

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Escuela Académico Profesional de Biología Microbiología**

**EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS PARA LA  
PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS POR  
FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO.**

Tesis presentada por:

**Bach. Franck Stiward Alvarez Joaquín**

Para optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO MICROBIÓLOGO**

Tacna - Perú  
2013

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 204

TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO –MICROBIÓLOGO

El Secretario Académico de la Facultad de Ciencias, certifica que mediante la resolución de la Facultad N° 7595 - 2013 - FACI/UNJBG se ha designado como jurado calificador para la sustentación de la tesis: "EVALUACIÓN DE SUSTRATOS ORGÁNICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS POR FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO", conformado por:

<b>PRESIDENTE:</b>	MSc. César E. Rivasplata Cabanillas
<b>SECRETARIO:</b>	Mgr. Roberto Castellanos Cabrera
<b>VOCAL:</b>	Mblgo. Luis Lloja Lozano

Quienes calificaron el trabajo de tesis sustentado en acto público el día 13 de Diciembre del 2013, a las 11:00 horas, por el Bachiller FRANCK STIWARD ALVAREZ JOAQUÍN, de la Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología, para optar el título profesional de Biólogo - Microbiólogo.

El jurado calificador en forma secreta e individual, se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto, procediendo a emitir el siguiente resultado:

Aprobado por unanimidad con la nota de 17 (DIECISIETE) con el calificativo de sobresaliente.

Para ratificar firma:



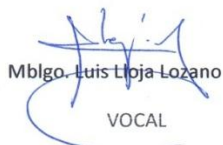
MSc. César Efraín Rivasplata Cabanillas

PRESIDENTE



Mgr. Roberto Castellanos Cabrera

SECRETARIO



Mblgo. Luis Lloja Lozano  
VOCAL

## ÍNDICE GENERAL

<b>INDICE</b> .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iv
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN .....	vi
INTRODUCCION .....	1
HIPÓTESIS .....	4
OBJETIVOS.....	5
Objetivo General .....	5
Objetivos Específicos .....	5
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	6
2.1 Aspectos generales del control biológico.....	6
2.1.1 Control biológico.....	6
2.1.2 Clasificación de los controladores biológicos.....	6
2.1.3 Importancia .....	7
2.1.4 Mecanismos de control biológico .....	8
2.2 Generalidades de los hongos entomopatógenos .....	13
2.2.1 Importancia y características.....	13
2.2.2 Clasificación .....	15
2.2.3 Mecanismo de acción .....	17
2.3 Generalidades del genero <i>Paecilomyces</i> .....	23
2.3.1 <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> .....	25
2.3.2 Morfología .....	27
2.3.3 Clasificación taxonómica.....	28
2.4 Generalidades del genero <i>Lecanicillium</i> .....	29
2.4.1 <i>Lecanicillium lecanii</i> .....	30
2.4.2 Morfología .....	32

2.4.3	Clasificación taxonómica.....	34
2.5	Generalidades del género <i>Metarhizium</i> .....	34
2.5.1	<i>Metarhizium anisopliae</i> .....	35
2.5.2	Morfología .....	36
2.5.3	Clasificación taxonómica.....	37
2.6	Importancia de los hongos entomopatógenos .....	38
2.7	Producción de hongos entomopatógenos.....	39
2.7.1	Métodos de producción .....	39
2.7.2	Métodos de producción <i>in vitro</i> .....	41
2.7.3	Factores que afectan la fermentación .....	48
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.1	Lugar de experimentación .....	59
3.2	Material en estudio .....	59
3.2.1	Material biológico .....	59
3.3	Diseño de Investigación .....	59
3.4	Metodología .....	60
3.4.1	Etapa prefermentativa.....	60
3.4.2	Etapa fermentativa.....	63
3.4.3	Evaluación de variables .....	64
3.5	Análisis estadístico .....	66
	RESULTADOS .....	67
	DISCUSIÓN .....	98
	CONCLUSIONES .....	118
	RECOMENDACIONES .....	120
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	121
	ANEXOS .....	135

## **AGRADECIMIENTOS**

Al profesor M. Sc. Daladier Castillo Cotrina, por su asesoramiento en el presente trabajo, por compartir sus conocimientos y experiencias, por sus orientaciones para ser un verdadero profesional.

A mis profesores, por su contribución en la adquisición de conocimientos y apoyo invaluable en mi desarrollo académico y personal.

A todos mis compañeros y amistades que me brindaron su afecto y comprensión durante mis estudios universitarios y para la realización de la presente tesis.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, por su amor y apoyo incondicional;  
por guiarme constantemente por el camino correcto y  
motivarme a seguir cumpliendo cada uno de mis sueños.*

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la producción de conidias de tres hongos entomopatógenos: *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*, en cinco sustratos orgánicos: arroz, trigo, cebada, sorgo y maíz chancado, bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de 26°C, 76% de humedad relativa y un fotoperiodo de 14/10 durante 17 días. El método de producción fue por fermentación en sustrato sólido para lo cual se colocaron 200 gramos de sustrato previamente hidratado y esterilizado en una bolsa de polipropileno, donde se inoculó 5 ml de una suspensión conteniendo  $10^6$  ufc/ml del hongo entomopatógeno en evaluación.

Se determinó que *Isaria fumosorosea* presenta la mayor producción de conidias en el sustrato arroz con  $8,47 \times 10^9$  ufc/g y una humedad de 58,21%, *Metarhizium anisopliae* en el maíz chancado con  $2,35 \times 10^{10}$  ufc/g y una humedad de 52,31%, mientras que *Lecanicillium lecanii* produjo la mayor concentración de conidias en el arroz con  $2,66 \times 10^9$  ufc/g a 53,54% de humedad en 17 días de fermentación.

Las conidias de *Isaria fumosorosea* producidas en el arroz, presentan el mejor porcentaje de germinación con 96,91%; mientras que *Metarhizium anisopliae* lo hace en los sustratos maíz y arroz con 94,85% y 94,74% respectivamente; las conidias de *Lecanicillium lecanii*, producidas en los sustratos maíz y trigo presentan los mejores porcentajes de germinación con 97,51% y 94,66% respectivamente, a 26°C durante 18 horas.

## I. INTRODUCCIÓN

Una de las alternativas para reducir el uso excesivo de insecticidas y evitar daños secundarios al ecosistema es la utilización de organismos entomopatógenos como los virus, hongos, bacterias, protozoarios y nematodos los cuales tienen la capacidad de reducir las poblaciones de insectos plaga (Monzón, 2001; Alves, 1998).

Factores como el aumento de resistencia de insectos a insecticidas y efectos adversos en el uso generalizado de químicos en el control de plagas han fomentado el uso de los hongos entomopatógenos como reguladores naturales y sustitutos potenciales de los insecticidas químicos (Viniestra *et al.*, 2003; Monzón, 2001).

Los hongos son marcadamente superiores a otros microorganismos puesto que generalmente no son específicos en su acción sobre insectos, lo que les confiere importancia en el control de un amplio rango de insectos plagas. los géneros más importantes para el control son: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora*, *Verticillum*, *Isaria* y *Zoophthora* (Elósegui, 2006).

El uso de estos hongos contra insectos fue sugerido desde hace mucho años, cuando en 1879, *Metarhizium anisopliae*, se utilizó para el control del picudo de la remolacha *Cleonus punctiventis* (García, 1996). El rango de hospedantes de algunos géneros de hongos entomopatógenos es variable, y tiende a ser más común en áreas tropicales, en las cuales factores tales como la temperatura y la humedad relativa favorecen su crecimiento. Sin embargo pueden encontrarse en áreas templadas (Rogg, 2000).

Aunque se reconoce la potencialidad de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico, en el Perú, aún no han sido ampliamente utilizados como micoinsecticida, debido a la carencia de información técnica por parte de las entidades responsables del manejo de las plagas y enfermedades, y los beneficios que pueden originar estos microorganismos a nivel de diferentes áreas afectadas por plagas (Pacheta *et al.*, 2006).

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato natural. Hasta la fecha a nivel de países de Latinoamérica como Nicaragua, Cuba, Colombia y Brasil, se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales abundantes de encada localidad, pero el más utilizado es el arroz y trigo, así mismo se han

hecho muchos avances en los métodos de producción artesanal e industrial (Robinson *et al.*, 2002).

La mayoría de las especies de hongos son producidas por fermentación en sustrato sólido empleando como base granos de cereales y leguminosas, donde el hongo crece como micelio superficial y produce conidias en hifas aéreas, pero según algunos autores la producción de hongos bajo este sistema dificulta la automatización del proceso y se han propuesto métodos de producción en dos fases, en el que los cultivos sumergidos son utilizado para producir una gran cantidad de micelio, el cual es colocado después sobre un sustrato sólido para obtener las conidias necesarios (Assaf *et al.*, 2006; Elias, 2002).

A pesar de que algunos investigadores consideran la fermentación en sustrato sólido como una técnica bastante artesanal porque demanda mucho espacio, tiempo, sustrato y dinero, es una de las más difundidas y utilizadas a nivel mundial incluso se está en la búsqueda de nuevos sustratos que puedan adecuarse a este sistema para la masificación de conidias (Matos, 2008).

En el presente trabajo se evaluó la producción de conidias de tres hongos entomopatógenos: *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium leccanii*, sobre cinco tipos de sustratos naturales como son el arroz, sorgo, maíz chancado, cebada y trigo, bajo el método de fermentación en sustrato sólido, como una alternativa para ser empleada como sustrato base en la masificación de conidias de diferentes hongos que permita aminorar los costos de producción.

## **PROBLEMA**

### **1.1 Enunciado del problema**

¿Cuál es la producción y el porcentaje de germinación de conidias de hongos entomopatógenos desarrollados en los sustratos orgánicos: arroz, trigo, cebada, sorgo y maíz chancado por fermentación en sustrato sólido?

### **1.2 HIPOTESIS**

Se obtiene mejor producción y porcentaje de germinación de conidas de hongos entomopatógenos en uno de los sustratos orgánicos: arroz, trigo, cebada, sorgo y maíz chancado por fermentación en sustrato sólido.

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **1.3.1 Objetivo general:**

Evaluar diferentes sustratos orgánicos para la producción de hongos entomopatógenos por fermentación en sustrato sólido

#### **1.3.2 Objetivos específicos:**

- Determinar la producción de conidias de los hongos entomopatógenos *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*, en los granos de arroz, cebada, trigo, sorgo y maíz chancado.
- Establecer el sustrato orgánico con mejor producción de conidias.
- Evaluar el porcentaje de germinación de las conidias producidas.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 ASPECTOS GENERALES DEL CONTROL BIOLÓGICO**

#### **2.1.1 CONTROL BIOLÓGICO**

Se define como el uso de organismos naturales o modificados genéticamente, genes o sus productos para reducir los efectos de organismos considerados plagas (Gabriel & Cook, 1990; Gonzales *et al.*, 2012).

#### **2.1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS CONTROLADORES BIOLÓGICOS**

##### **Entomófagos:**

Los insectos entomófagos son insectos que se alimentan de otros insectos ya sea matándolo o comiéndolo vivo. Existen un gran número de insectos entomófagos y el mecanismo más conocido es la predación, donde cazan y matan para comerlo una vez muerto (Gonzales *et al.*, 2012; Monzón, 2001).

Otros se alimentan mientras la presa está viva, estos son los parásitos, que obtienen sus nutrientes de uno vivo llamado hospedador. Existe un punto intermedio entre estos dos que son los llamados parasitoides que obtienen los nutrientes de un organismo vivo

(hospedador) pero finalmente lo matan. Son parasitoides en etapa larval y completan la etapa en un solo hospedador. Los predadores pueden ser formas inmaduras o adultas y las presas van a ser menores o iguales que su tamaño así se les facilita su captura. Los predadores más grandes toman presas más grandes y los pequeños, presas más pequeñas (Rogg, 2000).

### **Entomopatógenos:**

Los entomopatógenos son organismos capaces de provocar enfermedades y muerte a muchos insectos, actualmente se conocen más de 1500 especies de entomopatógenos, constituidos por bacterias, hongos, virus y nematodos; no obstante, sólo unos pocos han sido bien estudiados y se reproducen masivamente para ser usados en programas de control biológico (Montesinos, 2008; Fernández, 2002; Monzón, 2001, Rogg, 2000).

### **2.1.3 IMPORTANCIA**

El empleo de microorganismos como insecticidas biológicos (bacterias, hongos y virus) ha tomado tal relevancia que en la actualidad en diferentes países ya se emplean productos comerciales elaborados a base de estos organismos. Se conocen más de 100,000 especies de

microorganismos con potencial microbiano hacia poblaciones de insectos plagas en diferentes sectores: agrícolas, forestal y salud. Dentro de estas especies se encuentran 750 hongos, 700 virus, 300 protozoos y aproximadamente 100 bacterias (Rodríguez *et al.*, 1998; Rogg, 2000).

#### **2.1.4 MECANISMOS DE CONTROL BIOLÓGICO**

De acuerdo a Chávez *et al.* (2009), hay muchas formas de mecanismos en las que pueden operar los microorganismos, los que no son iguales en todos los casos; así un mismo aislado puede proteger simultáneamente por varios mecanismos. Entre estos mecanismos cabe destacar: Capacidad de colonización y forma de inoculación; competencia con los patógenos en el mismo nicho ecológico; competencia por nutrientes; producción de compuestos inhibidores o antibiosis; fungistasis; micoparasitismo; transmisión de virus e inducción de mecanismos generales de resistencia en las plantas (Chávez *et al.*, 2009).

##### **Colonización e inoculación**

La colonización de una planta por microorganismos solo puede ocurrir por inóculos existentes en su medio ambiente o bien traídos por

el viento, el agua, los animales o incorporados artificialmente por el hombre.

El concepto de potencial de un inóculo es la suma de todos los factores que contribuyen a la energía necesaria para la infección de una planta por un patógeno. Este potencial determina la cantidad de enfermedad producida y está ligado en principio a la cantidad de un microorganismo existente en un sistema, a mayor cantidad más facilidad para que la planta resulte infectada por un patógeno o protegida, si se trata de un agente de biocontrol (Doelle *et al.*, 2007).

Se necesita un valor mínimo de inóculo para que la planta pueda ser infectada por un patógeno. Para salvar los sistemas de defensa de la planta en términos generales se necesitan varios ataques simultáneos en diferentes puntos o varios propágulos en el mismo punto de forma que por debajo de una cierta densidad de inóculo no hay infección y por encima de un valor umbral, la infección progresa rápidamente. El potencial del inóculo varía con el patógeno y con la planta, dependiendo de la virulencia y resistencia de ambos respectivamente (Domenech, 2000).

## **Competencia**

La competencia surge cuando al menos dos organismos requieren la misma cosa y el uso por uno reduce la cantidad disponible para el otro. La competencia puede ser por los sitios de infección, donde la ocupación de dichos sitios por un microorganismo impide la colonización por otro o bien por determinados nutrientes. En la competencia por nutrientes o bien un microorganismo posee un mecanismo de absorción mejor o posee enzimas extracelulares más activas, de forma que uno obtiene más nutrientes y crece, mientras que el otro no obtiene nutrientes suficientes para crecer (Mitchell *et al.*, 2002; Magara *et al.*, 2004).

## **Antibiosis**

La lisis celular debida a enzimas o metabolitos de otros organismos (exólisis) se puede producir por la producción por parte de un microorganismo competidor de antibióticos, que normalmente actúan a muy bajas concentraciones (Magara *et al.*, 2004).

Hay antibióticos volátiles y otros productos tóxicos también volátiles capaces de afectar el crecimiento de las células, como el etileno o el cianuro de hidrógeno que también actúan a bajas

concentraciones, aunque estos productos no se consideran antibióticos en sentido estricto (Bernard & Janes, 2009).

### **Micoparasitismo**

El antagonismo puede operar simplemente usando el patógeno como fuente de alimento, si el patógeno es un hongo y el antagonista un micoparásito que normalmente es capaz de romper la pared celular del hospedador con quitinasas o glucanasas o bien si el patógeno es un oomiceto (*Pythium*, *Phytophthora*, etc.) que además necesitará celulasas (Cañedo & Ames, 2004; Elósegui, 2006).

Los micoparásitos mejor conocidos son los del género *Trichoderma*, que se están usando comercialmente contra muchos patógenos de suelo. Las hifas de *Trichoderma* penetran tanto las estructuras de supervivencia como esclerocios o hifas en estado de crecimiento (Cañedo & Ames, 2004).

Las hifas del micoparásito se enrollan alrededor del hospedador y en determinados puntos penetran en él atravesando la pared y membrana celulares, en otros casos el micoparásito se enrolla alrededor del hospedador y produce su muerte sin haber evidencia de que

agujereee la pared celular (Bernard & Janes 2009; Cañedo & Ames, 2004).

### **Inducción de resistencia sistémica (ISR)**

Consiste en la inducción del sistema de defensa que da resistencia al hospedador frente a patógenos por la interacción con un microorganismo no patógeno, el agente de biocontrol. Una vez puesto en marcha el mecanismo de resistencia es operativo ante el ataque de un patógeno. Cuando se induce la resistencia la planta expresa una serie de genes que confieren resistencia como 1,3- $\beta$ -glucanasas, fitoalexinas, genes relacionados con el refuerzo de la pared celular como peroxidadas y la deposición de lignina, callosa y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y proteínas relacionadas con patogénesis (Bernard & Janes, 2009; Elósegui, 2006).

### **Mecanismos combinados**

Muchos microorganismos antagonistas utilizan varios mecanismos de acción simultáneamente frente a un patógeno. Por ejemplo, algunos micoparásitos como *Gliocladium virens* o *Trichoderma harzianum* utilizan además del micoparasitismo, competencia y antibiosis (Elósegui, 2006).

## **2.2 GENERALIDADES DE LOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS**

### **2.2.1 IMPORTANCIA Y CARACTERÍSTICAS**

La importancia de los hongos entomopatógenos como reguladores naturales de poblaciones ha sido reconocida por muchos años. Factores como el aumento de resistencia de insectos a insecticidas y efectos adversos en el uso generalizado de químicos en el control de plagas han fomentado el uso de los hongos entomopatógenos como sustitutos potenciales de los insecticidas químicos (Velas & Montoya, 1993).

Dichos hongos se encuentran en la naturaleza, encontrándose en rastrojos de cultivos del suelo, las plantas, etc. Logrando estos un buen desarrollo en lugares frescos, húmedos y con poco sol (Monzón, 2002).

Prácticamente, todos los insectos son susceptibles a algunas enfermedades causadas por los hongos entomopatógenos, se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies capaces de parasitar a diferentes tipos de insectos y artrópodos, lo que indica un gran potencial para el uso de estos organismos como insecticidas biológicos (Monzón, 2002; Leucona, 1996).

Los hongos son marcadamente superiores a otros microorganismos puesto que generalmente no son específicos en su acción sobre insectos, lo que les confiere importancia en el control de un amplio rango de insectos plagas. Los géneros más importantes para el control son: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomophthora*, *Verticillum* y *Zoophthora* (Perdomo, 2011).

El uso de estos hongos contra insectos fue sugerido desde hace mucho años, cuando en 1879, *M. anisopliae* se utilizó para el control de *Cleonis punctriventis* “picudo de la remolacha” (Barnet & Hunter, 1997).

El rango de hospedantes de algunos géneros de hongos entomopatógenos es variable, y tiende a ser más común en áreas tropicales, en las cuales factores tales como la temperatura y la humedad relativa favorecen su crecimiento. Sin embargo pueden encontrarse en áreas templadas (Vélez & Montoya, 1993; Bernard & Janes 2009).

### 2.2.2 CLASIFICACIÓN

De acuerdo a la clasificación realizada por Ainsworth en 1973, citada por Tanada y Kaya (1993) y Perdomo (2011), los hongos son separados en dos divisiones:

- a. **División Myxomycota:** Aquellos que forman plasmodios.
- b. **División Eumycota:** Aquellos que no forman plasmodios y son frecuentemente micelianos. Se encuentran dentro de cinco subdivisiones:
  - Mastigomycotina: Forman zoosporas, oosporas y presentan estado perfecto.
  - Zygomycotina: No presentan zoosporas, presentan estado perfecto y forman zygosporas.
  - Ascomycotina: Presentan estado perfecto y forman ascosporas.
  - Basidiomycotina: Presentan estado perfecto y forman basidiosporas.
  - Deuteromycotina: No presentan estado perfecto ni zoosporas y forman conidias.

Las clases de mayor importancia desde el punto de vista del control de plagas agrícolas son Zygomycetes e Hyphomycetes (Tanada y Kaya, 1993).

Muchos hongos entomopatógenos se encuentran en la subdivisión Zygomycotina, clase Zygomycetes, orden Entomophthorales; en Ascomycotina, clase Pyrenomycetes, orden Sphaeriales; clase Laboulbeniomycetes, orden Laboulbeniales y en Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Moniliales.

**CUADRO 01: Clasificación de los principales hongos entomopatógenos**

Subdivisión	Clase	Entomopatógenos	Hospedante
Mastigomycotina	Chytridiomycetes	<i>Coelomyces</i>	Larvas de mosquitos
	Oomycetes	<i>Leptolegnia</i> <i>Lagenidium</i>	Larvas de mosquitos
Zygomycotina	Zygomycetes	<i>Mucor</i>	Varios
		<i>Entomophthorales</i>	Diversos
Ascomycotina	Plectomycetes	<i>Ascospaera</i>	Abejas
	Pyrenomycetes	<i>Cordyceps</i>	varios
Deuteromycotina	Coelomycetes	<i>Aschersonia</i>	Cochinillas
		<i>Beauveria</i>	Varios
	Hyphomycetes	<i>Culicinomyces</i>	Mosquitos
		<i>Hirsutella</i>	Ácaros
		<i>Metarhizium</i>	Varios
		<i>Nomuraea</i>	Lepidópteros
		<i>Paecilomyces</i>	Larvas de mosquitos,
		<i>Tolypocladium</i>	cochinillas, moscas
<i>Verticillium</i>	blancas y pulgones.		

**Fuente:** Albuquerque & Albuquerque (2009).

De acuerdo a Leucona (1996) y Monzón (2001), la subdivisión Deuteromycotina agrupa a los principales géneros de hongos entomopatógenos utilizados como controladores biológicos a nivel mundial como *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium*, siendo los géneros *Paecilomyces*, *Metarhizium*, *Beauveria* y *Verticillium*, los más utilizados en varios países de Latinoamérica, incluyendo el Perú (Berlanga,1997).

### **2.2.3 MECANISMO DE ACCIÓN**

Las fases en que se desarrollan los hongos sobre sus hospedantes son:

#### **- Adhesión**

Es un fenómeno que permite la fijación de los propágulos o unidades infectivas sobre la superficie de los hospedantes por medio de mecanismos donde intervienen propiedades físicas, químicas y electrostáticas del patógeno y del hospedante. El contacto entre las unidades infectivas con el tegumento es el prerrequisito para el

establecimiento y continuación de la micosis (Monzón, 2002; Leucona *et al.*, 1996).

### **- Germinación**

Luego de la adhesión e hidratación del conidio o espora sobre el tegumento, donde emite un tubo germinativo con formación en algunos casos de un apresorio, para posteriormente ingresar en el hemocele del insecto (Bernard & Janes 2009). Sin embargo, Leucona (1996), indica que las conidias de un hongo entomopatógeno pueden presentar cuatro comportamientos germinativos sobre la cutícula del hospedante:

- a. Emisión de un tubo germinativo corto que perfora el tegumento
- b. Emisión de un tubo germinativo largo, de comportamiento errante sobre la superficie y que no penetra la cutícula del insecto.
- c. Emisión de un tubo germinativo más o menos corto y en cuya extremidad se forma un conidio secundario de tamaño y forma diferente a la del primario.
- d. No puede germinar.

### **- Penetración**

Después de la germinación de las esporas, se produce una serie de transformaciones físicas y/o químicas tanto a nivel del tegumento como del conidio, que le permite al patógeno penetrar la cutícula de su hospedante específico (Leucona et al, 1996; Monzón, 2001).

### **- Multiplicación en el hemocele**

Cuando el hongo ataca la cutícula y penetra, puede haber en ella reacciones de melanización en el punto de penetración y posteriormente alrededor de los elementos fúngicos. Dichas reacciones pueden ser celulares (granulomas en los lepidópteros) o humorales, por mediación de células sanguíneas como en las larvas de *Aedes aegypti* infectadas por *L. giganteum*, sin embargo estas reacciones no siempre están presentes como en el caso de *C. obscurus* (Monzón, 2001).

Una vez en el interior del insecto el hongo se multiplica principalmente por gemación dando formas micelianas libres y unicelulares llamadas blastosporas en los Deuteromycetes, pero

inexistentes entre los Entomophthorales, sin embargo se producen en el hemocele hifas y protoplastos (Morales *et al.*, 2009).

El sistema inmunológico de los insectos reconocen y reaccionan fagocitando las estructuras fúngicas cuando el numero de estructuras es pequeña, pero la encapsulación es el principal mecanismo de defensa donde los plasmocitos o granulocitos se concentran en el punto de infección formando una masa pseudotisular llamado granuloma (Pucheta et al, 2006).

#### **- Producción de toxinas**

Las micotoxinas, son sustancias que pueden originar la muerte del insecto debido a las propiedades insecticidas, además actúan como sustancias inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedante por alteración de los hemocitos y retardo en la agregación de las células de la hemolinfa (Monzón, 2001; Pucheta et al, 2006).

Las micotoxinas que producen los hongos entomopatógenos son de dos tipos:

- a. Macromoléculas proteicas: Son enzimas extracelulares secretadas en cantidades significativas en el interior del insecto.
- b. Sustancias de bajo peso molecular: Son toxinas de bajo peso molecular como los ciclodepsipéptidos producidos por *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, siendo las más comunes las destruxinas.

Varios otros productos de bajo peso molecular pueden ser citados como tóxicos, entre ellos el ácido oxálico y dipicolínico y las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*.

#### **- Muerte del insecto**

La muerte del insecto ocurre generalmente antes de que el hongo colonice todo el interior del hemocele. Ello es originada por acción de las sustancias tóxicas secretadas por el hongo, la muerte del hospedante marca el final de la etapa parasítica para continuar creciendo saprofiticamente por todos los tejidos y compitiendo en ciertos insectos con la flora bacteriana intestinal (Monzón, 2001; Morales *et al.*, 2009).

Para la mayoría de los Entomophthorales, la multiplicación del hongo es esencialmente un fenómeno parasitario, el insecto muere cuando es totalmente invadido o muy poco antes de la invasión completa, en este caso la fase saprofítica es muy corta. El tiempo que demanda la muerte del insecto dependerá de la cepa del hospedante y de los factores ambientales.

#### **- Colonización total**

Luego de la muerte el micelio invade todos los organismos y tejidos comenzando en ciertos casos por el tejido graso. Después de la colonización total el cadáver se transforma en una momia resistente a la descomposición bacteriana, aunque en algunos casos el hongo llega a respetar algunos tejidos como glándulas de seda, músculos, tráqueas y huevos de pulgones ovíparos (Monzón, 2001; Morales *et al.*, 2009).

#### **- Emergencia del hongo**

Las hifas del hongo logran atravesar nuevamente el tegumento desde el interior hacia el exterior del insecto, generalmente emerge por las regiones menos esclerosadas del

tegumento como las membranas intersegmentales o los espiráculos (Morales *et al.*, 2009).

#### **- Esporulación**

Una vez que las hifas atraviesan el tegumento, ellas pueden quedar en etapa vegetativa o pasar a la reproductiva dentro de la 24 a 48 horas, con formación de conidias o esporas, el insecto adquiere una coloración que será característica de cada especie de hongo (Monzón, 2001 Morales *et al.*, 2009).

#### **- Diseminación**

Las conidias o esporas formadas sobre el insecto se diseminan por acción del viento, agua y la presencia de animales.

### **2.3 GENERALIDADES DEL GENERO *Paecilomyces***

El género *Paecilomyces*, fue introducido por Bainier en 1907 quien lo describió como cercanamente relacionado a *Penicillium*, difiriendo por la ausencia de colonias verdes y fiálides cilíndricas cortas con cuello largos y delgados, constituida por varias especies entomopatógenas, siendo los más importantes *P. farinosos* que controla larvas de lepidópteros y escarabajos; *P.*

*fumosoroseus* a lepidópteros; *P. brassicae* ataca a la polilla de la col y *P. lilacinus* controla fitonemátodos (Leucona, 1996; Elósegui, 2006).

Las especies presentan hifas hialinas a amarillosas, septadas, de paredes delgadas; la mayoría presenta ramificaciones verticiladas o irregularmente ramificadas, llevan en su parte terminal en cada rama grupos de fiálides, las cuales pueden ser también solitarias. Las fiálides constan de una porción basal cilíndrica o hinchada, adelgazándose abruptamente a menudo para formar un cuello muy notorio. Los conidióforos llevan cadenas de conidias; éstas son hialinas, unicelulares y de forma ovoide (Bustillo, 2001).

Las especies entomopatógenas de *Paecilomyces*, fueron reclasificados en los géneros *Isaria* y *Spicaria*. Los estados perfectos están relacionados con ascomicetes de los géneros *Byssochlamys*, *Talaromyces*, *Thermoascus* y posiblemente *Torrubiella* (Tanada & Kaya, 1993).

Luangsa *et al.* (2005); Perdomo (2011), indican que las especies de *Paecilomyces* están contenidas en dos secciones *Paecilomyces* e *Isarioidea*:

- **Sección Paecilomyces**, incluye la especie tipo de género, *P. variotii* Bainier, y aquellas especies que desarrollan colonias de color amarillo-marrón, oliva-marrón u otros colores oscuros, son mesofílicas, termotolerantes, termofílicas, saprófitas y no entomógenas. Estas especies se relacionan con los géneros de ascomicetes: *Talaromyces* C.R. Benj., *Byssochlamys* Westling y *Thermoascus* Miehe.
  
- **Sección Isarioidea**, contiene especies que presentan colonias de colores blanco, verde claro, rosa, rojo o púrpura, además de ser mesofílicas y entomógenas, y están relacionadas con *Cordyceps* Fr. y *Torrubiella* Boud.

*Paecilomyces fumosoroseus* ha sido clasificado en la sección Isarioidea, caracterizada por contener patógenos de insectos, las que forman fieltros algodonosos o masas polvosas en el cuerpo del huésped o bien forman sinemas sobre éste (Humer 1994; Smith, 1993).

### **2.3.1 *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith**

Desde el punto de vista taxonómico, este hongo pertenece a la subdivisión Deuteromicotina también conocido como hongos imperfectos. Como todos los miembros de este grupo, carece de forma sexual. *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize), también es conocido como *Isaria*

*fumosorosea* (Wize); *Monilia aquatilis* (Malgut) o *Spicaria fumosorosea* (Wize) (Carr *et al.*, 2003).

*Paecilomyces fumosoroseus*, es descrito como un patógeno natural que está siendo investigado para el control biológico de 41 especies de plagas pertenecientes a 25 familias de insectos. Dentro de las más importantes aplicaciones que se le han dado es para el control de la mariposa del fruto del durazno (*Carposina sasakii*), termitas, escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*), mariposa gypsy (*Limantria dispar* y *Galleria malolonella*), mariposa del dorso de diamante (*Plutella xylostella*), el áfido ruso del trigo (*Diuraphis noxia*) y la mosca blanca (*Bemisia argentifolii*) (Osborne *et al.*, 1990; Landa *et al.*, 1994).

En los últimos años es uno de los hongos entomopatógenos más empleado en el control de *Bemisia spp.* “mosquita blanca”, insecto chupador polífago extendido en todo el mundo y que anualmente causa millonarias pérdidas en la agricultura. *Paecilomyces fumosoroseus* es capaz de infectar a la mosquita blanca en todas sus etapas de desarrollo, incluyendo huevos, provocando altos niveles de mortalidad a una velocidad mayor que otros hongos entomopatógenos (Humber, 1999; Smith, 1993; Carr *et al.*, 2003).

## 2.3.2 MORFOLOGÍA

### Características Macroscópicas

Colonias de color gris claro a gris más oscuro, muchas veces la colonia basalmente tiene aspecto de fieltro con sobre crecimiento flocular, o puede tener un aspecto polvoriento granular en medio de Agar extracto de malta (MEA) o Papa Dextrosa Agar (PDA), crecen moderadamente rápido a 25°C, 4-8 cm en 14 días. Las colonias al esporular son al principio blancas, pero cambian a tonalidades de rosa y podrían llegarse a teñirse de gris con la edad (Smith, 1993; y Luangsa *et al.*, 2005).

### Características microscópicas

De acuerdo a Smith (1993); Alean (2003); Cañedo & Ames (2004) y Luangsa *et al.* (2005), *Isaria fumosorosea* se caracteriza por:

- Las hifas, se caracteriza por ser hialinas o amarillentas, septadas y de paredes suaves de 1,4 – 4,0  $\mu\text{m}$  de ancho.
- Las estructuras conidiógenas, son sinematosas o mononematosas de 1,6 - 3,6  $\mu\text{m}$  de ancho, que consiste en conidióforos verticilados o irregulares alcanzan hasta 100 $\mu\text{m}$  de largo x 1,5 a 3 $\mu\text{m}$  de diámetro, presentan en cada una de las ramas acúmulos de células conidiógenas, las cuales pueden ser solitarias en las hifas fértiles.

- Las conidias, se encuentran en cadenas basopetalas divergentes o enredadas, son subglobosas, ovoides, elipsoidales a cilíndricas, ocasionalmente fusiformes hialinas o ligeramente pigmentadas con paredes suaves o equinuladas de varias formas, el tamaño va de 3,2 - 5,6 × 1,9 - 3,6 μm. No produce clamidosporas.

*I. fumosorosea*, produce conidias en medios sólidos y blastoesporas en cultivos líquidos. Las blastoesporas empiezan su germinación más rápido en la cutícula del insecto que las conidias, lo cual indica que el uso de blastoesporas para el desarrollo de formulaciones sería más ventajoso sobre el uso de las conidias (Vega, 2000).

### 2.3.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La ubicación taxonómica de *Isaria fumosorosea* según Ulloa y Herrera (1994), es la siguiente:

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina.

Clase: Hyphomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

Género: *Isaria*.

Especie: *Isaria fumosorosea*

## 2.4 GENERALIDADES DEL GENERO *Lecanicillium*

*Verticillium*, es un género de hongos de la división Eumycota, de la familia Moniliaceae, el género suele incluir especies saprófitas y parásitas de plantas superiores, insectos, nematodos, huevos de moluscos y otros hongos. Según Barbara & Clewes (2003) y Zare & Gams. (2001), este género contiene 51 especies divididos en tres grupos: Micopatógenos, entomopatógenos y patógenos de plantas y saprófitos de restos vegetales.

Sin embargo recientemente se ha revisado este género y la mayoría de los entomopatógenos y micopatógenos los han reclasificado en un nuevo grupo llamado *Lecanicillium* (Zare & Gams, 2001).

*Lecanicillium*, es un género de hongos del orden Hypocreales, actualmente consta de 21 especies. Son hongos entomopatógenos, que anteriormente eran ampliamente conocidos como *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas. El género contiene las siguientes especies:

- *Lecanicillium acerosum* W. Gams, H.C. Evans & Zare 2001,
- *Lecanicillium antillanum* Zare & W. Gams 2001,
- *Lecanicillium aphanocladii* Zare & W. Gams 2001,
- *Lecanicillium araneorum* (Petch) Zare & W. Gams 2001,

- *Lecanicillium araneicola* Sukarno & Kurihara 2009,
- *Lecanicillium attenuatum* Zare & W. Gams 2001,
- *Lecanicillium dimorphum* (J.D. Chen) Zare & W. Gams 2001,
- *Lecanicillium evansii* Zare & W. Gams 2001,
- *Lecanicillium flavidum* (W. Gams & Zaayen) W. Gams & Zare 2008,
- *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare & W. Gams 2008;
- *Lecanicillium fungicola* var. *aleophilum* W. Gams & Zare 2008,
- *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* (Preuss) Zare & W. Gams 2008,
- *Lecanicillium fusisporum* (W. Gams) Zare & W. Gams 2001,
- *Lecanicillium kalimantanense* Kurihara & Sukarno 2009,
- *Lecanicillium nodulosum* (Petch) Zare & W. Gams 2001,
- *Lecanicillium pissodis* Kope & I. Leal 2006,
- *Lecanicillium psalliotae* (Treschew) Zare & W. Gams 2001,
- *Lecanicillium saksenae* (Kushwaha) Kurihara & Sukarno 2009,
- *Lecanicillium tenuipes* (Petch) Zare & W. Gams 2001,
- *Lecanicillium wallacei* (H.C. Evans) H.C. Evans & Zare 2008.

#### **2.4.1 *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Viegas**

La especie más representativa del género *Lecanicillium* con capacidad entomopatógena es *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Viegas, de amplia distribución geográfica, capaz de causar epizootias

de gran magnitud en regiones de clima tropical y subtropical, así como en los ambientes cálidos y húmedos de los invernaderos (García, 1996), tiene un color blanco y una apariencia algodonosa en placas petri y en los insectos parasitados. Crece bien a temperaturas entre los 20 a 25 °C a una humedad relativa del 90% (Obregón, 2002).

Se encuentra frecuentemente atacando especies de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Himenóptera y sobre todo ácaros, los insectos muertos por este hongo tienen una apariencia blanquecina (Alean, 2003; Elósegui, 2006).

En el 2001 los investigadores Gams y Zare, basados en técnicas moleculares agruparon a *Verticillium leccanii* en tres especies:

- *Lecanicillium lecanii* (Zimmerm) Zare & Gams,
- *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams
- *Lecanicillium longisporum* (Petch) Zare & Gams.

Las diferencias fundamentales entre las especies están dadas por el rango de hospederos y el tamaño de los conidias. *L. lecanii*, produce conidias ligeramente elipsoidales, muy homogéneas en forma y tamaño,

las conidias de *Lecanicillium muscarium*, son más largas y delgadas y en *Lecanicillium longisporium* son elipsoidales a ovales, raramente presentan septos (Elósegui, 2006).

Durante los últimos años *Lecanicillium lecanii*, junto a otros géneros, ha sido sujeto de múltiples investigaciones; en las cuales se busca esclarecer su ubicación fitogenética, así como el origen de sus atributos como arma para el control de plagas. Todo esto debido a que la agrupación de los diferentes géneros de entomopatógenos, según sus características morfológicas, coloniales, miceliares y de formación de sus conidias, no necesariamente refleja la relación fitogenética entre ellos (Goettel *et al.*, 2001).

#### **2.4.2 MORFOLOGÍA**

##### **Características Macroscópicas**

Las colonias crecen bien en un medio de cultivo a base de agar Malta, harina de avena o papa dextrosa agar, en los cuales se desarrolla un micelio delgado blanco o crema, que forma colonias blancas con apariencia algodonosa que mide de 18 a 22 mm y con menos color o de color amarillento al inverso del cultivo se observa la formación de una especie de halo, debido a que las hifas se desplazan concéntricamente

sobre el medio de cultivo; respecto al sitio de inoculación, en busca del mejor aprovechamiento de los nutrientes, adhesión y diseminación sobre el sustrato (Barranco, 2004).

Las colonias de *L. lecanii* crecen con un micelio aéreo, pulverulento, hifas moderadamente bifurcadas, septadas de pared lisa y hialina de 1,6 a 2,4  $\mu\text{m}$  de diámetro (Barbara & Clewes, 2003).

### **Características Microscópicas**

De acuerdo a Tzean *et al.* (1997) y Cañedo & Ames (2004), *Isaria fumosorosea*, se caracteriza por:

- Los conidióforos de las especies de *Lecanicillium*, son poco diferenciados de las hifas vegetativas y de las células conidiógenas.
- Las células conidiógenas (fiálides) están en forma de verticilios de dos a seis, en parejas o solitarias sobre hifas o apicalmente sobre cortas ramificaciones, miden de 11 a 30  $\mu\text{m}$  de largo x 1,5 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, son ligeramente anchos en la base y van adelgazando hacia la punta por donde salen las conidias.
- Las conidias, son pequeñas, hialinas cilíndricas o elipsoidales y redondeadas en sus extremos midiendo de 2 a 4 x 1 a 1,5  $\mu\text{m}$ . Son

uniformes en cuanto a forma y tamaño dependiendo del aislamiento.

Estas conidias nacen en forma de gotas filamentosas o en cadenas.

### **2.4.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

División: Eumycota.

Subdivisión: Deuteromycotina.

Clase: Hyphomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

Género: *Lecanicillium*

Especie: *Lecanicillium lecanii*

### **2.5 GENERALIDADES DEL GENERO *Metarhizium***

El género *Metarhizium*, está clasificado dentro del grupo Moniliaceae, muy próximo el género *Penicillium*, se caracteriza por presentar conidióforos que forman una capa de esporas: las fiálides pueden ser solas, en pares o en manojos; las conidias se producen en cadenas de basipétalos compactados en columnas, son ovoides o cilíndricos, unicelulares. Las conidias pueden ser hialinas o ligeramente pigmentadas de verde oliva con un tamaño de 7 a 9  $\mu\text{m}$  de largo y 4,5 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho. Las colonias crecen lentamente

alcanzando hasta 2 cm en 10 días a 20°C sobre medios de cultivo sintéticos (Moore & Prior, 1993; Moore, 1996).

### **2.5.1 *Metarhizium anisopliae* (Metschnikow) Sorok**

Tiene una apariencia de color verde oliva y polvoriento en las placas en laboratorio y en los insectos muertos y parasitados. Crece bien a temperaturas entre los 25 a 27 °C a una humedad relativa del 90% (Obregón, 2002).

Es el agente causal de la muscardina verde y es un patógeno de más de 300 especies de siete órdenes de insectos. Los Coleópteros son los hospederos más comunes, es el segundo hongo entomopatógeno más ampliamente usado en el control microbiano y es el hongo más utilizado en Latinoamérica para el control de diferentes especies de Cercópodos que son plagas en la caña de azúcar. *Metarhizium anisopliae* es un hongo imperfecto que presenta reproducción asexual. Fue uno de los primeros microorganismos que se usaron en el control de los insectos plaga. Primero se aisló del escarabajo gallo del trigo (Lezama, 1995).

Se le considera un agente de alto potencial en el control biológico de plagas agrícolas, es una especie de hongo cosmopolita que no infecta animales de sangre caliente y tampoco existen reportes de sensibilidad humana (Kaaya & Munyinyi, 1995).

## **2.5.2 MORFOLOGÍA**

### **Características Macroscópicas**

Presenta una colonia pegada al medio, completamente redonda, de colores oliváceo, amarillento, verdoso, marrón oscuro, dependiendo del aislamiento, con un revés incoloro a marrón, a veces verdoso citrino. Los cadáveres de los insectos afectados, se observan completamente cubiertos con micelio del hongo de color blanco. Cuando el hongo esporula sobre el cadáver, adquiere una coloración verdosa.

### **Características Microscópicas**

De acuerdo a Kaaya & Munyinyi (1995), *Metarhizium anisopliae*, se caracteriza por:

- Los conidióforos nacen del micelio y son irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septo, miden de 4 a 14 $\mu$  de longitud x 1,5 a 2,5 de diámetro.
- Las fiálides son cilíndricas en forma de clava, adelgazados en el ápice, miden de 6 a 13 $\mu$ m de longitud y de 2 a 4 $\mu$ m de diámetro.
- Las conidias son unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo, miden de 3,5 a 9  $\mu$ m de longitud x 1,5 a 3,5 $\mu$ m de diámetro. Se desconoce la forma de teleomorfos. *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* presenta conidio cortos de 3,5 a 9  $\mu$ m mientras que *Metarhizium anisopliae* var. *major* presenta conidias de 9 a 18  $\mu$ m.

### 2.5.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División: Eumycota.

Subdivisión: Deuteromycotina.

Clase: Deuteromycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

Género: *Metarhizium*

Especie: *Metarhizium anisopliae*.

## **2.6 IMPORTANCIA DE LOS HONGOS ENTOMOPATOGENOS**

Las principales ventajas de estos hongos son:

- Presentan grados variables de especificidad, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas. En el caso de las cepas, pueden ser específicas a nivel de especie, sin afectar a los enemigos naturales.
- Si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.
- Se pueden aplicar mezclas de hongos entomopatógenos con dosis sub letales de insecticidas para lograr efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado.
- No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores.
- Cuando el hongo no llega a causar la muerte del insecto, se presentan efectos secundarios que alteran el normal desarrollo de su ciclo de vida.

Pero también presentan algunas desventajas, como:

- Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitantes están

siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivos (protectores solares, aceites, antidesecantes).

- Requieren de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar que pierdan su patogenicidad.
- En general, los insecticidas biológicos no matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente. Sin embargo, el insecto deja de ser plaga al ser parasitado por el hongo, deja de alimentarse mucho antes de morir, disminuyendo el daño.

## **2.7 PRODUCCION DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS**

La metodología de la producción de hongos entomopatógenos va a depender de la relación existente entre el hongo y el insecto a controlar, es así que los entomopatógenos obligados, solo se pueden masificar *in vivo*, mientras que los entomopatógenos no obligados se pueden multiplicar *in vitro*, empleando conocimientos básicos disponibles de procesos fermentativos (Leucona, 1996).

### **2.7.1 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN**

#### **a. Producción “*in vivo*”**

Muchos hongos entomopatógenos obligados, son propagados a través de insectos sensibles vivos, pero la metodología de trabajo es sumamente laboriosa. Este método puede ser empleado para la diseminación de hongos en programas de control clásico o inoculativo. El inóculo producido *in vivo*, puede ser empleado para introducir un entomopatógeno a un área donde su ocurrencia no es normal o para inducir epizootias cuando es poco habitual que ocurra (Alves, 1998).

La producción industrial *in vivo*, requiere mantener instalaciones apropiadas para la cría del insecto hospedante, el insectario debe ser dividido empleando parte del mismo para mantener viable el patógeno y otra sección separada para proceder a su multiplicación a gran escala (Leucona, 1996).

**CUADRO 02: Hongos entomopatógenos producidos “*in vivo*”**

ESPECIE	PAÍS
<i>Entomophaga grylli</i>	Brasil
<i>Etmophthora</i>	Argentina
<i>Cordyceps</i>	Cuba
<i>Nomuraea</i>	Brasil

**Fuente:** Alves (1986); Leucona (1996).

## **b. Producción “*in vitro*”**

De acuerdo a Leucona (1996) y Alves (2001), para la producción *in vitro* se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Seleccionar una cepa capaz de producir abundantes conidias y mantener su virulencia.
- Seleccionar y optimizar un medio de cultivo que permita la obtención de altos rendimiento.
- El medio de cultivo debe facilitar la producción industrial a bajos costos.
- Desarrollar una adecuada formulación que asegure la calidad del producto y permita su fácil aplicación y almacenamiento.

## **2.7.2 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN “*in vitro*”**

### **2.7.2.1 FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SOLIDO**

#### **CARACTERÍSTICAS**

La fermentación en medio sólido, o también fermentación en estado sólido, se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos o semisólidos en ausencia de agua libre. Las fermentaciones de estas características son aquellas en las cuales el

sustrato no está disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua (Viniegra *et al.*, 1997; Chávez *et al.*, 2009).

La fermentación en sustrato sólido (FSS) se ha usado exitosamente para la producción de enzimas y metabolitos secundarios. Estos productos están asociados con la fase estacionaria de crecimiento microbiano y son producidos a escala industrial para su uso en agricultura y en el tratamiento de enfermedades. Muchos de esos metabolitos secundarios son producidos aún en fermentaciones líquidas sumergidas (FLS), aunque a través de su producción este método ha mostrado ser menos efectivo que la FSS, ya que cuando la producción a gran escala se incrementa así mismo lo hacen los costos y la demanda energética (Robinson *et al.*, 2002).

Los microorganismos que crecen bien en este sistema son aquellos que toleran una baja actividad de agua ( $A_w$ ) (Wainwright, 1995). Muchas especies de mohos filamentosos de los deuteromicetes crecen abundantemente sobre sustratos sólidos, por tal motivo la FLS, constituye una alternativa viable para el crecimiento y conidiación de los hongos entomopatógenos a escala industrial (Wainwright, 1995, Leucona, 1996).

**CUADRO 03: Especies de hongos entomopatógenos producidos por fermentación en sustrato sólido.**

<b>Especie</b>	<b>Sustrato</b>	<b>País</b>	<b>Recuento (conidias/g)</b>
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Arroz	Brasil	10 <sup>8</sup>
<i>Beauveria bassiana</i>	Arroz	Brasil	10 <sup>8</sup>
<i>Beauveria bassiana</i>	Arroz	Costa Rica	10 <sup>9</sup>
<i>Verticillium lecanii</i>	Arroz	Brasil	10 <sup>8</sup>
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Cebada	Colombia	10 <sup>10</sup>

**Fuente:** Leucona (1996) y Barquero (2005)

## TECNICAS DE PRODUCCION

### - Producción en frascos de vidrio

Es una metodología ampliamente utilizada para la producción de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, se basa en el empleo de frascos de vidrio de boca ancha como biorreactores (Barquero, 2005).

### - Producción en bolsas plásticas

El empleo de bolsas de polipropileno esterilizables introdujo mejoras sustanciales en la economía del proceso, entre otras, el uso de una mayor cantidad de sustrato que permite reducir el número de unidades de fermentación, el costo de cada bolsa (fermentador), sumado a la posibilidad de su comercialización directa, disminuye sensiblemente los gastos relacionados con la mano de obra.

#### - **Producción en bandejas**

El cultivo de hongos empleando bandejas como biorreactores está ampliamente difundido, si bien es simple desde el punto de vista constructivo y operacional, presenta el inconveniente que requiere una importante superficie para su funcionamiento y requiere mucha mano de obra. El espesor del lecho a emplear debe optimizarse, para evitar problemas de intercambio gaseoso e incremento de temperatura (Wainwright, 1995).

### **VENTAJAS DE LA FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO**

Doelle *et al.* (1992); Wainwright (1995) y Robinson *et al.* (2002), consideran como ventajas de la fermentación en estado sólido, los siguientes aspectos:

- Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación. Tienen mayor productividad volumétrica.

- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- Pueden emplearse, frecuentemente conidias como inóculo en los procesos de crecimiento de hongos, lo cual disminuye los costos y las manipulaciones en la preparación del inóculo.
- Las conidias de los hongos que se producen son mucho más resistentes y tienen mejor adaptabilidad a las condiciones en las que se aplican como agente de biocontrol.
- El proceso de recobrado es simplificado. Algunos productos son utilizados integralmente, como alimento animal, productos para el control biológico, etc.
- Los procesos se consideran generalmente como tecnologías limpias.

## **DESVENTAJAS DE LA FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO**

Según Robinson *et al.* (2002) y Chávez *et al.* (2009); entre las principales desventajas se encuentran:

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad.

- La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso.
- La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.
- Los procesos de transferencia de masa son limitados por la difusión.
- Muchos aspectos ingenieriles como el diseño de reactores y el escalado están muy poco caracterizados.
- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

### **2.7.2.2 PRODUCCION EN CULTIVO SUMERGIDO**

Si bien la fermentación en sustrato sólido presenta una serie de ventajas, la fermentación en cultivos sumergidos brindan muchas posibilidades para su exitosa aplicación en la producción de hongos entomopatógenos, así por ejemplo, el diseño de biorreactores y los sistemas de control del proceso disponibles para la producción en cultivos sumergidos, son aspectos que cuentan con un alto grado de desarrollo y sofisticación, esto permite realizar los cultivos ejerciendo un estricto control de los factores fisicoquímicos que rodea a los microorganismos, además este sistema permite su implementación a nivel industrial.

Los deuteromicetos, con excepción de *H. thompsonii*, *P. lilacinus* y *Beauveria bassiana*, generalmente no producen conidias en cultivos sumergidos, a pesar de crecer y rendir abundante cantidad de blastosporas; fragmentos de micelio de pared delgada y aspecto levaduriforme, si bien resultan infectivas, tienen un tiempo de vida medio corto y no soportan condiciones ambientales extremas. La utilización de fuentes de nitrógeno complejas (peptona y extracto de levadura), permiten alcanzar un buen crecimiento con formación de abundantes blastosporas, mientras que el empleo de fuentes nitrogenadas simples (nitrato de potasio), permiten la conidiación de *Beauveria bassiana* en medios líquidos. No obstante si las condiciones y medio de cultivo no son debidamente optimizadas el producto final estará constituido principalmente por blastosporas.

**CUADRO 04: Especies de hongos entomopatógenos producidos por fermentación en cultivo sumergido.**

<b>Especie</b>	<b>Estructura</b>
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Conidias, micelio y blastosporas
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Conidias, micelio y blastosporas
<i>Beauveria bassiana</i>	Conidias
<i>Beauveria tenella</i>	Micelio / blastosporas
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Micelio / blastosporas
<i>Nomuraea rileyi</i>	Micelio / blastosporas
<i>Spicaria prasiana</i>	Micelio / blastosporas
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Micelio / blastosporas

**Fuente:** Leucona (1996)

### **2.7.2.3 PRODUCCION POR SISTEMA BIFASICO**

Este sistema de producción consta de dos etapas, la multiplicación en medios líquidos para obtener micelio en abundante cantidad, la que generalmente se extiende hasta el final de fase de crecimiento exponencial, seguida de una segunda etapa en la cual el micelio obtenido es distribuido en bandejas (bien sobre un sustrato sólido o sobre un soporte inerte), las que se colocan en ambientes con temperatura y humedad controlada hasta alcanzar la esporulación. Esta forma de producir conidias ha sido empleada con éxito a escala industrial en Rusia, llegando a producir 22 toneladas de conidias de *Beauveria bassiana*.

### **2.7.3 FACTORES QUE AFECTAN LA FERMENTACION**

La actividad de los mohos filamentosos se ve muy afectada por las condiciones fisicoquímicas que influyen en su distribución en el medioambiente, los factores más importantes son la humedad, la actividad del agua, el pH, la temperatura, la concentración y disponibilidad del sustrato, la aireación, el tamaño de partículas y la forma de inoculación afectan significativamente tanto el crecimiento como la formación de productos (Doelle *et al.*, 2007; Chávez *et al.*, 2009).

En el cultivo líquido agitado el control de las condiciones ambientales es relativamente simple, ya que estos sistemas son homogéneos desde el punto de vista de la concentración celular, nutrientes y productos. Sin embargo se presentan serios problemas en los sistemas sólidos con el mezclado, la transferencia de oxígeno, el intercambio de calor y el control de la humedad y el pH, debido, principalmente, a la heterogeneidad y la consistencia del sistema (Doelle *et al.*, 2007).

### **La Humedad**

Todos los microorganismos requieren agua y la disponibilidad de ella es un factor importante para el crecimiento del microorganismo en la naturaleza; la disponibilidad de agua depende no solo del contenido de agua del ambiente, sino de la concentración de solutos en ella, debido a que las sustancias disueltas tienen gran afinidad por el agua, lo que hace que el agua asociada a los solutos sea inutilizable por los organismos (Mitchell *et al.*, 2002; Coyne, 1999).

El porcentaje de humedad en la fermentación sólida puede variar entre 30 y 80%, en dependencia del sólido utilizado, el microorganismo y el objetivo del proceso (formación de producto, crecimiento de la biomasa). Aunque el porcentaje de humedad es una de las variables que

comúnmente se optimiza en los sistemas de fermentación sólida, hoy se reconoce que no es solo la cantidad de agua presente en el sistema la que ejerce su influencia sobre la eficiencia del proceso, sino el carácter de las interacciones entre el agua y el medio sólido. Por eso no es contradictorio observar que un mismo microorganismo se desarrolle plenamente en dos sustratos diferentes con diferentes concentraciones de humedad (Magara *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2002).

### **Actividad del agua ( $A_w$ )**

La actividad del agua se define como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con el sustrato, es el parámetro que se ha utilizado para caracterizar cuantitativamente las interacciones físicas y/o químicas del agua en el sistema.

Los mohos muestran un comportamiento muy variado con respecto a la disponibilidad de agua, por lo general son más tolerantes a la escasez que otros organismos, requiere un rango de actividad de agua de 0,71 a 0,96 (Deacon, 1990; Huerta, 2000; Carrillo, 2003).

Se demostró que la actividad del agua no sólo ejerce influencia sobre el crecimiento, sino también sobre la formación de productos y, en

muchos casos, el valor mínimo requerido de actividad de agua para la formación del producto difiere del necesario para el crecimiento (Magara *et al.*, 2004; Domenech *et al.*, 2000).

### **El pH.**

El pH, afecta la permeabilidad de la membrana y el grado de disociación de las moléculas en iones, por lo tanto es posible que una especie de microorganismo sea incapaz de absorber nutrientes esenciales a un cierto valor de pH, o bien encuentre niveles tóxicos de compuestos, dependiendo de si son más tóxicos en la forma disociada o en la no disociada (Mitchell *et al.*, 2002; Deacon, 1990; Coyne, 1999).

Es otra variable que afecta el desarrollo de los procesos de fermentación en estado sólido, al igual que lo hace en los cultivos sumergidos. Sin embargo, en el caso de la fermentación sólida, su control es prácticamente imposible, debido a la ausencia de instrumentos capaces de medir el pH en la capa de líquido que rodea el sólido (Mitchell *et al.*, 2002).

El pH adecuado para el crecimiento de los mohos durante la fermentación en sustrato sólido es de 5 a 6,2 aunque en el proceso cambia por diferentes razones; normalmente disminuye por la secreción de ácidos

orgánicos como acéticos y lácticos durante el proceso. No obstante, la fuente de nitrógeno utilizada influye mucho en la tendencia que sigue el pH (Domenech, 2000; Dorta *et al.*, 1996).

### **La temperatura.**

La temperatura es uno de los factores ambientales más importante que afecta el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, la mayoría de los mohos son mesófilos y crecen en el intervalo de 10 a 40 °C, siendo la óptima de 25 a 35 °C, pocos mohos son termófilos y crecen entre 20 a 50 °C con una óptima de 40 °C (Deacon, 1990; Dorta *et al.*, 1996; Coyne, 1999; Carillo, 2003).

El crecimiento y la formación de productos son resultados de complejas reacciones químicas, y al igual que cualquier otra reacción, están afectados por la temperatura, la que ejerce una acción determinante en el conjunto de actividades celulares.

La temperatura es la variable cuyo control, en una fermentación sólida, se considera el más crítico debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido - líquido - gas, lo que favorece la acumulación

del calor metabólico en el sistema y un aumento de la temperatura del cultivo (Bernard *et al.*, 1992). Según Gutiérrez *et al.* (1995), el aumento de la temperatura favorece tres aspectos negativos:

- La actividad microbiana se desacelera o se detiene.
- Se deshidrata el medio sólido.
- El metabolismo se desvía como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación.

**CUADRO 05: Rango de temperatura de crecimiento de los principales hongos entomopatógenos cultivados por fermentación en sustrato sólido,**

Especie	Temperatura (°C)		
	Mínima	Óptima	Máxima
<i>Lecanicillium lecanii</i>	20- 25	23-24	28,5
<i>Metarhizium anisopliae</i>	20	23	27,5
<i>Beauveria bassiana</i>	22	23	26,5
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	22	24	25
<i>Beauveria brongniartii</i>	21	23	26

\*: Cultivados en arroz. Magara *et al.* (2004)

### **La concentración y disponibilidad del sustrato**

El medio de cultivo debe tener todos los nutrientes necesarios de forma balanceada para favorecer el crecimiento del microorganismo. Las relaciones entre algunos de sus elementos son de particular

importancia, por ejemplo, carbono-nitrógeno y fósforo-oxígeno, esta última de manera relevante en lo referido a la eficiencia de conversión energética y a la respiración (Cannel & Young, 1998).

La formulación tiene que ver con los aspectos cuantitativos de los medios, es decir, debe establecer las concentraciones a ser utilizada de cada componente. Una primera aproximación con respecto a las cantidades a utilizar de las diversas fuentes lo da el conocimiento de la composición de la biomasa del microorganismo empleado (Ertola & García, 1994).

Mediante el conocimiento de los coeficientes de rendimiento para la formación de biomasa y producto, y los valores de la energía de mantenimiento será posible establecer también los requerimientos de las fuentes de carbono necesarios para formular un medio (Ertola & García, 1994; Bosch *et al.*, 2001).

Al igual que en los cultivos sumergidos, la concentración de sustrato ejerce una influencia sobre el desarrollo del microorganismo. Hasta el momento, tal influencia no está caracterizada en términos de limitación o inhibición como en los cultivos sumergidos; pero se piensa

que los efectos de limitación sean mayores en las fermentaciones sólidas, debido a la baja velocidad de difusión de los nutrientes en la fase líquida (Cannel & Young, 1998). Si se ha encontrado que la relación carbono a nitrógeno tiene una gran importancia y su valor óptimo puede variar en el intervalo de 10 a 100 en dependencia del proceso de fermentación (Bosch *et al.*, 2001).

### **La aireación.**

En la mayoría de los procesos de fermentación en estado sólido participan microorganismos aerobios, y resulta la aireación un factor fundamental para el desarrollo del proceso. La aireación se utiliza para suministrar el oxígeno necesario, para extraer el CO<sub>2</sub> formado, así como para extraer el calor metabólico evolucionado, de manera que el flujo óptimo de aire debe tomar en consideración la naturaleza del microorganismo utilizado, los requerimientos de oxígeno para el crecimiento y/o la formación del producto deseado, la velocidad de generación de calor metabólico, la concentración crítica del dióxido de carbono y otros metabolitos volátiles, el espesor de la masa de sólido, entre otros. La aireación en las FES es más fácil que las fermentaciones sumergidas, porque la superficie de contacto es mayor entre el aire y el líquido que está absorbido en las partículas (Viniegra *et al.*, 2003).

## **El inóculo**

Otro factor que influye en los procesos de FES lo representa el tipo de inóculo y la forma de inoculación. Existen dos tipos fundamentales de inóculo en la producción de hongos, tanto a nivel de laboratorio como industrial: micelio o esporas (Domenech, 2000).

Las principales ventajas del uso de micelio como inóculo son: una mejor competitividad del hongo, una reducción de la posible colonización del sustrato por microorganismos contaminantes y la colonización más rápida debido a que se reducen los tiempos de incubación (la fase de latencia o de adaptación principalmente (Moore & Prior, 1993; Jenkins *et al.*, 1998).

Sin embargo, en diferentes trabajos se reporta el uso de suspensiones de esporas (Bosch *et al.*, 2001; Dorta *et al.*, 1996 y Booth & Shanks, 1998), destacándose su principal ventaja en la reducción de los costos en la etapa de propagación del microorganismo.

## **Características del sustrato**

La elección del sustrato es un punto crítico durante la FSS, donde los hongos deben atacar el sustrato sólido para solubilizarlos y

disponer de ellos, donde la concentración de nutrientes en el sistema puede disminuir, mantenerse o incrementarse durante el cultivo.

El carácter particulado de los materiales y la naturaleza polimérica de sus principales constituyentes (celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón, etc.), permiten identificar tres grupos de factores que afectan su dinámica de bioconversión, como son:

- Los factores que derivan de la macromorfología de las partículas (tamaño y forma, relación superficie/masa, naturaleza cristalina o amorfa, porosidad adsorción / desorción de agua, etc.), determinan la velocidad a la cual las distintas macromoléculas del sustrato se hacen accesibles al ataque por enzimas extracelulares.
- Factores que afectan las actividades enzimáticas involucradas en la hidrólisis total o parcial de las macromoléculas (pH, Temperatura, concentración de sustrato y productos), para dar lugar a las subunidades que pueden ser incorporadas por el microorganismo, estos factores determina la velocidad a la cual los distintos compuestos asimilables se hacen disponibles.

- Factores relacionados con la estructura de la matriz que se obtiene cuando el material a ser fermentado es empacado en pilas o dentro de biorreactores, en este caso, el espesor del lecho del sólido y el volumen de los espacios libres interpartículas afectaran la transferencia de gases y de calor, especialmente en aquellos procesos realizados sin el empleo de aireación forzada.

### **El tamaño de la partícula**

El tamaño de partícula está muy ligado a la transferencia de masa en el sistema de fermentación en estado sólido, y para considerar este fenómeno se ha propuesto dividir el análisis en la transferencia de masa intrapartícula y la interpartícula (Domenech, 2000). En el primer caso, influye más el tamaño y la forma del poro de la partícula, así como la porosidad, aunque también influye el tamaño de la partícula. En el segundo caso, el espacio interpartícula es lo más importante y es afectado por el tamaño de la partícula, su forma y la humedad (Bernard & Janes, 2009).

Otro aspecto que influye en la transferencia de masa durante el proceso, es el cambio de estructura de las partículas de sustrato resultado de la acción de los microorganismos (Domenech, 2000).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR DE EXPERIMENTACIÓN**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de la ciudad de Tacna.

#### **3.2 MATERIAL EN ESTUDIO**

##### **Material Biológico**

- Cepas de *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*, obtenidas del Servicio Nacional de Sanidad Agraria - Lima.
- Granos de arroz, cebada, trigo, sorgo y maíz chancado, que se compraron del mercado Grau de la ciudad de Tacna.

#### **3.3 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

Se empleó el diseño completamente aleatorizado con post prueba y grupo control (Hernández *et al.*, 2003), constituido por 5 tratamientos para cada hongo entomopatógeno: El tratamiento control formado por granos de arroz más hongo y los tratamientos experimentales formados por cebada, trigo, sorgo y maíz chancado más hongo respectivamente. Los hongos considerados en cada tratamiento fueron: *Isaria fumosorosea*,

*Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

#### **VARIABLES DE LA EXPERIMENTACIÓN:**

- **Variable dependiente:** Producción y porcentaje de germinación de conidias de hongos entomopatógenos: *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*.
  
- **Variable independiente:** Sustratos orgánicos: Arroz, cebada, trigo, sorgo, maíz chancado.

### **3.4 METODOLOGÍA**

#### **3.4.1 ETAPA PRE FERMENTATIVA**

##### **a. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

###### **Reconstitución de cepas**

Las cepas de los hongos entomopatógenos *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*, fueron reactivadas de acuerdo a la técnica propuesta por Cañedo & Ames (2004) y Berlanga (1998), en tubos de ensayo con tapa rosca conteniendo agar Sabouraud al 4% (DSA), mediante siembra por estría e incubadas a  $26 \pm 2$  °C durante 5 a 7 días.

### **Masificación de conidias**

La masificación se realizó en medios sintéticos de acuerdo a la metodología propuesta por Berlanga & Hernández (1997) y Alean (2003), la siembra se realizó por la técnica de siembra en superficie, colocando una alícuota de 0,1 ml de una suspensión fúngica de  $10^6$  conidias/ml, en placas de agar Sabouraud al 4 % complementada con 100 mg/litro de tetraciclina; las que se incubaron a  $26 \pm 2$  °C durante 7 días con observaciones periódicas.

### **Cosecha de conidias**

Las conidias producidas por los hongos en las placas Petri, se cosecharon colocando 15 perlas de vidrio de 0,5 cm de diámetro más 15 ml de agua destilada estéril, las que se fueron desprendidas del micelio por rotación. La suspensión obtenida se transfirió a un matraz estéril de 250 ml de manera independiente.

### **Recuento**

Se contó el número total de conidias por ml producidas por cada hongo entomopatógeno según el método de Berlanga & Hernández (1997). Se realizaron diluciones, transfiriendo 1 ml de la suspensión madre a un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada

estéril; luego con una pipeta Pasteur, se colocó una gota de la dilución a la cámara de Neubauer. De acuerdo al valor obtenido, se realizaron cálculos para diluir la suspensión concentrada de conidias hasta obtener una concentración final de  $10^6$  conidias por ml, utilizando agua destilada estéril a pH 6.

#### **b. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS SUSTRATOS**

La preparación del sustrato se realizó mediante los métodos propuestos por Berlanga & Hernández (1997), Monzón (2001), Cañedo & Ames (2004) como se describe a continuación:

##### **Selección y lavado**

Los granos de arroz, trigo, cebada, sorgo y maíz, fueron colocados sobre bandejas limpias de manera independiente, donde se retiró todo tipo de impurezas y granos deformes o contaminados, los sustratos se lavaron por tres veces consecutivas con agua de caño y se dejó escurrir en un colador por 30 minutos.

##### **Precocido**

Se precoció el arroz y el maíz chancado de la siguiente manera: Se colocó los granos sobre un pedazo de tela de 40 cm x 50

cm, el cual se amarró en una olla grande de acero; se hizo hervir 3 litros de agua, luego se introdujo los sustratos y se dejó hervir durante 5 minutos, posteriormente se sacó del agua y se dejó escurrir en un colador; luego el arroz y el maíz fueron esparcidos en bandejas limpias. Los granos de cebada, sorgo y trigo, se precocinaron por 20 minutos.

### **Empacado**

Los sustratos precocidos, fueron colocados en bolsas de polipropileno a razón de 200 gramos por bolsa y se les agregó 10 ml de agua destilada estéril a pH 6. Las bolsas se sellaron doblando la apertura 3 veces y con un engrapamiento final.

### **Esterilizado**

Las bolsas fueron esterilizadas en el autoclave a 121 °C durante 10 minutos a 15 libras de presión por dos días consecutivos.

## **3.4.2 ETAPA FERMENTATIVA**

### **Inoculación**

Se realizó según la metodología de Berlanga & Hernández (1997). Las bolsas de polipropileno conteniendo 200 gramos de uno de los

diferentes sustratos orgánicos, fueron inoculadas con una suspensión de 5 ml de conidias a una concentración de  $10^6$  conidias/ml, empleando una jeringa de primer uso. Una vez inoculado se desinfectó la zona de punción con alcohol al 70 % y se cubrió con cinta masking tape. Finalmente se homogenizó el inóculo manualmente en la bolsa.

### **Incubación**

Los fermentadores constituidos por las bolsas de polipropileno con sustrato orgánico más hongo, fueron colocados en estantes acondicionados para su cultivo (Anexo 01) a la temperatura de 27 °C con un fotoperiodo de 14:10, durante 17 días. El sustrato se removió manualmente cada tres días con el fin de incrementar la superficie de colonización y esporulación.

### **3.4.3 EVALUACIÓN DE VARIABLES**

#### **Recuento de conidias**

La evaluación de producción de conidias (conidias/gramo de sustrato), se realizó por el método de recuento directo, según Méndez *et al.* (2009) y Gómez *et al.* (2001), en tres oportunidades; a los 7, 12 y 17 días de la fermentación; para lo cual se colocó un gramo de sustrato orgánico en un tubo de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada con Tween 80 a una concentración de 0,05%. Se agitó fuertemente por un minuto para que

luego se realizara diluciones seriadas hasta el factor  $10^4$  y se hiciera el recuento de conidias a partir de estas diluciones en una cámara de Neubauer. El recuento fue expresado en conidias por gramo de sustrato.

### **Porcentaje de humedad**

Se determinó por el método gravimétrico propuesto por Carrillo (2003), se realizó en cuatro oportunidades: al 1, 7, 12 y 17 días de la etapa fermentativa se colocó 25 gramos de sustrato en un recipiente, este se llevó a una estufa a 80 °C durante 48 horas hasta obtener un peso constante. El porcentaje de humedad se obtuvo con la fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100$$

Donde:

$M_1$  = Peso del recipiente vacío

$M_2$  = Peso del recipiente + muestra húmeda

$M_3$  = Peso del recipiente + muestra seca.

### **Prueba de germinación**

La determinación de la prueba de germinación o viabilidad, se realizó de acuerdo al procedimiento propuesto por Gómez *et al.* (2001), al final de la fermentación, primero se realizó una dilución seriada hasta

obtener el factor  $10^4$ . Luego se transfirió una alícuota de 0,2 ml sobre la superficie de una placa conteniendo agar PDA y se sembró por extensión con un asa de Drigaslky. Las placas fueron incubadas  $26 \pm 2$  °C durante 18 horas. Posteriormente se cortó una porción de  $1 \text{ cm}^2$  de agar y se colocó sobre un portaobjeto y se llevó al microscopio e hizo el recuento de conidias en cinco campos de cada muestra. El porcentaje se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Germinación} = \frac{a}{a + b} \times 100$$

Donde:

a: Número de conidias germinadas

b: Número de conidias sin germinar

### 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron procesados estadísticamente. Se determinó el promedio, el intervalo de confianza, la desviación estándar y el análisis de varianza (ANOVA), con el fin de determinar diferencias significativas entre las medias producidas por los tratamientos; así mismo, para la determinación de la mejor producción de conidias promedio por sustrato, se aplicó la prueba de Duncan, a un nivel de confianza del 95 %.

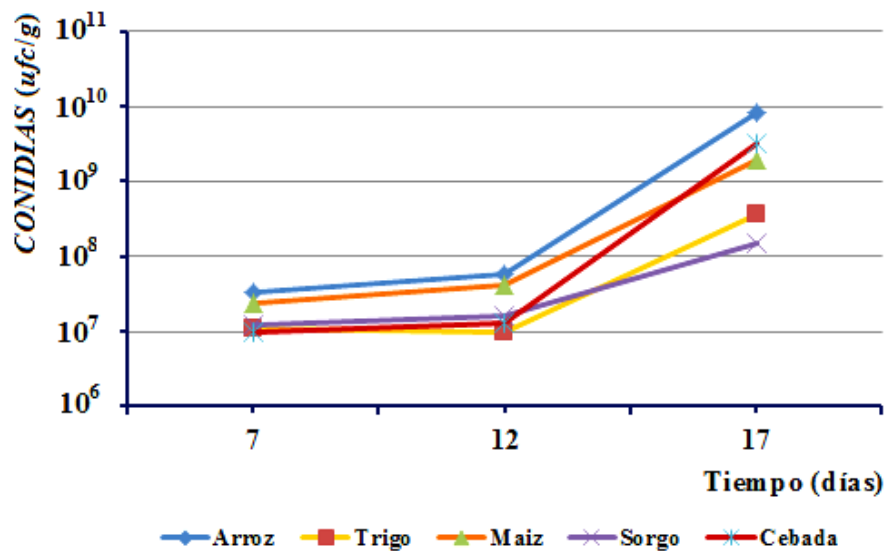
## IV. RESULTADOS

### A. PRODUCCIÓN DE CONIDIAS EN LOS SUSTRATOS ORGÁNICOS.

**CUADRO 06: Producción de conidias de *Isaria fumosorosea* sobre diferentes sustratos orgánicos durante 17 días de fermentación.**

Tiempo de fermentación (días)	Producción promedio de conidias (ufc/g)				
	Arroz	Trigo	Maíz	Sorgo	Cebada
7	$3,36 \times 10^7$	$1,08 \times 10^7$	$2,44 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$	$9,58 \times 10^6$
12	$5,79 \times 10^7$	$9,69 \times 10^6$	$4,08 \times 10^7$	$1,58 \times 10^7$	$1,27 \times 10^7$
17	$8,47 \times 10^9$	$3,63 \times 10^8$	$1,99 \times 10^9$	$1,54 \times 10^8$	$3,14 \times 10^9$

**Fuente:** Datos experimentales (anexo 01).



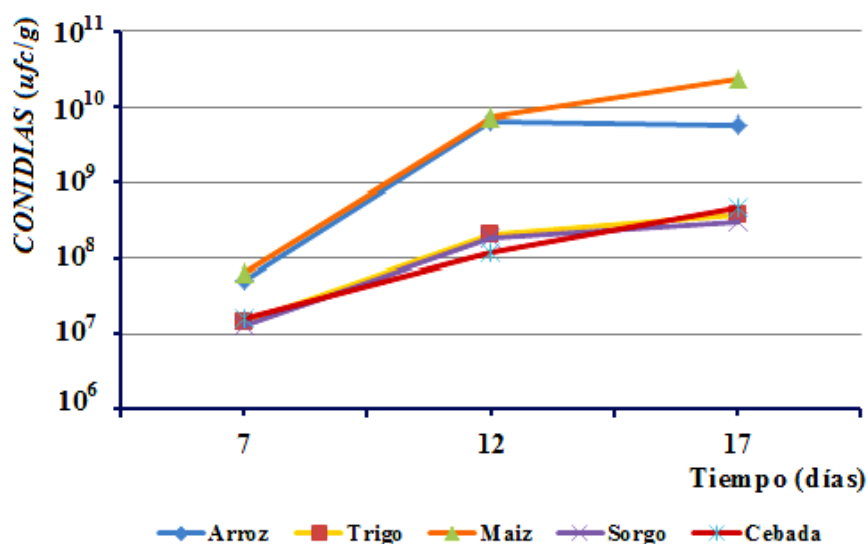
**FIGURA 01: Curvas de producción de conidias de *Isaria fumosorosea* sobre diferentes sustratos orgánicos durante 17 días de fermentación.**

En el Cuadro 06 y Figura 01 se observa que la producción promedio de conidias de *Isaria fumosorosea*, durante 17 días de fermentación es variable en los cinco sustratos evaluados, las concentraciones durante la primera evaluación (7 días), es similar en el arroz, trigo, maíz y sorgo a diferencia de la cebada, donde la concentración promedio fue la más baja con sólo  $9,58 \times 10^6$  ufc/g, a los 12 días, estos valores se incrementan ligeramente; obteniéndose la concentración más alta en el arroz con  $5,79 \times 10^7$  ufc/g y la más baja en el trigo con  $9,69 \times 10^6$  ufc/g, al final de los 17 días; las concentraciones promedios más altas se encuentran en el arroz ( $8,47 \times 10^9$  ufc/g), cebada ( $3,14 \times 10^9$  ufc/g) y maíz ( $3,63 \times 10^9$  ufc/g).

**CUADRO 07: Producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* sobre diferentes sustratos orgánicos durante 17 días de fermentación.**

Tiempo de fermentación (días)	Producción promedio de conidias (ufc/g)				
	Arroz	Trigo	Maíz	Sorgo	Cebada
7	$5,33 \times 10^7$	$1,44 \times 10^7$	$6,47 \times 10^7$	$1,28 \times 10^7$	$1,63 \times 10^7$
12	$6,64 \times 10^9$	$2,08 \times 10^8$	$7,42 \times 10^9$	$1,87 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$
17	$5,91 \times 10^9$	$3,77 \times 10^8$	$2,35 \times 10^{10}$	$3,13 \times 10^8$	$4,90 \times 10^8$

Fuente: Datos experimentales (anexo 02)



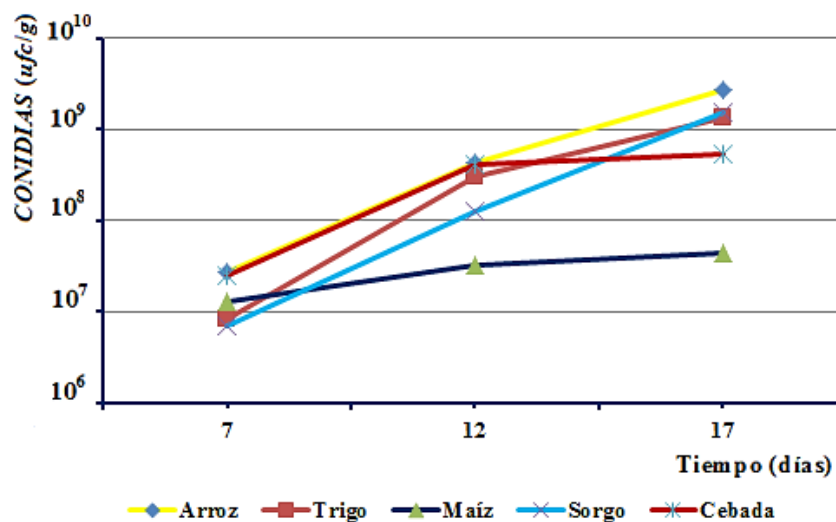
**FIGURA 02: Curvas de producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* sobre diferentes sustratos orgánicos durante 17 días de fermentación.**

En el Cuadro 07 y Figura 02, se observa que la concentración de conidias a los 7 días de cultivo de *Metarhizium anisopliae*, sobre los diferentes sustratos orgánicos son muy similares, las que se encuentran en un rango de que va de  $1,28 \times 10^7$  ufc/g en el sorgo a  $5,33 \times 10^7$  ufc/g en el arroz, con una mayor producción en el maíz con  $6,47 \times 10^7$  ufc/g, valores que se incrementan rápidamente a los 12 días de fermentación, en un rango de  $1,22 \times 10^9$  ufc/g en la cebada a  $6,64 \times 10^9$  ufc/g obtenidas en el arroz, con una máxima producción en los granos de maíz chancado con  $7,42 \times 10^9$  ufc/g, a los 17 días de evaluación, la máxima producción de conidias se observa en el maíz con  $2,35 \times 10^{10}$  ufc/g, seguido de  $5,91 \times 10^9$  ufc/g en el arroz mientras que los valores más bajos se encuentran en el sorgo ( $3,13 \times 10^8$  ufc/g), trigo ( $3,77 \times 10^8$  ufc/g) y cebada ( $4,90 \times 10^8$  ufc/g).

**CUADRO 08: Producción de conidias de *Lecanicillium lecanii* sobre diferentes sustratos orgánicos durante 17 días de fermentación.**

Tiempo de fermentación (días)	Producción promedio de conidias (ufc/g)				
	Arroz	Trigo	Maíz	Sorgo	Cebada
7	$2,77 \times 10^7$	$8,53 \times 10^6$	$1,29 \times 10^7$	$7,10 \times 10^6$	$2,50 \times 10^7$
12	$4,23 \times 10^8$	$3,03 \times 10^8$	$3,27 \times 10^7$	$1,23 \times 10^8$	$4,17 \times 10^8$
17	$2,66 \times 10^9$	$1,36 \times 10^9$	$4,47 \times 10^7$	$1,51 \times 10^9$	$5,38 \times 10^8$

Fuente: Datos experimentales (anexo 03).



**FIGURA 03: Curvas de producción de conidias de *Lecanicillium lecanii* sobre diferentes sustratos orgánicos durante 17 días de fermentación.**

En el Cuadro 08 y Figura 03, se observa que la producción promedio de conidias de *Lecanicillium lecanii* a los 7 días, estuvo en un rango de  $7,10 \times 10^6$  ufc/g (sorgo) a  $2,77 \times 10^7$  ufc/g (arroz); a los 12 días, oscilando entre  $3,27 \times 10^7$  ufc/g (maíz) a  $4,23 \times 10^8$  ufc/g (arroz); a los 17 días, al final de la fermentación, se observan las mayores concentraciones de conidias en el arroz ( $2,66 \times 10^9$  ufc/g), sorgo ( $1,51 \times 10^9$  ufc/g) y trigo ( $1,36 \times 10^9$  ufc/g).

**B. PRODUCCIÓN MÁXIMA PROMEDIO DE CONIDIAS EN LOS DIFERENTES SUSTRATOS ORGÁNICOS**

**CUADRO 09: Producción máxima promedio de conidias de los hongos entomopatógenos en los diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

TRATAMIENTOS	PRODUCCION DE CONIDIAS (ufc/g)			
	Repeticiones			Promedio
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$\chi$
<b>T<sub>1</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + arroz</b>	9,30 x 10 <sup>9</sup>	8,20 x 10 <sup>9</sup>	7,90 x 10 <sup>9</sup>	8,47 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>2</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + trigo</b>	3,20 x 10 <sup>8</sup>	3,70 x 10 <sup>8</sup>	4,00 x 10 <sup>8</sup>	3,63 x 10 <sup>8</sup>
<b>T<sub>3</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + maíz</b>	4,60 x 10 <sup>8</sup>	5,00 x 10 <sup>9</sup>	5,10 x 10 <sup>8</sup>	1,99 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>4</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + sorgo</b>	1,80 x 10 <sup>8</sup>	2,20 x 10 <sup>9</sup>	2,60 x 10 <sup>8</sup>	1,54 x 10 <sup>8</sup>
<b>T<sub>5</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + cebada</b>	6,10 x 10 <sup>8</sup>	9,00 x 10 <sup>8</sup>	7,90 x 10 <sup>9</sup>	3,14 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>6</sub>: <i>M. anisopliae</i> + arroz</b>	2,45x10 <sup>9</sup>	1,50x10 <sup>10</sup>	2,70x10 <sup>8</sup>	5,91 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>7</sub>: <i>M. anisopliae</i> + trigo</b>	4,20x10 <sup>8</sup>	4,00x10 <sup>8</sup>	3,10x10 <sup>8</sup>	3,77 x 10 <sup>8</sup>
<b>T<sub>8</sub>: <i>M. anisopliae</i> + maíz</b>	6,20x10 <sup>10</sup>	4,20x10 <sup>9</sup>	3,40x10 <sup>9</sup>	2,35 x 10 <sup>10</sup>
<b>T<sub>9</sub>: <i>M. anisopliae</i> + sorgo</b>	3,00x10 <sup>8</sup>	3,70x10 <sup>8</sup>	2,70x10 <sup>8</sup>	3,13 x 10 <sup>8</sup>
<b>T<sub>10</sub>: <i>M. anisopliae</i> + cebada</b>	5,00x10 <sup>8</sup>	5,40x10 <sup>8</sup>	4,30x10 <sup>8</sup>	4,90 x 10 <sup>8</sup>
<b>T<sub>11</sub>: <i>L. lecanii</i> + arroz</b>	3,40 x 10 <sup>8</sup>	6,23 x 10 <sup>9</sup>	1,42 x 10 <sup>9</sup>	2,66 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>12</sub>: <i>L. lecanii</i> + trigo</b>	3,30 x 10 <sup>9</sup>	2,40 x 10 <sup>8</sup>	5,50 x 10 <sup>8</sup>	1,36 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>13</sub>: <i>L. lecanii</i> + maíz</b>	7,00 x 10 <sup>7</sup>	5,00 x 10 <sup>6</sup>	5,90 x 10 <sup>7</sup>	4,47 x 10 <sup>7</sup>
<b>T<sub>14</sub>: <i>L. lecanii</i> + sorgo</b>	7,60 x 10 <sup>9</sup>	3,70 x 10 <sup>9</sup>	7,70 x 10 <sup>7</sup>	1,51 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>15</sub>: <i>L. lecanii</i> + cebada</b>	5,63 x 10 <sup>8</sup>	5,80 x 10 <sup>8</sup>	4,70 x 10 <sup>8</sup>	5,38 x 10 <sup>8</sup>

**Fuente:** Datos experimentales

En el Cuadro 09 se muestran las diferentes concentraciones de conidias promedio producidas al final de los 17 días de fermentación por los diferentes hongos entomopatógenos en cada uno de los sustratos evaluados. Se observa que la producción más baja se obtiene en el tratamiento **T<sub>13</sub>**, conformado por *Lecanicillium lecanii* sobre el sustrato maíz, con  $4,47 \times 10^7$  ufc/g, mientras que las producciones más altas se obtienen en los tratamientos **T<sub>8</sub>**, conformado por *Metarhizium anisopliae* sobre el sustrato maíz con  $2,35 \times 10^{10}$  ufc/g, seguido del **T<sub>1</sub>** constituido por *Isaria fumosorosea* sobre granos de arroz con  $8,47 \times 10^9$  ufc/g y el **T<sub>6</sub>** por *M. anisopliae* sobre granos de arroz con  $5,91 \times 10^9$  ufc/g.

**CUADRO 10: Análisis de varianza para la producción máxima promedio de conidias de los hongos entomopatógenos en los diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

F.V.	G.L.	S.C	C.M	F <sub>c</sub>	F <sub>(α=0,05)</sub>
<b>Tratamientos</b>	14	$3,69 \times 10^{15}$	$2,64 \times 10^{14}$	$3,99 \times 10^5$ **	2,06
<b>Error</b>	28	$1,98 \times 10^{10}$	$6,61 \times 10^8$		
<b>Total</b>	44	$7,32 \times 10^{25}$			
<b>C.V. = 11,88 %</b>			<b>S<math>\check{y}</math> = 0,33</b>		

\*\* : Altamente significativa

En el Cuadro 10, se muestran los resultados del análisis de varianza a los promedios de producción de conidias de los diferentes tratamientos, donde hay diferencias altamente significativas entre ellas debido a que el **F<sub>calculado</sub>** ( $3,99 \times 10^5$ ) es mayor a **F<sub>tabular</sub>** (2,06), a un nivel de confianza del 95%.

**CUADRO 11: Prueba de Duncan para la producción máxima promedio de conidias de los hongos entomopatógenos obtenidas sobre diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

<b>Tratamientos</b>	<b>Promedios (ufc/g)</b>	<b>Significancia (<math>F_{\alpha=0,05}</math>)</b>
<b>T<sub>8</sub>:<i>M. anisopliae</i> + maíz</b>	2,32x 10 <sup>10</sup>	a
<b>T<sub>1</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + arroz</b>	8,47x 10 <sup>9</sup>	a b
<b>T<sub>6</sub>:<i>M. anisopliae</i> + arroz</b>	5,91x 10 <sup>9</sup>	a b c
<b>T<sub>5</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + cebada</b>	3,14x 10 <sup>9</sup>	a b c d
<b>T<sub>11</sub>:<i>L. lecanii</i> + arroz</b>	2,56x 10 <sup>9</sup>	a b c d e
<b>T<sub>3</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + maíz</b>	1,99x 10 <sup>9</sup>	a b c d e
<b>T<sub>14</sub>:<i>L. lecanii</i> + sorgo</b>	1,51x 10 <sup>9</sup>	b c d e
<b>T<sub>12</sub>: <i>L. lecanii</i>+ trigo</b>	1,36x 10 <sup>9</sup>	b c d e
<b>T<sub>4</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + sorgo</b>	8,80x10 <sup>8</sup>	b c d e
<b>T<sub>15</sub>:<i>L. lecanii</i> + cebada</b>	5,38x10 <sup>8</sup>	c d e
<b>T<sub>10</sub>:<i>M. anisopliae</i> + cebada</b>	4,90x10 <sup>8</sup>	c d e
<b>T<sub>7</sub>: <i>M. anisopliae</i> + trigo</b>	3,77x10 <sup>8</sup>	d e
<b>T<sub>2</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + trigo</b>	3,63x10 <sup>8</sup>	d e
<b>T<sub>9</sub>:<i>M. anisopliae</i> + sorgo</b>	3,13x10 <sup>8</sup>	d e
<b>T<sub>13</sub>:<i>L. lecanii</i> + maíz</b>	4,47x 10 <sup>7</sup>	e

En el Cuadro 11, mediante la prueba de Duncan se determinó que el tratamiento **T<sub>8</sub>**, presenta el mejor promedio de producción de conidias para *Metarhizium anisopliae* con 2,32 x 10<sup>10</sup> ufc/g, en segundo lugar se encuentra el tratamiento **T<sub>1</sub>** (*I. fumosorosea* + arroz) con 8,47 x 10<sup>9</sup> ufc/g, en tercer lugar el **T<sub>6</sub>** (*M. anisopliae* + arroz) con 5,91 x 10<sup>9</sup> ufc/g, en cuarto lugar se observa al **T<sub>5</sub>** (*I. fumosorosea* + cebada) con 3,14 x 10<sup>9</sup> ufc/g en quinto lugar se observan a los tratamientos **T<sub>11</sub>** (*L. lecanii* + arroz) con 2,56 x 10<sup>9</sup> ufc/g y **T<sub>3</sub>** (*I. fumosorosea* + maíz) con 1,99 x 10<sup>9</sup> ufc/g; en el resto de tratamientos la producción de conidias disminuye paulatinamente

obteniéndose la más baja producción en el **T<sub>13</sub>** (*L. lecanii* + maíz) con 4,47 x 10<sup>7</sup> ufc/g.

**CUADRO 12: Producción máxima promedio de conidias de *Isaria fumosorosea* sobre diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

TRATAMIENTOS	PRODUCCION DE CONIDIAS (ufc/g)			
	Repeticiones			Promedio $\bar{x}$
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	
<b>T<sub>1</sub></b> : <i>I. fumosorosea</i> + <b>arroz</b>	9,30 x 10 <sup>9</sup>	8,20 x 10 <sup>9</sup>	7,90 x 10 <sup>9</sup>	8,47 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>2</sub></b> : <i>I. fumosorosea</i> + <b>trigo</b>	3,20 x 10 <sup>8</sup>	3,70 x 10 <sup>8</sup>	4,00 x 10 <sup>8</sup>	3,63 x 10 <sup>8</sup>
<b>T<sub>3</sub></b> : <i>I. fumosorosea</i> + <b>maíz</b>	4,60 x 10 <sup>8</sup>	5,00 x 10 <sup>9</sup>	5,10 x 10 <sup>8</sup>	1,99 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>4</sub></b> : <i>I. fumosorosea</i> + <b>sorgo</b>	1,80 x 10 <sup>8</sup>	2,20 x 10 <sup>9</sup>	2,60 x 10 <sup>8</sup>	1,54 x 10 <sup>8</sup>
<b>T<sub>5</sub></b> : <i>I. fumosorosea</i> + <b>cebada</b>	6,10 x 10 <sup>8</sup>	9,00 x 10 <sup>8</sup>	7,90 x 10 <sup>9</sup>	3,14 x 10 <sup>9</sup>

**Fuente:** Datos experimentales

En el Cuadro 12, se observa que la mayor producción promedio de conidias de *Isaria fumosorosea* al final de la fermentación, se da en **T<sub>1</sub>** conformado por el sustrato arroz con 8,47 x 10<sup>9</sup> ufc/g, seguido de los tratamientos **T<sub>5</sub>** con 3,14 x 10<sup>9</sup> ufc/g y **T<sub>3</sub>** con 1,99 x 10<sup>9</sup> ufc/g; mientras que en el **T<sub>4</sub>**, se da la más baja producción con sólo 1,54x 10<sup>8</sup> ufc/g.

**CUADRO 13: Análisis de varianza para la producción máxima promedio de conidias de *Isaria fumosorosea* en los diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

F.V.	G.L.	S.C	C.M	Fc	F <sub>(α=0,05)</sub>
Tratamientos	4	3394,35	848,59	67,16**	3,47
Error	10	126,35	12,63		
Total	14	352,69			
		C.V. = 5,05 %		S $\check{y}$ = 0,265	

\*\* : Altamente significativa.

Al realizar el análisis de varianza de los promedios de la producción de conidias de *Isaria fumosorosea* por fermentación en sustrato sólido, se muestra que hay diferencias altamente significativas entre ellas debido a que el **F**<sub>calculado</sub> (67,16) es mayor a **F**<sub>tabular</sub> (3,47) a un nivel de confianza del 95%.

**CUADRO 14: Prueba de Duncan para la producción máxima promedio de conidias de *Isaria fumosorosea* sobre diferentes sustratos orgánicos durante 17 días de fermentación.**

Tratamientos	Promedios (ufc/g)	Significancia (F <sub>α=0,05</sub> )
<b>T<sub>1</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + arroz</b>	8,47 x 10 <sup>9</sup>	a
<b>T<sub>5</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + cebada</b>	3,14 x 10 <sup>9</sup>	ab
<b>T<sub>3</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + maíz</b>	1,99 x 10 <sup>9</sup>	ab
<b>T<sub>2</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + trigo</b>	3,63 x 10 <sup>8</sup>	b c
<b>T<sub>4</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + sorgo</b>	1,54x 10 <sup>8</sup>	c

Mediante la prueba de Duncan se determinó que el tratamiento **T<sub>1</sub>** conformado por el sustrato arroz, presenta el mejor promedio de producción

con  $8,47 \times 10^9$  ufc/g, en segundo lugar se encuentran los tratamientos **T<sub>5</sub>** y **T<sub>3</sub>** con  $3,14 \times 10^9$  ufc/g y  $1,99 \times 10^9$  ufc/g respectivamente, mientras que los promedios más bajos se produjeron en los tratamientos **T<sub>2</sub>** ( $3,63 \times 10^8$  ufc/g) y **T<sub>4</sub>** ( $1,54 \times 10^8$  ufc/g).

**CUADRO 15: Producción máxima promedio de conidias de *Metarhizium anisopliae* sobre diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

TRATAMIENTOS	PRODUCCION DE CONIDIAS (ufc/g)			
	Repeticiones			Promedio $\bar{x}$
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	
<b>T<sub>6</sub>:<i>M. anisopliae</i> + arroz</b>	$2,45 \times 10^9$	$1,50 \times 10^{10}$	$2,70 \times 10^8$	$5,91 \times 10^9$
<b>T<sub>7</sub>:<i>M. anisopliae</i> + trigo</b>	$4,20 \times 10^8$	$4,00 \times 10^8$	$3,10 \times 10^8$	$3,77 \times 10^8$
<b>T<sub>8</sub>:<i>M. anisopliae</i> + maíz</b>	$6,20 \times 10^{10}$	$4,20 \times 10^9$	$3,40 \times 10^9$	$2,35 \times 10^{10}$
<b>T<sub>9</sub>:<i>M. anisopliae</i> + sorgo</b>	$3,00 \times 10^8$	$3,70 \times 10^8$	$2,70 \times 10^8$	$3,13 \times 10^8$
<b>T<sub>10</sub>:<i>M. anisopliae</i> + cebada</b>	$5,00 \times 10^8$	$5,40 \times 10^8$	$4,30 \times 10^8$	$4,90 \times 10^8$

**Fuente:** Datos experimentales

En el Cuadro 15, se observa que en el tratamiento **T<sub>8</sub>** conformado por el sustrato maíz, se produce la mayor producción promedio de conidias de *Metarhizium anisopliae* con  $2,35 \times 10^{10}$  ufc/g, seguido del **T<sub>6</sub>** (arroz) con  $5,91 \times 10^9$  ufc/g; mientras que los promedios más bajos se obtienen en los tratamientos **T<sub>7</sub>** (granos de trigo) con  $3,77 \times 10^8$  ufc/g y **T<sub>9</sub>** (sorgo) con  $3,13 \times 10^8$  ufc/g.

**CUADRO 16: Análisis de varianza para la producción máxima promedio de conidias de *Metarhizium anisopliae* sobre diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

F.V.	G.L.	S.C	C.M	Fc	F <sub>(α=0,05)</sub>
Tratamientos	4	68789,66	17197,42	495,85*	3,47
Error	10	346,83	34,68		
Total	14	69136,49			
		C.V. = 5,59 %		S $\bar{y}$ = 0,291	

\*: Altamente significativas.

El análisis de varianza a los promedios de producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* por fermentación en sustrato sólido, indica que hay diferencias altamente significativas entre ellas debido a que el  $F_{\text{calculado}}$  (495,85) es mayor al  $F_{\text{tabular}}$  (3,47), a un nivel de confianza del 95%.

**CUADRO 17: Prueba de Duncan para la producción máxima promedio de conidias de *Metarhizium anisopliae* sobre diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

Tratamientos	Promedios (ufc/g)	Significancia (F <sub>α=0,05</sub> )
<b>T<sub>8</sub>:<i>M. anisopliae</i> + maíz</b>	2,35 x 10 <sup>10</sup>	a
<b>T<sub>6</sub>:<i>M. anisopliae</i> + arroz</b>	5,91 x 10 <sup>9</sup>	ab
<b>T<sub>10</sub>:<i>M. anisopliae</i> + cebada</b>	4,90 x 10 <sup>8</sup>	bc
<b>T<sub>7</sub>:<i>M. anisopliae</i> + trigo</b>	3,77 x 10 <sup>8</sup>	bc
<b>T<sub>9</sub>:<i>M. anisopliae</i> + sorgo</b>	3,13 x 10 <sup>8</sup>	c

Mediante la prueba de Duncan se determinó que el tratamiento **T<sub>8</sub>** conformado por el sustrato maíz, presenta el mejor promedio de producción de conidias con 2,35 x 10<sup>10</sup> ufc/g, seguido del tratamiento **T<sub>6</sub>** (arroz) con

5,91 x 10<sup>9</sup> ufc/g, mientras que en tercer lugar se encuentran los tratamientos **T<sub>10</sub>** (cebada) y **T<sub>7</sub>** (trigo) con 4,90 x 10<sup>8</sup> y 3,77 x 10<sup>8</sup> ufc / g respetivamente, a diferencia del **T<sub>9</sub>** (sorgo) donde se da la menor producción con 3,13 x 10<sup>8</sup> ufc/g.

**CUADRO 18: Producción máxima promedio de conidias de *Lecanicillium lecanii* sobre diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

TRATAMIENTOS	PRODUCCION DE CONIDIAS (ufc/g)			
	Repeticiones			Promedio ( <i>x</i> )
	<i>x</i> <sub>1</sub>	<i>x</i> <sub>2</sub>	<i>x</i> <sub>3</sub>	
<b>T<sub>11</sub>:<i>L. lecanii</i>+ arroz</b>	3,40 x 10 <sup>8</sup>	6,23 x 10 <sup>9</sup>	1,42 x 10 <sup>9</sup>	2,66 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>12</sub>:<i>L. lecanii</i> + trigo</b>	3,30 x 10 <sup>9</sup>	2,40 x 10 <sup>8</sup>	5,50 x 10 <sup>8</sup>	1,36 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>13</sub>:<i>L. lecanii</i> + maíz</b>	7,00 x 10 <sup>7</sup>	5,00 x 10 <sup>6</sup>	5,90 x 10 <sup>7</sup>	4,47 x 10 <sup>7</sup>
<b>T<sub>14</sub>:<i>L. lecanii</i> + sorgo</b>	7,60 x 10 <sup>9</sup>	3,70 x 10 <sup>9</sup>	7,70 x 10 <sup>7</sup>	1,51 x 10 <sup>9</sup>
<b>T<sub>15</sub>:<i>L. lecanii</i>+ cebada</b>	5,63 x 10 <sup>8</sup>	5,80 x 10 <sup>8</sup>	4,70 x 10 <sup>8</sup>	5,38 x 10 <sup>8</sup>

**Fuente:** Datos experimentales

En el Cuadro 18, se observa que la mayor producción promedio de conidias del hongo *Lecanicillium lecanii*, se dan en los tratamiento **T<sub>11</sub>** (arroz) con 2,66 x 10<sup>9</sup> ufc/g; **T<sub>14</sub>** (sorgo) con 1,51 x 10<sup>9</sup> ufc/g y **T<sub>12</sub>** (trigo) con 1,36 x 10<sup>9</sup> ufc/g; mientras que en el **T<sub>13</sub>** (maíz) se observa la más baja producción con solo 4,47 x 10<sup>7</sup> ufc/g.

**CUADRO 19: Análisis de varianza para la producción máxima promedio de conidias de *Lecanicillium lecanii* sobre diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

F.V.	G.L.	S.C	C.M	Fc	F <sub>(α=0,05)</sub>
Tratamiento	4	233682,42	58420,60	108,29**	3,47
Error	10	5394,98	539,50		
Total	14	239077,40			
		C.V. = 7,11 %		S $\bar{y}$ = 0,35	

\*\* : Altamente significativa.

Al realizar el análisis de varianza de los promedios de la producción de conidias del hongo *Lecanicillium lecanii*, se muestra que hay diferencias altamente significativas entre ellas debido a que el F<sub>calculado</sub> (108,29) es mayor al F<sub>tabular</sub> (3,47) a un nivel de confianza del 95%.

**CUADRO 20: Prueba de Duncan para la producción máxima promedio de conidias de *Lecanicillium lecanii* sobre diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

Tratamientos	Promedios (ufc/g)	Significancia (F <sub>α=0,05</sub> )
T <sub>11</sub> : <i>L. lecanii</i> + arroz	2,66 x 10 <sup>9</sup>	a
T <sub>14</sub> : <i>L. lecanii</i> + sorgo	1,51 x 10 <sup>9</sup>	ab
T <sub>12</sub> : <i>L. lecanii</i> + trigo	1,36 x 10 <sup>9</sup>	ab
T <sub>15</sub> : <i>L. lecanii</i> + cebada	5,38 x 10 <sup>8</sup>	abc
T <sub>13</sub> : <i>L. lecanii</i> + maíz	4,47 x 10 <sup>7</sup>	bc

Mediante la prueba de Duncan se determinó que la mejor producción promedio de conidias de *Lecanicillium lecanii*, se da en el tratamiento **T<sub>11</sub>** (arroz) con  $2,66 \times 10^9$  ufc/g, en segundo lugar se encuentran los tratamiento **T<sub>14</sub>** (sorgo) con  $1,51 \times 10^9$  ufc/g y **T<sub>12</sub>** (trigo) con  $1,36 \times 10^9$  ufc/g, en tercer lugar el **T<sup>15</sup>** (cebada) con  $5,38 \times 10^8$  ufc/g mientras que el promedio más bajo se observa en el **T<sup>13</sup>** (maíz) con  $4,47 \times 10^7$  ufc/g.

C. PORCENTAJE DE HUMEDAD EN LOS DIFERENTES SUSTRATOS ORGÁNICOS EN FERMENTACIÓN.

CUADRO 21: Porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos durante la producción de conidias de *Isaria fumosorosea* durante 17 días de fermentación.

Tiempo de fermentación (días)	Porcentaje de humedad (%)				
	Arroz	Trigo	Maíz	Sorgo	Cebada
1	73,47	69,51	75,12	67,60	68,25
7	70,74	64,54	73,20	66,08	63,42
12	68,60	61,12	72,46	60,70	65,33
17	58,21	49,11	64,17	54,74	56,23

Fuente: Datos experimentales (anexo 04).

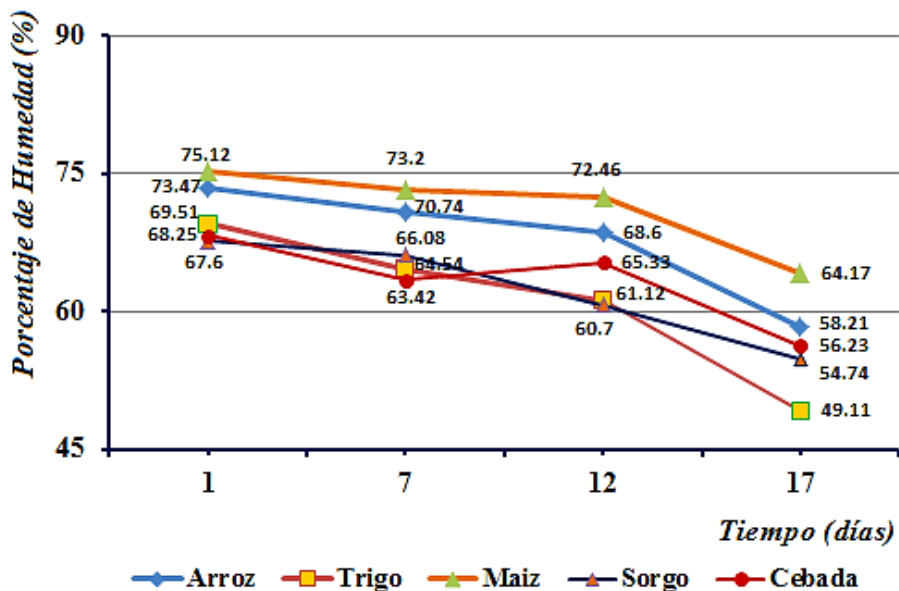


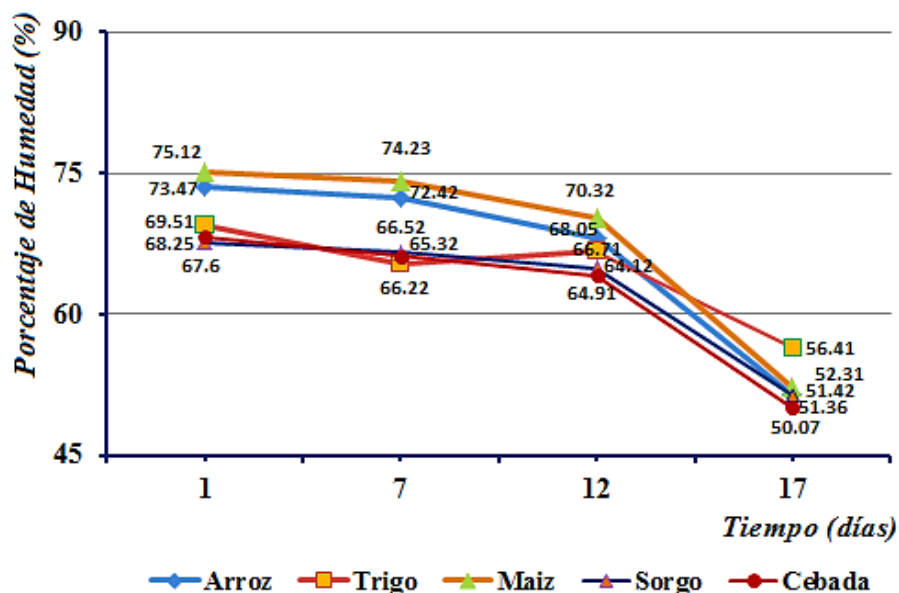
FIGURA 04: Curvas del porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos durante la producción de conidias de *Isaria fumosorosea* durante 17 días de fermentación.

En el Cuadro 21 y Figura 04, se observa que el porcentaje de humedad inicial de los diferentes sustratos orgánicos inoculadas con *Isaria fumosorosea*, varia de 67,60% a 75,12% en el sorgo y maíz respectivamente, a los 7 días el porcentaje se reduce ligeramente en los diferentes sustratos, con valores que van de 63,42% (cebada) a 73,20% en el maíz; a los 12 días, la humedad se mantiene entre 61,12% (trigo) a 72,46% en el maíz; pero a los 17 días, la humedad descende en todos los sustratos presentando el valor más bajo el trigo con 49,11%, seguido del sorgo (54,74%), cebada (56,23%), arroz (58,21%) y maíz (64,17%).

**CUADRO 22:** Porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos durante la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* durante 17 días de fermentación.

Tiempo de fermentación (días)	Porcentaje de humedad (%)				
	Arroz	Trigo	Maíz	Sorgo	Cebada
1	73,47	69,51	75,12	67,60	68,25
7	72,42	65,32	74,23	66,52	66,22
12	68,05	66,71	70,32	64,91	64,12
17	51,42	56,41	52,31	51,36	50,07

Fuente: Datos experimentales (anexo 05).



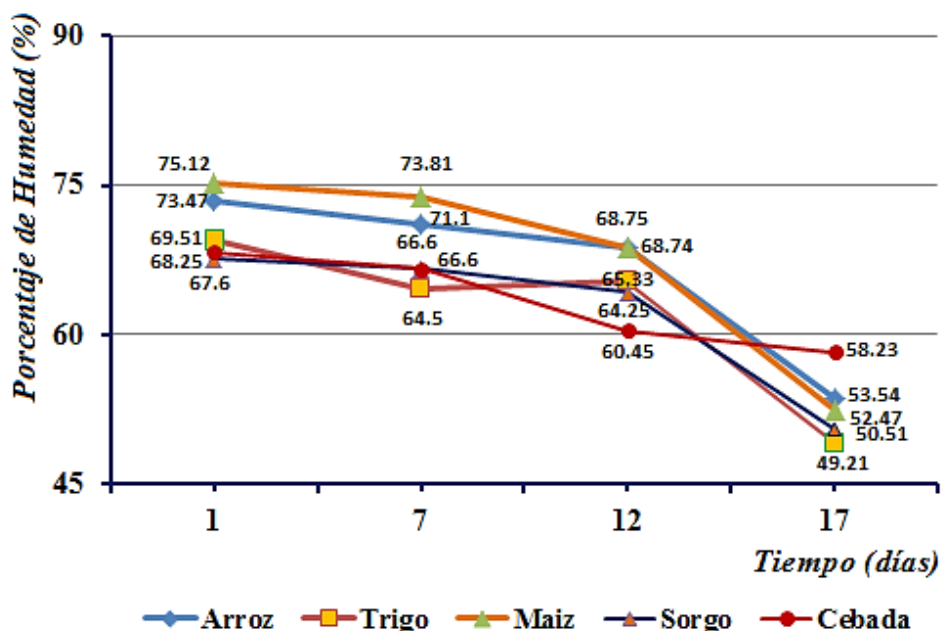
**FIGURA 05:** Curvas del porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos durante la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* durante 17 días de fermentación.

En el Cuadro 22 y Figura 05, se observa que el porcentaje de humedad inicial de los diferentes sustratos orgánicos inoculadas con *Metarhizium anisopliae*, desciende ligeramente a los 7 días de evaluación, valores que se encuentran entre 66,22% (cebada) a 74,23% (maíz); a los 12 días, la humedad oscila entre 64,12% (cebada) a 70,32% (maíz); a los 17 días, el porcentaje de humedad desciende en todos los sustratos, presentando el valor más bajo la cebada con 50,07%, seguidos del sorgo (51,36%), arroz (51,42%), maíz (52,31%) y trigo (56,41%).

**CUADRO 23: Porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos durante la producción de conidias de *Lecanicillium lecanii* durante 17 días de fermentación.**

Tiempo de fermentación (días)	Porcentaje de humedad (%)				
	Arroz	Trigo	Maíz	Sorgo	Cebada
1	73,47	69,51	75,12	67,60	68,25
7	71,10	64,50	73,81	66,60	66,60
12	68,74	65,33	68,75	64,25	60,45
17	53,54	49,21	52,47	50,51	58,23

Fuente: Datos experimentales (anexo 06).



**FIGURA 06: Curvas del porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos durante la producción de conidias de *Lecanicillium lecanii* durante 17 días de fermentación.**

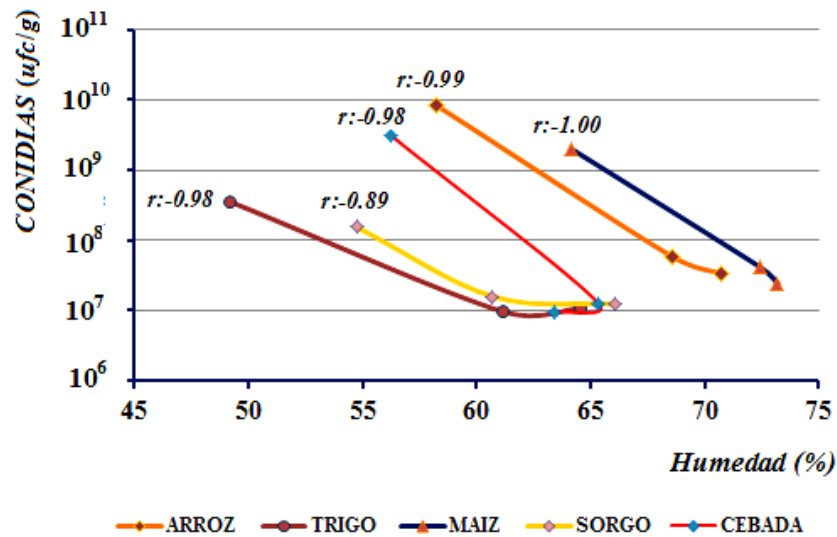
En el Cuadro 23 y Figura 06, se observa que el porcentaje de humedad inicial de los diferentes sustratos orgánicos inoculadas con *Lecanicillium lecanii*, desciende ligeramente a los 7 días de evaluación, similar a los otros hongos entomopatógenos, valores que se encuentran entre 66,60% (cebada y sorgo) a 73,81% (arroz); así mismo a los 12 días, la humedad en los sustratos baja entre 60,45% (cebada) a 68,75% (maíz); mientras que a los 17 días, el porcentaje de humedad desciende en todos los sustratos presentando el valor más bajo el trigo con 49,21%, seguidos del sorgo (50,51%), maíz (52,47%), arroz (53,54%) y cebada (58,23%).

**D. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE PEARSON ENTRE PRODUCCIÓN DE CONIDIAS Y PORCENTAJE DE HUMEDAD EN LOS DIFERENTES SUSTRATOS ORGÁNICOS.**

**CUADRO 24: Coeficiente de correlación de Pearson entre la producción de conidias de *Isaria fumosorosea* y el porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos.**

Sustrato orgánico	Tiempo de fermentación (días)	Producción de conidias (ufc/g)	Porcentaje de humedad (%)	Coefficiente de Pearson (r)
<b>Arroz</b>	<b>7</b>	$3,40 \times 10^7$	70,74	<b>-0,99</b>
	<b>12</b>	$7,73 \times 10^8$	68,6	
	<b>17</b>	$8,47 \times 10^9$	58,21	
<b>Trigo</b>	<b>7</b>	$1,10 \times 10^7$	70,74	<b>-0,98</b>
	<b>12</b>	$1,00 \times 10^8$	68,6	
	<b>17</b>	$3,63 \times 10^8$	58,21	
<b>Maíz</b>	<b>7</b>	$2,47 \times 10^7$	70,74	<b>-1</b>
	<b>12</b>	$5,37 \times 10^8$	68,6	
	<b>17</b>	$1,99 \times 10^9$	58,21	
<b>Sorgo</b>	<b>7</b>	$1,23 \times 10^7$	70,74	<b>-0,89</b>
	<b>12</b>	$7,73 \times 10^8$	68,6	
	<b>17</b>	$1,54 \times 10^8$	58,21	
<b>Cebada</b>	<b>7</b>	$9,67 \times 10^6$	70,74	<b>-0,98</b>
	<b>12</b>	$7,73 \times 10^8$	68,6	
	<b>17</b>	$3,14 \times 10^9$	58,21	

**Fuente:** Datos experimentales.



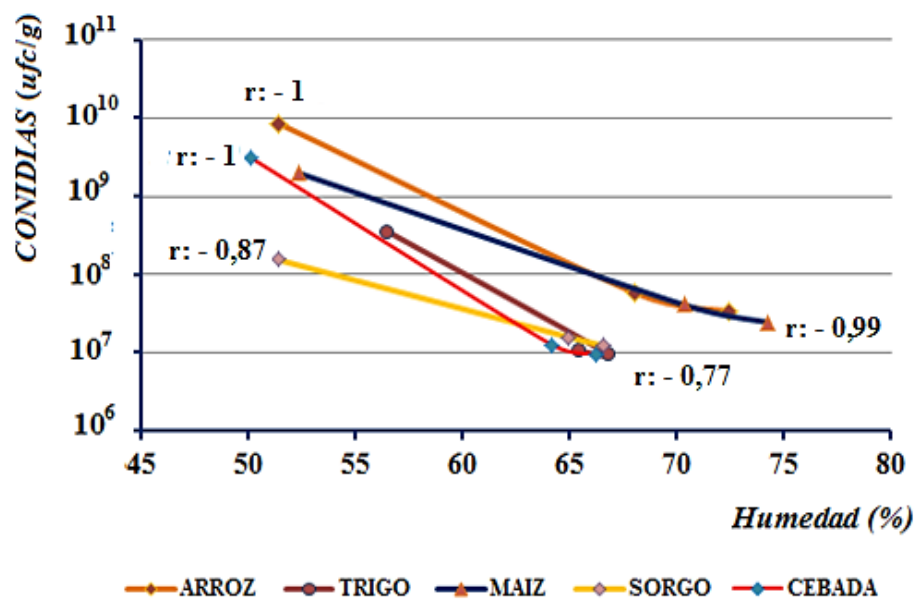
**FIGURA 07:** Curvas del coeficiente de correlación de Pearson entre la producción de conidias de *Isaria fumosorosea* y el porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos.

En el Cuadro 24 y Figura 07, se observa que los coeficientes de correlación de Pearson entre la producción de conidias de *Isaria fumosorosea* y el porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos, están relacionadas de manera inversa, a medida que se secan los sustratos, la producción de conidias se incrementa, esta relación es más lineal con los sustratos maíz ( $r: -1$ ), arroz ( $r: -0,99$ ) y cebada ( $r: -0,98$ ).

**CUADRO 25: Coeficiente de correlación de Pearson entre la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* y el porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos.**

Sustrato orgánico	Tiempo de fermentación (días)	Producción de conidias (ufc/g)	Porcentaje de humedad (%)	Coeficiente de Pearson (r)
Arroz	7	1,93 x 10 <sup>8</sup>	72,42	<b>-1</b>
	12	9,67 x 10 <sup>8</sup>	68,05	
	17	5,91 x 10 <sup>9</sup>	51,42	
Trigo	7	1,47 x 10 <sup>7</sup>	65,32	<b>-0,77</b>
	12	2,80 x 10 <sup>8</sup>	66,71	
	17	3,77 x 10 <sup>8</sup>	56,41	
Maíz	7	3,09 x 10 <sup>8</sup>	74,23	<b>-0,99</b>
	12	4,21 x 10 <sup>9</sup>	70,32	
	17	2,35 x 10 <sup>10</sup>	52,31	
Sorgo	7	5,20 x 10 <sup>7</sup>	66,52	<b>-0,87</b>
	12	1,87 x 10 <sup>8</sup>	64,91	
	17	1,21 x 10 <sup>9</sup>	51,36	
Cebada	7	3,13 x 10 <sup>8</sup>	66,22	<b>-1</b>
	12	3,50 x 10 <sup>8</sup>	64,12	
	17	4,90 x 10 <sup>8</sup>	50,07	

**Fuente:** Datos experimentales.



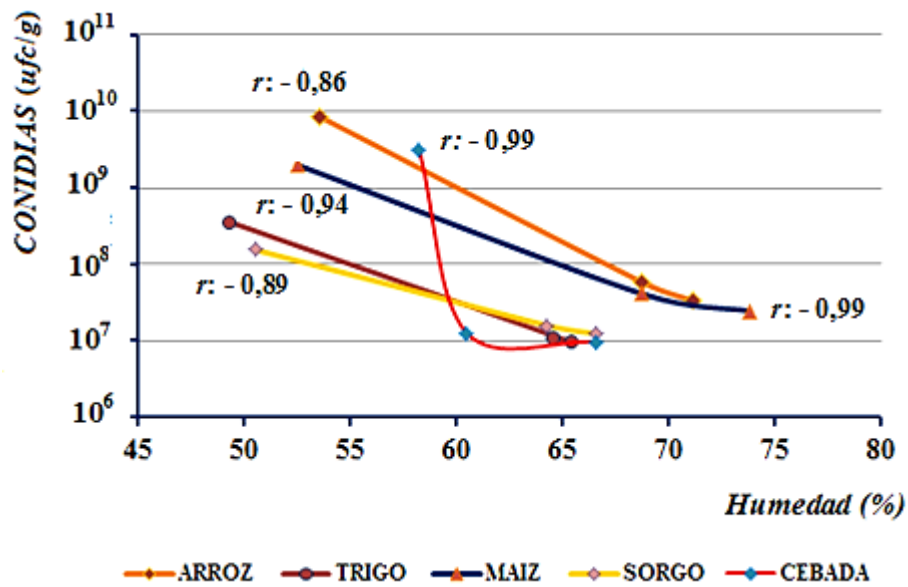
**FIGURA 08:** Curvas del coeficiente de correlación de Pearson entre la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* y el porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos.

En el Cuadro 25 y Figura 08, se observa que los coeficientes de correlación de Pearson entre la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* y el porcentaje de humedad, están relacionadas de manera inversa, esta relación es más lineal con los sustratos arroz ( $r: -1$ ), cebada ( $r: -1$ ) y maíz ( $r: -0,99$ ), mientras que es menor en el sorgo ( $r: -0,87$ ) y trigo ( $r: -0,77$ ).

**CUADRO 26: Coeficiente de correlación de Pearson entre la producción de conidias de *Lecanicillium lecanii* y el porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos.**

Sustrato orgánico	Tiempo de fermentación (días)	Producción de conidias (ufc/g)	Porcentaje de humedad (%)	Coeficiente de Pearson (r)
<b>Arroz</b>	<b>7</b>	1,09 x 10 <sup>7</sup>	71,10	<b>-0,86</b>
	<b>12</b>	4,23 x 10 <sup>8</sup>	68,74	
	<b>17</b>	2,66 x 10 <sup>9</sup>	53,54	
<b>Trigo</b>	<b>7</b>	1,63 x 10 <sup>7</sup>	64,50	<b>-0,94</b>
	<b>12</b>	3,03 x 10 <sup>8</sup>	65,33	
	<b>17</b>	1,36 x 10 <sup>9</sup>	49,21	
<b>Maíz</b>	<b>7</b>	1,83 x 10 <sup>7</sup>	73,81	<b>-0,99</b>
	<b>12</b>	3,27 x 10 <sup>8</sup>	68,75	
	<b>17</b>	5,80 x 10 <sup>8</sup>	52,47	
<b>Sorgo</b>	<b>7</b>	1,10 x 10 <sup>7</sup>	66,60	<b>-0,89</b>
	<b>12</b>	1,23 x 10 <sup>8</sup>	64,25	
	<b>17</b>	1,51 x 10 <sup>9</sup>	50,51	
<b>Cebada</b>	<b>7</b>	2,50 x 10 <sup>7</sup>	66,60	<b>-0,99</b>
	<b>12</b>	4,17 x 10 <sup>8</sup>	60,45	
	<b>17</b>	5,38 x 10 <sup>8</sup>	58,23	

Fuente: Datos experimentales.



**FIGURA 09:** Curvas del coeficiente de correlación de Pearson entre la producción de conidias de *Lecanicillium lecanii* y el porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos.

En el Cuadro 26 y la Figura 09, se observa que los coeficientes de correlación de Pearson entre la producción de conidias de *Lecanicillium lecanii* y el porcentaje de humedad de los sustratos, están relacionados de manera inversamente lineal, esta relación es más lineal con los sustratos maíz ( $r: -0,99$ ) y cebada ( $r: -0,99$ ) y menor en trigo ( $r: -0,94$ ), sorgo ( $r: -0,89$ ) y arroz ( $r: -0,86$ ).

E. PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE LAS CONIDIAS OBTENIDAS EN LOS DIFERENTES SUSTRATOS ORGÁNICOS.

**CUADRO 27: Porcentaje de germinación de las conidias de los hongos entomopatógenos producidos en diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

TRATAMIENTOS	PORCENTAJE DE GERMINACION (%)			
	Repeticiones			Promedio
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$\bar{x}$
<b>T<sub>1</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + arroz</b>	96,72	98,08	95,95	96,91
<b>T<sub>2</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + trigo</b>	96,15	93,55	94,64	94,78
<b>T<sub>3</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + maíz</b>	90,57	91,04	94,44	92,02
<b>T<sub>4</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + sorgo</b>	90,00	93,85	89,83	91,23
<b>T<sub>5</sub>: <i>I. fumosorosea</i> + cebada</b>	94,12	93,33	91,94	93,13
<b>T<sub>6</sub>: <i>M. anisopliae</i> + arroz</b>	93,44	92,06	96,23	93,91
<b>T<sub>7</sub>: <i>M. anisopliae</i> + trigo</b>	92,98	96,49	95,08	94,85
<b>T<sub>8</sub>: <i>M. anisopliae</i> + maíz</b>	95,08	95,38	93,75	94,74
<b>T<sub>9</sub>: <i>M. anisopliae</i> + sorgo</b>	91,67	92,19	92,59	92,15
<b>T<sub>10</sub>: <i>M. anisopliae</i> + cebada</b>	91,53	91,43	91,38	91,44
<b>T<sub>11</sub>: <i>L. lecanii</i> + arroz</b>	98,25	93,94	98,00	96,73
<b>T<sub>12</sub>: <i>L. lecanii</i> + trigo</b>	94,64	95,08	96,15	95,29
<b>T<sub>13</sub>: <i>L. lecanii</i> + maíz</b>	89,66	89,83	93,33	90,94
<b>T<sub>14</sub>: <i>L. lecanii</i> + sorgo</b>	91,04	93,65	94,92	93,20
<b>T<sub>15</sub>: <i>L. lecanii</i> + cebada</b>	92,45	94,12	88,14	91,57

**Fuente:** Datos experimentales

El Cuadro 27, se observa los porcentajes de germinación de las conidias de los diferentes hongos entomopatógenos producidos en los diferentes sustratos orgánicos, donde los porcentajes más altos proceden de los tratamientos **T<sub>1</sub>** (*I. fumosorosea* + arroz) con 96,91%, seguido del **T<sub>11</sub>** (*L. lecanii* + arroz) con 96,73%, a diferencia del tratamientos **T<sub>13</sub>** (*L. lecanii* + maíz) que presenta el más bajo porcentaje de germinación con 91,57%.

**CUADRO 28: Análisis de varianza para el porcentaje de germinación de las conidias producidas sobre diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>Fc</b>	<b>F<sub>(α=0,05)</sub></b>
<b>Tratamientos</b>	14	163,17	11,66	3,76*	2,04
<b>Error</b>	28	93,01	3,10		
<b>Total</b>	44	256,18			
<b>C.V. = 3,65 %</b>			<b>S<math>\check{y}</math> = 1,01</b>		

\*: Ligeramente significativa.

Al realizar el análisis de varianza de los porcentajes de germinación de las conidias de los hongos entomopatógenos procedentes de los diferentes tratamientos, se muestra que hay diferencias ligeramente significativas entre ellas, debido a que el  $F_{\text{calculado}}$  (3,76) es mayor al  $F_{\text{tabular}}$ (2,04) a un nivel de confianza del 95%.

**CUADRO 29: Prueba de Duncan para el porcentaje de germinación de las conidias de los hongos entomopatógenos producidas en diferentes sustratos orgánicos por fermentación en sustrato sólido.**

Tratamientos	Porcentaje de Germinación (%)	Significancia ( $F_{\alpha=0,05}$ )
<b>T<sub>1</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + arroz</b>	96,91	a
<b>T<sub>11</sub>:<i>L. lecanii</i> + arroz</b>	96,73	ab
<b>T<sub>12</sub>: <i>L. lecanii</i>+ trigo</b>	95,29	abc
<b>T<sub>7</sub>: <i>M. anisopliae</i> + trigo</b>	94,85	abcd
<b>T<sub>2</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + trigo</b>	94,78	abcde
<b>T<sub>8</sub>:<i>M. anisopliae</i> + maíz</b>	94,74	abcde
<b>T<sub>6</sub>:<i>M. anisopliae</i> + arroz</b>	93,91	abcde
<b>T<sub>14</sub>:<i>L. lecanii</i> + sorgo</b>	93,20	bcde
<b>T<sub>5</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + cebada</b>	93,13	cde
<b>T<sub>9</sub>:<i>M. anisopliae</i> + sorgo</b>	92,15	de
<b>T<sub>3</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + maíz</b>	92,02	de
<b>T<sub>15</sub>:<i>L. lecanii</i> + cebada</b>	91,57	de
<b>T<sub>10</sub>:<i>M. anisopliae</i> + cebada</b>	91,44	e
<b>T<sub>4</sub>:<i>I. fumosorosea</i> + sorgo</b>	91,23	e
<b>T<sub>13</sub>:<i>L. lecanii</i> + maíz</b>	90,94	e

**Fuente:** Datos experimentales

En el cuadro 29, se determinó mediante la prueba de Duncan, que el mejor porcentaje de germinación de conidias proceden del tratamiento **T<sub>1</sub>** (*I. fumosorosea* + arroz) con 96,91%, en segundo lugar se encuentra el **T<sub>11</sub>** (*L. lecanii* + arroz) con 96,73%, en tercer lugar **T<sub>12</sub>** (*L. lecanii*+ trigo) mientras que los tratamientos **T<sub>10</sub>** (*M. anisopliae* + cebada) **T<sub>4</sub>** (*I. fumosorosea* + sorgo) y **T<sub>13</sub>** (*L. lecanii* + maíz), obtienen los promedios más bajos con 91,44%, 91,2% y 90,94% respectivamente.

## V. DISCUSION

Los bioinsecticidas han sido definidos como el uso de organismos vivos para el control de plagas entre los que se encuentran los baculovirus, bacterias, hongos, nemátodos y protozoarios (Assaf *et al.*, 2006; Cannon, 2001), los hongos entomopatógenos, tienen la gran ventaja de sobrevivir como saprófitos, después de causar la muerte de los insectos considerados plagas en un determinado medio ambiente, donde utilizan como fuente de carbono diferentes compuestos orgánicos con alto contenido de glucanos, heteroglucanos, proteínas y en menor proporción lípidos, característica que les permiten ser utilizados en procesos industriales para ser masificados sobre diferentes sustratos orgánicos (Caro *et al.*, 2005; Monzón *et al.*, 2001; Carrillo, 2003).

De acuerdo a Caro *et al.* (2005) y Espinel *et al.*(2008), la selección del bioinsecticida, depende de diversos factores como su mecanismo de acción, aspectos económicos, su forma de aplicación y el método de producción, la cual se realiza principalmente por fermentaciones en medios sólidos y en menor proporción en medios líquidos aunque el cultivo bifásico es una alternativa emergente en los últimos años (Assaf *et al.*, 2006; Cajilma, 2009), en la investigación se utilizó la fermentación en sustrato sólido, por ser una técnica *in vitro* más adecuada y económica.

Según Monzón *et al.* (2001) y Caro *et al.* (2005), en la producción comercial y artesanal se utilizan como sustrato granos de cereales y leguminosas, esto es corroborado por Assaf *et al.* (2006) y Elias (2002); quienes a su vez indican que el arroz molido, arroz entero, cáscara de arroz, coco, sorgo y maíz son los sustratos utilizados en las fermentaciones sólidas, siendo el más empleado el arroz entero, aunque este en algunas ocasiones es muy caro o escaso; razón por la cual es importante buscar nuevos sustratos en cada región y estandarizar sus métodos de producción. Este es uno de los motivos por el que en el presente trabajo de investigación se evaluó la producción de conidias de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* y *Lecanicillium lecanii*, sobre granos de sorgo, trigo, maíz chancado y cebada, bajo condiciones de laboratorio con una temperatura promedio de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa del 75% y un fotoperiodo de 14/10 horas luz, con el fin de determinar la mejor producción de conidias por gramo de sustrato y así contribuir con un conocimiento alternativo sobre el empleo de un sustrato orgánico para la masificación comercial y artesanal de hongos biocontroladores que a su vez conlleva a que sean menores los costos de producción para ser distribuidos a los agricultores a precios cómodos para el control de los insectos plaga.

La selección de los sustratos se realizó tomando en cuenta su abundancia y precio en los mercados locales, al menos durante los meses de Febrero a Junio del

2012, tiempo donde se ejecutó la investigación, y de acuerdo a lo estipulado por Barajas *et al.* (2010), quienes manifiestan que la selección del sustrato depende de muchos factores, siendo los más importantes la disponibilidad local, los costos y la preferencia del hongo a cultivar.

Para Elosegui (2006) y Monzón *et al.* (2001), el sustrato utilizado en la producción de bioinsecticidas, es el principal punto crítico para el éxito del proceso fermentativo y debe tomarse en cuenta el tamaño, la forma, relación superficie - masa, porosidad y la capacidad de adsorción de agua de los sustratos utilizados.

La preferencia del hongo al sustrato, depende de la capacidad enzimática de los hongos entomopatógenos y la composición de nutrientes asimilables presentes en los granos utilizados (Enríquez, 2008; Barajas *et al.* 2010). Esto pudo influir, en parte, sobre los resultados obtenidos debido a que se observaron variaciones en la producción de conidias (Cuadro 06-20) y en el porcentaje de germinación de las conidias (Cuadro 27-29) de cada uno de los hongos evaluados sobre los diferentes sustratos orgánicos bajo las mismas condiciones de cultivo.

Debido a la importancia de los hongos entomopatógenos como agentes biocontroladores de plagas agrícolas, en la actualidad se buscan nuevos métodos

de producción como los cultivos bifásicos, para incrementar la producción de conidias y esporas, pero la fermentación en sustrato sólido, sigue siendo la técnica más utilizada, que utiliza diferentes sustratos orgánicos, por esa razón en diferentes países se viene buscando nuevos sustratos como los subproductos agrícolas con altos contenidos celulósicos con el fin de reemplazar el arroz y el trigo, los cuales actualmente son limitantes por su altos costos, y una alternativa sería el maíz para la masificación de *Metarhizium anisopliae*, donde se encontraron valores superiores al arroz, además al ser barato aminoraría los costos de producción, por otro lado los sustratos con baja producción de conidias podrían ser reevaluados suplementándolas y para ser empleadas en los procesos de masificación.

El hongo *Isaria fumosorosea*, presenta una producción de conidias ascendente, homogénea y constante en los granos de arroz, maíz y cebada, sin embargo al final de la fermentación, la producción de conidias en los granos de arroz es ligeramente superior con  $8,47 \times 10^9$  ufc/g, comparada con los producidos por este hongo en los granos de maíz chancado y cebada que obtienen valores de  $1,99 \times 10^9$  ufc/g y  $3,14 \times 10^9$  ufc/g respectivamente; a diferencia de la producción de conidias sobre los granos de trigo y sorgo, donde la producción es irregular y con menor número de conidias, como se puede observar en el trigo que a los siete días presenta una producción promedio de  $1,08 \times 10^7$  ufc/g, pero a los 12 días, estos valores bajan a  $9,69 \times 10^6$  ufc/g, obteniendo al final de la fermentación sólo

3,63x 10<sup>8</sup> ufc/g, mientras que en los granos de sorgo la producción se mantiene casi constante hasta los 12 días con una producción promedio de 1,23 x10<sup>7</sup> ufc/g a 1,58 x 10<sup>7</sup> ufc/g, incrementándose ligeramente al final de la de la fermentación con 1,54x 10<sup>8</sup> ufc/g. Esto indica que *I. fumosorosea*, tiene poca preferencia por los granos trigo y sorgo bajo las condiciones de cultivo empleadas (Cuadro 06).

La producción de conidias de *Metarhizium anisopliae*, desde el inicio hasta el final del proceso es homogénea y ascendente sobre los granos de arroz y maíz chancado, alcanzando rápidamente valores de 5,33 x 10<sup>7</sup> ufc/g (arroz) y 6,47 x 10<sup>7</sup> ufc/g (maíz) a los siete días de cultivo, ligeramente superiores a los obtenidos por *L.lecanii* e *I. fumosorosea*, a los 12 días se siguen incrementando hasta 6,64 x 10<sup>9</sup> ufc/g (arroz) y 7,42 x 10<sup>9</sup> ufc/g (maíz), similares a los obtenidos por *Isaria fumosorosea* en los granos de arroz (8,47 x 10<sup>9</sup> ufc/g) y superiores en el maíz (1,99 x 10<sup>9</sup> ufc/g) obtenido a 17 días de fermentación. Al final de la etapa fermentativa *Metarhizium anisopliae*, produjo más conidias sobre los granos chancados de maíz (2,35 x 10<sup>10</sup> ufc/g) que en el arroz (5,91 x 10<sup>9</sup> ufc/g). Mientras que la producción de conidias en los granos de trigo, sorgo y cebada durante el tiempo de fermentación fue baja. (Cuadro 07)

La producción de conidias de *Lecanicillium lecanii*, es homogénea y ascendente en los granos de arroz, trigo y sorgo durante todo el proceso

fermentativo, alcanzando la máxima producción de conidias en los granos de arroz con  $2,66 \times 10^9$  ufc/g, que demuestra la preferencia del hongo por el sustrato y corrobora la utilización de los granos de arroz como sustrato base para la masificación de este entomopatógeno, mientras que en los granos de cebada y maíz la producción es baja, en los granos de cebada la producción se incrementa ligeramente de  $2,50 \times 10^7$  ufc/g a  $5,38 \times 10^8$  ufc/g, pero en el maíz chancado se mantiene casi constante entre  $1,29 \times 10^7$  ufc/g a  $4,47 \times 10^7$  ufc/g durante los 17 días de fermentación (Cuadro 08). Estos valores están por debajo de los obtenidos por los otros hongos en el maíz, comportamiento que pudo deberse a muchos factores asociados a las condiciones de cultivo o generadas por el sustrato. Cajilma (2009); Leucona (1996) y Tanada & Kaya (1993), manifiestan que la temperatura y la humedad de cultivo, son dos factores de gran importancia en la producción de conidias así como la velocidad de germinación de los hongos entomopatógenos.

Para Bernard *et al.* (1992), la temperatura es la variable crítica en la fermentación de estado sólida, difícil de controlar, debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo, lo que favorece la acumulación de calor metabólico en el sistema e incrementa la temperatura del cultivo que tiene un efecto negativo en la

producción de conidias dentro de las bolsas, debido a que los diferentes hongos tiene un rango determinado de temperatura.

Aunque a nivel de laboratorio se trató de regular la temperatura, mediante el movimiento del sustrato, ventilación y controlando la iluminación de los anaqueles, esta variable pudo en parte ser responsable de la irregular dinámica de producción de conidias de los hongos entomopatógenos sobre los diferentes sustratos, especialmente a *Lecanicillium lecanii*, según los reportes de Barranco (2004), este hongo disminuye su crecimiento si se encuentra a temperaturas mayores de 22°C y reduce su crecimiento y germinación hasta un 80% si la temperatura se incrementa a 28°C, lo cual es corroborado por Elosegui (2006) y Barbara & Clewes (2003), quienes manifiestan que es un hongo muy sensible al cambio de temperatura y decae notablemente pasando el umbral de los 22° C. Por el contrario la producción de conidias de *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* sobre los diferentes sustratos es ascendente y superior a *L. lecanii*, por que pueden desarrollar a temperaturas generalmente mayores dentro del rango de 23 a 29° C (Arzumanov *et al.*, 2005; Agamez *et al.*, 2008).

Otro de los factores que pudo influenciar la producción de conidias durante el experimento, es la humedad del sustrato, según Magara *et al.*(2004), el bajo porcentaje de humedad de los sustratos puede inducir la conidiación irregular

y un exceso de humedad la disminución de oxígeno disponible por la saturación de los espacios en el sustrato, la humedad inicial de los diferentes sustratos estuvo en un rango de 68,25% a 75,12%, valores considerados aceptables dentro del rango de 45 a 80% establecido por Carrillo (2003) para las fermentaciones sólidas.

Al comparar las producciones máximas de conidias producidas por los diferentes hongos entomopatógenos sobre los sustratos arroz, sorgo, cebada, trigo y maíz chancado al final de los 17 días de fermentación, se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, destacando el **T<sub>8</sub>**, que presenta el mejor promedio de producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* con  $2,32 \times 10^{10}$  ufc/g sobre los granos de maíz chancado, en segundo lugar se encuentra el tratamiento **T<sub>1</sub>**, con una producción de conidias de *Isaria fumosorosea* de  $8,47 \times 10^9$  ufc/g sobre los granos de arroz y en tercer lugar el **T<sub>6</sub>** con  $5,91 \times 10^9$  ufc/g al cultivar *Metarhizium anisopliae* sobre granos de arroz, en el resto de tratamientos la producción de conidias disminuye paulatinamente obteniéndose la más baja producción en el tratamiento **T<sub>13</sub>** con  $4,47 \times 10^7$  ufc/g al cultivar *Lecanicillium lecanii* sobre el maíz chancado (Cuadro 09).

Los análisis individuales realizados a *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii* sobre los diferentes sustratos, muestran

diferencias de producción entre los tratamientos, es así que al evaluar la producción de conidias de *Isaria fumosorosea*, se determinó mediante el análisis de varianza que existen diferencias altamente significativas en la producción de conidias sobre los diferentes sustratos y al realizar la prueba de Duncan, se comprobó que *Isaria fumosorosea*, presenta la mayor producción de conidias en el tratamiento **T<sub>1</sub>**, conformado por el sustrato arroz con  $8,47 \times 10^9$  ufc/g, seguido de los tratamientos **T<sub>5</sub>** constituido por los granos de cebada con  $3,14 \times 10^9$  ufc/g y **T<sub>3</sub>** con  $1,99 \times 10^9$  ufc/g en el maíz, mientras que la producción más baja se obtuvo en el tratamiento **T<sub>4</sub>**, con sólo  $1,54 \times 10^8$  ufc/g en el sorgo, resultados que demuestran la preferencia de este hongo por el arroz.

Los valores obtenidos en nuestro experimento son superiores a los reportados por Carret *et al.* (2003), al evaluar la producción de conidias de *Isaria fumosorosea*, en diferentes presentaciones de arroz, quienes encontraron una mayor producción en el arroz pelado con  $9,10 \times 10^8$  ufc/g, mientras que en el arroz con cáscara  $8,50 \times 10^8$  ufc/g, valores que se encuentran por debajo de  $8,47 \times 10^9$  ufc/g, obtenidos en el experimento y según Vidal *et al.* (2000), esta variación puede deberse a la disponibilidad de nutrientes en sustrato y capacidad de asimilación por la cepa empleada, lo cual también es corroborado por Mitchell *et al.* (2002), quienes indican que para un buen rendimiento se debe seleccionar una determinada cepa adecuada para cada metodología de masificación.

Si bien es cierto, durante el experimento *Isaria fumosorosea*, presenta la mayor producción en los granos de arroz, los otros sustratos no deberían ser descartados porque según Herrera *et al.* (1999) y Carret *al.* (2003) estos deberían ser suplementados con melaza, extracto de la levadura *Torula* o realizar un preparado mixto, para incrementar la concentración de conidias.

Los reportes de Kassa *et al.* (2008), indican que *Metarhizium anisopliae*, es una de las especies de hongos entomopatógenos con las que más se ha trabajado en todo el mundo en relación con su producción sobre diferentes sustratos de origen vegetal, como papa, trigo, soya, arroz y salvado de trigo y se la está evaluando sobre diferentes residuos celulósicos.

Los resultados obtenidos al evaluar la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* en los diferentes sustratos carbonados bajo condiciones de laboratorio durante 17 días de fermentación, indican que existen diferencias altamente significativas entre los promedios de producción a nivel de los tratamientos (Cuadro 11), y al realizar la prueba de Duncan, se determinó que la producción más alta se obtuvo en el tratamiento **T<sub>8</sub>** con  $2,35 \times 10^{10}$  ufc/g sobre el maíz chancado, seguido del tratamiento **T<sub>1</sub>** con  $5,91 \times 10^9$  ufc/g al cultivarlo sobre granos de arroz, mientras que la producción más baja se obtuvo en el **T<sub>4</sub>** con solo  $3,13 \times 10^8$  ufc/g sobre los granos de sorgo.

El mismo comportamiento fue observado por Rodríguez (2000), al cultivar en botellas de vidrio a *Metarhizium anisopliae* sobre maíz amarillo chancado, donde obtuvo una producción promedio de  $2,14 \times 10^{11}$  ufc/g, superior a  $2,35 \times 10^{10}$  ufc/g obtenido al utilizar maíz híbrido precocido, mientras que en los granos de arroz obtuvo  $3,64 \times 10^{11}$  ufc/g superiores a  $5,91 \times 10^9$  ufc/g obtenidos en el experimento, lo cual evidencia que el maíz es una de las alternativas más cercana para reemplazar los granos de arroz para el cultivo de este hongo además que su precio es más económico.

Nelson *et al.* (1996), al comparar la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae*, sobre granos de arroz suplementado con glucosa y extracto de levadura cultivados a 23 °C durante 21 días, obtuvo  $1,42 \times 10^9$  ufc/g, valor muy cercano a  $5,91 \times 10^9$  ufc/g obtenido en el experimento, donde se utilizó arroz precocido sin suplementos pero cultivados a 26°C durante 17 días de fermentación, variación que pudo deberse a la temperatura y calidad del sustrato (Agamez *et al.*, 2008). Así mismo, Sandoval *et al.* (2007), determinaron que la producción de conidias de *M. anisopliae* se incrementa en los granos de arroz precocido con una humedad superior al 50% en el rango de  $9,4 \times 10^8$  a  $3,8 \times 10^9$  ufc/g.

Arzumanov *et al.* (2005), manifiestan que el contenido de humedad del sustrato afecta sensiblemente el proceso de esporulación de *M. anisopliae* durante el cultivo, siendo el óptimo entre 57 y 58%, al inicio del experimento todos los sustratos fueron hidratados obteniéndose un rango de humedad promedio de 67,60 a 75,12 %, valores por encima de lo establecido pero al final de la fermentación estos se reducen entre 50,07 a 56,41%, que coinciden con la máxima producción de *M. anisopliae*, en los granos de maíz con  $2,35 \times 10^{10}$  ufc/g y una humedad de 52,31%.

De acuerdo a Rangel *et al.* (2008) y Desphande *et al.*(2003), el irregular crecimiento micelial y baja producción de conidias en los sustratos cebada, sorgo y trigo pudieron deberse al estrés hídrico y osmótico, que tienen un marcado efecto sobre la germinación, crecimiento, virulencia, características de la superficie de las conidias y otras propiedades de *M. anisopliae*

Al evaluar la producción promedio de conidias de *Lecanicillium lecanii*, sobre los diferentes sustratos, se determinó que este hongo entomopatógeno presenta la más alta producción en el tratamiento  $T_{11}$  con  $2,66 \times 10^9$  ufc/g sobre los granos de arroz, seguido en segundo lugar por los tratamientos  $T_{12}$  con  $1,51 \times 10^9$  ufc/g en el trigo y  $T_5$  con  $1,36 \times 10^9$  ufc/g sobre los granos de cebada, mientras

que la producción más baja se obtuvo en el maíz chancado precocido con  $4,47 \times 10^7$  ufc/g (Cuadro 20).

A pesar de que *Lecanicillium lecanii*, obtiene la mayor producción de conidias sobre los granos de arroz con  $2,66 \times 10^9$  ufc/g, es bajo en comparación con los producidos por los otros hongos en el mismo sustrato. De acuerdo a Cortez (2007), la baja producción de conidias de *L. lecanii* pudo deberse a la alta compactación que ejerce el hongo sobre el arroz como medio, lo que evita que exista aireación interna y consecuentemente, se reduzca la producción de conidias, lo cual también es mencionado por Madrigal *et al.* (2003), quienes demostraron que el hongo *L. lecanii* produce mayor cantidad de conidias cuando se cultiva en sustratos que le permiten mayor aireación. Según Barranco (2004), la temperatura de 26°C empleada en el cuarto de cultivo influyó negativamente durante la producción de conidias, porque las conidias de *L. lecanii* requieren para germinar temperaturas entre los 20 y 25°C y un crecimiento óptimo se logra entre 23 y 24°C, por tanto la germinación y el crecimiento disminuye excesivamente arriba de los 25°C.

Otro factor importante que pudo influir durante la producción de conidias de *L. lecanii* sobre los diferentes sustratos, pudo ser la cepa empleada, como lo demuestra Cortez (2007), quien encontró diferencias importantes en la producción

de conidias de 15 cepas poliespóricas y monospóricas de este hongo en granos de arroz, asimismo Berlanga (1998) y Bernard & Janes (2009), indican que los cultivos viejos producen bajos rendimientos y pierde ciertas características patogénicas, por lo que se recomienda reactivarla en el insecto hospedante, esta variable no pudo afectar los bajos rendimientos en los sustratos por que se trabajó con cultivos jóvenes y reactivados en medios selectivos.

En el Cuadro 21, se observa que el porcentaje de humedad inicial de los diferentes sustratos orgánicos inoculadas con *Isaria fumosorosea*, a los 7 días se reduce ligeramente en los diferentes sustratos, con valores que van de 63,42% (cebada) a 73,20% en el maíz, a los 12 días, la humedad se mantiene entre 61,12% (trigo) a 72,46% en el maíz, pero a los 17 días, la humedad descende en todos los sustratos presentando el valor más bajo el trigo con 49,11%, seguidos del sorgo (54,74%), cebada (56,23%), arroz (58,21%) y maíz (64,17%).

Mientras que en las bolsas inoculadas con *Metarhizium anisopliae*, la humedad descende ligeramente a los 7 días de evaluación, con porcentajes que se encuentran entre 66,22% (cebada) a 74,23% (maíz); a los 12 días, bajan de 64,12% (cebada) a 70,32% (maíz); a los 17 días, el porcentaje de humedad más bajo se observa en la cebada con 50,07%, seguidos del sorgo (51,36%), arroz (51,42%), maíz (52,31%) y trigo (56,41%) (Cuadro 22).

El mismo comportamiento se observan en las bolsas con *Lecanicillium lecanii*, donde la humedad de los sustratos desciende ligeramente a partir de los 7 días alcanzando al final de la fermentación el promedio más bajo en el trigo con 49,21%, similar al obtenido por *Isaria fumosorosea*, seguidos del sorgo (50,51%), maíz (52,47%), arroz (53,54%) y cebada (58,23%) (Cuadro 23).

La variación de la humedad está asociada de manera inversa con la producción de conidias según el coeficiente de correlación de Pearson a nivel de los diferentes sustratos, nos indica la producción de conidias de los tres hongos entomopatógenos se incrementa a medida que se evapora o baja el porcentaje de humedad de los sustratos.

Esta asociación es más lineal con los sustratos maíz ( $r: -1$ ), arroz ( $r: -0,99$ ) y cebada ( $r: -0,98$ ) para *Isaria fumosorosea* (Cuadro 24), mientras que a nivel de *Metarhizium anisopliae*, se observa una mayor asociación en el sustrato maíz ( $r: -0,99$ ) y cebada ( $r: -0,99$ ) (Cuadro 25) y para *Lecanicillium lecanii*, una mayor asociación con los granos de cebada ( $r: -1$ ), arroz ( $r: -1$ ), y maíz ( $r: -0,99$ ) (Cuadro 26).

Esta asociación inversa entre la conidiación y la humedad, fue observada por Montesinos (2008), al colocar los sustratos infestados por *Isaria fumosorosea*,

sobre bandejas, donde el número de conidias se incrementó de  $10^9$  a  $10^{13}$  ufc/g cuando el sustrato tenía una humedad del 15 a 18% y de acuerdo a Carrillo (2003) y Mitchell *et al.* (2002), es común que los mohos filamentosos generan estructuras de resistencia frente a condiciones adversas.

Aunque el porcentaje de humedad, es una de las variables que comúnmente se optimiza en los sistemas de fermentación sólida, hoy se reconoce que no es solo la cantidad de agua presente en el sistema la que ejerce su influencia sobre la producción de conidias, sino las interacciones entre el agua y el medio sólido, por eso no es contradictorio observar que un mismo microorganismo se desarrolle plenamente en dos sustratos diferentes con diferentes concentraciones de humedad (Magara *et al.*, 2004; Rangel *et al.*, 2008).

El control de la calidad de las conidias producidas en los diferentes tratamientos se determinó mediante la prueba de germinación *in vitro* de los hongos entomopatógenos, parámetro muy importante que permite obtener una proyección del comportamiento del hongo en el campo (Desphande *et al.*, 2003).

Al comparar los resultados obtenidos del porcentaje de germinación en los diferentes tratamientos se determinó que existen diferencias ligeramente significativas entre ellas, donde las conidias procedentes del tratamiento **T<sub>1</sub>** (*I.*

*fumosorosea* + arroz) presentan el mejor porcentaje de germinación con 96,91%, en segundo lugar se encuentra el **T<sub>11</sub>** (*L. lecanii*+ arroz) con 96,73%, en tercer lugar **T<sub>12</sub>** (*L. lecanii* + trigo) mientras que los tratamientos **T<sub>10</sub>** (*M. anisopliae* + cebada), **T<sub>4</sub>** (*I. fumosorosea* + sorgo) y **T<sub>13</sub>** (*L. lecanii* + maíz), obtienen los promedios más bajos con 91,44%, 91,2% y 90,94% respectivamente (Cuadro 29).

De acuerdo a los reportes internacionales que provienen de Cuba, México, Colombia, Canadá, Alemania, Suiza y España, se establecieron para este parámetro dos valores significativos dependiendo del hongo; para *Lecanicillium lecanii* se da como resultado aceptable de 80 a un 85% de germinación a las 24 horas y para el resto de hongos entomopatógenos una germinación del 90% como mínimo para ser considerado adecuado (Barranco, 2004; Bernard & Janes, 2009; Deshpande, 2001; Barbara & Clewes, 2003); en base a esta clasificación todas las conidias procedentes de los diferentes tratamientos cumplen los rangos establecidos por que se encuentran entre el 90,94 a 96,91% (Cuadro 29).

Según Monzón (2001), el porcentaje de germinación de las conidias para *Isaria fumosorosea* no debe ser menor al 95%, tomando en cuenta este valor como base, en el Cuadro 27, se observa que sólo los tratamientos **T<sub>1</sub>** y **T<sub>2</sub>** conformados por el arroz y el trigo cumplen la condición, mientras que el resto de tratamientos está por debajo de 95% pero por encima de 90%, valor considerado aceptable por

Bernard & Janes, (2009) y Deshpande (2009), según estos datos solo los granos de arroz y trigo podrían utilizarse en los cultivos intensivos por mantener un porcentaje de germinación del 95 %, mientras que los sustratos cebada, sorgo y maíz, deberían ser reevaluadas antes de ser utilizadas en cultivos intensivos porque su rentabilidad podría ser muy baja y generarían pérdidas económicas, aunque para Morales *et al.* (2009), la rentabilidad depende de la abundancia de los sustratos en cada región.

Esta variación del porcentaje de germinación es muy común en los diferentes hongos y está influenciada por el sustrato, como se demostró en los trabajos realizados por Carr *et al.* (2003), al trabajar con cepas de *Isaria fumosorosea* cultivadas sobre diferentes presentaciones de arroz, es así, que en el arroz pelado el porcentaje germinación fue de 92,65 %, en el arroz entero 85 a 89 % mientras que en la cáscara de arroz sólo 84%, este comportamiento también se pudo observar en nuestros resultados al utilizar diferentes sustratos como medio de masificación.

De acuerdo a los trabajos realizados por Dorta *et al.* (1996) y Nelson *et al.* (1996), el porcentaje de germinación *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* debe ser mayor a 85%, lo que concuerda con los datos emitidos por Bernard & Janes, (2009) y Deshpande (2009), quienes consideran un valor promedio superior a

90%, en nuestros resultados el porcentaje de germinación de las conidias de *M. anisopliae* procedentes de los sustratos orgánicos fueron de 91,44 a 94,85% (Cuadro 27), valores que se encuentra por encima de lo establecido, lo cual indica que los sustratos evaluados podrían ser utilizados en los procesos de masificación pero sin dejar en cuenta la rentabilidad.

Desphande (2001) y Barbara & Clewes (2003), establecieron que el porcentaje de germinación aceptable para *Lecanicillium lecanii* está entre 80 a 85% a las 24 horas; en el Cuadro 27 se muestra que el porcentaje de germinación obtenido esta por encima del rango establecido por estos autores; lo que nos indica que estos sustratos también podrían ser utilizados en procesos de escalamiento, aunque debería tomarse en cuenta otros parámetros, debido a que su producción comparado a los de *Isaria fumosorosea* y *Metarhizum anisopliae* sobre los mismos sustratos son los más bajos.

Finalmente, se pudo evidenciar que los tres hongos entomopatógenos presentan un buen porcentaje de germinación, y que el resto de conidias en los cuales no se pudo evidenciar la presencia de tubo germinativo después de las 24 horas a 26°C, quizás necesitaban más tiempo o disponibilidad de agua libre para poder hidratarse y germinar en el medio de cultivo (Rosas, 1999), pero según Aregger (1992) y Carr *et al.* (2003), las conidias que manifiestan un retraso de

germinación, pueden afectar la capacidad infectiva del hongo sobre los insectos, dando tiempo a los insectos a crecer y poder resistir el ataque de las conidias y si su concentración no es adecuada la mortalidad también sería baja, por lo que es necesario realizar una evaluación previa de las cepas y seleccionar las más adecuadas para cada uno de los sustratos orgánicos evaluados (Castro *et al.*, 2000; Caro *et al.*, 2005).

## VI. CONCLUSIONES

- Se determinó que *Isaria fumosorosea* presenta la mayor producción de conidias en el sustrato arroz con de  $8,47 \times 10^9$  ufc/g a 26°C con una porcentaje de humedad de 58,21 % en 17 días de fermentación.
- *Metarhizium anisopliae*, presenta la mayor producción de conidias en el sustrato maíz con de  $2,35 \times 10^{10}$  ufc/g a 26°C con una porcentaje de humedad de 52,31% en 17 días de fermentación.
- *Lecanicillium lecanii*, presenta la mayor producción de conidias en el sustrato arroz de  $2,66 \times 10^9$  ufc/g con un porcentaje de humedad de 53,54% en 17 días de fermentación.
- Las conidias de *Isaria fumosorosea* producidas en el arroz, presentan el mayor porcentaje de germinación de 96,91% a 26°C durante 18 horas.
- *Metarhizium anisopliae* presenta un buen porcentaje de germinación en los sustrato maíz y arroz con 94,85 % y 94,74% respectivamente, a 26°C durante 18 horas.

- *Lecanicillium lecanii*, presenta un buen porcentaje de germinación en los sustratos maíz y trigo con 97,51 % y 94,66% respectivamente, a 26°C durante 18 horas.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Realizar ensayos previos para mejorar el proceso de humidificación y tiempo de precocido de los diferentes sustratos y darles las condiciones necesarias a cada hongo entomopatógeno.
- Buscar nuevas fuentes carbonadas baratas en los mercados y evaluar la producción de conidias por fermentación en sustrato sólido.
- Evaluar la producción de nuevas cepas de hongos entomopatógenos en los sustratos cebada, trigo, sorgo y maíz chancado.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, E. y E. Albuquerque. (2009). Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (Homoptera: Aleyrodidae). *Academia Pernambucana de Ciência* 5(6): 209-242.
- Agamez, Y., N. Zapata, L. Oviedo, J. Barrera. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp.* *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2): 23-34.
- Alean, C. (2003). Evaluación de la patogenicidad de diferentes Hongos Entomopatógenos en el control de mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* (Bondar) en condiciones de invernadero. Tesis. Bogotá – Colombia. Págs. 38-50.
- Alves, S. (1998). Control Microbiano de Insectos. 2<sup>da</sup> Edición Universidad Sao Paulo. Piracicaba - Brasil. Págs. 21-31.
- Arzumanov T., N. Jenkins, S. Roussos. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry*. 2005; 40(3/4):1037-1043.

Assaf, T., A. Jeronimo y S. Roben (2006). Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. Pp. 56 – 64.

Barajas, G., R. Destéfano y C. Messias, C. (2010). Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74, 112-119.

Barbara, D. y E. Clewes. (2003). Plant pathogenic *Verticillium* species: How many of them are there. *Molecular Plant Pathology* 4(4):297-305.

Barranco, J. (2004) Contribución al estudio de las actividades enzimáticas involucradas en el mecanismo de patogenicidad de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* cultivado en medio sólido. Tesis. UAM-Iztapalapa, Mexico. 70 pp.

Berlanga, A. (1998). Aislamiento e Identificación de Hongos Entomopatógenos. Tecmán - Colombia. Págs.13 -25.

- Berlanga, P. y M. Hernández. (1997). Aislamiento, Identificación y Conservación de Hongos Entomopatógenos. *Sociedad Mexicana de Biología* 2: 18-35.
- Bernard A. y P. Janes. (2009). Environmental Parameters. In *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier Applied Science 6:65-85.
- Booth S. y Shanks J. (1998). Potential of a drier rice / Mycelium formulation of entomopathogenic fungi to suppress subterranean pest in small fruits. *Biocontrol Science and Technology*. 8: 197-206.
- Bosch A., R. Marona. y O. Yantono (2001). A single descriptive model of filamentous fungi spore germination. *Process Biochemistry* 30(7): 599 - 606.
- Bustillos, (2001). Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. *Entomología*. 3(3): 30-53.
- Castro, R., C. Meza y M. García. (2000). Desarrollo de un medio de cultivo para la propagación de esporas de hongos entomopatógenos. *Revista chapingo serie zonas aridas* 4:79 – 85.

- Cannel, E. y M. Young. (1998). Solid state fermentation by fungi. *Process Biochem* 15: 2 -7.
- Cannon, R. (2001). Microbial insecticides: The opening of a new era?. *Shell Agriculture* 5: 13-15.
- Caro, L.; Villamizar, L.; Espinel, C.; Cotes, A. (2005). Efecto del medio de cultivo en la virulencia de *Nomuraea rileyi* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología* 31 (1): 79-88.
- Carrillo, L. (2003). *Microbiología agrícola*. Editorial El Ateneo Buenos Aires - Argentina. Pp: 89 – 96.
- Carr, A; E. Orestes y N. Bel (2003). Aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (wize) broum & Smith. *Fitosanidad* 7 (3):27 – 32.
- Cañedo, V. y T. Ames. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. Pp: 62.

Cortez H. (2007). Producción de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* en diferentes sustratos y patogenicidad. *Agricultura Técnica en México* 33(1): 83-87.

Chavez, M; R. Rodriguez; L. Rodriguez y C. Aguilar. (2009). Aspectos básicos de la fermentación en medio sólido. *Cienciaviva* 20: 132-135.

Desphande M., A. Chandele, P. Nahar, A. Patil y G, Ghormade (2003). Entomopathogenic fungi: Mycoinsecticides useful against lepidopteran pests in pulses. *Bull OILB/SROP* 26(1):27-30.

Doelle H. W., Mitchell D. A. y Rolz C. E. (2007). *Solid Substrate Cultivation*. Elsevier Applied Science 4:35 – 45.

Domenech, F. (2000). Obtención de un biopreparado a partir de *Metarhizium anisopliae* por fermentación en estado sólido para su empleo como control biológico de insectos en la agricultura. Subdirección de Biotecnología, ICIDCA, Ciudad Habana. Pp: 45-56.

Dorta, B.; Arcas J. A. y Ertola R. J. (1996). Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 19: 434-439.

- Ertola, A; y E. Garcia (1994). Producción Masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samsom Mediante una Alternativa de Cultivo Bifásico. Revista Proyección. Págs.156-161.
- Elias, M. (2002). Efecto de las condiciones operacionales de fermentación sobre la producción de *Paecilomyces fumosoroseus* cepa 612 en cultivo sumergido. *Entomophaga* 16: 165-169.
- Elósegui, O. (2006). Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas. Instituto de Investigación de Sanidad Vegetal. La Habana – Cuba. Pp: 15-23.
- Enriquez, T. (2008). *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*. 50, 257–261
- Espinel, C., L. Torres, E. Grijalba, L. Villamizar y A. Cotes. (2008) Preformulados para control de la mosca blanca *Bemisia tabaco* (Hemiptera: Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio. Revista Colombiana de Entomología 34 (1): 22-27.

Figueroa, L; A. Varela, D. Corredor. (2007). Evaluación de Sustratos Naturales Para la Propagación Masiva del Hongo Entomopatógeno *P. fumosoroseus*. *Revista de Investigación* 2(5): 127-131.

García, J. (1996). Evaluación de Cepas Nativas de *V. leccanii* en el Control de Mosca Blanca de los Invernaderos *Trialeurodes vaporariorum*. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá – Colombia. Pp:121-128.

Goettel, M. y V. Roberts. (1991). Mass production, formulation and application of entomopathogenic fungi. *Journal of Microbiological Methods*. Págs. 15-20.

González M., C. Aguilar y R. Rodríguez. (2012). Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: Retos y perspectivas. *Acta química Mex* 4(8): 45 – 55.

Gómez, H.; Zapata, A.; Gamarra, H. (2001). Manual de producción de hongos y virus entomopatógenos para el control de plagas agrícolas. SENASA. Lima- Perú. Págs.15-27.

Hernandez, H; I. Alfaro y R. Arrieta. (2001). *Microbiología industrial* 3: 36 -41.

Hernandez, V.; Carrillo, A. (1997). Producción masiva en sustrato sólido y formulación de Hongos Entomopatógenos. Soc. Méx. Col Biol. Págs. 31-38.

Herrera, F.; M. Carballo y P. Shannon (1999). Eficacia de cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre *B. tabaci*, en el laboratorio. Manejo Integrado de Plagas 2: 37-43.

Humer, G. (1994). Production and properties of *Beauveria bassiana*. Conidia Cultivated in Submerged Cultura. Canadian Journal of Microbiology 4: 12-20.

Jenkins, N., G. Heviefo, J. Langewald, A. Cherry, y C. Lomer. (1998) Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides . Biocontrol News and Information. 19 (1): 21-31.

Kaaya, G. y M. Munyinyi. (1995). Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* for Tes Tes flieset developmental sites. Journal of invertebrate pathology 66:237 – 241.

Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skinner M, Gouli V, Gouli S, (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Mycol Res. 112(5):583-591.

Landa, Z., L. Osborne y J. EyaL. (1994). Standardin vivo bioassay to assess entomogenous fungi on whiteflies. Sbornik, Jihoceska Univerzita Zemedelska Fakulta, Ceske Budijovice, Fytotechnicka Rada 11 (2): 3-14

Leucona, E. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. INTA. Buenos Aires – Argentina. Págs. 54–78.

Lezama, G. (1995). Patogenicidad de organismos parásitos de insectos. Tesis, Universidad de Colima. Tecoman, Colombia. Pp: 56 – 58.

Lozano, M. (2007). Producción de *Paecilomyces fumosoroseus* Brown & Smith y Evaluación de su efectividad biológica contra *Bemisia argentifolli* Bellows & Perring en cultivo de Algodón. Pp: 65 – 71.

Luangsa J; L. Hywel, L. Manoch y R. Samson (2005). On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. Mycol. Res. 109: 581-589.

Nelson T., A. Low y T. Glare. (1996). Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*. *Plant Protection Conf.* 4(9): 257-261.

Madrigal, H., Alatorre, R; Mora, G., Bravo, H. Ortiz y L. Navarro. (2003). Caracterización cultural y patogénica de diferentes aislamientos del hongo *Lecanicillium (Verticillium) lecanii*. *Rev. Mex. de Fitopatol.* 21:161-167.

Magara, E.; Nankinga, C.; Gold, C.; Kyamanywa, P.; Tushemereirwe, W.; Moore, D. Y Gowen, S. (2004). Efficacy of *Beauveria bassiana* substrates and formulations for the control of banana weevil. *Uganda Journal of Agricultural Sciences* 9: 908-913.

Mitchell, D. A., Berovic, M. y Krieger N. (2002). Overview of solid state bioprocessing *Biotechnology Annual Review.* Elsevier Science 8:135 - 141.

Morales V., Garay B., Romero A., Sánchez J. (2009). Insecticidas biológicos en el control de insectos plaga: agrícolas, forestales, de almacén y urbanas en

México. Artículo científico. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp: 1-5.

Moore, D. y Prior, C. (1993). The potencial of mycoinsecticides. *Biocontrol News and Information* 14 (2): 31-40.

Moore, E. (1996). *Fundamentals of Fungi*. Prentice Hall, Inc. New Jersey, U.S.A. Pp: 231- 239.

Montesinos R. (2008). Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Pp: 82- 92.

Monzón, A. (2001). Producción, Uso y Control de Calidad de Hongos Entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. Págs. 95-103.

Obregón, M. (2002). *Uso y Manejo de Bioprotectores en la Agricultura*. Cartago, CR. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica del INA. Pp: 42 - 56.

- Pariona, N., P. Castellanos y P. León. (2007). Capacidad Entomocida de Cepas Nativas de *Beauveria sp.* sobre *Schistocerca piceiform.* Revista Peruana de Biología. Págs. 253 – 257.
- Perdomo, H. (2011). Caracterización fenotípica y molecular de Hongos filamentosos oportunistas: *Scedosporium*, *Acremonium*, *Phialemonium*, *Lecythophora* y *Paecilomyces*. Tesis Doctoral. Universidad Rovira Virgili. Italia. Pp: 27 – 32.
- Pacheta, R., B. McNeil, B. y J. Harvey (2006). The impact of biotechnology on Hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*. 13(3), 455-490.
- Pucheta M., Flores A., Rodríguez S., De la torre M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31 (12): 856 - 860.
- Rangel, D., D. Alston y D. Roberts. (2008). Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycol Res*. 112(11):1355-1361.

- Robinson, T., D. Singh y P. Nigam. (2002). Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisoría para la producción de metabolitos secundarios. *Vitae* 9(2):65 -72.
- Rogg, H. (2000). Manual integrado de plagas de cultivos tropicales. Ed. Abdy-Yala. Quito, Ecuador. Pp: 21-26.
- Smith, P. (1993). Control de *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News and Information* 14: 71 – 78.
- Tanada, Y. y Kaya, H. (1993). *Insect Pathology*. Academia Press. Inc. San Diego - USA. Págs. 160-167.
- Tzean, S, L. Hsieh Y W. Wu. (1997). *Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan*. Council of Agriculture, Taiwan.
- Ulloa M; y T. Herrera. (1994). *Etimología e iconografía de géneros de hongos*. Cuadernos del Instituto de Biología 21. UNAM. Ed., México, Pp: 300.

Vega, F., P. Dowd, L. Lacey, P. Pell, D. Jackson y M. Klein. (2000)  
Dissemination of beneficial microbial agents by insects. En: Lacey, L.A.  
y Kaya, H.K. (Eds.) Field Manual of Techniques in Invertebrate  
Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of  
Insects and Other Invertebrate Pests. Kluwer Academic, Dordrecht,  
2000. pp. 152-177.

Veles, T. y R. Montoya (1993). Cuticular pro-phenoloxidasas of the silkworm,  
*Bombyxmori*: Purification and demonstration of its transport from  
hemolymph. The Journal of Biological Chemistry. 274(4), 11100-11112.

Viniegra, F., E. Favela, E., Aguilar, C. Romero, S. Díaz, G. y C. Augur (2003).  
Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid  
fermentation systems. Biochemical Engineering Journal 13: 157 - 167.

Wainwright, M. (1995). Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Editorial  
Acribia S.A. Zaragoza - España. Págs. 172–203.

Zare, R. y W. Gams. (2001). A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III.  
Generic classification. Nova Hedwigia. 72: 329-337.

# **ANEXOS**

**ANEXO 01: Monitoreo de la producción de conidias de *Isaria fumosorosea* (ufc/g) en los sustratos orgánicos.**

Sustrato Orgánico	Tiempo de fermentación (días)	Producción de conidias de <i>Isaria fumosorosea</i> (ufc/g)			
		Recuento			Promedio $\bar{x}$
		$x_1$	$x_2$	$x_3$	
Arroz	7	$2,70 \times 10^7$	$3,80 \times 10^7$	$3,70 \times 10^7$	$3,40 \times 10^7$
	12	$7,60 \times 10^8$	$8,10 \times 10^8$	$7,50 \times 10^8$	$7,73 \times 10^8$
	17	$9,30 \times 10^9$	$8,20 \times 10^9$	$7,90 \times 10^9$	$8,47 \times 10^9$
Trigo	7	$1,00 \times 10^7$	$1,40 \times 10^7$	$9,00 \times 10^6$	$1,10 \times 10^7$
	12	$1,30 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$	$7,00 \times 10^7$	$1,00 \times 10^8$
	17	$3,20 \times 10^8$	$3,70 \times 10^8$	$4,00 \times 10^8$	$3,63 \times 10^8$
Maíz	7	$2,60 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$	$2,80 \times 10^7$	$2,47 \times 10^7$
	12	$6,40 \times 10^8$	$4,20 \times 10^8$	$5,50 \times 10^8$	$5,37 \times 10^8$
	17	$4,60 \times 10^8$	$5,00 \times 10^9$	$5,10 \times 10^8$	$1,99 \times 10^9$
Sorgo	7	$1,10 \times 10^7$	$1,20 \times 10^7$	$1,40 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$
	12	$7,60 \times 10^8$	$8,10 \times 10^8$	$7,50 \times 10^8$	$7,73 \times 10^8$
	17	$1,80 \times 10^8$	$2,20 \times 10^9$	$2,60 \times 10^8$	$1,54 \times 10^8$
Cebada	7	$1,00 \times 10^7$	$8,00 \times 10^6$	$1,10 \times 10^7$	$9,67 \times 10^6$
	12	$7,60 \times 10^8$	$8,10 \times 10^8$	$7,50 \times 10^8$	$7,73 \times 10^8$
	17	$6,10 \times 10^8$	$9,00 \times 10^8$	$7,90 \times 10^9$	$3,14 \times 10^9$

**ANEXO 02: Monitoreo de la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae* (ufc/g) en los sustratos orgánicos.**

Sustrato Orgánico	Tiempo de fermentación (días)	Producción de conidias de <i>Metarhizium anisopliae</i> (ufc/g)			
		Recuento			Promedio $\bar{x}$
		$x_1$	$x_2$	$x_3$	
Arroz	7	$7,30 \times 10^7$	$4,60 \times 10^8$	$4,50 \times 10^7$	$5,33 \times 10^7$
	12	$1,01 \times 10^9$	$9,60 \times 10^8$	$9,30 \times 10^8$	$6,64 \times 10^9$
	17	$2,45 \times 10^9$	$1,50 \times 10^{10}$	$2,70 \times 10^8$	$5,91 \times 10^9$
Trigo	7	$1,20 \times 10^7$	$1,90 \times 10^7$	$1,30 \times 10^7$	$1,44 \times 10^7$
	12	$3,00 \times 10^8$	$3,00 \times 10^8$	$2,40 \times 10^8$	$2,08 \times 10^8$
	17	$4,20 \times 10^8$	$4,00 \times 10^8$	$3,10 \times 10^8$	$3,77 \times 10^8$
Maíz	7	$8,10 \times 10^8$	$5,30 \times 10^7$	$6,30 \times 10^7$	$6,47 \times 10^7$
	12	$1,07 \times 10^9$	$1,04 \times 10^{10}$	$1,15 \times 10^9$	$7,42 \times 10^9$
	17	$6,20 \times 10^{10}$	$4,20 \times 10^9$	$3,40 \times 10^9$	$2,35 \times 10^{10}$
Sorgo	7	$1,60 \times 10^7$	$1,30 \times 10^8$	$1,00 \times 10^7$	$1,28 \times 10^7$
	12	$2,30 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	$1,50 \times 10^8$	$1,87 \times 10^8$
	17	$3,00 \times 10^9$	$3,70 \times 10^8$	$2,70 \times 10^8$	$3,13 \times 10^8$
Cebada	7	$3,00 \times 10^8$	$3,70 \times 10^8$	$2,70 \times 10^8$	$1,63 \times 10^8$
	12	$2,90 \times 10^8$	$3,40 \times 10^8$	$4,20 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$
	17	$5,00 \times 10^8$	$5,40 \times 10^8$	$4,30 \times 10^8$	$4,90 \times 10^8$

**ANEXO 03: Monitoreo de la producción de conidias de *Lecanicillium lecanii* (ufc/g) en los sustratos orgánicos.**

Sustrato Orgánico	Tiempo de fermentación (días)	Producción de conidias de <i>Lecanicillium lecanii</i> (ufc/g)			
		Recuento			Promedio $\bar{x}$
		$x_1$	$x_2$	$x_3$	
Arroz	7	$2,80 \times 10^7$	$2,80 \times 10^7$	$2,70 \times 10^7$	$2,77 \times 10^7$
	12	$4,40 \times 10^8$	$4,10 \times 10^8$	$4,20 \times 10^8$	$4,23 \times 10^8$
	17	$3,40 \times 10^8$	$6,23 \times 10^9$	$1,42 \times 10^9$	$2,66 \times 10^9$
Trigo	7	$1,30 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6$	$2,30 \times 10^7$	$8,53 \times 10^6$
	12	$1,90 \times 10^8$	$1,60 \times 10^8$	$5,60 \times 10^8$	$3,03 \times 10^8$
	17	$3,30 \times 10^9$	$2,40 \times 10^8$	$5,50 \times 10^8$	$1,36 \times 10^9$
Maíz	7	$1,70 \times 10^7$	$1,80 \times 10^6$	$2,00 \times 10^7$	$1,29 \times 10^7$
	12	$2,90 \times 10^7$	$3,10 \times 10^7$	$3,80 \times 10^7$	$3,27 \times 10^7$
	17	$7,00 \times 10^7$	$5,00 \times 10^6$	$5,90 \times 10^7$	$4,47 \times 10^7$
Sorgo	7	$8,00 \times 10^6$	$1,30 \times 10^6$	$1,20 \times 10^7$	$7,10 \times 10^6$
	12	$1,10 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	$8,00 \times 10^7$	$1,23 \times 10^8$
	17	$7,60 \times 10^8$	$3,70 \times 10^9$	$7,70 \times 10^7$	$1,51 \times 10^9$
Cebada	7	$2,60 \times 10^7$	$2,70 \times 10^7$	$2,20 \times 10^7$	$2,50 \times 10^7$
	12	$4,10 \times 10^8$	$4,70 \times 10^8$	$3,70 \times 10^8$	$4,17 \times 10^8$
	17	$5,63 \times 10^8$	$5,80 \times 10^8$	$4,70 \times 10^8$	$5,38 \times 10^8$

**ANEXO 04: Monitoreo de la porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos durante la producción de conidias de *Isaria fumosorosea*.**

Sustrato Orgánico	Tiempo de fermentación (días)	Porcentaje de humedad (%)			
		Recuento			Promedio $x$
		$x_1$	$x_2$	$x_3$	
Arroz	1	72,40	74,52	73,50	73,47
	7	69,57	71,80	70,24	70,74
	12	69,30	71,00	68,40	68,60
	17	58,14	55,23	62,10	58,21
Trigo	1	71,56	68,55	68,40	69,51
	7	63,14	66,14	63,42	64,54
	12	57,30	62,10	65,23	61,12
	17	48,71	51,23	49,44	49,11
Maíz	1	75,54	74,50	75,25	75,12
	7	74,12	72,10	74,21	73,20
	12	71,40	71,11	74,41	72,46
	17	64,11	66,23	64,20	64,17
Sorgo	1	67,32	66,54	68,47	67,60
	7	66,11	65,07	67,01	66,08
	12	60,32	61,20	60,47	60,70
	17	53,72	55,16	54,23	54,74
Cebada	1	69,25	68,31	68,07	68,25
	7	65,24	61,60	62,54	63,42
	12	65,23	65,32	66,71	65,33
	17	56,62	56,51	55,72	56,23

**ANEXO 05: Monitoreo de la porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos durante la producción de conidias de *Metarhizium anisopliae*.**

Sustrato Orgánico	Tiempo de fermentación (días)	Porcentaje de humedad (%)			
		Recuento			Promedio $x$
		$x_1$	$x_2$	$x_3$	
Arroz	1	72,40	74,52	73,50	73,47
	7	72,35	71,54	73,45	72,42
	12	68,31	69,23	68,14	68,05
	17	51,11	52,23	51,11	51,42
Trigo	1	71,56	68,55	68,40	69,51
	7	64,70	65,14	66,14	65,32
	12	64,30	65,20	65,10	66,71
	17	56,72	54,04	58,32	56,41
Maíz	1	75,54	74,50	75,25	75,12
	7	73,14	74,46	74,54	74,23
	12	71,40	71,11	70,41	70,32
	17	54,10	52,32	51,14	52,31
Sorgo	1	67,32	66,54	68,47	67,60
	7	65,12	65,51	67,80	66,52
	12	64,71	63,30	64,70	64,91
	17	51,27	52,61	51,34	51,36
Cebada	1	69,25	68,31	68,07	68,25
	7	66,70	65,55	66,40	66,22
	12	65,22	63,11	65,04	64,12
	17	50,10	51,20	51,07	50,07

**ANEXO 06: Monitoreo de la porcentaje de humedad de los sustratos orgánicos durante la producción de conidias de *Lecanicillium lecanii*.**

Sustrato Orgánico	Tiempo de fermentación (días)	Porcentaje de humedad (%)			
		Recuento			Promedio $x$
		$x_1$	$x_2$	$x_3$	
Arroz	1	72,40	74,52	73,50	73,47
	7	70,62	71,21	72,14	71,10
	12	69,31	68,22	68,10	68,74
	17	54,23	53,47	52,30	53,54
Trigo	1	71,56	68,55	68,40	69,51
	7	67,54	65,45	66,51	64,50
	12	65,10	64,31	64,32	65,33
	17	49,22	48,65	51,40	49,21
Maíz	1	75,54	74,50	75,25	75,12
	7	75,31	73,21	73,32	73,81
	12	69,24	68,20	69,11	68,75
	17	51,16	53,15	53,14	52,47
Sorgo	1	67,32	66,54	68,47	67,60
	7	65,32	65,10	67,43	66,60
	12	64,71	63,30	64,70	64,25
	17	50,27	51,16	51,22	50,51
Cebada	1	69,25	68,31	68,07	68,25
	7	66,35	65,24	66,50	66,60
	12	62,31	60,21	59,60	60,45
	17	58,37	58,40	57,81	58,23



**FOTO 01:** Selección y preparación de los distintos sustratos orgánicos.



**FOTO 02:** Pesaje y empackado de los distintos sustratos orgánicos.



**FOTO 03:** Obtención y preparación del inóculo: Cosecha de conidias.



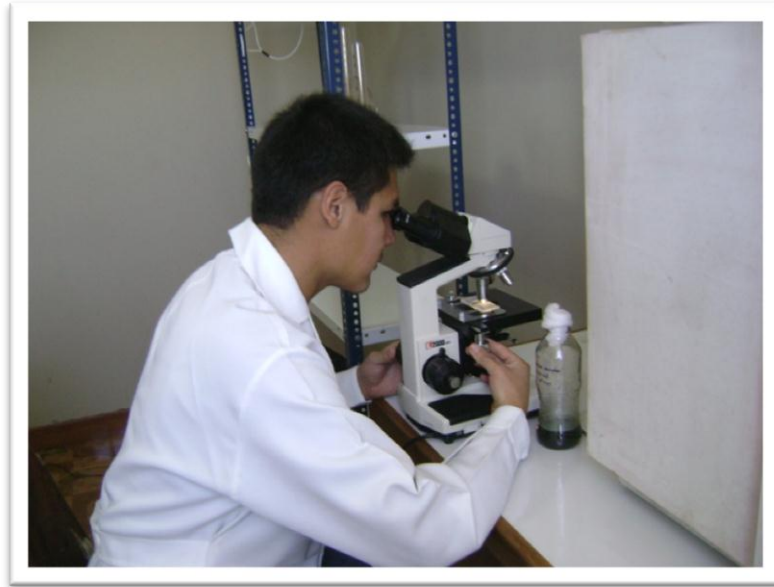
**FOTO 04:** Inoculación de las bolsas de polipropileno conteniendo los distintos sustratos orgánicos.



**FOTO 05:** Incubación de los fermentadores previamente inoculados.



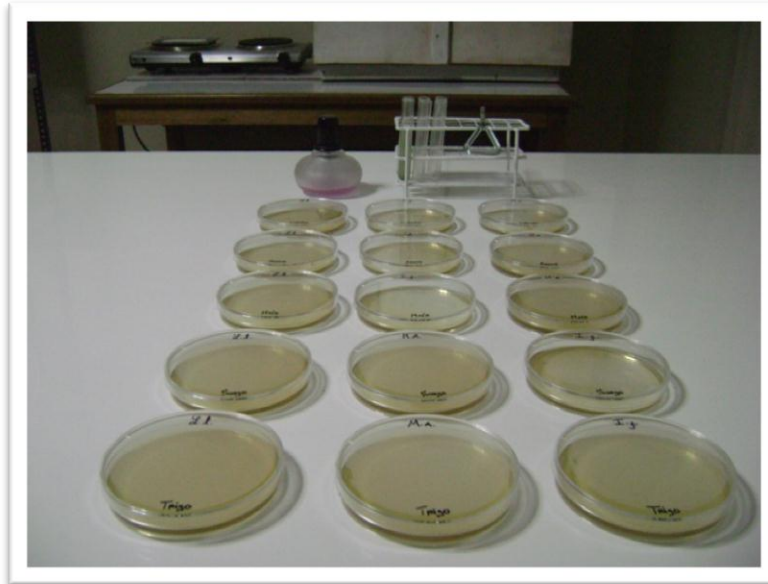
**FOTO 06:** Diluciones seriadas y carga de la Cámara de Neubauer.



**FOTO 07: Evaluación de Variables: Recuento de conidias.**



**FOTO 08: Monitoreo de la temperatura, fotoperiodo y humedad.**



**FOTO 09: Determinación del Porcentaje de Germinación.**



**FOTO 10: Producción de hongos entomopatógenos en arroz por fermentación en sustrato sólido.**



**FOTO 11:** Producción de hongos entomopatógenos en trigo por fermentación en sustrato sólido.



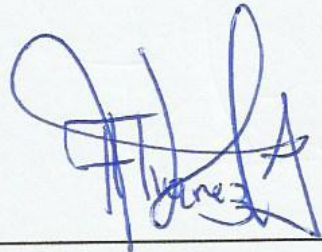
**FOTO 12:** Producción de hongos entomopatógenos en maíz por fermentación en sustrato sólido.



**FOTO 13:** Producción de hongos entomopatógenos en sorgo por fermentación en sustrato sólido.



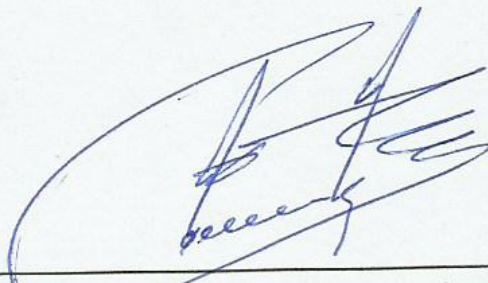
**FOTO 14:** Producción de hongos entomopatógenos en cebada por fermentación en sustrato sólido.



---

Bach. Franck Alvarez Joaquín

**Tesista**



---

M. Sc. Daladier Castillo Cotrina

**Asesor**