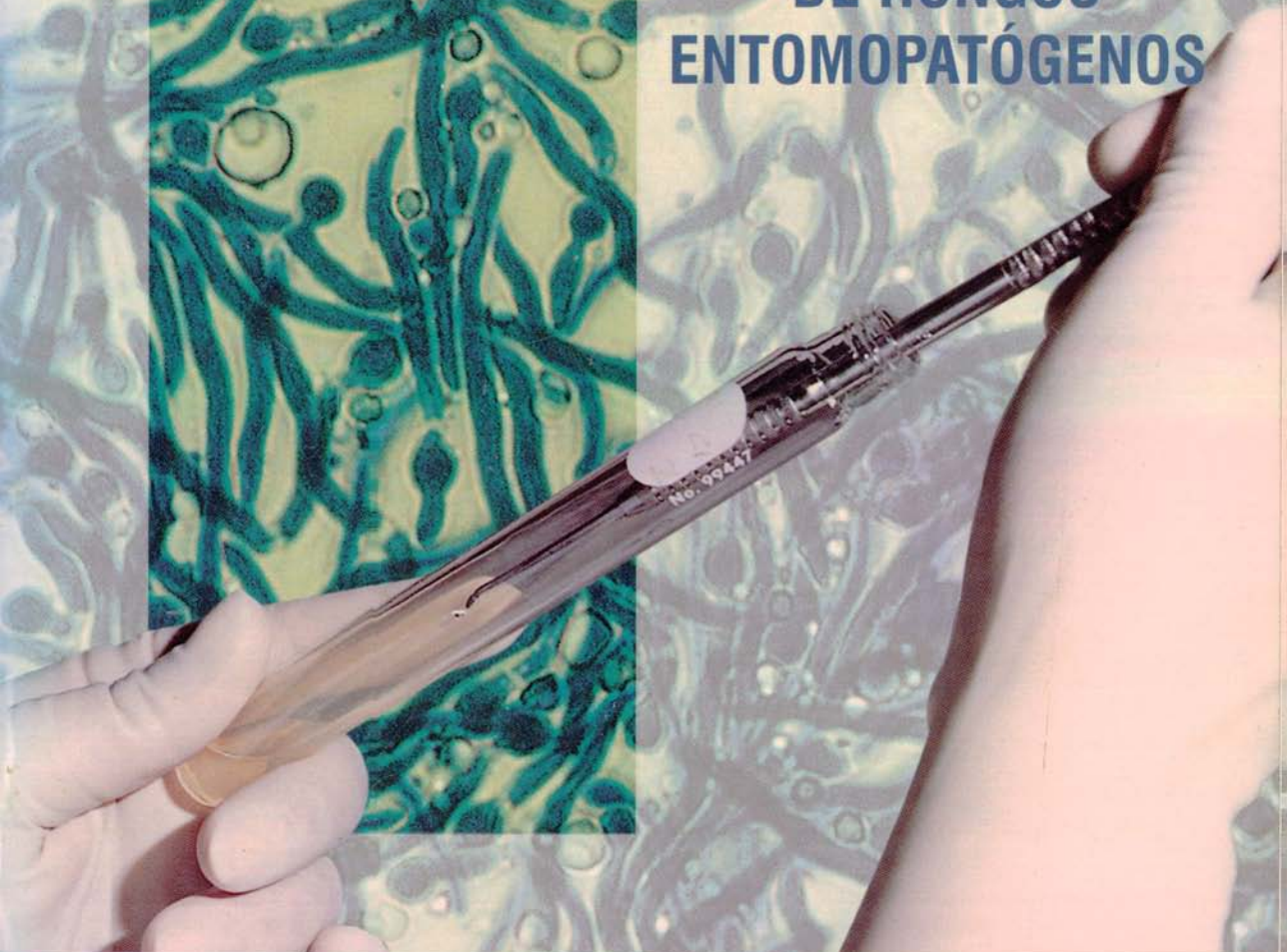


TÉCNICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE FORMULACIONES DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS



GERENCIA TÉCNICA
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ

"Pedro Uribe Mejía"

Cenicafé

Chinchiná - Caldas - Colombia

Boletín Técnico

Nº17

1997



Cenicafé
CENTRO DE DOCUMENTACIÓN

FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA

**GERENCIA TÉCNICA
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

**CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ
"Pedro Uribe Mejía"**

Cenicafé

**TÉCNICAS PARA EL CONTROL
DE CALIDAD DE FORMULACIONES
DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS**

Por:

Patricia E. Vélez A.
Francisco J. Posada F.
Patricia Marín M.
María Teresa González G.
Eduardo Osorio V.
Álex E. Bustillo P.

Chinchiná - Caldas - Colombia



FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA

COMITÉ NACIONAL DE CAFETEROS

Ministro de Relaciones Exteriores
Ministro de Hacienda y Crédito Público
Ministro de Agricultura y Desarrollo Rural
Ministro de Comercio Exterior
Director del Departamento de Planeación Nacional
Gerente de la Caja de Crédito Agrario, Industrial y Minero

Miembros elegidos para el período 1996 - 1998

PRINCIPALES

Luis Ignacio Múnera Cambas
Mario Gómez Estrada
Alfonso Palacio Rudas (+)
Rodrigo Múnera Zuloaga
Diego Arango Mora
Jesús Antonio Botero Gatner
Ernesto Sayer Martínez
Luis Ardila Casamitjana

SUPLENTE

Octavio Arizmendi Posada
Luis Gonzalo Giraldo Marín
Yesid Castaño González
Alonso Durán Rivera (+)
Rodrigo Velásquez Betancourth
Ramón Campo González
Floresmiro Azuero Ramírez
Edgar Dávila Muñoz

Gerente General
JORGE CÁRDENAS GUTIÉRREZ

Subgerente General
HERNÁN URIBE ARANGO

Gerente Técnico
ANTONIO HERRÓN ORTIZ

Director Programa de Investigación Científica
Director Centro Nacional de Investigaciones de Café
GABRIEL CADENA GÓMEZ

Los trabajos suscritos por el personal técnico del Centro Nacional de Investigaciones de Café son parte de las investigaciones realizadas por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Sin embargo, tanto en este caso como en el de personas no pertenecientes a este Centro, las ideas emitidas por los autores son de su exclusiva responsabilidad y no expresan necesariamente las opiniones de la Entidad.

UNA PUBLICACIÓN DE CENICAFÉ

Editor: Héctor Fabio Ospina Ospina I.A., MSc.
Mecanografía: Beatriz Jaramillo Giraldo
Diseño y Diagramación: Ángela C. Miranda C.
Fotografía: Gonzalo Hoyos Salazar
Patricia Marín M.
CENICAFÉ

Primera edición abril de 1997
1000 ejemplares

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
PATRÓN DE COMPARACIÓN	3
REACTIVACIÓN DEL HONGO	4
PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS	7
Concentración de esporas	7
Germinación de esporas	12
Prueba de pureza	13
PRUEBA DE PATOGENICIDAD	17
Procedimiento	18
PRUEBAS FISICOQUÍMICAS	23
pH	23
Porcentaje de humedad	23
Humectabilidad	25
Suspensibilidad	27
Taponamiento de boquillas	30
PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	33
LITERATURA CITADA	36

FORMATOS DE REGISTRO

Página

Formato 1.	Registro y determinación de la concentración de esporas de hongos entomopatógenos usando la cámara de Neubauer	11
Formato 2.	Registro y determinación del porcentaje de germinación de esporas de hongos entomopatógenos	15
Formato 3.	Registro y evaluación de pureza en las formulaciones de hongos entomopatógenos mediante el método de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC).	16
Formato 4.	Registro de la mortalidad y ciclo de desarrollo de los hongos entomopatógenos sobre la broca del café	20
Formato 5.	Registro del porcentaje de mortalidad de hongos entomopatógenos sobre broca del café	21
Formato 6.	Registro del tiempo promedio de mortalidad de hongos entomopatógenos	22
Formato 7.	Determinación de pH, humedad y humectabilidad de las formulaciones de hongos entomopatógenos	24
Formato 8.	Determinación de la humedad en formulaciones de hongos entomopatógenos	26
Formato 9.	Evaluación de la suspensibilidad de hongos entomopatógenos	29
Formato 10.	Registro de la descarga de productos en la prueba de taponamiento de boquillas por formulaciones de hongos entomopatógenos usando equipos de aspersión	32
Formato 11.	Control de calidad para formulaciones de bioinsecticidas	34

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.	Patrones de: a) <i>Beauveria bassiana</i> - Bb9205 y b) <i>Metarhizium anisopliae</i> - Ma9236 cultivadas en arroz, a los 25 días de desarrollo.	3
Figura 2.	Proceso de desinfestación de brocas en la solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (a) y lavado de las brocas en ADE (b).	4
Figura 3.	Secado de las brocas en toallas de papel esterilizadas.	5
Figura 4.	Inmersión de las brocas en la suspensión madre del hongo <i>B. bassiana</i> (infección).	5
Figura 5.	Brocas infectadas con el hongo entomopatógeno colocadas en cámara húmeda.	5
Figura 6.	Esporulación de los hongos entomopatógenos <i>B. bassiana</i> (a) y <i>M. anisopliae</i> (b) sobre brocas del café, al cabo de 10 días de inoculación.	6
Figura 7.	Siembra del hongo en medio SDA a partir de adultos de broca infectados con <i>B. bassiana</i>	6
Figura 8.	Crecimiento y esporulación del hongo <i>B. bassiana</i> - Bb9205 en SDA.	6
Figura 9.	Obtención de esporas del hongo <i>B. bassiana</i> cultivado en arroz (a) para la preparación de la suspensión madre (b).	7
Figura 10.	Toma de submuestras a partir de la suspensión madre del hongo <i>B. bassiana</i>	8
Figura 11.	Reticulado de la cámara de Neubauer o hemocitómetro observado al microscopio (10X). Retículo de uno de los lados (a), cuadrante central destinado al recuento de esporas de hongos (b).	8
Figura 12.	Llenado de la cámara de Neubauer con una micropipeta.	9
Figura 13.	Aspecto microscópico (40X) de las conidias de los hongos <i>B. bassiana</i> (a) y <i>M. anisopliae</i> (b) en uno de los 25 cuadrantes de la parte central de la cámara de Neubauer.	9
Figura 14.	Diagrama del procedimiento para preparar diluciones a partir de la suspensión madre.	10

Figura 15.	Depósito de alícuotas de la suspensión de esporas en la superficie del medio agar- agua al 1,5%.	12
Figura 16.	Tinción de las alícuotas. Adición del azul de lactofenol a las 24 horas de incubación (a), remoción de la alícuota (b) y depósito en láminas de vidrio para observación al microscopio (c).	12
Figura 17.	Aspecto microscópico (63X) de la germinación del hongo <i>B. bassiana</i> a las 24 horas de incubación en agar-agua al 1,5%	13
Figura 18.	Aspecto microscópico (40X) de la germinación del hongo <i>M. anisopliae</i> a las 24 horas de incubación en agar-agua al 1,5%.	13
Figura 19.	Adición de la suspensión de esporas del hongo sobre la superficie del medio SDA+cloranfenicol al 0,016%.	14
Figura 20.	Dispersión del inóculo depositado en el medio con una pipeta estéril.	14
Figura 21.	Hongos <i>B. bassiana</i> (a); y <i>M. anisopliae</i> (b), producidos en arroz, libres de contaminantes. <i>B. bassiana</i> en el cual se observa crecimiento del hongo contaminante <i>Penicillium</i> sp. (c).	14
Figura 22.	Etapas del proceso infectivo (inicio, cubrimiento y esporulación) de los hongos <i>B. bassiana</i> (A) y <i>M. anisopliae</i> (B) sobre la broca del café <i>H. hampei</i>	17
Figura 23.	Inmersión de las brocas en una suspensión de esporas, de concentración conocida del hongo <i>B. bassiana</i>	18
Figura 24.	Procedimiento del bioensayo de patogenicidad. Adición del sustrato (a) y adición diaria de ADE (b)	18
Figura 25.	Imagen al estereoscopio de las etapas de la enfermedad causada por los hongos <i>B. bassiana</i> (a) y <i>M. anisopliae</i> (b) en la broca del café. Muerte del insecto, inicio del micelio, cubrimiento de micelio, formación de esporas y esporulación.	19
Figura 26.	Medida del pH de la formulación.	23
Figura 27.	Adición de la formulación del hongo entomopatógeno a un volumen determinado de agua destilada para la prueba de humectabilidad.	25
Figura 28.	Muestra de un bioinsecticida en polvo sometida a determinación de humectabilidad en el laboratorio.	25

Figura 29.	Suspensión de esporas (SE) a partir de la cual se establece la relación de esporas al tiempo cero (concentración inicial (CI)) y a los 50 minutos (concentración final (CF)) en la prueba de suspensibilidad	28
Figura 30.	Toma de 10 ml de la suspensión de esporas de cada submuestra para la determinación de la concentración final en la prueba de suspensibilidad.	28
Figura 31.	Aspersión de un bioinsecticida con un equipo de aspersión de presión previa retenida (40-100-10) muy utilizado en la zona cafetera. El producto es dirigido a las ramas productivas del árbol de café.....	30
Figura 32.	Flujo normal de un producto bioinsecticida a través de una boquilla.	30
Figura 33.	Depósito de la mezcla del hongo en el tanque de la aspersora, para la prueba de taponamiento de la boquilla.	31
Figura 34.	Volumen recuperado en los tiempos de descarga 0, 25 y 50 minutos de operación del equipo (Prueba taponamiento de la boquilla).	31

INTRODUCCIÓN

La investigación con hongos entomopatógenos cada día recibe más atención debido a los efectos permanentes que éstos causan en las poblaciones de insectos plagas de importancia económica y al uso potencial como agentes de control biológico en programas de manejo integrado. Esto ha originado un gran interés en su producción masiva, formulación y comercialización como insecticidas biológicos.

En Europa, Brasil, Cuba y Venezuela se han desarrollado formulaciones de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (1,9,10,12,15). En Colombia el uso generalizado de los hongos entomopatógenos especialmente *B. bassiana* se hizo realidad con las investigaciones realizadas por Cenicafé para el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, que han servido de modelo para su aplicación en otros cultivos como el arroz, algodón, flores, leguminosas, pastos y palma africana.

La comercialización de insecticidas basados en hongos entomopatógenos requiere un control de las

propiedades biológicas, físicas y químicas, que asegure al usuario un producto con la máxima eficacia de control en el campo (14). En la literatura es escasa la información sobre procedimientos que permitan ejercer un control de calidad sobre los hongos entomopatógenos. Existe bastante información acerca de *Bacillus thuringiensis* (3,11) y algunas publicaciones sobre pruebas de seguridad en el manejo de entomopatógenos (4). La información sobre hongos se limita a indicar cuales pruebas se deben realizar (6,13) y describe la legislación de hongos entomopatógenos para su comercialización (7).

Recientemente en Colombia se expidió una reglamentación sobre la producción de entomopatógenos (8) y sobre los requisitos para obtener las licencias de producción y venta; sin embargo, esta reglamentación adolece de una información detallada sobre el control de calidad de estos productos. El Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), coordina un grupo interinstitucional y de productores que busca llegar a un consenso sobre estas pruebas. El presente documento es un aporte a este objetivo, basado en las

investigaciones desarrolladas en Cenicafé, en el cual se propone una metodología apoyada en resultados experimentales con soporte estadístico, para realizar las pruebas de calidad de las formulaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* que producen los caficultores en sus fincas y los laboratorios comerciales de hongos para el control de la broca del café.

Las instrucciones consignadas permiten analizar los productos presentados en sustratos naturales o formulados en seco con materiales inertes. Las pruebas de

calidad de las diferentes formulaciones se realizan comparándolas con un patrón seleccionado, del hongo producido con la tecnología artesanal (2).

Las características del patrón son las siguientes:

1. Cultivo de primer pase en sustrato de arroz después de reactivado en broca.
2. Medio de cultivo inoculado con una suspensión del hongo que asegure un crecimiento rápido y uniforme.

3. Cultivo desarrollado en promedio de temperaturas de 25 ± 2 °C, con un tiempo de incubación de 25 días, condiciones que permiten la máxima esporulación.

Los datos de cada prueba son registrados en formatos individuales, los cuales se consolidan y analizan en conjunto, estableciendo la calidad de las formulaciones examinadas.

PATRÓN DE COMPARACIÓN

Para el caso del hongo *B. bassiana* se utiliza el aislamiento Bb 9205, como patrón de comparación y para *M. anisopliae* se usa el aislamiento Ma 9236 (Figura 1). Ambos deben ser reactivados en broca del café y cultivados en sustrato de arroz contenido en botellas de vidrio transparente durante 25 días, a una temperatura de 25 ± 2 °C.



Figura 1. Patrones de: a) *Beauveria bassiana*- Bb9205 y b) *Metarhizium anisopliae*- Ma9236 cultivados en arroz, a los 25 días de desarrollo.

REACTIVACIÓN DEL HONGO

Para la reactivación del hongo sobre adultos de la broca del café se procede como sigue:

- a. Se seleccionan brocas activas de una colonia, especialmente aquellas que se observan volando.
- b. Las brocas se desinfectan con hipoclorito de sodio al 0,5 %, el cual se prepara tomando 9,52 ml de cualquier producto comercial (5,25%), llevándolo a 100 ml con
- c. Posteriormente se realiza la infección de las brocas por inmersión durante dos minutos en 10 ml de la suspensión madre del hongo (Figura 4) y se colocan en una caja galletera o en un frasco de boca ancha que contenga una toalla de papel esterilizada, la cual debe permanecer

agua destilada estéril (ADE). Las brocas se sumergen durante 10 minutos en esta solución, luego se lavan tres veces con ADE sobre mallas de tul esterilizadas, que sirven de colador (Figura 2). Luego con la ayuda de un pincel se colocan sobre una toalla de papel esterilizada (Figura 3).

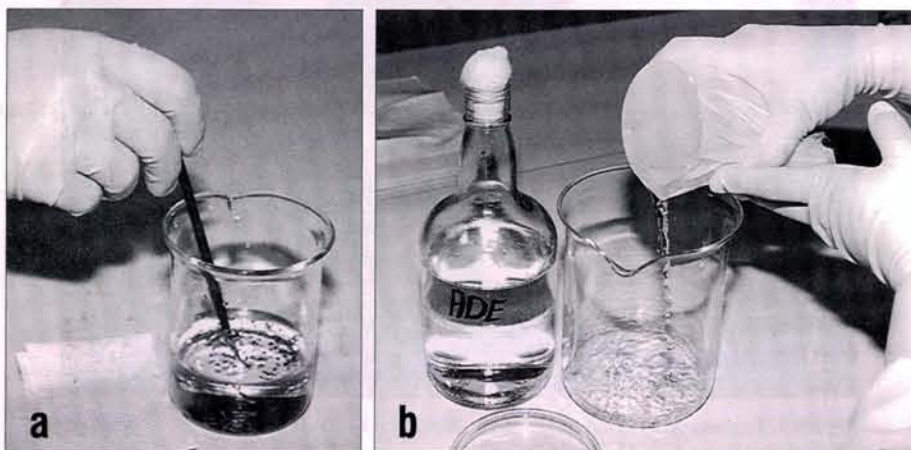


Figura 2. Proceso de desinfección de brocas en la solución de hipoclorito de sodio al 0,5% (a) y lavado de las brocas en ADE (b).

húmeda (Figura 5). El recipiente se debe mantener tapado.

- d. Después de 10 días, es decir, cuando el hongo se ha desarrollado completamente sobre el cuerpo de las brocas (Figura 6), se toman individualmente éstas con un pincel desinfectado, se someten

a una nueva desinfección con hipoclorito de sodio comercial al 5,25% por un minuto y sin lavar, se pasan inmediatamente sobre la toalla de papel esterilizada para retirar el exceso de hipoclorito.

- e. Finalmente las brocas infectadas con el hongo se colocan individual-

mente en tubos de ensayo con 8 ml de medio de cultivo inclinado, Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) (Figura 7) o tres brocas en una botella con arroz; cuando el hongo obtenga su máximo crecimiento y esporulación en el medio (Figura 8) se inicia la producción masiva a partir de éste.

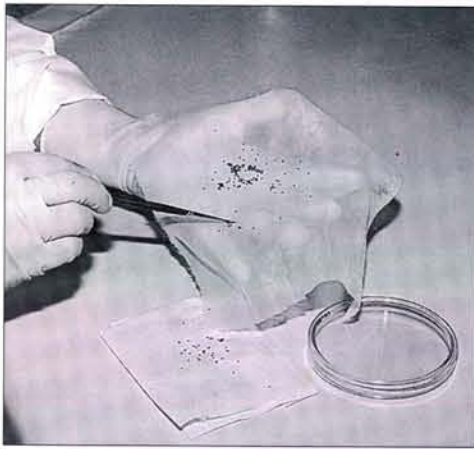


Figura 3. Secado de las brocas en toallas de papel esterilizadas.

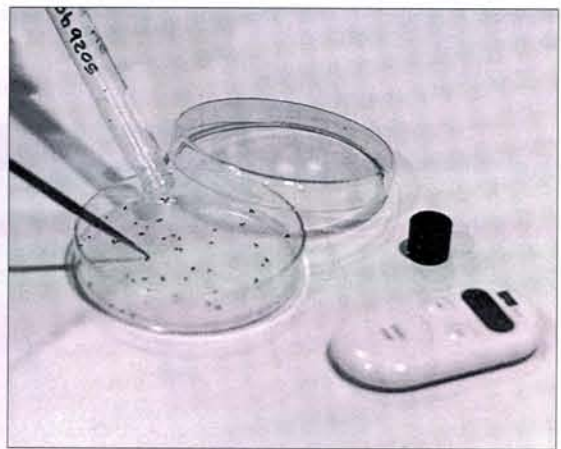


Figura 4. Inmersión de las brocas en la suspensión madre del hongo *B. bassiana* (infección).



Figura 5. Brocas infectadas con el hongo entomopatógeno colocadas en cámara húmeda.

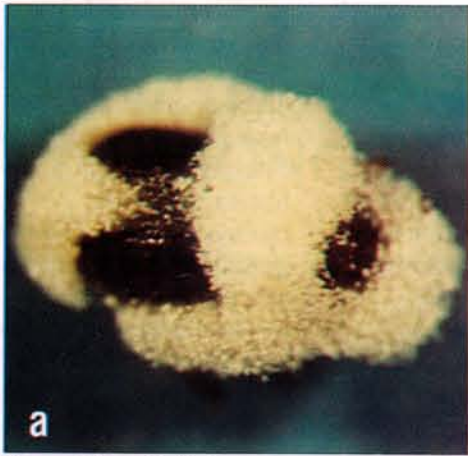


Figura 6. Esporulaci3n de los hongos entomopat3genos *B. bassiana* (a) y *M. anisopliae* (b) sobre brocas del caf3, al cabo de 10 d3as de inoculaci3n.

Figura 7. Siembra del hongo en medio SDA a partir de adultos de broca infectados con *B. bassiana*



Figura 8. Crecimiento y esporulaci3n del hongo *B. bassiana*-Bb9205 en SDA.

PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

Concentración de esporas

La cuantificación de la concentración de esporas permite determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso o volumen existentes en una formulación y sirve de base para establecer la dosificación de un producto. El siguiente es el procedimiento:

Para los patrones *B. bassiana* (Bb9205) y *M. anisopliae* (Ma 9236) se toma una botella al azar, de un cultivo de 25 días de desarrollo y se remueven las esporas con la ayuda de una espátula de madera, adicionando agua con Tween 80 al 0,1% hasta un volumen conocido (500 ó 1000 ml) (Figura 9). De esta forma queda preparada la suspensión madre de la cual se toman 4 submuestras de 1 ml y se depositan en tubos con 9 ml de ADE, quedando de esta manera preparada la dilución 10^{-1} ; se repite el procedimiento llevando 1 ml de esta dilución (10^{-1}) a tubos con 9 ml de ADE, es decir, 10^{-2} y así sucesivamente hasta

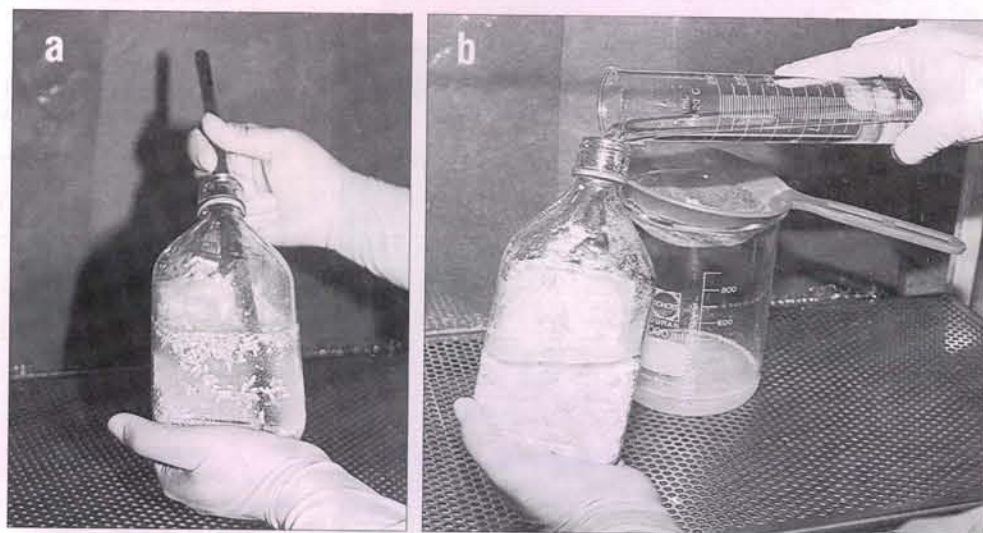


Figura 9. Obtención de esporas del hongo *B. bassiana* cultivado en arroz (a) para la preparación de la suspensión madre (b).

obtener una dilución 10^{-4} o la dilución apropiada que permite el conteo para estimar el número de esporas por mililitro de la suspensión (Figura 10).



Figura 10. Toma de submuestras a partir de la suspensión madre del hongo *B. bassiana*.

Para el recuento de esporas se utiliza la cámara de Neubauer o hemocitómetro (Figura 11). La cámara esta dividida en 2 retículos y cada uno se subdivide en 9 cuadrados (Figura 11a) de 1 mm^2 cada uno, o sea que cada retículo tiene una superfi-

cie total de 9 mm^2 . El cuadrado central (Figura 11 b) aparece de nuevo subdividido en 25 cuadrantes y éstos en 16 cuadrantes más pequeños.

El volumen (V) en mm^3 de cada uno de los cuadrantes es el siguiente:

Volumen = ancho x largo x profundidad.
 $V = 1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3$ (Volumen del cuadrante en el cual se realiza el conteo de esporas).

El número de esporas se obtiene en ml, por tanto, se debe realizar la conversión de mm^3 a ml, entonces:

$$\frac{1\text{ ml} - 10^3\text{ mm}^3}{X - 0,1\text{ mm}^3} \times \frac{1\text{ ml} \times 0,1\text{ mm}^3}{10^3\text{ mm}^3} = \frac{0,1\text{ ml}}{10^3} = 0,1 \times 10^{-3}$$

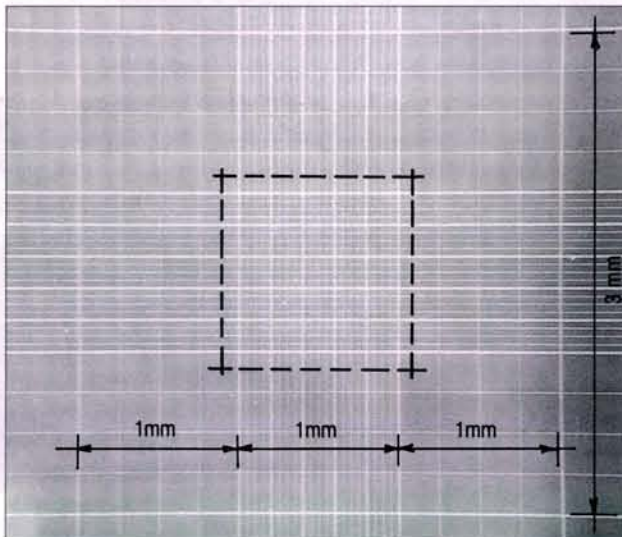
$$X = 10^{-1} \times 10^{-3} = 10^{-4}\text{ ml (Factor de la cámara)}$$


Figura 11. Reticulado de la cámara de Neubauer o hemocitómetro observado al microscopio (10X). Reticulo de uno de los lados. El cuadrante central (resaltado), está destinado al recuento de esporas de hongos.

El recuento se determina sumando el total de esporas presente en los 25 cuadrantes centrales de la cámara. A cada submuestra se le realiza tres veces este procedimiento para un total de seis lecturas. La concentración de esporas se calcula multiplicando el promedio del número de esporas obtenido por el inverso de la dilución empleada para el conteo (Si la dilución empleada fue 10^{-3} el inverso es 10^3) y por el inverso del factor de la cámara (10^4).

Si N es el número promedio de esporas por cuadrante, entonces la concentración que se desea conocer, denominada C, se estima de la siguiente manera:

$$C = N \times \text{Dilución empleada} \times \text{Factor de cámara.}$$

Antes de proceder al recuento de esporas el hemocitómetro debe ser

lavado y secado. El tubo de la dilución de la muestra de la cual se va a hacer el conteo de esporas se agita en un vórtex durante 30 segundos e inmediatamente se toma la muestra de $10 \mu\text{l}$ ($0,01 \text{ ml}$) con una micropipeta y se deposita con cuidado, de manera que el líquido entre por capilaridad sin que se formen burbujas en la cámara (Figura 12). Si esto ocurre, se retira el cubreobjetos, se lava, se seca la cámara y se repite el proceso.

En cada compartimiento de la cámara se depositan $10 \mu\text{l}$ de la dilución 10^{-4} ó de aquella que facilite un conteo de 10 a 50 esporas por cuadrante. Se deja reposar medio minuto antes de proceder al conteo. Luego se lleva la cámara al microscopio y con el objetivo 10X se localiza en el campo visual el cuadrante central, se enfoca en tal forma que se observen nítidamente los cuadrantes y luego se pasa al objetivo 40X (Figura 13).

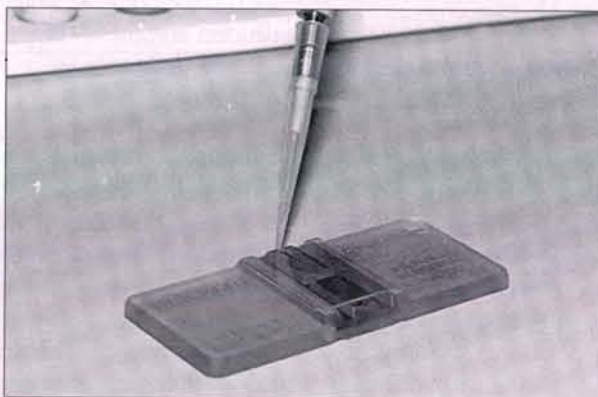


Figura 12. Llenado de la cámara de Neubauer con una micropipeta

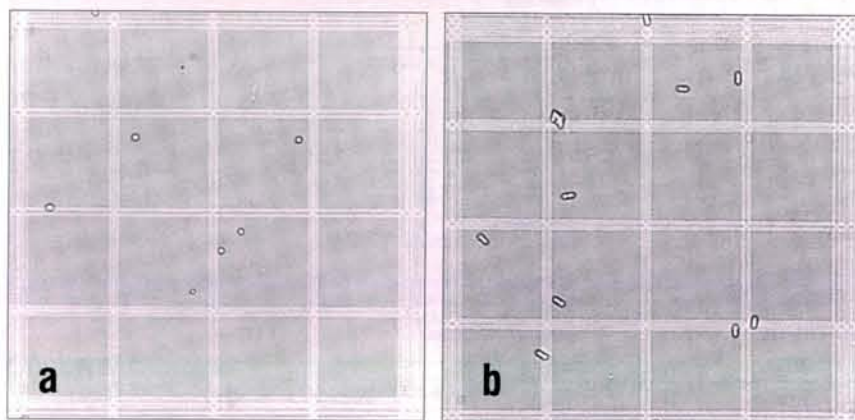


Figura 13. Aspecto microscópico (40X) de las conidias de los hongos *B. bassiana* (a) y *M. anisopliae* (b) en uno de los 25 cuadrantes de la parte central de la cámara de Neubauer.

Para el cálculo del número de esporas por gramo se debe determinar previamente el peso del sustrato arroz-agua utilizado para el cultivo del hongo.

Para obtener el número de esporas por gramo del producto, se multiplica el promedio del número de esporas por mililitro obtenido en el recuento, por el volumen empleado en la preparación de la suspensión madre y se divide por el peso de la muestra utilizada (Formato 1).

Con relación a las muestras producidas en sustrato arroz por los Comités Departamentales de Cafeteros y entidades particulares, las cuatro submuestras se obtienen a partir de cuatro botellas seleccionadas por fecha o lote de producción y se prepara la suspensión madre según la metodología citada para el patrón de comparación.

Cuando se trata de una formulación en polvo se toma una muestra representativa del lote que se va a examinar, se procede de la siguiente manera:

- 1) Se toman 10 gramos de cada recipiente (lote) y se prepara una mezcla de la cual se extraen cuatro submuestras de 1 gramo.

- 2) Cada submuestra es depositada en tubos de ensayo calibrados que contienen 10 ml de tween 80 al 0,1% en ADE ("suspensión madre" = 10^0), se agita en un vórtex o manualmente durante un minuto.

- 3) Se mezclan, un mililitro de la suspensión madre con 9ml de ADE (dilución 10^1) y un mililitro de la dilución 10^1 con 9 ml de ADE hasta obtener la dilución 10^2 . Se continúa de igual forma hasta obtener una dilución apropiada que permita fácilmente el recuento de esporas (Figura 14).

- 4) El número de esporas por gramo del producto, se obtiene multiplicando el promedio del número de esporas por mililitro, obtenido en el recuento, por el volumen emplea-

do en la preparación de la suspensión madre (10 ml) y se divide por el peso de la muestra utilizada (1g).

Normalmente las formulaciones en materiales inertes contienen muchos artefactos que impiden hacer los recuentos en diluciones muy bajas. Por tanto, es necesario hacer los estimativos en diluciones mayores que permitan observar bien las esporas.

Cuando se evalúan formulaciones líquidas, se toman 10 ml de cada recipiente y se realiza una mezcla (suspensión madre, 10^0), de la que se toman cuatro submuestras de 1 ml. Con estas submuestras se preparan las diluciones de la forma antes descrita para estimar el número de esporas por mililitro de formulación.

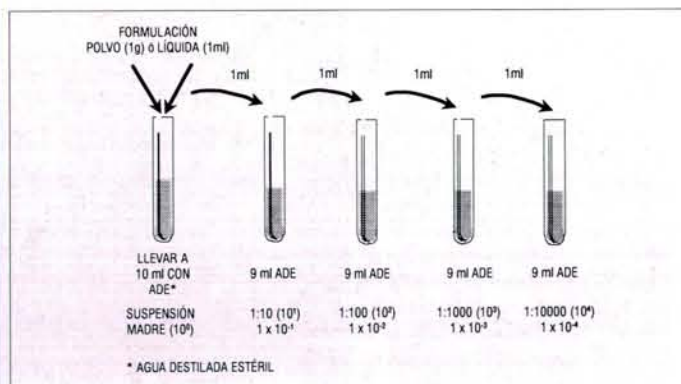


Figura 14. Diagrama del procedimiento para preparar diluciones a partir de la suspensión madre.

FORMATO 1. Registro y determinación de la concentración de esporas de hongos entomopatógenos usando la cámara de Neubauer. Cenicafé

Fecha 15-03-95

Objetivo: Control de Calidad

Evaluador: Patricia Marín

MUESTRA	Submuestra Lote	Lectura en la cámara						Σ	X̄	D.E.
		1	2	3	4	5	6			
Código: <u>123</u> Dilución: <u>10⁻³</u> Volumen de agua: <u>500 ml</u> P=Peso muestra: <u>100 g</u> Formulación: <u>Cepa Cenicafé</u> Hongo-cepa: <u>B3 9205</u> Fecha: <u>15-03-95</u>	1/152	23	24	24	33	28	31	173	28,8	4,26
	2/154	20	23	28	29	28	29	155	25,8	3,5
	3/156	25	23	29	33	29	28	167	27,8	3,4
	4/158	16	19	15	21	18	23	112	18,6	3,0
	[] e/ml= X*D*fc	$25,2 \times 10^3 \times 10^4 = 25,2 \times 10^7 \pm 4,6 \times 10^7$ e/ml							25,2	4,6
	$[] e/g = mL * \sqrt{P} = 25,2 \times 10^7 * 500 \text{ ml} / 100 \text{ g} \pm 4,6 \times 10^7 * 500 \text{ ml} / 100 \text{ g} = 1,26 \times 10^9 \pm 0,23 \times 10^9$ esporas/gramo									
Código:	1									
Dilución:	2									
Volumen de agua:	3									
Peso muestra:	4									
Formulación:	4									
Hongo-cepa:	[] e/ml= X*D*fc									
Fecha:	[] e/g = e/ml*V/P=									
Código:	1									
Dilución:	2									
Volumen de agua:	3									
Peso muestra:	4									
Formulación:	4									
Hongo-cepa:	[] e/ml= X*D*fc									
Fecha:	[] e/g = e/ml*V/P=									

*X=promedio del número de esporas

fc=Factor para la cámara de Neubauer = 10

OBSERVACIONES: _____

Germinación de esporas

Esta prueba establece la viabilidad del hongo y en combinación con el estimativo del número de esporas se puede calcular la cantidad de esporas viables de una formulación por unidad de peso o volumen. Este estimativo se hace con cada una de las cuatro submuestras preparadas para determinar la concentración de esporas. Se procede entonces así:

1) Se preparan de 10 a 15 ml de Agar-agua al 1,5 % sin acidificar en cajas de petri¹. Se marcan 5 puntos en la superficie externa inferior de la caja, correspondientes a los puntos en los cuales se depositarán las alícuotas

que contienen las esporas (Figura 15).

2) De la dilución 10^{-3} de cada submuestra preparada en la prueba anterior y previamente agitada, se toman 5 μ l para depositar en las cajas de petri, a razón de 5 alícuotas por caja por submuestra. Las cajas de petri inoculadas se incuban a 25 ± 2 °C durante 24 horas.

3) Transcurrido el tiempo de incubación se agrega una gota de azul de lactofenol a cada alícuota con el propósito de detener la germinación y a la vez teñir las esporas del hongo; luego se cortan las alícuotas depositándolas sobre una lámina portaobjetos (Figura 16), y se cubren con una laminilla.

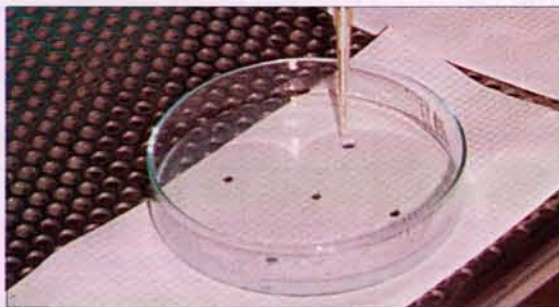


Figura 15. Depósito de alícuotas de la suspensión de esporas en la superficie del medio agar-agua al 1,5%.



Figura 16. Tinción de las alícuotas. Adición del azul de lactofenol a las 24 horas de incubación (a), remoción de la alícuota (b) y depósito en láminas de vidrio para observación al microscopio (c).



^{1/} MARÍN P. Evaluación de diferentes medios de cultivo para determinar la germinación del hongo *B. bassiana* producido en formulaciones comerciales. Informe Anual de Labores. Entomología. CENICAFÉ. 1994. 26p.

- 4) La observación se hace con el objetivo 40X contando un mínimo de 100 esporas (se registran germinadas y no germinadas) por alícuota (Figuras 17 y 18). Con los datos obtenidos en las cuatro submuestras se calcula el porcentaje de germinación (Formato 2).

Una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas. Lo anterior, debido a que al asperjar el hongo en el campo debe tener un rápido efecto sobre la población del insecto que está atacando y un corto período de exposición a condiciones ambientales adversas.



Figura 17. Aspecto microscópico (63X) de la germinación del hongo *B. bassiana* a las 24 horas de incubación en agar-agua al 1,5%



Figura 18. Aspecto microscópico (40X) de la germinación del hongo *M. anisopliae* a las 24 horas de incubación en agar-agua al 1,5%.

Prueba de pureza

La prueba de pureza tiene como finalidad establecer la proporción del agente biológico en la formulación e identificar los microorganismos contaminadores, contribuyendo a mejorar el proceso de producción y formulación de los entomopatógenos. Para realizar esta prueba se realiza el siguiente procedimiento:

- 1) Se prepara SDA más cloranfenicol (0,016%) de la siguiente manera: 0,25 gramos de cloranfenicol en 100 ml de agua destilada estéril, de esta solución se toma 1 ml que se agrega a 150 ml de SDA previo al vaciado en las cajas de

petri esterilizadas, es decir, cuando alcance una temperatura de 40 °C. El medio se vierte en cantidades de 10 a 15 ml por caja.

- 2) Luego se toman los tubos de la dilución 10^{-4} de cada una de las submuestras del patrón y se agitan en un vórtex durante un minuto; se inocula 0,1 ml en la superficie de dos cajas por submuestra (Figura 19), dispersando el inóculo con la ayuda de un rastrillo o pipeta esterilizada (Figura 20). En el caso de los productos comerciales se toma de la dilución 10^{-3} , ó 10^{-4} , dependiendo de la concentración del producto.
- 3) Las cajas inoculadas se someten a incubación a una temperatura de 25 ± 2 °C con el fin de promover el desarrollo de unidades formadoras de colonia (UFC).
- 4) Diariamente y durante 7 días se contabiliza el número de UFC de cada microorganismo en cada una de las submuestras. Al final de las lecturas, se identifican los microorganismos presentes (Figuras 21) Se anota el número de UFC estimado, el porcentaje

del entomopatógeno en estudio, otros hongos, bacterias y levaduras encontrados (Formato 3).

El porcentaje de pureza (P) se calcula de la siguiente manera:

$$\% P = \frac{\text{UFC del hongo evaluado}}{\text{UFC totales}} \times 100$$

Se considera que las formulaciones comerciales deben tener un porcentaje de pureza superior al 90%*.

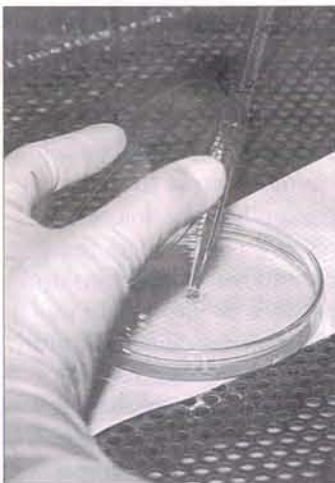


Figura 19. Adición de la suspensión de esporas del hongo sobre la superficie del medio SDA+cloranfenicol al 0,016%.

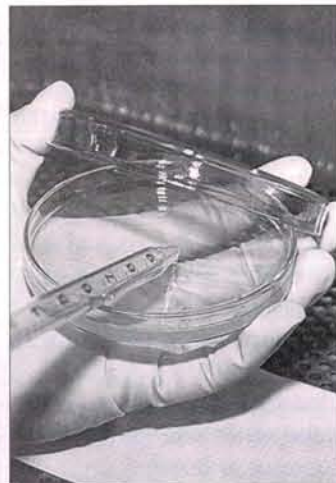


Figura 20. Dispersión del inóculo depositado en el medio con una pipeta estéril.

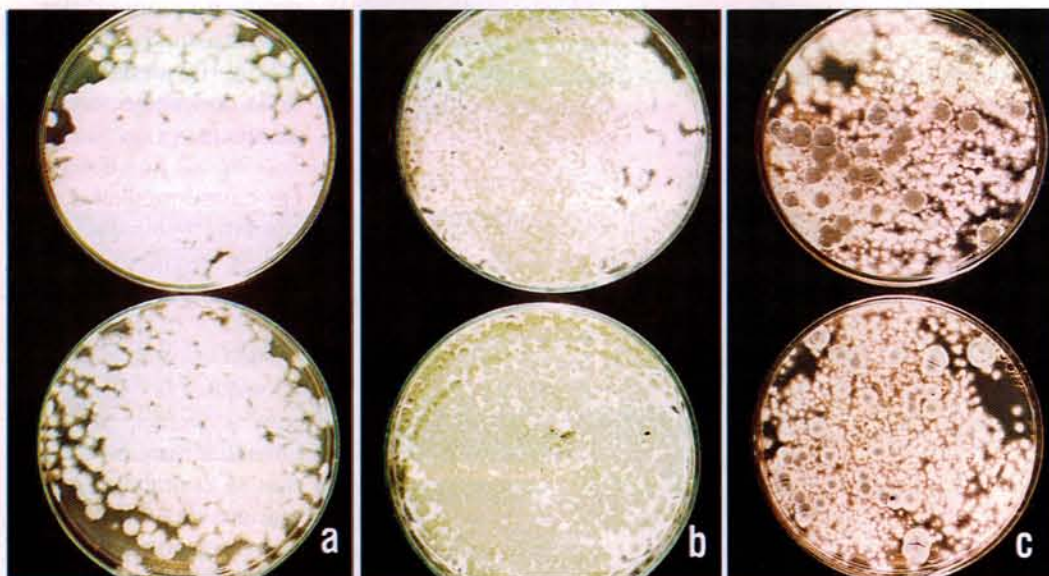


Figura 21. Hongos *B. bassiana* (a); y *M. anisopliae* (b), producidos en arroz, libres de contaminantes. *B. bassiana* en el cual se observa crecimiento del hongo contaminante *Penicillium* sp. (c).

* Los microorganismos contaminantes permisibles, no deben causar daño a la salud humana, animal, vegetal ni al medio ambiente.

FORMATO 2 . Registro y determinación del porcentaje de germinación de esporas de hongos entomopatógenos. Centicafé

Fecha: 15-03-95 Objetivo: Control de Calidad Evaluador: Patricia Popun

MUESTRA	Submuestra Lote	Número de esporas observadas por submuestra																Total G+NG	% G.	D.E.
		1		2		3		4		5		NG	G	NG	G					
		G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG									
Código: 123	1/152	98	5	101	1	102	8	135	11	173	10	559	48	601	92,09					
Dilución: 10 ⁻³	2/154	139	15	146	8	102	18	87	16	151	11	625	68	693	96,95					
Tiempo lectura: 24h	3/156	170	42	126	5	100	0	110	1	130	2	636	02	656	97,72					
Formulación: <u>Bayo</u>	4/158	91	10	100	2	121	0	100	0	104	0	516	12	528	94,23	3,67				
Hongo/copa: <u>Centicafé</u>	%G- G+NG+G																			
Fecha: <u>15-03-95</u>	1																			
Código	2																			
Dilución	3																			
Tiempo lectura	4																			
Formulación	%G- G+NG+G																			
Hongo/copa	1																			
Fecha	2																			
Código	3																			
Dilución	4																			
Tiempo lectura	%G- G+NG+G																			
Formulación	1																			
Hongo/copa	2																			
Fecha	3																			
	4																			
	%G- G+NG+G																			

* G: Esporas germinadas; NG: Esporas no germinadas.

OBSERVACIONES:

FORMATO 3. Registro y evaluación de pureza de las formulaciones de hongos entomopatógenos mediante el método de las unidades formadoras de colonias (UFC). *Cenicafé*

Muestra código: 123 Fecha inoculación : 15-03-95 Formulación: *Cepa Cenicafé*

Hongo/cepa: *Bb9205* Dilución: 10⁻⁴ Evaluador: *Patricia Marín*

Fecha de Lectura/	Submuestra Lote	Caja	UFC Total	Entomopatógeno		Hongos Contaminantes				Levaduras		Otros	
				<i>B. bassiana</i>		Penicillium sp							
				N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	1/152		1205	1200		5							
	2/154		1053	1050		3							
			892	890		2							
			951	950		1							
	3/156		1152	1150		2							
			1403	1400		3							
	4/158		1300	1300		0							
			98	980		0							
Σ			9936	8920		16							
X			1117	1115		99,82							0,17
D.E				178,9		1,6							

D.E.= Desviación estándar
Nota: Contar e identificar los organismos contaminantes.

OBSERVACIONES: _____

PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Esta es la prueba más importante en el análisis de calidad de una formulación, ya que determina si el patógeno realmente ataca la plaga para la cual está recomendado. Sin embargo, no asegura que bajo condiciones de campo su eficacia va a ser igual a la registrada en laboratorio. Requiere el

desarrollo de una metodología para criar y manipular los insectos en el laboratorio y asegurar que permanezcan vivos en el tratamiento testigo durante la prueba. Las pruebas se diseñan para proporcionar condiciones ideales en el momento de la exposición al patógeno, para que ocurra la germinación e invasión del hospedante, y en la conidiogénesis, para favorecer la esporulación del hongo sobre el insecto muerto y poder confirmar que la mortalidad se debió al tratamiento con el hongo (Figura 22).

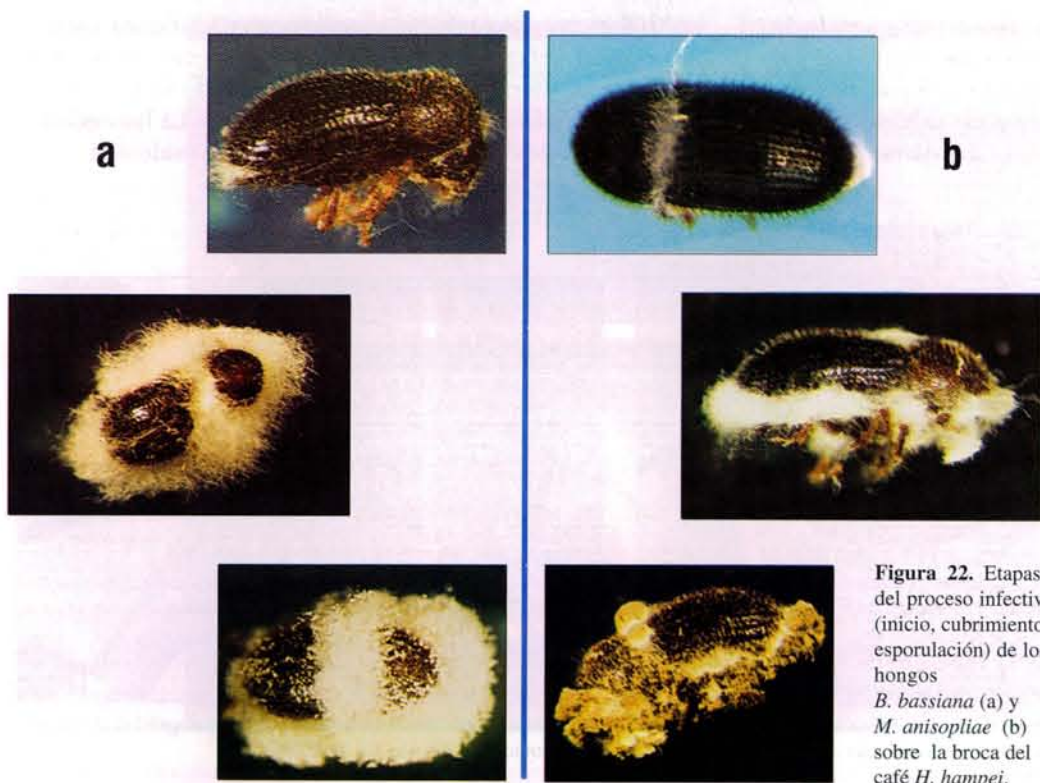


Figura 22. Etapas del proceso infeccioso (inicio, cubrimiento y esporulación) de los hongos *B. bassiana* (a) y *M. anisopliae* (b) sobre la broca del café *H. hampei*.

Procedimiento

Se seleccionan adultos de broca del café de menos de 8 días de edad, provenientes de una cría libre de patógenos. Se desinfectan previamente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante 10 minutos y se lavan en ADE usando mallas de tul esterilizadas que sirven de colador (Figura 2). De estas brocas se seleccionan las que presentan mayor actividad.

Las formulaciones que se deben evaluar se comparan con el patrón (Bb 9205). La concentración de inóculo empleado debe ser de 1×10^7 e/ml suspendidas en ADE, tanto para el patrón como para cada uno de los productos comerciales

formulados y no formulados. Para la evaluación de cada producto se toman 40 brocas al azar, distribuidas en 4 repeticiones, cada una con 10 individuos. Para cada evaluación se utiliza un testigo compuesto de adultos de broca que no entran en contacto con el hongo.

Las brocas se sumergen en una suspensión de esporas del hongo (1×10^7 e/ml), durante 2 minutos (Figura 23), la cual se mantiene en agitación manual. Luego, se coloca una broca por vial de vidrio (frasco de antibiótico), con un disco de toalla de papel previamente humedecido con ADE y se tapa con una mota de algodón esterilizada bien ajustada a la boca del vial.

Al cabo de 24 horas se adiciona, como sustrato a cada vial, un grano de café pergamino seco de agua (45% de humedad), es decir, sin ningún proceso de secado mecánico (Figura 24a).

Diariamente y durante 10 días se evalúa la mortalidad causada por el hongo en estudio, observando al estereoscopio los síntomas y signos de enfermedad en las brocas. Las brocas vivas o muertas deben permanecer en los viales para que no se interrumpa el desarrollo normal del hongo en el insecto (5). Con una jeringa desechable diariamente se adiciona ADE (Figura 24b), hasta humedecer el disco de papel evitando la presencia de agua libre. La humedad puede ser considerada

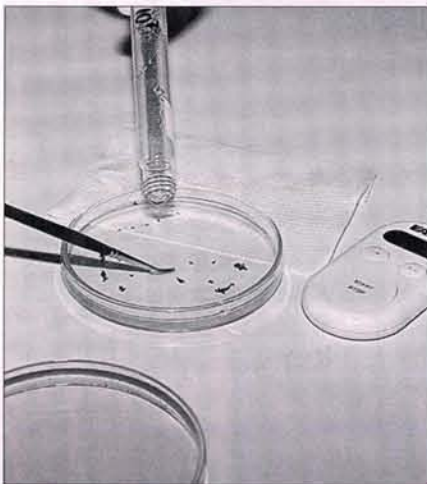


Figura 23. Inmersión de las brocas en una suspensión de esporas de concentración conocida del hongo *B. bassiana*.

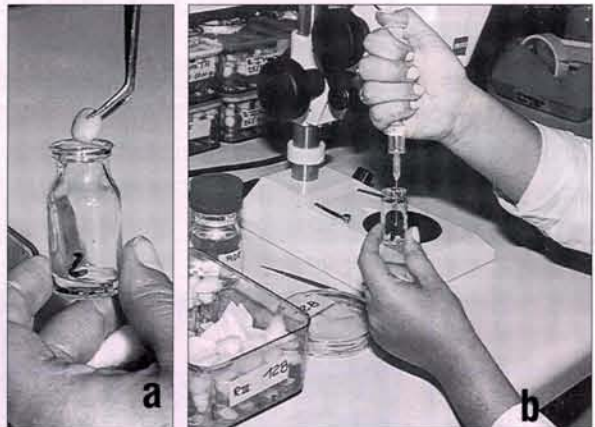


Figura 24. Procedimiento del bioensayo de patogenicidad. Adición del sustrato (a) y adición de ADE (b).

como el factor más importante en el desarrollo de una micosis en las etapas de germinación de las esporas y conidiogénesis.

Con el registro diario de patogenicidad (Formato 4) se establece el ciclo de desarrollo del hongo sobre la broca (Figura 25), el porcentaje de mortalidad (Formato 5) y el promedio del tiempo de mortalidad (Formato 6), que constitu-

yen otros criterios importantes en la calidad biológica del hongo en estudio.

El tiempo de evaluación varía para cada hongo entomopatógeno estudiado, dependiendo del ciclo biológico del hongo en el insecto y de la supervivencia del insecto no tratado bajo las condiciones del ensayo. Los productos comerciales deben causar mortalidades superiores al 80% en esta prueba.



Figura 25.
Imagen al estereoscópio de las etapas de la enfermedad causada por los hongos *B. bassiana* (a) y *M. anisopliae* (b) en la broca del café. Muerte del insecto, inicio del micelio, cubrimiento de micelio, formación de esporas y esporulación.

FORMATO 4. Registro de la mortalidad diaria y ciclo de desarrollo de los hongos entomopatógenos sobre la broca del café. Cenicafé

Muestra código: 123 Fecha de Inoculación: 18-03-95 Objetivo: Control de Calidad Repeticiones: I-II

Formulación: Copa Cimicid Hongo/cepa: B69205 Evaluador: Fabrizia Maman

Broca N°	Muerte broca		Inicio crecimiento micelio		Cubrimiento micelio		Formación esporas		Esporulación		Mortalidad otras causas	Observaciones insectos vivo
	Fecha	Días	Fecha	Días	Fecha	Días	Fecha	Días	Fecha	Días		
1	21		22		23		24		27			
2	22		-		23		24		26			
3	21		22		23		24		27			
4	21		22		23		24		27			
5	24		25		26		28		28			
6	22		23		24		25		29			
7	21		22		23		24					
8	22		23		24		25		27			
9	22		24		25		26		28			
10												
Σ% = 9 = Número de brocas muertas por el hongo. % = 90% de mortalidad por repetición												
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
Σ%												

FORMATO 5. Registro del porcentaje de mortalidad de hongos entomopatógenos sobre la broca del café. Cenicafé

Fecha: 29-03-95

Objetivo: Control de Calidad Evaluador: Felipe Morán

Código Formulación Hongos/cepa	Repetición I			Repetición II			Repetición III			Repetición IV			Σ			X			D.E
	EP	OC	N	EP	OC	N	EP	OC	N	EP	OC	N	EP	OC	N	EP	OC	N	
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
123 Cept Cenicafé Bb 4205	9	90		10	100		9	90		10	100		38	380		95	95		5,7

EP: Entomopatógeno; OC: Otras Causas

FORMATO 6. Registro del tiempo promedio de mortalidad de hongos entomopatógenos Cenicafé

Fecha: 22-03-95 Objetivo: Control de Calidad Evaluador: Patricia Morin

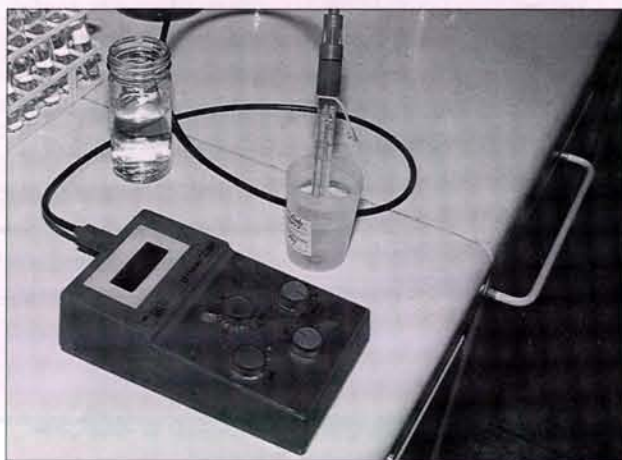
Código Formulación Hongos/cepa	Número de días evaluados											Σ	X	D.E		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11					
123/Cepa Cenicafé Bb			19	13	5	1						38	3,6	0,80		

PRUEBAS FISICOQUÍMICAS

pH

Mediante éste, se determina la acidez o la alcalinidad de una formulación. Se prepara una mezcla en proporción 1:10 (muestra: agua destilada), se homogeneiza y se deja reposar durante una hora. Con un potenciómetro (Figura 26), previamente calibrado con soluciones Buffer, se determina el pH (Formato 7). El valor del pH influye en la germinación del hongo, retardándola en valores extremos. Se consideran intervalos óptimos de pH los valores entre 5,5 y 7,0.

Figura 26.
Medida del
pH de la
formulación.



Porcentaje de humedad

Los valores de humedad encontrados en las producciones artesanales que utilizan como sustrato arroz, tanto del hongo *B. bassiana* como *M. anisopliae* son muy variables y oscilan entre el 30 y el 80%, y en general no afectan la germinación y patogenicidad de los hongos. Humedades mayores del 80% proporcionan condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos tales como bacterias y levaduras que entran a competir con el agente biológico y reducen su viabilidad.

En el caso de productos liofilizados o formulados en inertes como talco, bentonita, leche y tierra de diatómaceas, se presentan porcentajes de humedad entre 3,0 y 15%, que retardan ligeramente el proceso de germinación.

La determinación de humedad se puede realizar mediante la utilización de un desecador infrarrojo LJ-16, al cual se le adapta un sensor que registra la pérdida de humedad del producto cada 5 minutos y compara la lectura actual con la anterior hasta el momento en que se estabiliza la humedad,

FORMATO 7. Determinación de pH, humedad y humectabilidad de las formulaciones de hongos entomopatógenos *Cenicafé*

Objetivo: *Control de Calidad*

Evaluador: *Eduardo Osorio*

Fecha Prueba	Formulación		pH	% Humedad Equipo: Determinador Infrarrojo LJ-16	Humectabilidad (Tiempo)
	Cód.	Nombre/Cepa			
15-03-95	123	<i>Cepa Cenicafé Bb 9205</i>	7,2	52,65	—
17-03-95	125	<i>Brocaril</i>	8,07	1,11	60 min

registrando el porcentaje de pérdida o estableciendo previamente los tiempos de secado de acuerdo al producto inerte, ej: sustrato arroz 70 minutos, y talcos o bentonitas 40 minutos (Formato 7).

Otra forma de determinar la humedad se consigue secando una cápsula de porcelana a 150 °C durante dos horas. Se toma luego con una pinza metálica y se coloca a enfriar durante 30 minutos en un desecador de vidrio con cloruro de calcio, el cual favorece la presencia de humedad constante. Transcurrido este tiempo, se pesa la cápsula vacía (PC) en una balanza analítica y se toma una muestra de 1g de formulación que se deposita en la cápsula. Luego se registra su peso (Peso Cápsula + Muestra Húmeda= PCMH). Posteriormente, la cápsula más la muestra húmeda se lleva a la estufa a 105 °C, durante 24 horas. Al finalizar el secado, se saca de la estufa y se traslada a un desecador durante 30 minutos. Por último, se pesa la cápsula más la muestra seca (Peso Cápsula + Muestra Seca, PCMS) (Formato 8).

Figura 27. Adición de la formulación del hongo entomopatógeno a un volumen determinado de agua destilada para la prueba de humectabilidad.



destilada (Figura 27). Con un cronómetro se mide el tiempo transcurrido entre el momento de agregar la muestra y el instante en que ésta desaparece de la superficie (Formato 7). Esta prueba se realiza sólo a productos industriales formulados en polvos (Figura 28), talcos, bentonitas, tierra de diatomáceas y leche, entre otros.

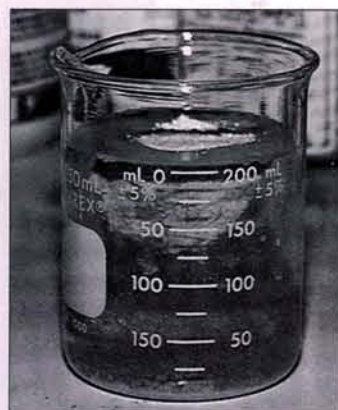


Figura 28. Muestra de un bioinsecticida en polvo sometida a determinación de humectabilidad en el laboratorio.

El porcentaje de humedad se determina como en el siguiente ejemplo:

PC = 10,8919 g
 PCMH = 20,7688 g
 PCMS = 20,7220 g
 Peso húmedo (PH) = (PCMH)-(PCMS) = 0,0468 g
 Peso muestra (PM)= (PCMH)-(PC) = 9,8769

Porcentaje de humedad = % H = PH x 100/PM

% H = 0,0468 x 100 / 9,8769 = 0,47%

Humectabilidad

Determina el tiempo que tarda un polvo mojable en humedecerse completamente. Para esto, se pesan 5 g de la formulación que se va a evaluar y se depositan en un punto fijo en la superficie de un vaso de precipitado de 250 ml y 7 cm de diámetro interno, que contiene 200 ml de agua

FORMATO 8. Determinación de la humedad de formulaciones de hongos entomopatógenos Cenicafé

Fecha: 15-03-95

Evaludador: Eduardo Osorio

Codigo	FORMULACIÓN NOMBRE/CEPA	PC=Peso capsula (g)	PCMh=PC + Muestra húmeda (g)	PCMS=PC+ Muestra seca (g)	PH=Peso húmedo = PCMh-PCMS	PM= Peso muestra= PCMh-PC	% H = PH X 100 / PM
128	Cepa Cenicafé	10,2848	16,5761	14,0353	2,5408	6,23130	$\frac{2,540 \times 100}{6,2313} = 40,30\%$

OBSERVACIONES:

Susceptibilidad

Determina la concentración de esporas del producto en suspensión después de un tiempo de preparación la mezcla, con el fin de asegurar la homogeneidad de la concentración del producto durante la aspersión. Se procede como sigue:

- 1) Para el patrón de referencia (Bb 9205) se utiliza el hongo producido en arroz con 25 días de desarrollo (aislamiento reactivado en broca e incubado a 25 ± 2 °C). Con este hongo se prepara una suspensión adicionando a una botella (100 g de arroz con hongo) 10 ml de aceite de uso agrícola y un poco de agua destilada estéril, removiendo las esporas con la ayuda de una espátula.
- 2) Se vierte la suspensión en un erlenmeyer y se completa hasta un litro, adicionado agua destilada. Así se obtiene la suspensión madre (SM).
- 3) De la suspensión madre se toman 50 ml y se llevan a un volumen total de un litro (suspensión de esporas (SE)), conservando la relación gramo de producto

formulado por volumen de agua recomendado (100 g de arroz con hongo/20 L de agua), en aspersiones en el campo (Figura 29).

- 4) Se agita el volumen total de la suspensión de esporas, se filtra a través de una malla 60 mesh o colador de red pequeña que permita solamente el paso de las esporas del hongo y elimine los residuos de arroz. Se agita la muestra, se toma 1 ml y se lleva a un tubo con 9 ml de ADE (10^{-1}), realizando las diluciones respectivas. Se cuentan las esporas en el hemocitómetro y se calcula la concentración inicial (CI) de esporas por mililitro en el volumen total de la suspensión.
- 5) El volumen restante de la suspensión se distribuye en cuatro probetas de 250 ml, agitando previamente. Se dejan en reposo en un sitio que no esté sometido a vibraciones o movimientos que alteren el proceso de sedimentación normal de las esporas.
- 6) Al cabo de 50 minutos se introduce lentamente

a cada una de las probetas, una pipeta de 10 ml, cuya punta penetre 15 cm desde la graduación superior de la probeta. De este sitio se toman 10 ml de la suspensión de esporas y se depositan en tubos de vidrio (Figura 30).

- 7) A partir de estas suspensiones se preparan diluciones (10^{-1} , 10^{-2} ó la dilución que permita el conteo de esporas), preferiblemente la dilución en la cual se efectuó el conteo para determinar la concentración inicial. Se hace el recuento de esporas en el hemocitómetro tres veces consecutivas, para un total de seis lecturas, estableciendo la concentración final (CF). Con esta información proveniente de las cuatro probetas, se calcula el promedio de esporas presentes en cada una de las suspensiones del patrón (Formato 9).

La susceptibilidad de formulaciones en otros portadores se determina en forma similar, teniendo en cuenta la dosis y el volumen por área, recomendado por el fabricante, para establecer la concentración del producto.

El volumen final de la suspensión que se va a evaluar debe mantener la misma relación gramo de producto formulado por volumen de agua recomendado.

La suspensibilidad de las preparaciones y formulaciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* se calcula considerando el número de esporas por mililitro presentes al cabo de 50 minutos, teniendo como base la concentración de esporas de la suspensión inicial. De esta forma, se obtiene el porcentaje de esporas suspendidas en cada una de las preparaciones y formulaciones del hongo.

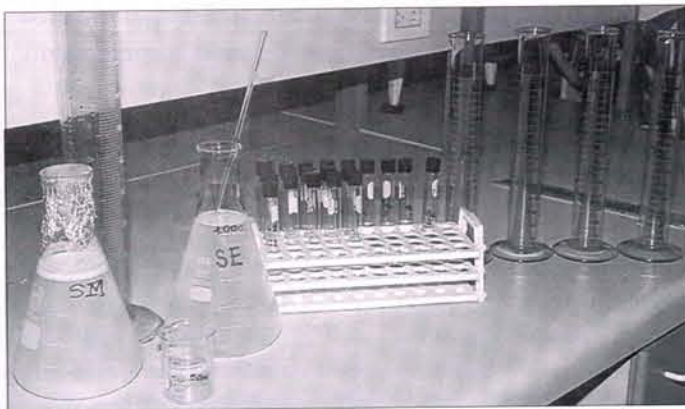


Figura 29. Suspensión de esporas (SE) a partir de la cual se establece la relación de esporas al tiempo cero (concentración inicial (CI)) y a los 50 minutos (concentración final (CF)) en la prueba de suspensibilidad

Figura 30. Toma de 10 ml de la suspensión de esporas de cada submuestra para la determinación de la concentración final en la prueba de suspensibilidad.



La fórmula que se debe aplicar para el % de suspensibilidad es:

$$\% \text{ Suspensibilidad (\% S)} = CF \times 100 / CI$$

Ejemplo:

$$6,5 \times 10^7 \text{ e/ml (concentración inicial (CI))} - 100\%$$

$$4,4 \times 10^7 \text{ e/ml (concentración final (CF))} - X$$

$$X = 67,7$$

En donde: X= 67,7%, es el porcentaje de esporas suspendidas al cabo de 50 min, lo que corresponde al tiempo que se demora una aspersora de 10 litros de presión previa retenida, para evacuar su contenido con una boquilla de 190 cc/min de descarga.

FORMATO 9. Evaluación de la sensibilidad de hongos entomopatógenos *Cenicafé*

Objetivo: *Control de Calidad* Evaluador: *Sabiría Marín*

MUESTRA	Submuestra	Lectura en cámara						Σ	\bar{X}	Concentración e/ml	% Susceptibilidad $\%S = \frac{CF \times 100}{CI}$
		1	2	3	4	5	6				
Fecha: <i>03-15-95</i> Código: <i>123</i> Formulación: <i>Cepa Cenicafé</i> Hongo/cepa: <i>B6 9205</i> Dilución: <i>10⁻²</i>	CI	13	8	9	11	10	13	64	10,66	$10,6 \times 10^6$	$\frac{9,11 \times 10^6}{10,6 \times 10^6} \times 100$
	CF1	7	11	15	7	12	10	62	10,33	$10,3 \times 10^6$	= 89% Susceptible
	CF2	11	8	9	8	10	8	54	9	9×10^6	
	CF3	9	12	10	7	7	11	56	9,33	$9,33 \times 10^6$	
	CF4	7	8	10	12	10	8	55	9,16	$9,11 \times 10^6$	
	ΣIX										
Fecha: Código: Formulación: Hongo/cepa: Dilución:	CI										
	CF1										
	CF2										
	CF3										
	CF4										
	ΣIX										

CI : Concentración inicial
 CF: Concentración final

OBSERVACIONES:

Taponamiento de boquillas

El objetivo de esta prueba es evaluar si las formulaciones comerciales originan taponamiento de las boquillas en los equipos de aspersión. Los equipos de aspersión más utilizados en la zona cafetera son los de presión previa retenida y de palanca, utilizados con boquillas de baja descarga (TX-3, HC-3), con un flujo de 190 cc/minuto y a 40 lb/pulg² de presión. Las formulaciones utilizadas no deben causar taponamiento de estas boquillas (Figuras 31 y 32), por tanto, debe realizarse la siguiente prueba:

- 1) Suspender la muestra en agua de acuerdo con las recomendaciones de la etiqueta del producto.
- 2) Homogeneizar la mezcla y verter a la aspersora completando el volumen con agua (Figura 33).

- 3) Asperjar la mezcla, llevando un registro acerca de la cantidad de producto descargado por minuto, inmediatamente después de cargada la aspersora (tiempo 0), a los 25 y 50 minutos de operación del equipo (Figura 34).
- 4) Una vez finalizado el proceso se observa si

ocurre taponamiento de la boquilla y si se encuentran restos de la mezcla en los filtros de la bomba (Formato 10).

Las variaciones en la descarga (cantidad/minuto), en los diferentes tiempos de evaluación, son consecuencia del taponamiento originado por la mezcla cuando obstruye la boquilla y los filtros del equipo.



Figura 31. Aspersión de un bioinsecticida con un equipo de aspersión de presión previa retenida (40-100-10) muy utilizado en la zona cafetera. El producto es dirigido a las ramas productivas del árbol de café.



Figura 32. Flujo normal de un producto bioinsecticida a través de una boquilla.



Figura 33. Depósito de la mezcla del hongo en el tanque de la aspersora, para la prueba de taponamiento de boquillas.

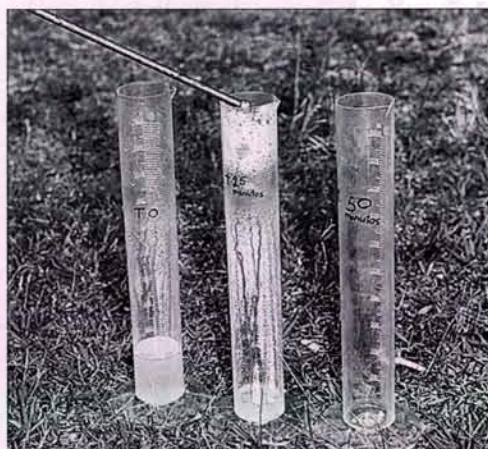


Figura 34. Volumen recuperado en los tiempos de descarga 0, 25 y 50 minutos de operación del equipo (Prueba de taponamiento de boquilla).

FORMATO 10. Registro de la descarga de productos en la prueba de taponamiento de boquillas por formulaciones de hongos entomopatógenos usando equipos de aspersión. *Cenicafé*

Objetivo: Control de Calidad Equipo/Boquilla: Colimax Leo Evaluador: Eduardo Osorio
Orjetra HC3

Fecha	Formulaciones Código/ Nombre/Cepa	Dosis Producto Comercial	Descarga (ml/minuto)			Tiempo descarga bomba	Observaciones Taponamiento boquilla, disminución descarga, etc.
			0	25	50		
15-03-95	128/Benicial-	200g/lm ó 1g/L	170	170	170	56 minutos	

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los datos de cada prueba se consolidan en el Formato 11, para presentar la información al usuario y mantener un archivo de las evaluaciones realizadas en el laboratorio. En este registro se debe anotar, en la sección de observaciones, informa-

ción pertinente que contribuya a tener un mejor conocimiento del entomopatógeno objeto de la investigación y producción.

Las pruebas de calidad se deben realizar en todas las etapas, tanto de producción como de distribución y almacenamiento de las formulaciones de los hongos, para contar con información que permita corregir los factores que deterioran la calidad. De esta forma, las pruebas ayudan a mantener los estándares de calidad de los productos.

FORMATO 11. Control de calidad para formulaciones de bioinsecticidas Cenicafé

Muestra código: 123 Entomopatógeno: B. bassiana Cepa CENICAFÉ: Bb 9205
 Nombre formulación: Cepa Cenicafé Cantidad recibida: 400 gramos
 Procedencia: Unidad Producción de Cenicafé
 Fecha recibo: 12-03-95 Fecha inoculación: 16-02-95 Fecha análisis: 15-03-95

1. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.

1.1 Concentración (\bar{X}): $1,26 \times 10^9 \pm 0,23 \times 10^9$ esporas/gramo

1.2 Germinación (\bar{X}): $94,23 \pm 3,67\%$ a las 24 horas. Esporas contadas: 2.000

1.3 Pureza		Dilución	UFC	%
Entomopatógeno	<i>Beauveria bassiana</i>	10^{-4}	1115	99,82
Contaminantes	<i>Penicillium sp.</i>		2	0,17

2. PATOGENICIDAD.

Especie: *Hypothenemus hampei* Estado: Adulto Concentración: 1×10^4 esporas/ml
 Mortalidad (\bar{X}): $95 \pm 5,7$ % Tiempo promedio de mortalidad: $3,6 \pm 1,8$ días

3. PRUEBAS FISCOQUÍMICAS.

pH: 7,2 Humectabilidad _____ minutos Suspensibilidad: 89 % a los 50 minutos.

Humedad 52,65 % Taponamiento de boquilla: Si _____ No _____ minutos _____

Equipo _____ Boquilla _____

OBSERVACIONES : _____

FECHA 25-03-95

FIRMA _____

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a los Microbiólogos Armando Rivera M., Juan Carlos López N. y a la Bacterióloga Martha Gladys Bernal U. por su colaboración en la revisión del documento y al personal de apoyo del centro por su colaboración en la ilustración del texto.

LITERATURA CITADA

1. ALVES, S. B. Fungos entomopatogénicos. *In*: ALVES, S.B. ed. São Paulo, Editora Manole Ltda. 1986 p. 73-126
2. ANTÍA, O. P.; POSADA, F. J.; BUSTILLO, A. E.; GONZÁLEZ, M. T. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Avances Técnicos Cenicafé* No. 182:1-12. 1992
3. BURGÉS, H. D. The standardization of products based on *Bacillus thuringiensis*. *In*: VAN DER LAAN, ed. *Insect pathology and Microbial control*. Amsterdam. North Holland Publishing Co., 1967. p. 306-312
4. BURGÉS, H. D. Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. *In*: BURGÉS, H. D. ed. *Microbial control of pests and plant diseases. 1970-198*, London, Academic Press. 1981. p. 737-767
5. GONZÁLEZ, M. T.; POSADA, F. J.; BUSTILLO, A. E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 44(3): 93-102. 1993
6. HABIB, M. E. M. Padronização de inseticidas microbianos. *In*: ALVES S. B. ed. *Controle microbiano de insetos*. São Paulo. Editora Manole Ltda. 1986. p. 289-296
7. HALL, R. A.; ZIMMERMANN, G.; VEY, A. Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticides. *Entomophaga* 27(2): 121-127. 1983.

8. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO ICA.
Normas del ICA en materias de insumos agrícolas.
Santafé de Bogotá D.C., Noviembre 7 de 1995. 44p.
9. KHLOPTSEVA, R. I. The use of microbial preparations in the USSR. *Biocontrol News and Information* 13 (2):29N-32N. 1992.
10. LIPA, J. L. Update: microbial pest control in Eastern Europe. *The IPM Practitioner* 12(2): 1-5. 1990.
11. MAAS GEESTERANUS, H. P.; NOORDINK, J. Ph. W.; VAN DEN ANKER, C. A. A bioassay to characterize strains and preparations of *Bacillus thuringiensis* Berliner. In: VAN DER LAAN, P. A. ed. *Insect Pathology and Microbial Control*. Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1967. p. 302-306
12. McCOY, C. W.; TIGANO-MILANI, M. S. Use of entomopathogenic fungi in biological control: a world view. *Pesq. Agropec. Bras.*, 27: 87-93. 1992.
13. MÜLLER-KÖGLER, E. On mass cultivation, determination of effectiveness, and standardization of insect pathogenic fungi. In: VAN DER LAAN, P. A. ed. *Insect Pathology and Microbial Control*. Amsterdam, North Holland Publishing Co., 1967. 360 p.
14. POSADA, F. J.; ANTÍA, O. P.; BUSTILLO, A. E. Estandarización de las pruebas de control de calidad para la formulación de bioplaguicidas. In: CONGRESO SOCOLEN, 19. Manizales, Julio 15-17. *Memorias, Manizales, SOCOLEN*, 1992. p. 97.
15. ROSSET, P.; PEREZ, C.; LACAYO P., L. I.; JIMENEZ, C. M., WRIGHT, J. Avances en investigación sobre formulaciones del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin para el manejo del picudo de algodón y la broca del café. In: REVISIÓN interna anual 1990. Turrialba (Costa Rica), CATIE. Programa Mejoramiento de Cultivos Tropicales, 1991. 26p.