

Formulaciones de Hongos Entomopatógenos: HEPs 2.0 para el control de insectos plaga



Natalí Fernández P.
Químico, Dra. Cs.
Investigadora en Biopolímeros
INIA Quilamapu



María Esperanza Sepúlveda S.
Ingeniera Agrónoma, Mg. Cs.
Producción de Hongos Entomopatógenos
INIA Quilamapu



Ricardo Ceballos C.
Ingeniero Forestal, Dr. Cs.
Investigador en Ecología Química
INIA Quilamapu



La incorporación de tecnología bajo la figura de un formulado de Hongos Entomopatógenos (HEP) mejora considerablemente la estabilidad de almacenamiento y otorga una mayor protección en el manejo de plagas con estos biocontroladores.

El hecho de que los hongos puedan infectar y crecer en insectos se conoce desde el año 900, según escritos encontrados en Oriente. En 1834, cuando Agostino Bassi realizó investigaciones sobre enfermedades en gusanos de seda, pudo demostrar que existía un hongo que causaba enfermedades infecciosas en insectos. Más tarde, y en honor a este científico, este hongo llevaría su nombre: *Beauveria bassiana*.

A comienzos de 1900, nuevas investigaciones demostraron que los hongos son capaces de infectar insectos y podrían ser empleados como potenciales insecticidas biológicos para el control de plagas. A estos microorganismos se les llamó hongos entomopatógenos (HEPs). El posterior desarrollo de insecticidas de síntesis química, con un actuar más rápido y de amplio espectro, hizo que el interés por los HEPs disminuyera.

Actualmente, debido a los efectos adversos que se han ido descubriendo por el uso de insecticidas químicos, el control biológico ha experimentado un renacimiento. Así, el uso de HEPs como bioinsecticidas ha ido en aumento, ya que entre los microorganismos que causan enfermedades en los insectos, los hongos son los únicos que pueden

infectar por contacto, a través de la cutícula del insecto, y no necesitan ser ingeridos por lo que pueden infectar, incluso, a insectos chupadores como los pulgones, que succionan el contenido de las células de la planta sin masticar las hojas.

Existen más de 700 especies de HEPs divididas en 100 géneros, lo que proporciona una amplia base genética para la búsqueda, selección y desarrollo de bioinsecticidas. Sin embargo, en el ámbito comercial los géneros del orden taxonómico Hypocreales (anteriormente Hyphomycetes) son los más empleados. Dentro de este se encuentran *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* (anteriormente *Verticillium*) e *Isaria* (antes *Paecilomyces*), los que se utilizan para controlar una amplia variedad de insectos plaga.

A nivel de especies, *B. bassiana* es la que presenta un espectro de uso más amplio, por lo que, a nivel mundial, existe un mayor número de productos comerciales disponibles. No ocurre lo mismo con los productos comerciales en base a *M. anisopliae*, que además presentan un menor rango de insectos huéspedes. Otras especies, como *L. lecanii* (antes *Verticillium lecanii*), han demostrado

una amplia utilización para el control de varias especies de insectos. Recientemente, se han registrado productos a base de *I. fumosorosea* (antes *P. fumosoroseus*), *B. brongniartii* y *P. tenuipes*.

A pesar de su gran potencial, el desarrollo de productos comerciales en base a HEPs no es tan abundante como debería ser. Uno de los mayores desafíos es la ineludible comparación con los insecticidas químicos, lo que, entre otros aspectos, considera los tiempos de respuesta, eficacia y persistencia, para determinar su potencial como alternativa en el manejo plagas.

Para alcanzar el éxito en el desarrollo de productos comerciales en base a HEPs, las investigaciones se han orientado a aspectos tendientes a aumentar la viabilidad durante el almacenamiento a largo plazo y a mejorar los métodos de aplicación. Ambos son fundamentales para el desempeño de los HEPs, y deben ser abordados como un prerrequisito, previo a su masificación a escala comercial.

Uno de los primeros intentos en utilización de HEPs a una escala mayor a las condiciones de laboratorio se realizó en 1879, cuando Iliá Ilich Méchnikov descubrió que el

gorgojo de la remolacha, *Cleonus punctiventris*, es afectado por el hongo *Metarhizium*. Así, en los primeros intentos de masificación de esporas de este hongo, 55 kg de sus esporas se mezclaron con arena fina y se esparcieron en cultivos cercanos a Kiev, Ucrania. En una evaluación realizada 10 y 15 días después, Méchnikov encontró que entre el 55 y el 80 % de las larvas del gorgojo estaban muertas a causa del hongo.

Experiencia chilena

El mercado nacional de los bioinsumos ha crecido considerablemente en los últimos años. De acuerdo con el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), existen 117 productos clasificados como controladores biológicos de plagas y enfermedades, de los cuales 34 corresponden a hongos entomopatógenos, según el listado de "Insumos visados para agricultura orgánica nacional, de acuerdo con el D. S. 2/2016, actualizado a enero de 2019". De estos productos, la mayoría tiene una presentación comercial en formato de "polvo mojable", que consiste en conidias en estado puro. Actualmente, el método de inoculación más común de estos productos es la aplicación mediante la pulverización de una suspensión de esporas, tanto sobre el follaje o directamente al suelo en el caso de plagas subterráneas.

La facilidad relativa de obtener y aplicar directamente conidias de los HEPs, posee la desventaja de exponer el hongo a dos de las condiciones más restrictivas y severas para su acción: la radiación ultravioleta y la humedad relativa. Estos factores son los de mayor influencia en el desarrollo y la patogenicidad de los HEPs, así como en el desarrollo de la enfermedad a nivel epizootico. Dado que la gran mayoría de los productos comerciales disponibles están basados en esporas desnudas, el momento de la aplicación es fundamental para lograr la máxima eficacia. Así, para proteger a las esporas de la radiación ultravioleta, la

aplicación debe hacerse al atardecer o en días nublados. En el caso de las aplicaciones al suelo, para evitar la deshidratación y asegurar la penetración del producto, es preferible aplicar antes de una lluvia.

Para obtener una alternativa eficaz al uso de productos químicos, las restricciones de los HEPs debían ser resueltas. El proceso de formulación ha sido una revolución tecnológica, que ha permitido enfrentar estas dificultades en la producción comercial de agentes biológicos de control, como los HEPs.

En términos generales, una formulación corresponde a una combinación de componentes en proporciones o estructuras apropiadas según una fórmula. En particular, en el manejo de plagas una formulación a base de HEPs consta de un ingrediente activo, esporas del hongo, y de excipientes o vehículos que aportan a la vida útil, y facilitan la aplicación del ingrediente activo. La importancia de los excipientes reside en que permiten modificar la adhesión y viscosidad del producto final, permitiendo, así, una mayor eficacia del ingrediente activo.

Los excipientes y vehículos utilizados en el desarrollo de una formulación no deben presentar actividad biológica, ni afectar la actividad del hongo. Deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas adecuadas para mezclarse con las conidias, facilitar la aplicación del producto, y ser económicamente adecuados a los fines comerciales. Por lo tanto, los objetivos de una formulación de HEPs es aumentar la estabilidad durante el almacenamiento y después de la aplicación, además de mejorar la adhesión de las conidias a la cutícula del insecto, aumentar o mantener la virulencia, y facilitar su manejo y aplicación. En términos comerciales, las propiedades físicas y biológicas de una formulación deben permanecer estables por un tiempo mínimo de 12 meses, aunque es recomendable que se logren periodos de 18 meses o incluso mayores.

Desarrollo de formulaciones de HEPs bajo la marca BioINIA

INIA ha desarrollado diversas investigaciones para el desarrollo de formulaciones en base a HEPs, de manera de dotar a las esporas de las características adecuadas para un biopesticida y que sean un producto alternativo a los insecticidas de síntesis química.

Con el fin de obtener una formulación estable que permita el desarrollo de un producto comercial, se ha empleado la técnica de encapsulado, que desarrolla cápsulas con esporas activas de HEPs. La encapsulación se define como un proceso que involucra la envoltura completa de las conidias dentro de una matriz y/o membrana porosa o impermeable, para obtener cápsulas de tamaño pequeño que varían desde los nanómetros hasta los milímetros. Las partículas de tamaño inferiores a 1 µm se denominan nano, las que van de 1 a 2000 µm se denominan micro, y las mayores a 2000 µm se denominan macro-perlas o cápsulas.

La microencapsulación, como técnica para el desarrollo de formulaciones, se realiza mediante el proceso de secado por aspersión, que permite la obtención de pequeñas cápsulas con el microorganismo viable protegido por una o varias capas de una matriz polimérica. Además, con esta técnica es posible incorporar otros componentes para conferir protección ante factores ambientales, como aditivos humectantes, adhesivos, nutrientes y protectores solares. Este método utiliza una solución homogenizada con las esporas y el material de soporte, que se atomiza en una cámara con flujo de aire caliente, provocando la evaporación del disolvente y, en consecuencia, la formación de microcápsulas. Las principales ventajas del proceso son la administración de manera continua de la solución, el bajo costo de operación, alta calidad y estabilidad de las cápsulas, buen rendimiento y rápida solubilidad.

Resultados y proyecciones de estudios de encapsulamientos de HEPs realizados por BioINIA

Mediante la técnica de microencapsulación, BioINIA desarrolló una formulación para una cepa de *Metarhizium anisopliae*, comercializada para el control de pololo verde (*Hylamorpha elegans*) bajo la marca BioINIA (FIGURA 1). Las esporas del hongo fueron microencapsuladas junto con polivinilpirrolidona y gelatina bovina, los cuales otorgaron protección y estabilidad al hongo. Se realizó un ensayo de campo en la comuna de El Carmen, donde se aplicó el producto comercial (cepa sin formular) y la cepa formulada en tres huertos orgánicos de frutales a inicios de otoño, época en la que se recomienda la aplicación de este tipo de productos. La mortalidad generada por ambos productos fue prácticamente la misma. La gran diferencia radicó en la permanencia del HEP. A un mes desde su aplicación, la cantidad de unidades formadoras de colonias del hongo formulado fue el doble comparada con las esporas desnudas (producto comercial) (CUADRO 1).

INIA también ha considerado el desarrollo de formulaciones que contienen fuentes de nutrientes alternativos para las conidias, a la vez que se les protege del medio ambiente. En este sentido, se han elaborado encapsulados en base a biopolímeros, como alginato y celulosa, entre otros. Este tipo de formulación es



➤ **Figura 1.** (A) Secado por aspersión de esporas de hongo entomopatógeno. (B) Aplicación de microcápsulas sobre *Hylamorpha elegans*. (C) Micelio de *Metarhizium anisopliae* emergido desde microcápsulas sobre la superficie de larvas de *H. elegans*.

apropiada para aplicaciones que se hacen directamente al suelo para el control de plagas, como los gusanos blancos, haciendo que la aplicación sea mucha más sencilla para el usuario. El alginato es un polímero empleado en la encapsulación debido a su propiedad de formar una matriz versátil, biocompatible y no tóxica para los HEPs, además de protegerlos de agentes externos como el calor, pH, oxígeno, luz, etc. Para la generación de este tipo de producto (FIGURA 2) se han evaluado diferentes parámetros en la producción de perlas y cápsulas con alginato de sodio al 1,5 % (FIGURA 3), como tamaño de boquilla, presión de

aire, frecuencia de vibración y flujo de la mezcla encapsulante.

En investigaciones recientes, se han evaluado distintos tamaños de cápsulas, logrando obtener un mayor tiempo de almacenamiento y un mejor desempeño en pruebas de laboratorio comparado con esporas sin formular. Las cápsulas han mostrado una mejor viabilidad y propiedades higroscópicas, lo que las hace capaces de absorber el vapor de agua del ambiente, dando la posibilidad de mantener la interacción con el ambiente y propiciar el buen crecimiento del hongo entomopatógeno. Las evaluaciones en condiciones de campo

Cuadro 1. Unidades formadoras de colonia ($\times 10^2$) g^{-1} en suelo obtenidas en ensayo de aplicación.

Lugar de aplicación	Pre aplicación	7 días post aplicación		14 días post aplicación		21 días post aplicación		28 días post aplicación	
	CsF	CsF	CF	CsF	CF	CsF	CF	CsF	CF
Huerto 1	0.2	6.6	6.4	5.3	6.9	4.9	7.5	4.4	8.1
Huerto 2	0	5.7	5.8	5.0	5.5	5.0	6.3	3.1	7.7
Huerto 3	0	6.0	6.3	5.6	6.0	5.2	6.4	4.2	6.4

CsF: Conidias sin formular (producto comercial BioINIA). CF: Conidias formuladas.

de esta formulación se encuentran en desarrollo.

Actualmente, utilizando esta misma técnica, se está desarrollando una cápsula de biopolímero degradable, donde se combinan hongos entomopatógenos y sustancias atrayentes para plagas. Se pretende establecer estrategias de control basadas en el concepto de "atraer y matar", explorando los efectos de sinergia entre los hongos entomopatógenos y sustancias como semioquímicos (feromonas y kairomonas) y CO₂.

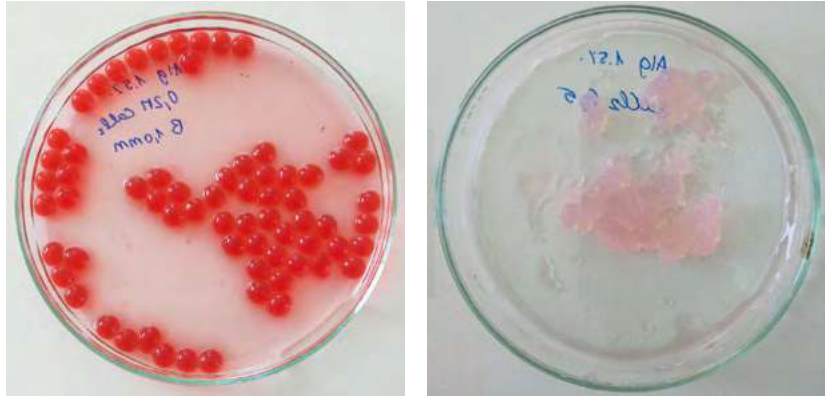


Figura 2. Diferentes tamaños de cápsulas obtenidas por medio de la encapsulación de esporas en alginato.



Figura 3. Cápsulas producidas con alginato de sodio 1,5 % y núcleo de suspensión de conidias.

Esta innovación, consiste en el desarrollo de una coformulación que apunta a aumentar la eficacia del control realizado con HEPs mediante el poder atrayente de los semioquímicos. Lo anterior busca explotar la orientación natural que presentan las larvas subterráneas de muchos insectos herbívoros hacia las raíces de las plantas, usando semioquímicos o CO₂ como guía de orientación. Así, cuando estas cápsulas

sean aplicadas al suelo, liberarán las sustancias atrayentes. Al ser la larva atraída y al entrar en contacto con las cápsulas, las esporas del hongo entomopatógeno se adherirán a la cutícula y comenzarán el proceso infeccioso.

El desarrollo de formulaciones busca fomentar y ampliar el uso de microorganismos entomopatógenos para el control de plagas. Así, en el futuro cercano, los formulados

debieran ser considerados un componente confiable en el manejo integrado de plagas. Aún queda mucho por investigar, pero el despertar de la conciencia sustentable en el público y la adopción de normativas más estrictas tendientes a fomentar la inocuidad, entre otros aspectos, propician un presente ideal para continuar explorando alternativas para un manejo fácil y seguro de los HEPs por parte del usuario. **TA**