

**Subsecretaría de Educación Superior
Dirección General de Educación Superior Tecnológica
Instituto Tecnológico de la Zona Maya**

**“PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DEL HONGO *Beauveria
bassiana* EN EL LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO
DEL ITZM”.**

**Informe Técnico de Residencia Profesional que presenta la C.
CABALLERO COUOH WENDY DE JESÚS.**

N° de Control.

07870030

Carrera: Ingeniería Forestal.

Asesora Interna: Lic. Laura Isabel Sansores Lara.

Ejido Juan Sarabia, Quintana Roo

Diciembre 2014



ITZM

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE LA ZONA MAYA

El Comité de revisión para Residencia Profesional de la estudiante de la carrera de INGENIERÍA FORESTAL, **Wendy de Jesús Caballero Couoh**; aprobado por la Academia del Instituto Tecnológico de la Zona Maya integrado por; el asesor interno Lic. Laura Isabel Sansores Lara, el asesor externo el Lic. Saúl Cruz Mora, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo titulado **"PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DEL HONGO *Beauveria bassiana* EN EL LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO DEL ITZM"** que presenta como requisito parcial para acreditar la asignatura de Residencia Profesional de acuerdo al Lineamiento vigente para este plan de estudios, dan fe de la acreditación satisfactoria del mismo y firman de conformidad.

ATENTAMENTE

Asesor Interno



Lic. Laura Isabel Sansores Lara.

Asesor Externo



Lic. Saúl Cruz Mora.

Ejido Juan Sarabia, Quintana Roo.

Diciembre 2014.

“PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DEL HONGO *Beauveria bassiana* EN EL LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO DEL ITZM”.

RESUMEN

La investigación del presente trabajo de Residencia Profesional se realizó en el laboratorio del control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, el cual consistió en el proceso de producción de un insecticida biológico *Beauveria bassiana* realizando las etapas de siembra de matrices a partir de una cepa líquida, esta técnica fue de siembra directa, en un tubo de ensayo con medio sólido (agar), con la finalidad de obtener cepas libres de contaminantes; posteriormente se realizó la inoculación (siembra) en arroz para obtener el agente biológico para el control de la *Hypsiophyla grandella*.

La colecta de muestras de *Hypsiophyla grandella* se realizó en una plantación del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias estación San Felipe Bacalar, Quintana Roo; la cual consistió en realizar una revisión a los árboles de Cedro (*Cedrella odorata*) que mostraban síntomas de ataque de *Hypsiophyla grandella*, asimismo realizando la colecta de las larvas de los mismos para ser llevadas al laboratorio y aplicarles el hongo *Beauveria bassiana* y comprobar la efectividad del agente biológico producido.

La inoculación del hongo *Beauveria bassiana* realizado a las larvas previamente lavados, desinfectados y conservados en un área con clima controlado a 22° C se logró que se micozaran, lo que quiere decir que en esta etapa de laboratorio si es efectivo el hongo *Beauveria bassiana* para el control de la *Hypsiophyla grandella*. Quedando pendiente para una etapa posterior la aplicación en campo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
CONTENIDO.....	ii
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	iii
1. OBJETIVOS.....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	1
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	2
2.1 JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA.....	2
2.2 JUSTIFICACIÓN SOCIAL	2
2.3 JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. ANTECEDENTES.	5
5. METODOLOGÍA.....	11
5.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	12
5.1.1 PREPARACIÓN DE MATRICES.....	13
5.1.2 SIEMBRA DE MATRICES.....	14
5.2 PREPARACIÓN DE MATERIAL Y EQUIPO DE LABORATORIO PARA SEMBRAR HONGO <i>Beauveria bassiana</i> EN ARROZ.....	15
5.2.1 PREPARADO E INOCULACIÓN DE ARROZ.....	15
5.3 CRECIMIENTO DEL HONGO <i>Beauveria bassiana</i>	19

5.4 COSECHA DEL HONGO <i>Beauveria bassiana</i>	19
5.5 COLECTA DE LARVAS DE <i>Hypsyphyla grandella</i>	20
5.6 PREPARACIÓN DE MATERIAL PARA INOCULACIÓN DEL HONGO <i>Beauveria bassiana</i> EN LARVAS DE <i>Hypsyphyla grandella</i>	22
5.6.1 LAVADO DEL AGENTE PATÓGENO EN EL LABORATORIO.....	23
5.6.2 INOCULACIÓN DEL HONGO <i>Beauveria bassiana</i> EN LARVAS DE <i>Hypsyphyla grandella</i>	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
7. CONCLUSIÓN.....	28
8. RECOMENDACIONES.....	28
9. GLOSARIO.....	29
10. BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Concepto	Página
Figura No. 1.-	Vestimenta adecuada para ingresar al Laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya.	13
Figura No. 2.-	Autoclave cilíndrica utilizada en el proyecto.	14
Figura No. 3.-	Matrices de <i>Beauveria bassiana</i> obtenidas en el laboratorio de control biológico del ITZM.	15
Figura No. 4.-	Acomodado de las bolsas de arroz para esterilizar.	17
Figura No. 5.-	Arroz esterilizado y colocado para su enfriado a temperatura ambiente.	17
Figura No. 6.-	Material utilizado en la inoculación del arroz.	18
Figura No. 7.-	Pistola de inyección utilizada en la inoculación y bolsas de arroz por inocular.	18
Figura No.8.-	Bolsas de arroz inoculadas en la sala de crecimiento.	19
Figura No. 9.-	Cosecha del hongo <i>Beauveria bassiana</i> en el laboratorio de control biológico del ITZM.	20
Figura No. 10 y 11.	Revisión de ramas para ver y coleccionar las larvas de <i>Hypsiophyla grandella</i> .	21
Figura No. 12.-	Extracción de la larva de <i>Hypsiophyla grandella</i> .	21
Figura No. 13.-	Larvas coleccionadas de <i>Hypsiophyla grandella</i> para inocular.	22
Figura No. 14.-	Cajas Petri, agua purificada para esterilizar.	22
Figura No. 15.-	Lavado y enjuagado de las larvas.	23
Figura No. 16.-	Pesado de la dosis del hongo <i>Beauveria bassiana</i> a utilizar.	24
Figura No. 17.-	Agitación de la dosis de hongo <i>Beauveria bassiana</i> a utilizar en la inoculación de larvas <i>Hypsiophyla grandella</i> .	24

<i>Figura No. 18.-</i>	Inoculación de las larvas <i>Hypsyphyla grandella</i> .	25
<i>Figura No. 19.-</i>	Cajas de Petri con larvas <i>Hypsyphyla grandella</i> inoculadas con <i>Beauveria bassiana</i> en diferentes dosis.	25
<i>Figura No. 20.-</i>	Vista microscópica de la parte de una larva de <i>Hypsyphyla grandella</i> micozada con <i>Beauveria bassiana</i> logrado en el laboratorio de control biológico del ITZM.	27
<i>Figura No. 21.-</i>	Vista Estereoscópica de una larva de <i>Hypsyphyla grandella</i> micozada con <i>Beauveria bassiana</i> logrado en el laboratorio de control biológico del ITZM.	27

**“PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DEL HONGO *Beauveria bassiana* EN
EL LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO DEL ITZM”.**

I. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General:

Producción y aplicación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en el laboratorio de control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya.

1.2 Objetivos específicos:

- Aislar e identificar al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.
- Producir el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en PDA como medio de cultivo.
- Inocular las esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en semillas de arroz.
- Identificar las plantaciones forestales para realizar las pruebas de aplicación del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.
- Aplicar el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en el Laboratorio en *Hypsiphylia grandella*.
- Probar diferentes concentraciones.

2. JUSTIFICACIÓN

Con el objetivo de concluir la carrera de Ingeniería Forestal se realizó en el Laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, ubicado en el km. 21.5 de la carretera Chetumal-Escárcega en el Ejido de Juan Sarabia, Municipio de Othón Pompeyo Blanco en el Estado de Quintana Roo; el Proyecto de Residencia Profesional que lleva por título: “Producción y aplicación de *Beauveria bassiana* en el Laboratorio de Control Biológico del ITZM”.

2.1 JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA:

La Residencia Profesional es un requisito para concluir la carrera de Ingeniería Forestal ya que el futuro Ingeniero debe poner en práctica los conocimientos adquiridos en el aula, lo cual hace que el egresado enriquezca sus conocimientos de manera integral y logre vincular lo académico con el campo laboral.

2.2 JUSTIFICACIÓN SOCIAL:

La participación en la Residencia Profesional hace que el alumno aplique los conocimientos, pero también contribuye a la solución de una problemática existente en la instancia en la cual se realizará, y por ende será en beneficio de la sociedad y el medio ambiente.

2.3 JUSTIFICACIÓN ECONÓMICA:

En particular, lo que se busca es contribuir en el sector forestal con el uso de una alternativa más para el control de una plaga en las plantaciones forestales, específicamente de *Hypsiphyla grandella* en *Cedrella odorata* y que se verá reflejada en una reducción en el gasto económico que se destina para tal efecto.

3. INTRODUCCIÓN

Son muchas las pérdidas económicas debido a un gran número de insectos plaga que dañan miles de cosechas, anualmente. Para los años 50's el control de las plagas se realizaba con químicos por su rápida acción y su efectividad. Sin embargo, sus beneficios eran enfocados en la eliminación rápida de la plaga en las cosechas sin considerar el ambiente, la salud humana y la economía. Lo que ha causado daños irreparables al paso de los años.

En los últimos años ha sido de gran importancia para la comunidad científica, buscar formas de preservar el ambiente y evitar el desbalance ecológico al introducir sustancias nocivas. Por este motivo se exploró desde hace algunas décadas la incorporación de microorganismos como bacterias, hongos, nematodos y virus como bioinsecticidas (Valenzuela, 1987).

Además de los beneficios que traería para los pequeños agricultores el uso de bioinsecticidas en cuanto a la salud, estos son de aplicación sencilla y menos costosos. Sin mencionar los beneficios en el ambiente, ya que se están utilizando microorganismos endémicos que normalmente se encuentran como saprofitos del suelo.

Los primeros microorganismos que se identificaron como causantes de la enfermedad en insectos fueron los hongos, debido a que era imposible observar su crecimiento sobre el cuerpo de éstos. Los hongos patógenos de insectos, conocidos como hongos entomopatógenos, penetran, invaden y se multiplican dentro de los insectos. En el grupo de los patógenos de insectos, una característica particular de los hongos es que no requieren ser ingeridos por el insecto para causar la enfermedad, ya que pueden penetrar a través de su cutícula. Su crecimiento y desarrollo está limitado principalmente por condiciones medioambientales adversas, especialmente la radiación solar, la baja humedad y las altas temperaturas.

Las unidades de reproducción de los hongos son llamadas esporas o conidias, que usualmente son las que infectan a los insectos. El proceso de infección se puede

dividir en tres etapas: 1. Adhesión de esporas a la cutícula del insecto y germinación; 2. Penetración de la cutícula del insecto; 3. Desarrollo del hongo en el interior del insecto, que generalmente termina en la muerte de éste.

Según Pucheta Díaz et al. (2006), los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes controladores, constituyendo un grupo con más de 750 especies, diseminados en el medio ambiente y provocando infecciones fungosas a poblaciones de artrópodos; el hongo ***Beauveria bassiana*** objeto de este trabajo se encuentra entre los géneros más importantes según López-Lorca y Hans-Borje (2001) así como para la FAO (2003).

En el desarrollo del control biológico, que para Tellez-Jurado et al (2009) se define como una práctica agrícola en constante crecimiento que busca la destrucción total o parcial de patógenos e insectos plaga frecuentemente mediante el uso de sus enemigos naturales, los hongos entomopatógenos según Samson *et al.* (2002), son capaces de producir enfermedad y muerte de los insectos.

Para Butt *et al.*(2001), la producción de hongos para el control de plagas implica una amplia investigación donde se involucran disciplinas como la patología, ecología, genética y fisiología, además de técnicas para la producción masiva, formulación y estrategias de aplicación.

Es por eso, que el presente trabajo de residencia profesional es con el interés de producir el hongo ***Beauveria bassiana*** en el laboratorio de control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya con la finalidad de su aplicación en campo en diferentes plantaciones forestales (***Cedrella odorata***) para el control de ***Hypsiphyla grandella***, que aqueja en nuestra región. Los hongos entomopatógenos son una opción viable para disminuir el detrimento del medio ambiente.

4. ANTECEDENTES

El término entomopatógeno se ha definido por varios autores de distintas maneras, algunos lo definen como a aquellos microorganismos (bacterias, hongos, nematodos y virus) que son capaces de atacar insectos (Devotto *et al.*, 2000), o como los que reducen las poblaciones de insectos plaga en niveles que no causen daño ecológico a los cultivos (Tanzini *et al.*, 2001), o bien los que son un medio de control en la reducción de poblaciones de insectos vectores de enfermedades (Scholte *et al.*, 2004). También los han definido como parásitos obligados o facultativos de insectos, con una alta capacidad de esporulación, sobrevivencia y, sus mayores ventajas están en la manipulación, adaptación a diferentes ambientes, especificidad y capacidad de penetración del tegumento (Allendes, 2007).

Constituyen uno de los grupos de mayor importancia en el control biológico de insectos. Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas de las enfermedades causadas por estos hongos inclusive los Dípteros (Alean, 2003; Rodríguez *et al.* 2006; Scholte *et al.*, 2004). Los hongos entomopatógenos se encuentran en la división Eumycota y en las subdivisiones: Zygomycotina, Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina (Alean, 2003; Ulloa y Hanlin, 2006).

Los hongos entomopatógenos se conocen desde hace dos milenios, cuando los chinos identificaron especies de *Cordyceps e Isaria* de especímenes del gusano de seda y una especie de cicada (Chicharra o cigarra). Agostino Bassi en 1836 relata un tratado sobre la enfermedad del gusano de seda, la muscardina, cuyo agente causal era ***Beauveria bassiana***. Este hecho marca el inicio de la Patología de insectos. El desarrollo y aplicabilidad de la patología de insectos se inicia en 1879 con Hagen quien estudia el posible uso de hongos para el control de insectos (Vergara, 2004).

Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos. Entre los más importantes están: *Meetarhizium*, ***Beauveria***, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*,

Fusarium, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*, (Monzon, 2001); Asaff *et al.*, 2002; Pucheta, 2006).

A nivel mundial, las dos especies más frecuentes y estudiadas de hongos entomopatógenos son ***Beauveria bassiana*** y ***Metharhizium anisopliae***, debido a su eficiencia y facilidad de multiplicación, (Allendes, 2007; Rodríguez *et al.*, 2006), por lo cual éstos pueden servir de agentes entomopatógenos, contra organismos patógenos causantes de enfermedades, o de organismos que sirven de vectores de otros microorganismos que causan daño a plantaciones, animales y al propio ser humano (Scholte *et al.*, 2004).

En forma natural los hongos satisfacen ciertos requerimientos nutricionales por la digestión enzimática de sus hospederos. Estos requerimientos también pueden ser suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación, aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa micelial o conidios, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para diferentes especies de hongos.

Además de los problemas tecnológicos, hay que tener en cuenta el mecanismo de acción mediante el cual actúa el microorganismos, así como si su efecto se encuentra estrechamente vinculado a condiciones locales y micro-ambientales y muy específicamente a condiciones de humedad y temperatura entre otros factores condicionantes.

En cuanto al mecanismo específico de acción, los hongos entomopatógenos actúan principalmente por contacto, cuando el hongo es capaz de penetrar dentro del insecto e invadirlo, provocándole la muerte por micosis. Además la mayoría de estos hongos producen sustancias líticas y toxinas que ayudan a la penetración y a inhibir los mecanismos de defensa de los insectos entre otras formas de actuar. Aun cuando muchas de estas toxinas se producen sólo en el interior del insecto, se ha demostrado que muchas especies de hongos pueden producir durante su

reproducción metabolitos bioactivos con efecto insecticida, lo que potencia su acción, lo cual debe tenerse en cuenta al diseñar un esquema de producción.

Las etapas en el desarrollo de una micosis pueden simplificarse en 10 pasos:

1. Adhesión al tegumento
2. Germinación del conidio
3. Penetración por la cutícula
4. Multiplicación en el hemocele
5. Producción de toxinas
6. Muerte del insecto
7. Colonización
8. Emergencia del micelio fuera del insecto
9. Esporulación del hongo
10. Diseminación.

Los microorganismos antagonistas, que se emplean para el control de otros patógenos actúan por diferentes mecanismos: hiperparasitismo, antibiosis, competencia de nutrientes y por el nicho ecológico, las más frecuentes son las dos primeras.

En su acción además intervienen varios factores que pueden favorecer o no la actividad antagónica del microorganismo como son temperatura, pH, humedad relativa y la presencia de otros microorganismos, entre otras.

Para la selección del método de reproducción es importante tener en cuenta no sólo la factibilidad tecnológica y económica, sino el mecanismo de acción ya que en el producto final deben estar presentes las estructuras infectivas y los metabolitos activos de forma estable y con su mayor potencial biológico.

Los aspectos a tener en cuenta son:

1. Selección de la cepa adecuada

2. Selección de un medio de cultivo con un balance de nutrientes que permita obtener un desarrollo del hongo con el máximo potencial patogénico y con eficiencia económica.
3. La posibilidad tecnológica y económica de escalar el proceso a nivel de producción.
4. Formulación que permita periodos de almacenamiento prolongados, facilidad de aplicación y estabilidad en condiciones de campo.

La estabilidad en el medio ambiente, puede ser, incluso más importante que la patogenicidad de la cepa en condiciones de laboratorio, por lo cual se llegan a soluciones de compromiso.

Aunque los hongos entomopatógenos tienen la ventaja de actuar por contacto y afectar teóricamente cualquier estadio de la plaga, aún aquellos en los cuales el insecto no se alimenta, hay que tener en cuenta que las estructuras de los hongos y en particular los conidios pueden sufrir desecación, inhibición por otros microorganismos, etc., cuando se encuentran expuestos al medio ambiente.

Para la elección de la composición del medio de cultivo debe tenerse en cuenta si la forma de producción es sólida o líquida, definir entonces la disponibilidad de materias primas locales, su factibilidad económica y la relación Carbono/Nitrógeno que permita estabilizar las condiciones de pH y un mejor desarrollo del microorganismo. En los medios de cultivos se emplean frecuentemente sales inorgánicas que facilitan la conidiogénesis.

El ajuste de parámetros como son la temperatura, tipo y concentración del inóculo, humedad relativa y tamaño de partícula en los medios sólidos, tiempo total del proceso y demanda de oxígeno, tanto en las formas líquidas como sólidas, entre otros, se realiza mediante el empleo de modelos de optimización que permiten de forma rápida lograr estos resultados.

En general se emplean cuatro formas de producción;

1. Cultivos sobre soportes sólidos en bandejas, frascos o bolsas.
2. Cultivos líquidos agitados en zaranda. (fermentación sumergida)
3. Cultivos líquidos en condiciones estáticas (frascos)
4. Cultivos bifásicos, donde se realiza el inóculo en forma líquida agitado o estático y posteriormente se pasa al soporte sólido

Estos métodos se consideran artesanales o semiartesanales y aunque pueden lograrse volúmenes grandes de producto, el número de manipulaciones manuales hace que se clasifiquen de esta forma.

Cada uno de los métodos tiene ventajas y desventajas, por lo cual la decisión depende de varios factores, entre los que por supuesto, la calidad del producto final y su factibilidad tecnológica y económica son lo más importante.

En el caso de los hongos las etapas más difíciles son las de recobrado y formulación, ya que resulta necesario que en estas fases se alcance un bioproducto con un porcentaje de humedad relativa inferior a 10, y para esto no pueden emplearse condiciones de secado que impliquen temperaturas elevadas que puedan afectar la viabilidad de los conidios o la estabilidad de algunos metabolitos sensibles.

En general las formulaciones fúngicas, aún aquellas en las que se logran bajos porcentajes de humedad necesitan ser conservadas en frío. Temperaturas superiores a 10 grados C no garantizan la estabilidad de estos productos por más de tres meses, lo cual es sin duda uno de los mayores inconvenientes para su producción a escala industrial

En la actualidad se encuentran en desarrollo en Cuba y en otros países tecnologías para la reproducción masiva de hongos entomopatógenos y antagonistas mediante fermentación sumergida en fermentadores de grandes volúmenes y en todos los caso es la etapa de recobrado y formulación la que aún no ha sido resuelta eficientemente.

Otra vía en la fermentación en Fase Solida, que aunque con muy buenas perspectivas para el desarrollo de los productos a partir de hongos y con mejores posibilidades para su recobrado y secado al tener un porcentaje muy bajo de agua libre, presenta el inconveniente de que los equipos para estas producciones no tienen aún un buen desarrollo a escala industrial.

La ***Beauveria bassiana***.-Se pretende reproducir en el Laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, mediante cultivo sobre soporte sólido empleando arroz. Por fermentación se obtendrán biopreparados a partir de ***Beauveria bassiana*** en polvo. Las formas sólidas y secas se conservan por tres meses a temperaturas entre 4-10° C. (Fernández Larrea).

Se pretende aplicar el producto del hongo entomopatógeno ***Beauveria bassiana*** en ***Cedrella odorata*** para el control de ***Hypsiphyla grandella***.

Las ventajas de aplicación de este hongo entomopatógeno en cultivos son:

1. Es compatible con otros métodos de control
2. No contamina fuentes de agua, ni el medio ambiente
3. No hay riesgo de intoxicación de los aplicadores y
4. Reduce los costos de producción por la no utilización de insecticida químico.

5. METODOLOGÍA

Asepsia.

Basándonos en el Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos (Verónica Cañedo, Teresa Ames.2004). Mantener el mayor cuidado en la limpieza del material y del laboratorio mismo es fundamental para realizar trabajos confiables. El medio ambiente se encuentra, por lo general, cargado de microorganismos diversos que pueden contaminar el ámbito de trabajo, por ello es conveniente no descuidar la limpieza de los materiales, instrumentos y equipo necesario para el trabajo. Los materiales de vidrio y cualquier otro elemento deben estar profundamente limpios antes de comenzar el trabajo.

Lavado.

Durante los trabajos con microorganismos, específicamente hongos, es necesario y fundamental trabajar con mucha asepsia, debido a que es indispensable el mantenimiento de los cultivos puros. Por lo tanto, es conveniente que luego de lavar todo el material de vidrio, éste sea enjuagado dos veces con agua destilada, para eliminar todo residuo de detergente antes de ser esterilizado.

Esterilización.

La esterilización de los materiales de vidrio y medios de cultivo nos asegura un estado de asepsia que permite trabajar sin dificultades. La forma más común de esterilización es por medio del calor seco o húmedo.

La esterilización por calor seco se consigue con el uso de un horno o estufa y es útil en el caso de esterilizar placas petri y otros materiales de vidrio. La temperatura a la que se somete el material durante 90 a 120 minutos debe fluctuar entre 160 y 180° C. Es eficaz, siempre y cuando se deje espacio libre para que el aire caliente circule alrededor de los materiales.

La esterilización por calor húmedo o a presión de vapor de agua se consigue con el uso de una autoclave. Se encuentran de varios modelos y tamaños, pero todas tienen el mismo principio de funcionamiento. A mayor presión, mayor es la temperatura de ebullición del agua; cuando la presión aumenta a 15 libras (dos atmósferas), la temperatura llega a 121.6° C. No existe microorganismo que tolere esta temperatura durante 15 minutos. El tiempo es el factor que permite que el calor penetre en la masa de esterilización y se absorba. Cuando se esterilizan medios de cultivo en frascos de vidrio, se debe asegurar que éstos ocupen no más de las tres cuartas partes del frasco para permitir una ligera ebullición sin derramarse, por lo mismo, las tapas deben colocarse ligeramente sueltas. Los frascos Erlenmeyer se deben taponar con algodón para permitir la circulación del vapor. Los tubos de ensayo conteniendo medio, se deben colocar en una gradilla o rejilla.

5.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.

Como ya se ha dicho, cuando se trabaja con hongos entomopatógenos es necesario tener los ambientes de trabajo, así como los utensilios, materiales de vidrio, etc. en completo estado de asepsia. Existe un conjunto de procedimientos para eliminar o reducir la contaminación por microorganismos ya sean hongos entomopatógenos, fitopatógenos, patógenos del hombre, saprofitos, etc. que puedan interferir con el trabajo que se desea realizar. Éstos pueden estar flotando en el aire, depositados sobre las superficies de trabajo y del ambiente como paredes, techos, estantes, entre otros.

El alcohol es muy utilizado en trabajos de laboratorio para desinfectar la superficie de la cámara de flujo laminar así como las superficies de trabajo. Los alcoholes actúan desnaturalizando las proteínas, disolviendo las capas lipídicas y como agentes deshidratantes.



Figura. 1. Vestimenta adecuada para ingresar al Laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya.

En el Laboratorio de Control Biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, se ha procedido a la desinfección del mismo con alcohol y cloro, también contamos con la vestimenta adecuada y realizamos este proceso cada vez que ingresamos al laboratorio para las prácticas de la Residencia Profesional, a continuación se relata todo el proceso de la investigación en cuestión.

5.1.1 Preparación de Matrices.

Una vez esterilizado el material a utilizar (tubos de ensayo, vaso de precipitado, asa, etc.) se procedió a pesar 3.9 gr, de PDA (papa, Dextrosa ,Agar) la cual se cocinó y mezcló con 100 ml. de agua purificada aproximadamente 20 minutos a 250° C. en la placa de calentamiento y disolviéndose al mismo tiempo, una vez cumplido el tiempo y visto que la solución es uniforme se continua a vaciar la solución del medio de

cultivo en los tubos de ensayo aproximadamente 10 ml, por tubo y en un vaso de precipitado se colocan de manera vertical previamente cada tubo tapado con algodón en la parrilla de la autoclave y se esteriliza a 1.0 de presión y 120° C por 20 minutos, cumplido este tiempo se saca el material esterilizado en los tubos de ensayo y se inclinan de manera horizontal con una leve inclinación para que se enfríen y se solidifiquen para poder realizar la siembra de la sepa del hongo a utilizar.



Figura.-2. Autoclave cilíndrica utilizada en el proyecto.

5.1.2 Sembrado de Matrices.

La siembra directa de hongo entomopatígeno en el medio de cultivo en los tubos de ensayo se realizó en la campana de flujo laminar (previa desinfección) en la cual se utilizó un mechero, la sepa para siembra y un asa de siembra, la siembra se realizó utilizando el asa en forma de zigzag, y se le vuelve a poner el tapón de algodón, se espera la esporulación del hongo en el tubo de ensayo aproximadamente diez días para obtener una cepa sana y en condiciones de inocular arroz para producir el hongo entomopatígeno como insecticida biológico.

Después de los diez días se obtuvo las nuevas cepas de *Beauveria bassiana* producidas en el laboratorio entomológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya. Y se pudo observar que tenían una buena esporulación, estas mismas se llevan al refrigerador para conservar su viabilidad y utilizarlas posteriormente para inocular en el arroz para su producción masiva.



Figura.- 3 Matrices de *Bauveria bassiana* obtenidas en el laboratorio de control biológico del ITZM.

5.2 Preparación de material y equipo de laboratorio para sembrar hongo *Beauveria bassiana* en arroz.

5.2.1 Preparado e inoculación de arroz.

Para la inoculación (siembra) en 10 kg. de arroz se realizó lo siguiente: En una tina se preparó una solución para desinfectar el arroz agregando 10 lt. de agua purificada, 5 ml. de Enroxil al 10% y 2.5 ml. de cloro. Una vez hecha la solución desinfectante en una malla de mosquitero se vertieron los 10 kg. de arroz y se

sumergieron por un tiempo aproximado de 15 minutos, cumplido el tiempo se procedió a sacar el arroz y se esperó a que se escurra la solución desinfectante aproximadamente de 12 a 15 minutos hasta que deje de gotear, posteriormente se procedió a envasar el arroz aproximadamente 300 gr. por bolsa, haciéndole un nudo casi en la punta de la bolsa de tal manera que le quede algo de aire a la bolsa y listo; para esterilizar el arroz embolsado para lo cual se colocan en la tina del autoclave de manera que circule el vapor entre las bolsas para que el esterilizado sea uniforme a 1.0 de presión atmosférica, 120° C. por 20 minutos, terminado este tiempo se apaga la autoclave y se drena lentamente la presión de la misma y se saca el arroz inmediatamente para que no se queme y se deja enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 12 horas para realizar la inoculación con el hongo *Beauveria bassiana*. Transcurrido este tiempo se procede hacer la inoculación en la campana de flujo laminar (previa desinfección) en la cual se utilizó un mechero, un frasco ele Meyer de 1000 ml, una pistola de inyectar manual metálica y cinta maskintape, previa preparación de la solución de 1000 ml. de agua purificada, el contenido de la matriz en el tubo de ensayo, 1 ml. de enroxil y 5 gotas de dispersante, esta inoculación se realiza inyectando 20 ml. de la solución en cada una de las bolsas de arroz y sellando con cinta masking tape donde fue inyectada la bolsa.



Figura.- 4 Acomodado de las bolsas de arroz para esterilizar.



Figura.- 5 Arroz esterilizado y colocado para su enfriado a temperatura ambiente.



Figura.- 6 Material utilizado en la inoculación del arroz.



Figura .- 7 Pistola de inyección utilizada en la inoculación y bolsas de arroz por inocular.

5.3 Crecimiento del hongo *Beauveria bassiana*.

Esta etapa se desarrolla en una sala de crecimiento después de haber realizado la inoculación del hongo *Beauveria bassiana* en las bolsas de arroz, la cual consiste en dejar en reposo las bolsas inoculadas en la sala de germinación durante aproximadamente 20 días a una temperatura de 22 a 24° C. cabe hacer mención que cada 4 días se debe de manipular las bolsas de arroz para romper el micelio con el objeto de homogenizar el contenido del arroz con el hongo en crecimiento, cumplido el tiempo de los 20 días se procede a la cosecha del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.



Figura.- 8 Bolsas de arroz inoculadas en la sala de crecimiento.

5.4 Cosecha del Hongo *Beauveria bassiana*.

Esta actividad se realiza en una tina de plástico con una malla-cernidor; poniendo una bolsa de 300gr. de arroz con hongo *Beauveria bassiana* con 20 gr de diatomita

siendo esta un antihumectante; después de cosechar todo el hongo se deposita en una charola y se extiende para que seque y posteriormente se embolsa y se guarda en el refrigerador.



Figura.- 9 Cosecha del hongo *Beauveria bassiana* en el laboratorio de control biológico del ITZM.

5.5 Colecta de larvas de *Hypsyphyla grandella*.

Para esta actividad se visitó la estación San Felipe Bacalar del INIFAP para recolectar dichas larvas, para lo cual se revisaron las plantas (árboles) que mostraban síntomas del daño y se lograron capturar las larvas y llevarlas al laboratorio de control biológico del Instituto Tecnológico de la zona maya para su inoculación con el hongo *Beauveria bassiana*.



Figura.- 10 y 11 Revisión de ramas para ver y coleccionar las larvas de *Hypsyphyla grandella*.



Figura.- 12 Extracción de la larva de *Hypsyphyla grandella*.



Figura.- 13 Larvas colectadas de *Hypsiophyla grandella* para inocular

5.6 Preparación de material para la inoculación del Hongo *Beauveria bassiana* en larvas de *hypsiophyla grandella*.

Se esteriliza el material a utilizar como son cajas Petri, previamente preparadas con papel absorbente, porta objeto, y 2 ml. de agua destilada por caja Petri. Esta esterilización se hace a 1.0 de presión atmosférica a 120 °C por 20 minutos.



Figura.- 14 Cajas Petri, agua purificada para esterilizar.

5.6.1 Lavado del Agente patógeno en el Laboratorio. (Desinfección).

Para esta actividad se realiza lo siguiente se lavaron las larvas con agua y detergente en dos ocasiones, posteriormente se desinfectaron con cloro al 5% en dos ocasiones de forma rápida para que no se mueran las larvas, posteriormente se enjuagaron con agua esterilizada en dos ocasiones y listo para la inoculación.



Figura.- 15 Lavado y enjuagado de las larvas.

5.6.2 Inoculación del Hongo *Beauveria bassiana* en larvas *Hypsyphyla grandella*.

Para realizar la inoculación en larvas de *Hypsyphyla grandella* se utilizaron distintas concentraciones del hongo *Beauveria bassiana* de 0.25, 0.35, 0.50, y 0.75 para observar la efectividad del hongo en las larvas.



Figura.- 16 Pesado de la dosis del hongo *Beauveria bassiana* a utilizar.



Figura.- 17 Agitación de la dosis de hongo *Beauveria bassiana* a utilizar en la inoculación de larvas *Hypocypha grandella*.



Figura.- 18 Inoculación de las larvas *Hypsiophyla grandella*.



Figura.- 19 Cajas de Petri con larvas *Hypsiophyla grandella* inoculadas con *Beauveria bassiana* en diferentes dosis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en el laboratorio de control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, en la producción del hongo entomopatógeno ***Beauveria bassiana*** son óptimos, debido a que se logró reproducir las matrices del hongo ***Beauveria bassiana*** obteniendo cepas sanas para realizar la inoculación en arroz. Al hacer la siembra en las bolsas de arroz para la producción masiva de las esporas del hongo ***Beauveria bassiana*** se logró reducir la contaminación en un 100%.

En la producción del hongo se logró observar que, debido a las medidas de higiene exigidas para entrar al laboratorio, se logró reducir la contaminación del ambiente interno y con esto demostrar que en el instituto también se puede llevar acabo la producción del hongo ***Beauveria bassiana***. La cual se puede lograr a bajo costo y al mismo tiempo es benéfico para el medio ambiente al reducir el uso de insecticidas químicos o totalmente desplazarlos por este insecticida biológico, que favorecería el aspecto económico de los productores en sus cultivos al adquirirlo a bajo costo en el Instituto Tecnológico de la Zona Maya.

Con respecto al efecto del hongo ***Beauveria bassiana*** en la ***Hypsyphyla grandella*** es efectivo en la etapa de laboratorio en la cual se tienen condiciones controladas.

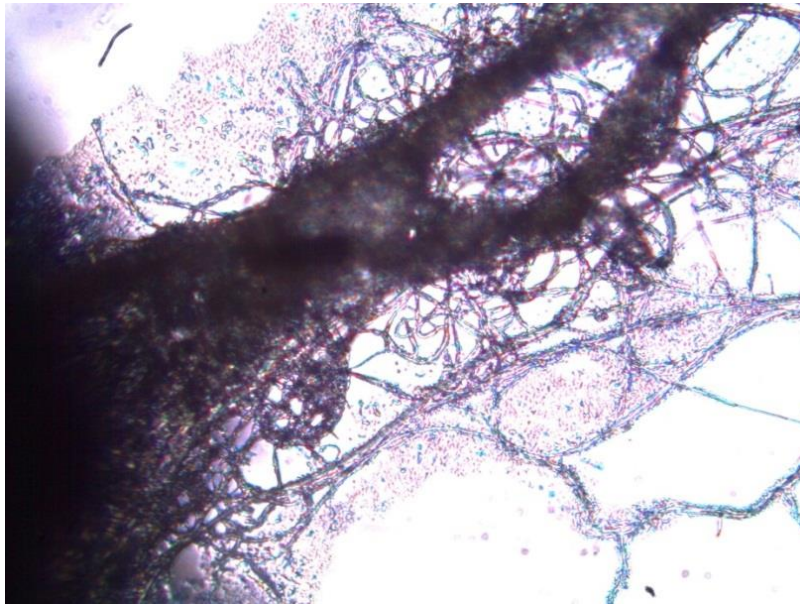


Figura.- 20 Vista microscópica de la parte de una larva de *Hypsiphyla grandella* micozada con *Beauveria bassiana* logrado en el laboratorio de control biológico del ITZM.



Figura.- 21 Vista Estereoscópica de una larva de *Hypsiphyla grandella* micozada con *Beauveria bassiana* logrado en el laboratorio de control biológico del ITZM.

7. CONCLUSIÓN.

La buena y sana producción del hongo *Beauveria bassiana* en el laboratorio de control biológico del Instituto Tecnológico de la Zona Maya, ha superado ampliamente muchas expectativas al lograr que el 100 de la producción esté libre de algún otro agente extraño que sea de nuestro interés. Este bioinsecticida se produce a bajo costo motivo por el cual los productores lo pueden adquirir de forma económica, siendo esto un beneficio en su sistema productivo al reducir costos y contaminación en sus productos y al medio ambiente.

8. RECOMENDACIÓN

Se recomienda mantener una estricta higiene para tener una excelente bioseguridad al trabajar en el laboratorio del Instituto Tecnológico de la Zona Maya y de esta manera evitar la contaminación del área y de las cepas de *Beauveria bassiana* producidas en el mismo.

Si se piensa en producir el hongo *Beauveria bassiana* en forma comercial, se requiere habilitar el laboratorio para este objetivo ya que en materia de producción se requiere más atención al cultivo del hongo así como crear las condiciones para su desarrollo y cosecha, así como contar con más personal, asimismo dotar al laboratorio de una planta emergente para la alimentación de energía eléctrica y así poder conservar la temperatura necesaria permanente que necesita el hongo para su reproducción.

9. GLOSARIO

ANTIBIOSIS.- Es una interacción biológica que consiste en la imposibilidad de vivir unos organismos en las inmediaciones de otros, debido a que éstos se agregan una sustancia, llamada antibiótico, que provoca la muerte de aquellos.

CONIDIO.- (Conidium pl. Conidia) también se le llama conidiospora; espora asexual, no móvil, generalmente formada en el ápice o en un lado de una célula esporógena especializada. Los conidios pueden ser uni, bi, o pluricelulares; secos o mucosos, pero nunca se producen dentro de alguna estructura con pared celular rígida o peridio, como sucede con las esporangiosporas. Los conidios son las estructuras asexuales de los deuteromicetes, ascomicetes y basidiomicetes y se pueden generar de novo (la mayoría) a partir de células hifales preexistentes.

ENTOMOPATÓGENO.- Microorganismos (bacterias, hongos, nematodos y virus) que son capaces de atacar insectos.

ESPORA.- Pequeña unidad de propagación unicelular o pluricelular asexual o sexual móvil o inmóvil que funciona como una semilla aunque difiere de esta última porque una espora no contiene embrión preformado.

ESPORULACIÓN.- Es un tipo de reproducción mediante esporas como endosporas.

ESTADÍO.- Etapa o fase de un proceso.

HIPERPARASITISMO.- Es el fenómeno por el cual un parásito vive de otro parásito. Esto es importante en un agroecosistema determinado ya que el conocimiento de cadenas parasitarias, además de competencia y antibiosis, representan una de las bases del control biológico de las enfermedades y plagas de los cultivos.

HONGO.- organismo eucariótico acrorófilo, heterotrófico, y casi siempre el productor de esporas su talo varia de ameboide o plasmodial a unicelular o filamentoso.

INOCULACIÓN.- En biología es ubicar algo que crecerá y se reproducirá. El verbo *inocular* proviene del latín *inoculare* y significa injertar.

MICOSIS.- Enfermedad producida por hongos.

NICHO ECOLÓGICO.- Un **nicho** es un término que describe la posición relacional de una especie o población en un ecosistema. En otras palabras, cuando hablamos de nicho ecológico, nos referimos a la «ocupación» o a la función que desempeña cierto individuo dentro de una comunidad.

PATOGENICIDAD.- De los microbios se define como su capacidad para producir enfermedad en huéspedes susceptibles.

TEGUMENTO.- (del latín: *integumentum* = *protección*), es con frecuencia el sistema orgánico más extenso de un animal ya que lo recubre por completo, tanto externamente, como numerosas cavidades internas. Su función es la de separar, proteger e informar al animal del medio que le rodea; en ocasiones actúa también como exoesqueleto. Está formado por la piel y las faneras.

10. BIBLIOGRAFÍA.

Agostino Bassi en 1836

Alean I. C. 2003. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homóptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá D.C. Colombia.

Alean, 2003; Rodríguez et al. 2006; Scholte et al., 2004

Alean, 2003; Ulloa y Hanlin, 2006.

Allendes G.L. 2007. Evaluación de 8 cepas nativas de *Metharhizium anisopliae* var. *Anisopliae* (Metsch) sorokin., para el control de *Aleurothrixus floccosus* Maskell. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad Agrónoma.

Allendes, 2007; Rodríguez et al., 2006

Assaff T.A. V.Y. Reyes. E. V. López y M. De la torre. 2002. Guerra entre insectos y microorganismos; una estrategia natural para el control de plagas. Avance y perspectiva vol. 21: 21:291-295.

Butt et al. (2001).

Devotto L.M. Gerding y A. France., 2000. Hongos entomopatógenos: Una alternativa para la obtención de Biopesticidas. Bioleche. 23:30-33.

FAO (2003).

Fernández Larrea Vega Orietta. Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de calidad. Laboratorio de Hongos Entomopatógenos de la Habana Cuba.

López-Lorca y Hans-Borje (2001)

Monzon A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Costa Rica No. 63:95-103*

Pucheta Díaz. M. 2006. Evaluación del efecto insecticida de *Beauveria bassiana*, *Metharhizium anisopliae*, y *Paecilomyces fumosoroseus* sobre mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), en frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Universidad Autónoma Metropolitana.

Rodríguez M.S. Gerding M. y France A. 2006. Selección de aislamiento de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate. *Tuta absoluta Meyrick* (LPIDÓPTERA: Gelechiidae). *Agricultura técnica (Chile) 66(2): 151-158.*

Samson et al. (2002)

Scholte E. J. B.G.J. Knols, R. A. Samson y W. Takken. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of insect Science, 4:19, 24 pp.*

Tanada, Y.; KAYA, H. K., Chapter 10, Fungal Infection. In: *Insect pathology*, Eds. Y, Tanada y H.K. Kaya. Academic press. 1993. 318-366 p.

Tanzini M., S. Alves, A. Setten y N. Augusto. 2001. Compatibilidad de agentes bioactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo integrado de plagas (Costa Rica), 59:15-18.*

Tellez-Jurado et al (2009)

Ulloa M. y R.T. Hanlin. 2006. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología.* Edit. APS Press. USA. 672 pp.

Valenzuela, E. 1987. Microorganismos Entomopatógenos su aprovechamiento en el control de insectos plagas. Universidad Autónoma de Chapingo.

Vergara R.R. 2004. Enfoque agroecológico del empleo de entomopatógenos para el control de plagas. Conferencia dictada en el Octavo Seminario de Agroecología, Agromedicina y Medio Ambiente. Tunja: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 34p.

Verónica Cañedo, Teresa Ames. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos.