

Control de calidad en los procesos de producción de hongos entomopatógenos y del parasitoide *Cotesia flavipes* en Costa Rica.

Biol. Laura María Castro Alfaro*

Resumen

Es importante implementar no solo un sistema de control de calidad eficiente para evaluar el producto final, sino que también, un sistema de control de calidad para el proceso, buscando principalmente la obtención de productos con la máxima eficacia en el campo. El objetivo de este trabajo es describir los procedimientos desarrollados por DIECA, para el control de calidad de los procesos de producción de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliaea*) que comprende realizar un control riguroso desde la preparación del inóculo que incluye la calidad de las cepas, de las matrices y del producto terminado. Y del parasitoide *Cotesia flavipes* donde se determina el estado sanitario del hospedero y la calidad del parasitoide.

Introducción

Un requisito esencial para la producción de cualquier agente de control biológico es un sistema de control de la calidad efectivo. La calidad se define como el conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que lo hacen apto para satisfacer las necesidades a las cuales va dirigida (Fernández y Vega, 2006).

*Bióloga. Funcionaria del *Departamento de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA-LAICA)* Costa Rica. E-mail: lcastro@laica.co.cr. Teléfono (506) 24-94-1129/ (506) 24-94-7555 / Fax (506) 24-94-44-51.

Las normas y procedimientos para el control de calidad de los productos y procesos conjuntamente con los registros, constituyen la garantía para la validación de las producciones de bioplaguicidas.

Un producto con especificaciones bien definidas y con los consiguientes procedimientos de control de calidad asegura su buen funcionamiento y su seguridad, promueve la estandarización de los costos de producción y garantiza su estabilidad en el mercado lo que conlleva a la ganancia de confianza en el consumidor. En el caso de parasitoides y productos a base de hongos su funcionamiento no confiable por falta de calidad ha limitado su éxito en países en desarrollo donde estos requerimientos son mínimos o no existen (Elósegui, 2006).

Es por esta razón que debe implementarse no solo un sistema de control de calidad eficiente para evaluar el producto final, sino que también, un sistema de control de calidad para el proceso, buscando principalmente la obtención de productos con la máxima eficacia en el campo.

Objetivo General

Describir los principales procedimientos desarrollados por DIECA, para el control de calidad de los procesos de producción de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliaea*) y del parasitoide *Cotesia flavipes* y con esto garantizarle al usuario productos con la más alta calidad.

Generalidades de los hongos entomopatógenos.

Los hongos usados para el control de insectos son llamados hongos entomopatógenicos. Son un grupo de microorganismos ampliamente estudiados, existiendo más de 700 especies

reunidas en 100 géneros. Entre los hongos más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium*.

Estos géneros pertenecen a la división Eumycota y a la subdivisión Deuteromycotina, también llamados hongos imperfectos porque aparentemente no se conoce su fase sexual y se reproducen por conidios (esporas asexuales). Todas las especies presentan micelio septado y ramificado y los conidios son producidos por fialidas. Se conocen alrededor de 100 especies con efecto insecticida, sin embargo, solamente cerca de 20 especies han sido estudiadas como agentes de control (Carballo et al, 2004).

En general, las fases que desarrollan los hongos sobre sus hospedantes son: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. El inóculo o unidad infectiva está constituido por las estructuras de reproducción asexual, es decir por conidias.

El proceso de ataque comienza con la adhesión de las conidias a la cutícula del insecto, luego se produce la germinación que lo fija en la cutícula creándose una hifa de penetración que introduce al interior del insecto. Una vez dentro, se multiplican rápidamente y se dispersan a través del cuerpo. La muerte del huésped es ocasionada por la destrucción de tejidos y, ocasionalmente, por toxinas producidas por los hongos. Una vez que el huésped muere, los hongos emergen de su cuerpo para producir esporas, las cuales, llevadas por el viento, lluvia o por otros insectos pueden expandir la infección (Bustillo, 1997).

La cantidad o dosis de hongos para el control de los insectos plaga depende de la susceptibilidad de la plaga y de la efectividad del hongo. En el caso de los insecticidas químicos la medida de la potencia es equivalente a la cantidad del ingrediente activo, pero para el caso de los hongos entomopatógenos la potencia se mide por pruebas serológicas o

por análisis químicos, sin embargo, el resultado definitivo se obtiene a través de los bioensayos (Fernández y Vega, 2006).

Control de calidad en los procesos de producción de hongos entomopatógenos.

En el proceso de producción de hongos entomopatógenos el control de calidad constituye un factor clave. Este consiste en la evaluación rigurosa de la calidad en cada uno de los pasos del proceso de producción. Su objetivo principal es evitar los problemas de contaminación y garantizar la calidad del hongo producido. Existen una variedad de microorganismos contaminantes que pueden afectar el proceso, algunos de los cuales son patógenos al hombre. Entre los contaminantes más comunes están los hongos y las bacterias; por las características de crecimiento algunos de ellos son más difíciles de eliminar que otros (Monzón, 2001).

Como ya se ha señalado, la calidad no sólo se refiere al producto final, también es necesario conocer el comportamiento de los diferentes parámetros durante el proceso.

Desde la etapa de preparación de los inóculos debe realizarse el control de calidad del proceso, lo cual incluye la calidad de las cepas y de las matrices. Posteriormente, al final de la producción se toman muestras de los lotes y se les realizan las pruebas de calidad, para lo cual se tienen en cuenta varios parámetros, uno de los más importantes es la pureza o ausencia de contaminantes en los productos, la concentración y la viabilidad biológica. Asimismo, de todos los aspectos que deben tomarse en cuenta para la certificación de la calidad de un bioplaguicida, sin duda uno de los más importantes es el bioensayo y aunque es laborioso y costoso constituye la única forma certera de validar la calidad de un producto para estos fines.

Calidad de la cepa.

El control de calidad comienza con la cepa e incluye las cepas de mantenimiento y la de producción. En ambos casos el principal objetivo es el conservar las cepas de los hongos entomopatógenos, preservando así las características genéticas originales y su viabilidad por largos periodos de tiempo.

Se pueden utilizar métodos de conservación a largo plazo, los cuales son mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Dentro de estos métodos los más utilizados son la criongelación y la liofilización (García y Uruburu, 2004).

Sin embargo, en DIECA se utiliza el método de conservación a corto plazo, lo que permite mantener cepas activas para su uso frecuente. La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido, para lo que se utilizan tubos con agar inclinado. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco.

En las cepas de producción deben evitarse los pases sucesivos, ya que se corre el riesgo de perder virulencia, un método que se usa frecuentemente para reactivar la acción insecticida del hongo es el pase del mismo por el insecto meta de donde posteriormente se reaisla la cepa. En este caso debe verificarse su pureza y las características principales que la identifican, y por supuesto el restablecimiento de su actividad biológica (figura 1).

El control de pureza y la actividad biológica de las cepas debe realizarse con la frecuencia necesaria para garantizar que mantenga las condiciones por las cuales ha sido seleccionada.

Igualmente, el realizar un control de calidad en esta etapa de producción, nos permite detectar la presencia de contaminantes en los medios de cultivo y obtener cultivos puros, con buenas características de crecimiento y de eficacia para el control de la plaga.

Debido a que en la etapa de cepario se trabaja con medios de cultivo de alto valor nutritivo, existen mayores posibilidades de crecimiento de microorganismos no deseados, principalmente hongos y bacterias presentes en el ambiente o en otras fuentes de contaminación. El control de calidad en la etapa de cepario debe realizarse con mucho rigor, debido a que es el inicio del proceso de producción, y la selección incorrecta de la cepa y del cultivo puro así como la presencia de contaminantes afectará los siguientes pasos del proceso, y por consiguiente la calidad y el rendimiento del producto obtenido (Monzón, 2001).



Figura 1. Proceso de revigorización de las cepas de hongos entomopatógenos.

Calidad de las matrices líquidas de hongos.

El objetivo de la matriz es reproducir el hongo para la inoculación de las bolsas. Para realizar la inoculación de las matrices se prepara una suspensión de inóculo a partir del cultivo puro (PDA), este inóculo debe ser de buena calidad, o sea mostrar un buen crecimiento y estar libre de contaminantes.

El material dispuesto a inocular en el día, se revisa previamente, extrayendo una muestra de cada matriz a utilizar.

Para su observación se prepara un montaje en portaobjetos añadiendo una gota de cada muestra y se coloca en el microscopio. De esta forma se determina la presencia de estructuras ajenas al material que se dispone a inocular (figura 2).

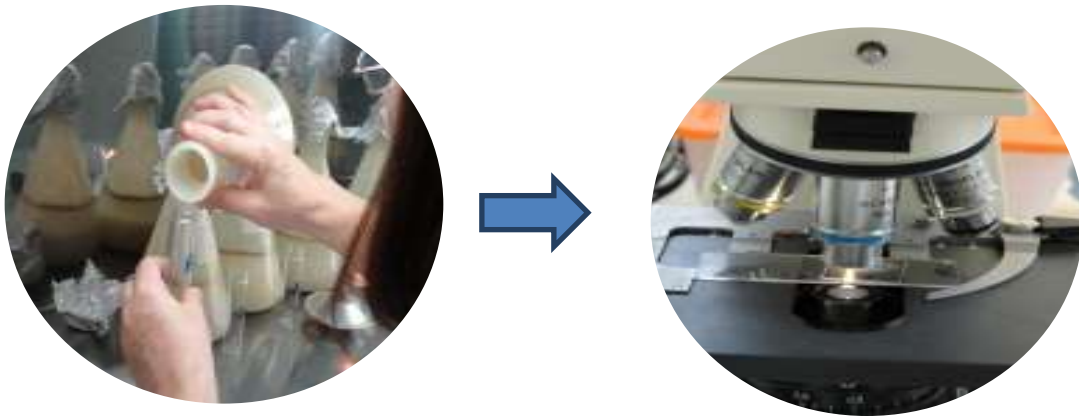


Figura 2. Revisión de la calidad de las matrices líquidas de hongos entomopatógenos.

Control de calidad producto terminado

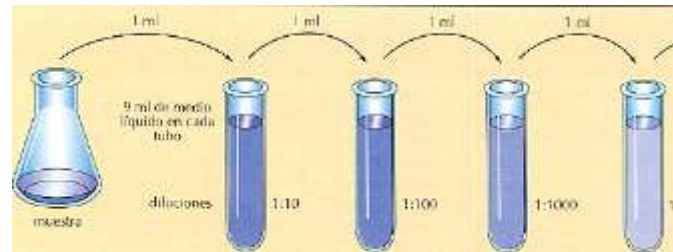
El control de calidad del producto terminado se realiza mediante la evaluación de rendimiento en número de conidias por gramo, la viabilidad de las conidias (porcentaje de germinación) y la pureza de cada lote.

Determinación de la concentración de conidios por gramo.

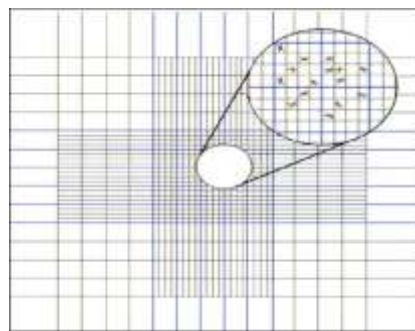
El manejo de diferentes cepas de hongo ha generado resultados variables con respecto a cada lote producido. Las variaciones del sustrato, las diferencias de humedad y temperatura tanto internas del laboratorio como externas (propias del ambiente), la vigorosidad y agresividad de las cepas y su capacidad de desarrollo generan diferencias en las concentraciones de cada lote.

La determinación de la concentración de conidios es una técnica cuantitativa con la cual se establece la cantidad de conidios del hongo entomopatógeno presente en la muestra. No evalúa la calidad biológica de estas estructuras. Los conteos de conidios se realizan en la cámara de Neubauer o hemocitómetro, utilizando el microscopio óptico con el objetivo 40x. El procedimiento seguido por DIECA para evaluar la concentración de esporas, es el método descrito por Marín et al 1997 del CENICAFE, el cual consiste en tomar 1 gramo de la muestra y diluirlo en 10ml de agua con un dispersante, con lo cual se tendría la solución madre. De esta se toma un mililitro y se disuelve en 9 ml de agua destilada teniendo la dilución 10^{-1} y así sucesivamente hasta obtener una dilución 10^{-4} , de la cual se toma una muestra de 0,01 ml y se llena el hemocitómetro. Se cuentan todos los cuadrantes del centro que son 25 y se aplica la siguiente fórmula ($C = N * \text{Dilución empleada} * \text{Factor de la cámara}$) donde C es la concentración de conidios que se desea conocer, N es el

promedio de conidios por cuadrante y el factor de la cámara que es 10^4 ; de esta forma se determina la concentración de conidios del hongo evaluado por ml (figura 3).



Preparación de diluciones seriadas



Conteo de conidios en la cámara de Neubauer o hemocitómetro

Figura 3. Determinación de la concentración de conidios de cada lote de hongo evaluado.

Viabilidad de conidios.

Se realiza como un indicador de la capacidad y velocidad de los conidios del hongo, para emitir un tubo germinativo in vivo y poder penetrar potencialmente la cutícula del insecto meta. Esta prueba se realiza mediante una siembra en PDA (Papa Dextrosa Agar) del hongo, tomando $5\mu\text{L}$ de la dilución 10^{-3} . Después de 18 horas, se determina la cantidad de esporas germinadas (figura 4). Así se establece una relación del número de conidios

viables con respecto al tiempo. La viabilidad de los lotes analizados es expresada como porcentaje de conidios viables.



Figura 4. Conidio germinado después de 18 horas

Prueba de Pureza

La prueba de pureza tiene como finalidad establecer la proporción del agente biológico en la formulación e identificar los microorganismos contaminadores, contribuyendo a mejorar el proceso de producción y formulación de los entomopatógenos. Los lotes deberán estar libres de todo tipo de contaminaciones.

La técnica comprende la siembra de una alícuota obtenida a partir de una dilución seriada de cada lote, cada caja inoculada se incuba a una temperatura de 25°C, durante 7 días con el

fin de promover el desarrollo de las unidades formadoras de colonias (UFC); después del periodo de incubación se deben identificar cada uno de los microorganismos presentes como son UFC del hongo entomopatógeno evaluado, otros hongos, bacterias y levaduras encontrados (figura 5).

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

$$\%P = \frac{\text{Unidades formadoras de colonias del hongo evaluado}}{\text{Unidades Formadoras de colonias totales}} \times 100$$

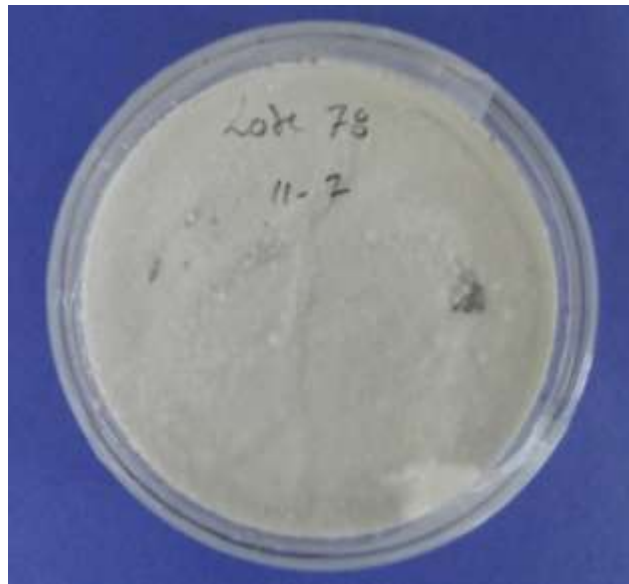


Figura 5. Evaluación de la pureza de un lote de *Beauveria sp.*

Se considera que las formulaciones comerciales deben tener un porcentaje de pureza superior al 90%. Los microorganismos contaminantes permisibles, no deben causar daño a la salud humana, animal, vegetal ni al medio ambiente.

Bioensayos

Se denomina bioensayos o pruebas de patogenicidad a las pruebas que se realizan con organismos vivos, con el objeto de determinar los siguientes parámetros: rango de hospedantes, virulencia, competencia ecológica (comportamiento en condiciones de campo), condiciones que incrementan o reducen la formación de epizootias y las barreras de infección. El desarrollo de un bioensayo requiere del entendimiento tanto del patógeno como del hospedante, de lo contrario se pueden producir resultados inconsistentes. Otros factores que pueden influenciar la viabilidad, virulencia y eficacia de los hongos son los métodos de producción, formulación y aplicación.

En los bioensayos se deben utilizar insectos provenientes de crianzas en laboratorio, de la misma edad y en buenas condiciones sanitarias. En caso de trabajar con larvas, éstas deben ser seleccionadas y separadas un día antes de la instalación del ensayo y alimentarlas teniendo cuidado de no utilizar productos antifúngicos. Además, las larvas deben estar próximas a mudar, para que lo puedan hacer en el tiempo de espera y no en pleno desarrollo del ensayo.

La inoculación de los insectos se debe realizar por aspersión o inmersión por 10 segundos en la suspensión de conidias. Los insectos tratados deben ser mantenidos en incubadora o en ambiente con temperatura constante, de acuerdo a los requerimientos del hongo evaluado, que debe ser observado diariamente (figura 6).

La mortalidad del tratamiento testigo, es decir los insectos tratados con agua destilada estéril, no debe ser mayor al 10 % ni éstos deben presentar signos de micosis.

La suspensión de conidias debe ser obtenida de un cultivo fresco en esporulación, agregándole agua destilada estéril. Con la ayuda de un asa se debe retirar todo el micelio para que las conidias estén en contacto con el agua. Luego, se agita enérgicamente para su

homogenización. Se deben hacer las diluciones necesarias que permitan un conteo fácil en la cámara de Neubauer, y realizar el cálculo correspondiente de la suspensión a utilizar. Las evaluaciones se deben realizar diariamente hasta que muera el 100 % de la población, de esta manera se determinará el TL 50 de los tratamientos (Cañedo et al, 2004).

En los primeros ensayos de selección, se considera que un aislamiento es altamente patogénico, cuando en este caso, al término de un tiempo prudencial después de la inoculación del hongo, un porcentaje igual o mayor al 80% de los insectos inoculados con una suspensión de 1×10^7 conidios/ml, muere. El periodo de tiempo varía desde algunos días hasta 15 o más, según la especie del insecto, el sistema de acondicionamiento y la agresividad de la cepa. Igualmente, es importante validar los resultados de los bioensayos del laboratorio a nivel de campo, ya que la condiciones presentes ahí, afectan casi siempre la expresión del máximo potencial de control de los hongos (Rodríguez, 2006).



Figura 6. Bioensayo con *Metamasius hemipterus* impregnados con *Metarhizium anisopliae*

Producción del parasitoide *Cotesia flavipes*

Generalidades de *Cotesia flavipes*

Este parasitoide gregario tiene su origen en el sudeste asiático, pertenece a la familia Braconidae y ha sido utilizado exitosamente en programas de control biológico de la caña de azúcar, considerado tradicionalmente como uno de los enemigos naturales más importantes, usado para control del barrenador *Diatraea saccharalis* en cultivos de caña de azúcar (Carballo et al, 2004).

Es por esta razón que DIECA mantiene una producción de este parasitoide desde el año 1984, asegurándole al usuario un producto con la máxima eficacia en el campo.

Control de calidad en el proceso de producción de *Cotesia flavipes*

El control de calidad en la producción del parasitoide *Cotesia flavipes* comprende diferentes aspectos que permiten determinar la calidad del proceso. En primer lugar se toma en cuenta el estado sanitario del hospedero utilizado para la reproducción del parasitoide que en este caso es el barrenador común de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis* así como la calidad y productividad del parasitoide.

Control de calidad del hospedero

El comportamiento de los insectos puede variar lentamente sin que sea perceptible para el personal que diariamente lo manipula, lo que implica la detección tardía de problemas sanitarios, fisiológicos o reproductivos.

Existen agentes contaminantes que se manifiestan en periodos cortos de tiempo y desarrollan síntomas en el insecto o estructuras del patógeno que pueden identificarse con certeza de manera rápida, mientras en otros casos no es posible hasta la realización de un

diagnóstico a nivel microscópico que señale la causa que afecta los insectos. También, altas densidades de insectos (hacinamiento) pueden generar cambios en el comportamiento e incrementar los riesgos patológicos. Crías de insectos muy pequeñas pueden causar pérdida del vigor de la especie.

Se debe considerar realizar control de calidad en variables como las siguientes:

- **Porcentaje de emergencia de adultos**

De las larvas destinadas para mantener el pie de cría se recuperan finalmente individuos en estado de crisálida, descartando aquellos que muestran deformidad, en condiciones adecuadas de manejo se excluyen por esta causa entre 5% y el 10% de las crisálidas.

En condiciones normales de operación, la emergencia de adultos se lleva a cabo en el 95% de las crisálidas, de cada lote de crisálidas se debe obtener el porcentaje de emergencia de adultos. Cuando se reduce la emergencia, las crisálidas deben sumergirse por un minuto en sulfato cúprico al 1,5% antes de colocarlas en los tubos de emergencia.

- **Huevos / postura (oviposición)**

Las crisálidas se colocan en cámaras (30 machos y 20 hembras), al nacer los adultos estos colocaran sus huevos en el papel mantequilla que recubre la parte interna de la cámara, los huevos aptos son los que se recogen las primeras dos noches. Los huevos se lavan con agua estéril y se incuban por un periodo de 2-3 días. Los huevos se observan en el estereoscopio para determinar el estado de las larvas, lo que se comprueba observando el movimiento de las mandíbulas de las mismas.

- **Tamaño de larvas**

Las larvas aptas para ser parasitadas (tercer y cuarto instar) se obtienen después de 14-15 días a una temperatura de 28°C. En estas condiciones se obtienen larvas de 25-30mm. El material destinado para ser parasitado es seleccionado principalmente por el tamaño (25-30mm), asociado a una coloración brillante y un buen aspecto de movilidad, aquellas larvas que se presentan con puntos necróticos, flácidas o blancuzcas son eliminadas (Badilla, Solís y Alfaro, 1994).

En cuanto al peso las larvas aptas para la obtención de avispas deben pesar 60mg y las larvas destinadas para el pie de cría pueden tener un peso de 45mg, es decir, más pequeñas que las empleadas para la producción de avispas. Se aceptan larvas de menor tamaño para asegurar un pie de cría con una proporción de sexos de 1:1, considerando que los machos son más pequeños que las hembras; se ha observado que al escoger larvas más grandes, la proporción se desequilibra en favor de las hembras. Las que no cumplen los requisitos son descartadas (Lastra y Gómez, 2006).

En DIECA se seleccionan 20 larvas de cada lote, las cuales se pesan y miden con el fin de detectar una posible disminución en el tamaño, que podría estar causada por varios factores como la presencia de microsporidios, o alteraciones en los ingredientes de la dieta.

- **Estado sanitario del hospedero (*Diatraea saccharalis*)**

El proceso de producción de *Diatraea saccharalis* en el laboratorio comienza con el establecimiento de la colonia. Una vez que se logra completar el ciclo de vida del insecto en el laboratorio, se da inicio al proceso de cría propiamente dicho a través del manejo de cada estado de desarrollo. De forma integral, es indispensable asegurar el cumplimiento de

las condiciones de asepsia definidas para preservar la cría de gérmenes y garantizar la calidad de las larvas destinadas a la producción de parasitoides (Lastra y Gómez, 2006).

Sin embargo, las larvas de *Diatraea saccharalis*, son frecuentemente infectadas por microsporidios (figura 7), hay evidencia de que la destrucción del tejido graso por parte de estos protozoarios, provocaría una reducción en la producción hormonal juvenil, generando como resultado un desarrollo larval anormal. Los síntomas más comunes presentes en los insectos infectados incluyen un tamaño pequeño, deformidad morfológica, letargo, dificultad en el movimiento, áreas hinchadas en la cutícula, también presentan manchas negras en el tegumento (Poinar y Gómez, 1984).

El diagnóstico de los microsporidios se realiza a partir de la extracción de fluidos de los tubos de Malpighi o como segunda opción, se puede obtener muestras de hemolinfa. Estas muestras se observan al fresco en el microscopio, y también se pueden utilizar tinciones como Giemsa y Weber.

En DIECA se realiza una revisión semanal de las parejas de adultos de *Diatraea saccharalis* que han puesto huevos, con el fin de mantener el pie de cría libre de microsporidios o de otro contaminante que pueda afectar la producción del parasitoide. El material que no cuente con las características deseadas es eliminado de una forma segura.

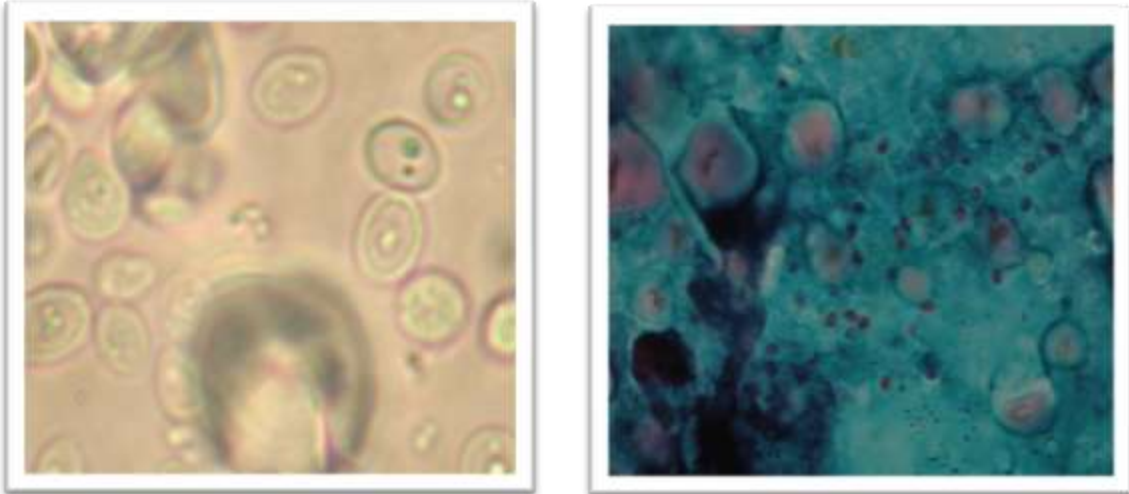


Figura 7. Microsporidios presentes en tubos de Malphigi de un adulto de *Diatraea saccharalis*

Control de calidad del parasitoide

Desde el punto de vista patológico, las posibilidades de contaminación por algún microorganismo patológico son poco documentadas, siendo más importante los cambios en el comportamiento y reproducción de estos insectos o la presencia de “parasitoides del parasitoide producido” (hiperparasitismo).

Al establecer un sistema de control de calidad se debe tener en consideración diversos aspectos como el superparasitismo el cual genera un mayor número de individuos pero de menor tamaño, desproporción de la relación de sexos, con una baja fecundidad y una menor habilidad de búsqueda, pudiendo incluso causar la muerte del hospedante y del parasitoide asociado.

En la producción del parasitoide *C. flavipes*, se utilizan parámetros cuantitativos que nos indican las tendencias del producto durante el ciclo productivo. Estas tendencias permiten conocer el comportamiento reproductivo del parasitoide bajo las condiciones ofrecidas en el laboratorio, así como determinar los ajustes necesarios en relación con el volumen de individuos para enviar a campo de acuerdo a las dosis requeridas. Para determinar cuantitativamente las tendencias productivas del parasitoide se toman muestras representativas de cada lote producido, lo que consiste en seleccionar 10 masas y colocarlas en cajas por separado. De cada muestra se pesan los puparios o masas de pupas, luego se dejan nacer las avispas para proceder con la cuantificación de la cantidad de hembras y machos de *C. flavipes* nacidos, así como la cantidad de individuos no nacidos determinando una cantidad y porcentaje de fallo o mortalidad. A partir de estos conteos se determina y registra entonces la cantidad y porcentaje de individuos fallidos (no nacidos); cantidad de machos y hembras; total de individuos por pupa; la relación hembra-macho (H/M) y la sumatoria de hembras y machos (M+H); lo cual permite establecer los indicadores del porcentaje (%) de eficiencia; porcentaje (%) de fallados; porcentaje (%) de peso promedio por pupa y la tendencia en cuanto a la cantidad de avispas por masa y por vaso.

Medidas generales de asepsia

Como ya se ha mencionado, cuando se trabaja con hongos entomopatógenos y con la producción de parasitoides, es necesario tener los ambientes de trabajo así como los utensilios, materiales de vidrio, etc. en completo estado de asepsia.

Mantener el mayor cuidado en la limpieza del material y del laboratorio mismo es fundamental para realizar trabajos confiables. El medio ambiente se encuentra, por lo general, cargado de microorganismos diversos que pueden contaminar el ámbito de trabajo,

por ello es conveniente no descuidar la limpieza de los materiales, instrumentos y equipo necesario para las tareas diarias. Los materiales de vidrio y cualquier otro elemento deben estar profundamente limpios antes de comenzar la labor.

Por esta razón que se debe realizar mensualmente o cuando se crea conveniente, un monitoreo de los contaminantes del ambiente, para este fin se puede utilizar el método de sedimentación en placa Petri que ha sido ampliamente utilizado. Las placas con medio de cultivo estéril, permanecen abiertas durante determinados períodos de tiempo, permitiendo la sedimentación de los microorganismos. Este método es sencillo y económico. Tiene la ventaja de que se pueden identificar las colonias de los microorganismos viables, pero su interpretación es difícil porque no pueden relacionarse con el volumen de aire muestreado. La deposición varía con el tamaño y forma de los microorganismos, la velocidad y la turbulencia del aire. El método no es cualitativa ni cuantitativamente exacto y detecta principalmente los microorganismos que más persisten en el aire, no detectándose, sin embargo, los microorganismos más pequeños.

En DIECA se realizan plaqueos mensuales de cada área de trabajo tanto en el laboratorio de producción de hongos como en el laboratorio de producción de *Cotesia*, lo que nos permite conocer la carga de contaminantes en el ambiente, de forma que se puedan tomar medidas de desinfección, antes de que se presente una contaminación de los productos.

Igualmente es importante programar una limpieza profunda mensual, de todas las áreas de trabajo, lo que incluye limpieza de muebles, vidrios y cambios de filtros de las cámaras de flujo laminar. Además, una vez por semana, preferiblemente los viernes, deberá realizarse una aspersión con un Fungicida como el Mancozeb, Rovral, Octave, Benomyl, u otro producto con una acción similar, que permita eliminar los microorganismos contaminantes más comunes de los laboratorios. Solo en caso de tener una contaminación fuerte en

cualquiera de los dos laboratorios se deberá realizar dos aspersiones por semana, rotando los fungicidas.

Bibliografía

1. BUSTILLO, A. 1997. Los hongos entomopatógenos en el control de insectos plaga. Cenicafé, Colombia. 45p.
2. CAÑEDO, V.; AMES, T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos (en línea). Centro Internacional de la Papa. Perú. Consultado el 28 de junio 2013. Disponible en: <http://cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>.
3. CARBALLO, M. Guaharay, F. López, J. 2004. Control biológico de plagas agrícolas, Costa Rica, CATIE. 184p.
4. CARBALLO, M. 2002. Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos (en línea). CATIE, Costa Rica. Consultado 4 de julio 2013. Disponible en http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rev66/productos_fitosan.pdf.
5. BADILLA, F.; SOLÍS, A.; ALFARO, D. 1994, Manual de producción del parasitoide *Cotesia flavipes* para el control biológico de los taladradores de la caña de azúcar *Diatraea* spp en Costa Rica. DIECA. Costa Rica. 21 p.
6. ELÓSEGUI, O. de. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas (en línea). INISIVA, La Habana, Cuba. Consultado el 21 de julio 2013. Disponible en <http://www.inisav.cu/OtrasPub/METODOS%20ARTESANALES%20DE%20PRODUCCION%20DE%20BIOPLAGUICIDAS.pdf>.
7. FERNÁNDEZ, O.; VEGA, L. 2006. Temas interesantes acerca del control biológico de plagas. 2 ed. Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 240p.

8. GARCÍA, M.; URUBURU, F. 2004, La conservación de cepas microbianas (en línea). España. Consultado el 3 de julio 2013. Disponible en: <http://www.uv.es/cect>.
9. GONZÁLEZ, M.; et al. 2012. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas (en línea). Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. México. Consultado el 10 de julio 2013.
Disponible en:
<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM8/5.pdf>.
10. LASTRA, B.; GÓMEZ, L. 2006. La cría de *Diatraea saccharalis* para la producción masiva de sus enemigos naturales. Cenicaña, Colombia.
11. MARÍN, P. et al. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Cenicafé, Colombia.
12. MONZÓN, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua (en línea). CATIE, Costa Rica. Consultado 2 de julio 2013. Disponible en <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rev63/pag95-103.pdf>.
13. POINAR, G.; GÓMEZ, T. 1984. Laboratory guide to insect pathogens and parasites, New York: Plenum Press.
14. RODRÍGUEZ, A. 2006. Control de procesos y control de calidad aplicados por DIECA para facilitar la producción de los hongos entomopatógenos. In: XVI Congreso de la Asociación de Técnicos Azucareros de Costa Rica. San José, Costa Rica. p 435-442.

