vitro of *Trichoderma* Species against Several Basidiomycetes Soil Borne Pathogens and *Sclerotium rolfsii*. *Z. Pflanzenkr, Planzenschutz*, 97 (1): 34-41.
90. Webster, J. (1980) *Introduction to Fungi*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.410.
91. Zare, R. & Gams, W. (2004). A monograph of *Verticillium* Section *Prostrata*. *Botanical Journal of Iran Rostanika*, No.3. ISSN: 1608-4306.

6. ANEXOS

ANEXO 1

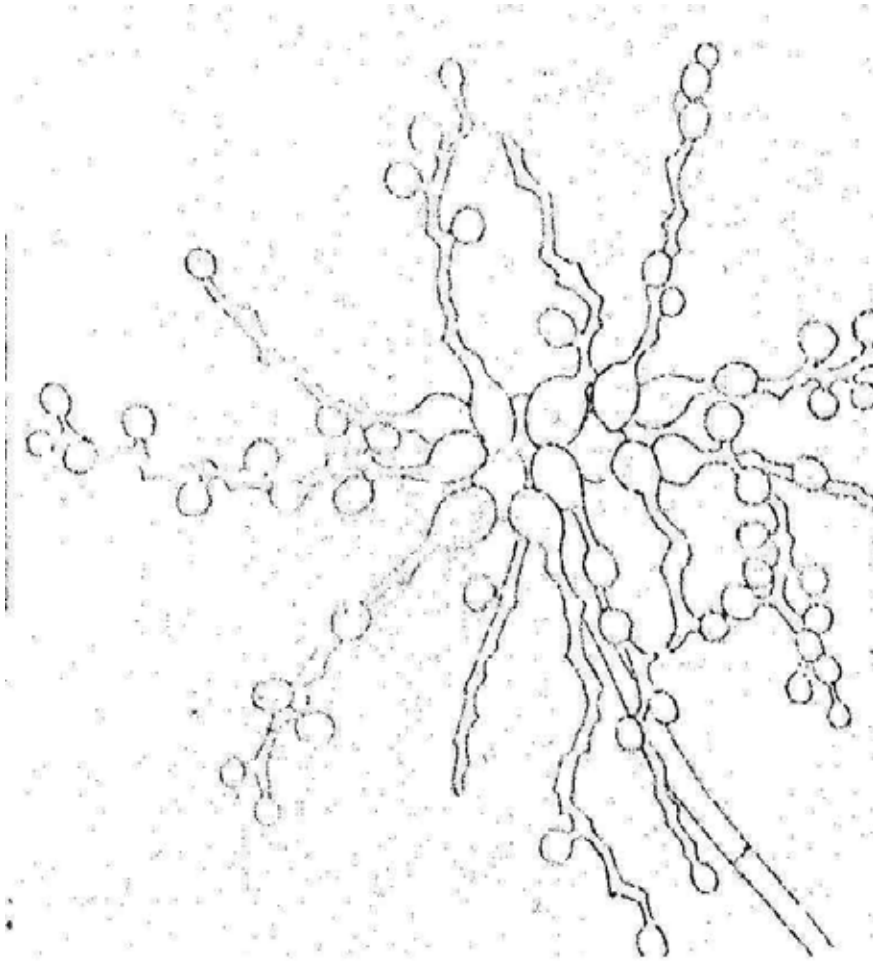


Fig.1. Características microculturales de *Beauveria bassiana*.

Tomado de: CMI, 1979.

ANEXO 2

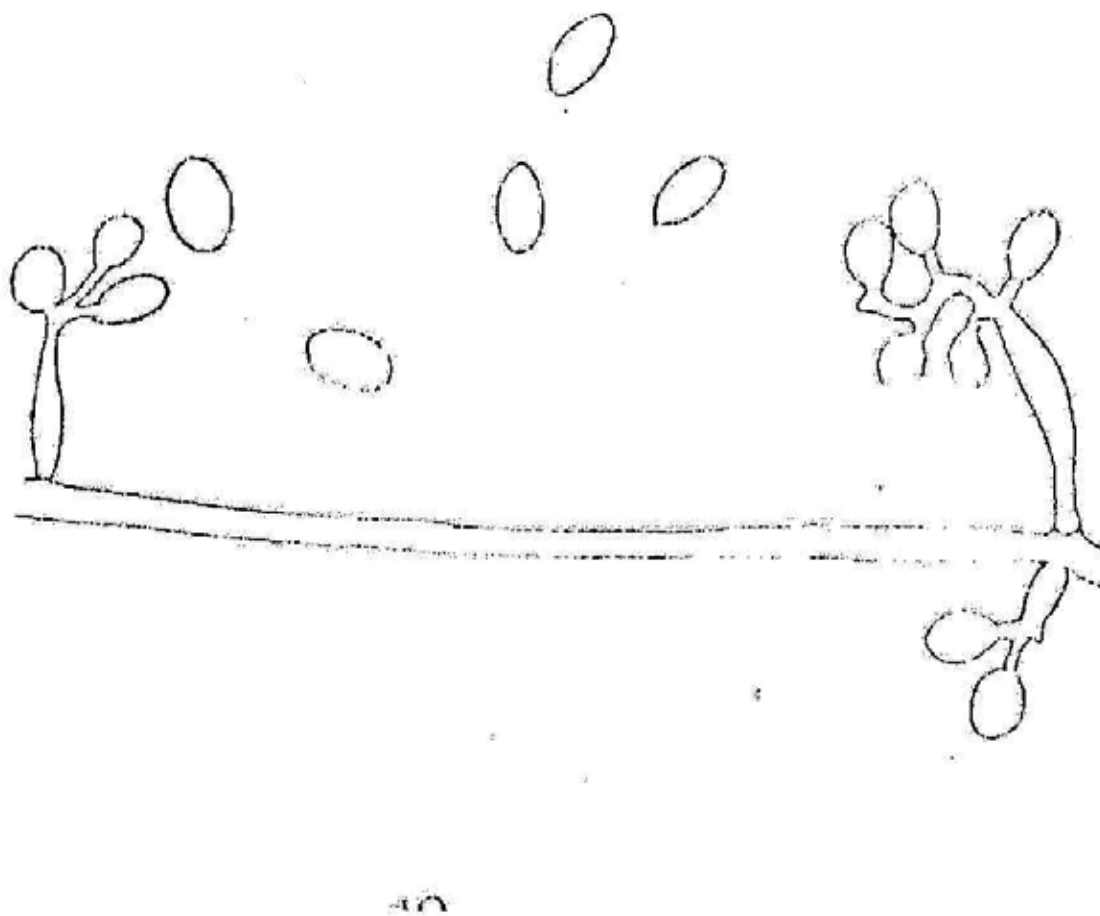


Fig. 2. Características microculturales de *Beauveria brongniartii*.

Tomado de: CMI, 1979.

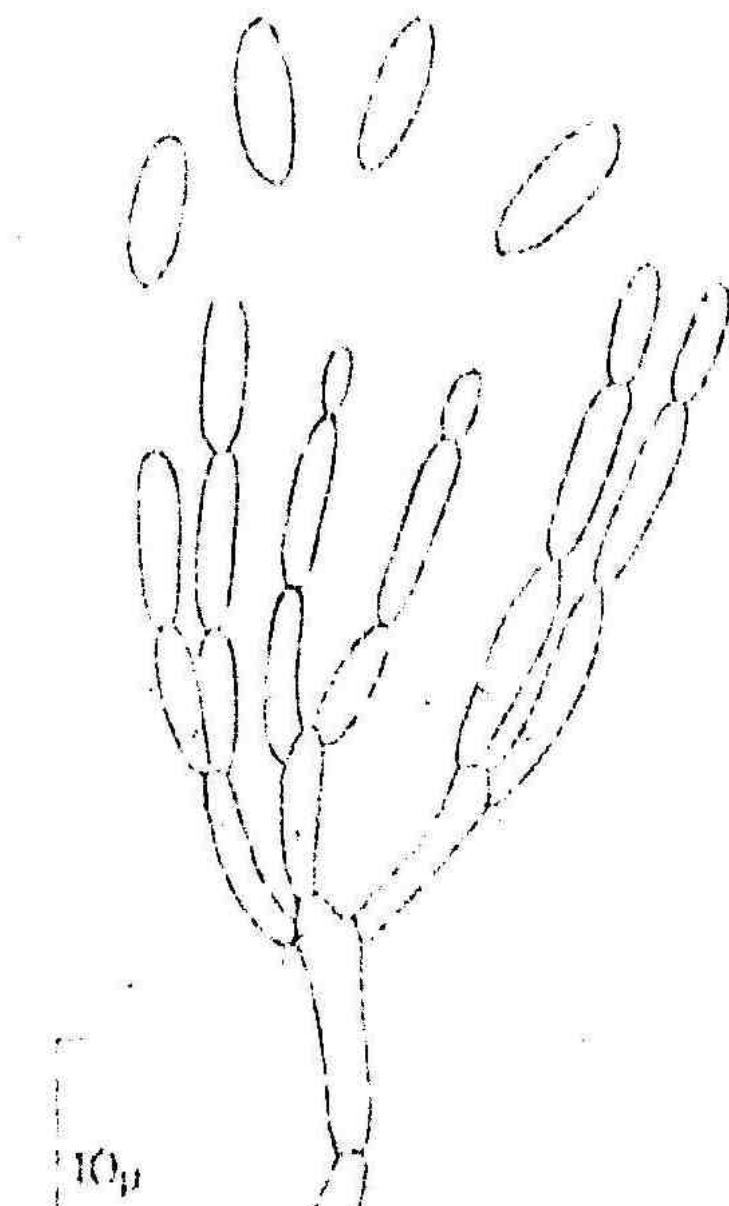


Fig.3. Características microculturales de *Metarhizium anisopliae*.

Tomado de: CMI, 1979.

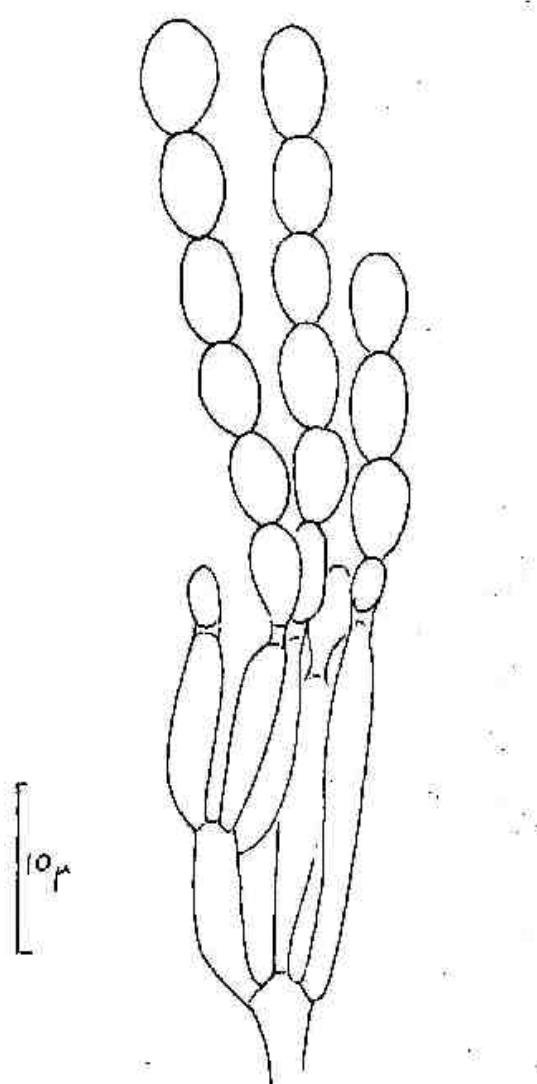


Fig.4. Características microculturales de *Metarhizium flavoviride*.

Tomado de: CMI, 1979.

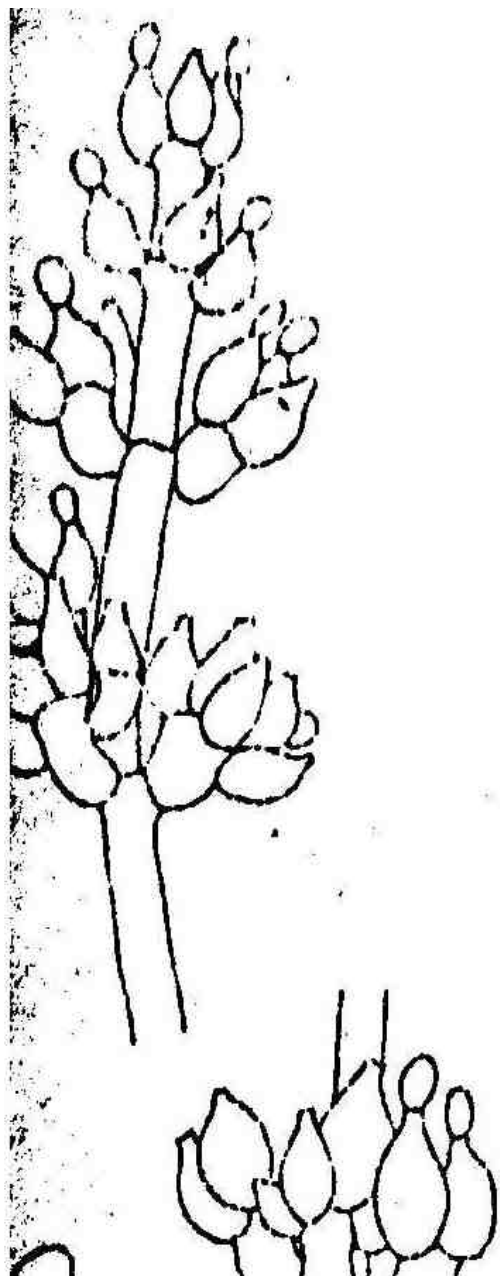


Fig. 5. Características microculturales de *Nomuraea rileyi*.

Tomado de: CMI, 1979.

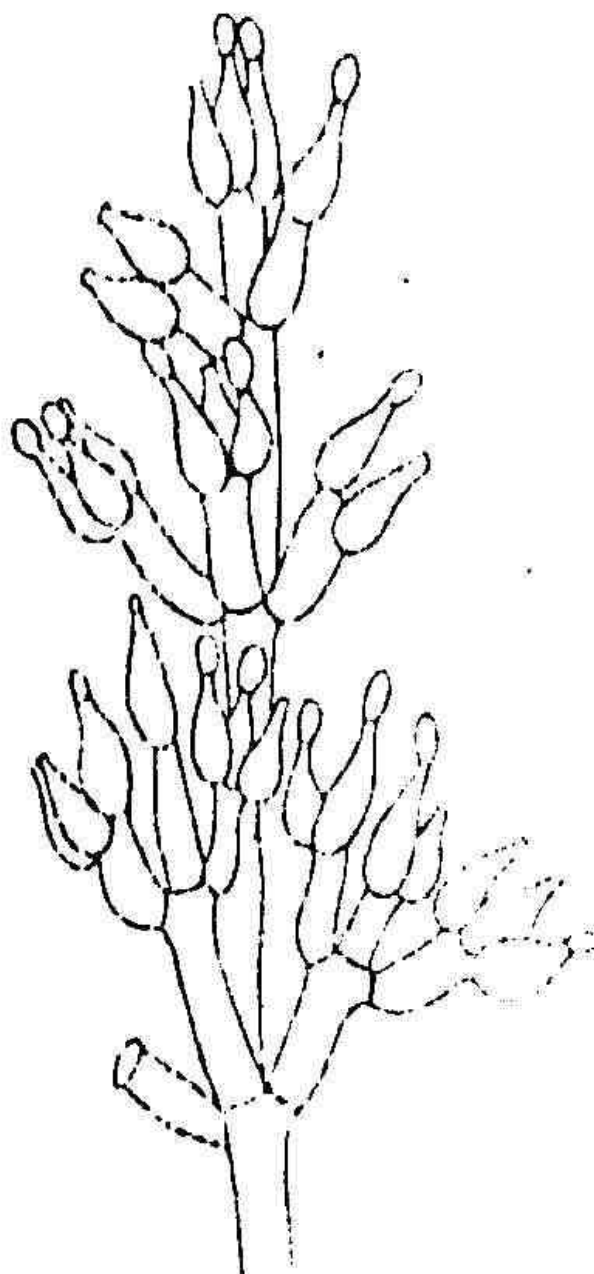


Fig. 6. Características microculturales de *Paecilomyces fumosoroseus* .

Tomado de: CMI, 1979.

ANEXO 7

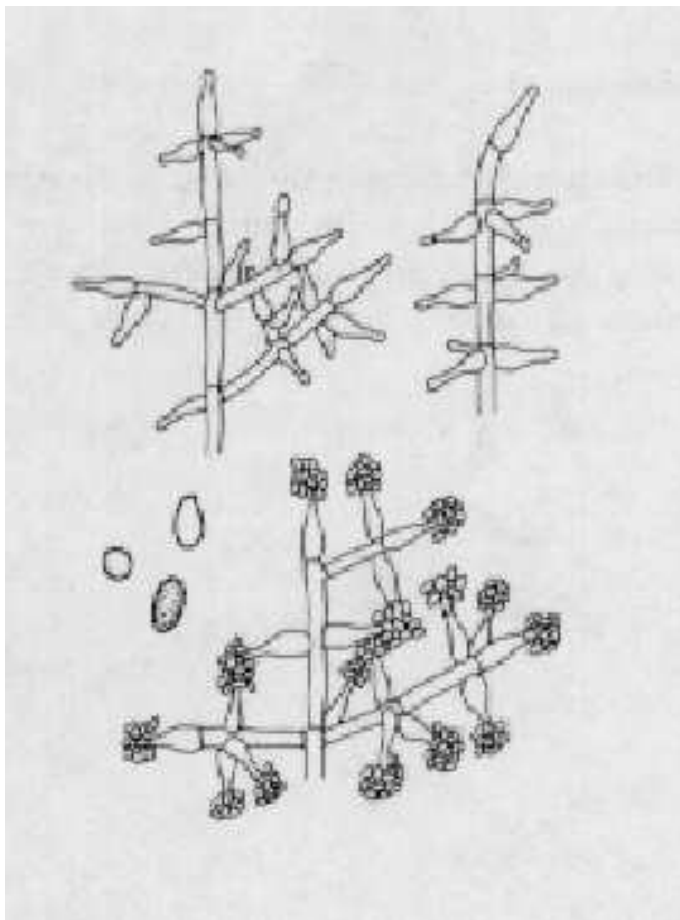


Fig. 7. Características microculturales de *Trichoderma*.

Tomado de: Can. J. Bot. Vol. 69, 1991.

ANEXO 8

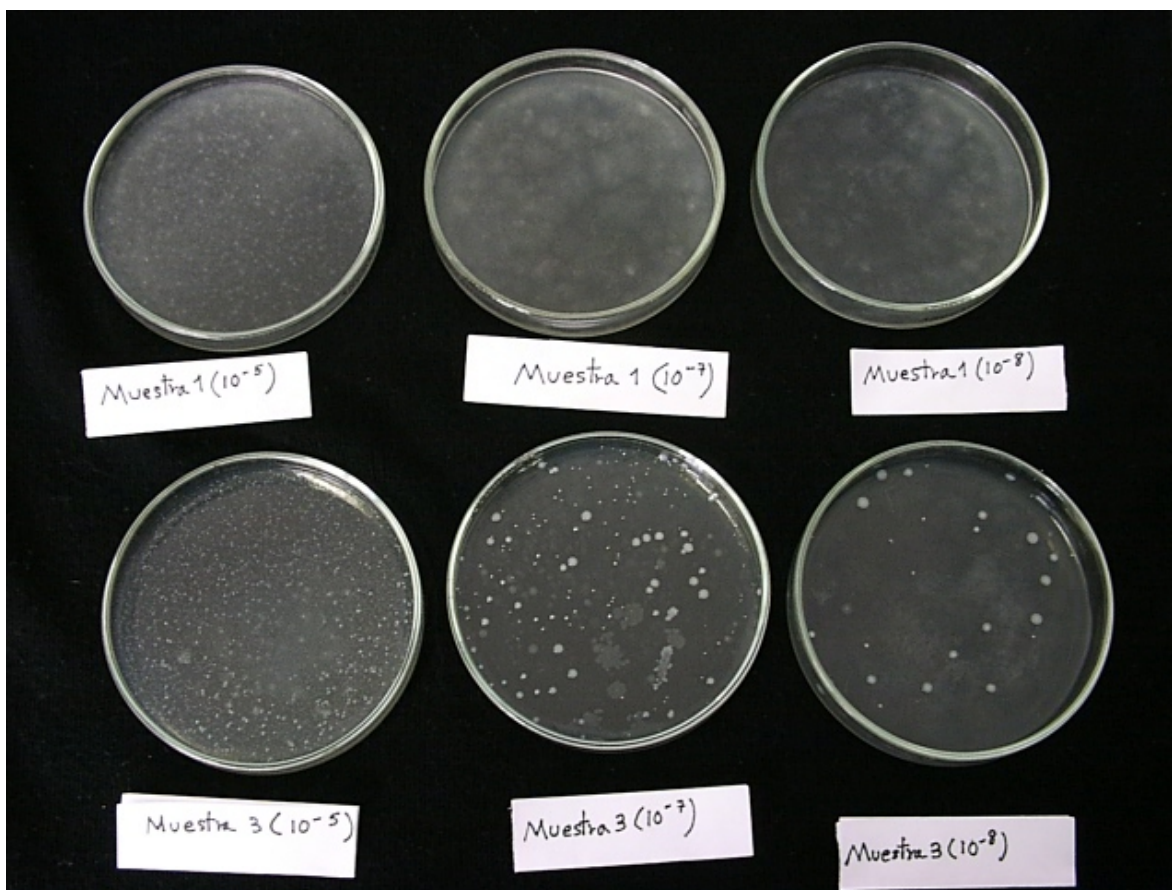


Fig. 8. Placas Petri con unidades formadoras de colonia fúngicas de *Trichoderma* y contaminantes bacterianos a partir de muestra de suelo para el aislamiento de antagonistas.

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.

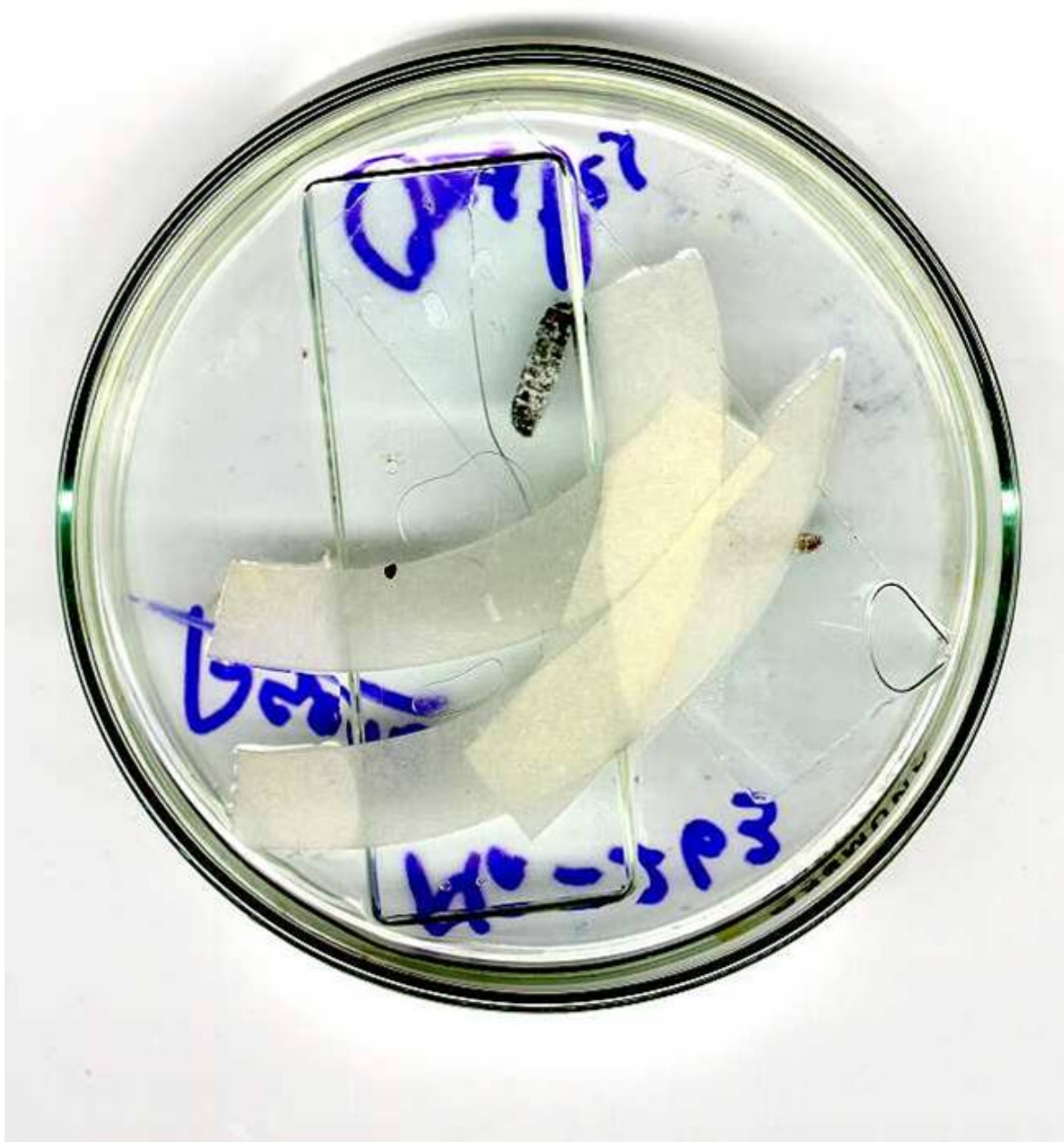


Fig. 9. Larva de *Galleria mellonella* infectada por *Metarhizium* sp. a partir de una muestra de suelo de una plantación de cítrico. Nótese la melanización intensa y el micelio emergiendo en blanco.

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.

ANEXO 10



Fig. 10. Fermentador de 100 L para el desarrollo de inóculo de *Trichoderma harzianum* para sustrato sólido (sistema bifásico) en Cuba o para producción líquida de conidios y blastosporas. Nótese a la derecha en azul la pizarra controladora del proceso.

Tomado de: Planta Piloto de Fermentaciones, INISAV, Cuba.



Fig. 11. Cultivos pre-inóculos sólidos sobre PDA de *Trichoderma harzianum* en frascos Roux.

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.



Fig. 12. Preparación de inóculos de *Metarhizium anisopliae* a partir de cultivos cepas en cuñas de agar para desarrollar preinóculos líquidos por cultivos agitados durante el escalado (Sistema de producción bifásico).

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.



Fig. 13. Cultivo líquido estático.

Tomado de: INISAV, Cuba.



Fig. 14. Prueba de viabilidad (germinación) en conidios de *Trichoderma viride*. Aumento 1000X.

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.

ANEXO 15



Fig.15. Producción de *Trichoderma* sólida en bandejas en fase de secado.

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.



Fig. 16. Secado en bandeja de *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* sp.).

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.



Fig. 17. Esporas concentradas de *Trichoderma harzianum*.

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.



Fig. 17. Equipo cosechador de esporas Mycoharvester (MH-1) separando esporas de *Beauveria bassiana* desarrollada sobre arroz.

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.



Fig. 19. Medidas de bioseguridad al manipular agente fúngicos para el biocontrol. Nótese el uso de guantes y máscara con filtro bacteriológico para evitar el contacto directo del material e inhalación de esporas respectivamente.

Tomado de: Laboratorio Hongos Entomopatógenos y Antagonistas, INISAV, Cuba.