

Artículo de Investigación

Aislamiento, identificación y conservación de cepas entomopatógenas del género *Beauveria* de yerbales orgánicos del Paraguay.

Claudia Elena Gonzalez^{1*}, Mónica Liliana Albrecht², Gustavo Ángel Bich³ y María Lorena Castrillo⁴

^{1,2}Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Itapúa. Encarnación. Paraguay.

^{3,4}Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis). Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Misiones, Argentina.

^{3,4}CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

*Autor correspondiente: Claudia Elena Gonzalez; claudiagonzalez@cyt.uni.edu

Recibido: 17/12/2020 **Aceptado:** 09/08/2021

Resumen

En Paraguay la yerba mate tiene una gran importancia comercial y cultural, sus hojas se consumen como parte de una bebida tradicional llamada mate, en infusión caliente o en forma fría denominada tereré. Esta planta es atacada por varias especies de insectos y su control generalmente se realiza con biocidas. Sin embargo, en la yerba orgánica estos controles no están permitidos por las normativas de calidad y exportación. El hongo *Beauveria* es entomopatógeno, y es capaz de atacar a una de las principales plagas de la yerba mate, *Gyropsylla spegazziniana*, causante de producir ampollas o rulos en las hojas con grandes consecuencias económicas negativas. Los hongos entomopatógenos pueden ser utilizados dentro de los programas de control biológico ya que atacan a los insectos produciendo su muerte. Por lo tanto, se pretende buscar microorganismos y evaluar su bioprospección con la finalidad de utilizarlos en líneas biotecnológicas que aporten beneficios en las actividades económicas industriales agrícolas. En el presente trabajo se reporta el aislamiento, la identificación y la conservación de cepas fúngicas del género *Beauveria*, nativas de Paraguay, como material de partida para evaluar la potencialidad de su aplicación en procesos de biocontrol de *G. spegazziniana*.

Palabras clave: Aislamiento, cepas fúngicas nativas, biocontrol, *Ilex paraguariensis* St. Hil.

Abstract

Yerba mate has great commercial and cultural importance in Paraguay; its leaves are consumed as part of a traditional drink called mate as a hot infusion, or tereré as a cold infusion. This plant is attacked by several species of insects and its control is generally carried out with biocides. However, in organic yerba mate plantations these substances are not allowed due to quality and export regulations. The *Beauveria* fungus is entomopathogenic and is capable of attacking one of the main pests of the yerba mate, *Gyropsylla spegazziniana*, which causes blisters or curling in the leaves with great negative economic consequences. Entomopathogenic fungi can be used within biological control programmes considering that they attack insects causing their death. Therefore, it is intended to search for microorganisms and evaluate their bioprospecting in order to use them in biotechnological lines that provide benefits in agricultural and industrial economic activities. The present work reports the isolation, identification, and conservation of fungal strains of the genus *Beauveria* which is native from Paraguay, as a starting material to evaluate the potentiality of its application in biocontrol processes of *G. spegazziniana*.

Keywords: Isolation, Native fungal strains, biocontrol, *Ilex paraguariensis* St. Hil.

1. Introducción

La yerba mate o (*Ilex paraguariensis* St. Hill) es una planta que se desarrolla principalmente en tres países de América Latina, Paraguay, Argentina y Brasil, de ella se aprovechan sus hojas y ramas más jóvenes que después de sufrir un proceso de secado y triturado o canchado se almacena aproximadamente un año para luego ser molida y de esta manera se elabora el producto comercial que se conoce como mate (1) En Paraguay el mate se puede consumir caliente en forma de infusión o como una bebida fría conocida como tereré que es de gran preferencia por los consumidores de la región (2).

Factores tanto bióticos como abióticos condicionan directa e indirectamente la productividad del sector yerbatero (3) Dentro de los factores bióticos, toda entidad biológica cuya actividad interfiera con la labor del hombre, causando perjuicios económicos, se expresa por ende como plaga (4). Entre las entidades biológicas consideradas plagas se encuentran diversos organismos como ser: insectos, nematodos, bacterias y hongos fitopatógenos (5). La planta de yerba mate tiene diversas plagas entre ellos insectos que atacan sus hojas y ramas y producen pérdidas económicas de gran consideración. Uno de los insectos de interés es conocido como *Gyropsylla spegazziniana*, es específico de la yerba y pertenece al orden

Homóptera de la familia *Psyllidae* y tiene varios nombres vulgares o comunes utilizados en la región como el rulo o ampolla de la yerba mate, psílido de la yerba mate (3).

El mayor daño a las hojas lo producen los organismos adultos de *G. spegazziniana* que son pequeñas chicharritas de 2,2 a 2,5 mm de color verde amarillentas con alas transparentes. La hembra se reconoce porque presenta al final del abdomen el aparato ovopositor y es la responsable de inyectar una toxina en el brote de la hoja tierna y colocar los huevos próximos a la nervadura central, como consecuencia se produce una reacción en forma de plegamiento o empanadita y se origina una ampolla o agalla en cuyo interior desarrollan las ninfas que se alimentan de la savia. Como parte del ecosistema natural pueden encontrarse hongos entomatógenos o patógenos de insectos que podrían infectar a estos insectos. Uno de los géneros fúngicos que atacan al psílido de la yerba pertenece a *Beauveria* y puede encontrarse tanto en el suelo, en la planta y en la superficie u órganos de insectos y actuar como control biológico (6).

A lo largo de la historia, con el propósito de contrarrestar las pérdidas ocasionadas por los insectos plaga, se han desarrollado diversos métodos e implementado numerosos programas de control (7), siendo el control químico el método tradicional de mayor difusión para combatirlos. Sin embargo, el uso excesivo y continuo de estos insecticidas sintéticos acarrea altos costos ambientales, así como un elevado riesgo para la salud humana debido al nivel de toxicidad que presentan (8). Por lo que la búsqueda y aplicación de métodos alternativos como el control biológico se comenzaron a utilizar (9, 10). El género *Beauveria bassiana* ha sido ampliamente estudiado ya que ataca insectos patógenos de muchas especies vegetales de interés comercial se sabe que son causantes de epizootias de áfidos como también de otros insectos y tiene actividad antagónicas sobre otros patógenos debido a que pueden producir enzimas que le permiten competir por recursos nutritivos de tal manera que por esta vía podrían evitar el ataque de otros insectos (11).

El género *Beauveria* ataca al psílido de la yerba penetrando por la cutícula que reviste su cuerpo conocida como exoesqueleto y de esta manera ingresa al cuerpo de las hembras sin necesidad de ser ingerido y le produce la muerte, el hongo produce esporas que se dispersan por el aire infectando nuevas plantas (12). Por lo que a nivel mundial se los cultivan con la finalidad de producir fórmulas comerciales de esporas que diluidas en agua se atomizan a las plantas para inocular de forma artificial y que las mismas actúen como control biológico, además de ser una excelente alternativa para preservar el ambiente (13).

Sin embargo, el conocimiento actual acerca del aislamiento, caracterización y uso de controladores biológicos como las cepas fúngicas del género *Beauveria*, en plantaciones forestales y de yerba mate es aún muy poco explorado en nuestro país. En este contexto, la

bioprospección consiste en buscar microorganismos utilizando líneas biotecnológicas que aporten beneficios en las actividades económicas industriales agrícolas. El aislamiento, identificación, caracterización y selección de cepas fúngicas biocontroladoras nativas con alta especificidad y patogenicidad contra insectos plaga en plantaciones agrícolas y forestales de nuestro país, podrían contribuir a la expansión del limitado número de productos para el control de insectos, y para el control de enfermedades producidas por las plagas en una manera significativa y sustentable (14). Los productos a base de biocontroladores tendrían como beneficio principal para el productor, plantaciones más rentables y sostenibles, tanto por la sanidad y nutrición vegetal logradas, como por los rendimientos en la cosecha. Además, implicarían menos perjuicios a la salud y al ambiente, ya que el uso de biocontroladores es seguro para el hombre y permite reducir el empleo de productos químicos de alto impacto ambiental.

Debido a todo lo expuesto, el objetivo general propuesto fue aislar, identificar y conservar cepas fúngicas del género *Beauveria*, nativas de Paraguay, a partir de plantaciones orgánicas de yerba mate y poder contar con material de partida para evaluar la potencialidad de su aplicación en procesos de control biológico del principal organismo causante del rulo de la yerba mate, *Gyropsylla spegazziniana*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Recolección y aislamiento fúngico

La recolección, de las 50 muestras de suelo, se realizó en los yerbales de la Empresa Yerbatera Pajarito S.A. de la ciudad de Bella Vista, Departamento de Itapúa y durante los meses de septiembre 2019 a marzo de 2020. Los muestreos de suelo se realizaron en plantaciones orgánicas certificadas y no biotratadas, entre las plantas de yerba que presentaron mayor ataque del insecto *Gyropsylla*, donde se descartó la fracción superficial del suelo y a una profundidad de 20 cm se recolectaron asépticamente muestras de 500 g. (4). Asimismo, en los 50 sitios de muestreos se buscó la presencia de *Gyropsylla* muertas y se las recolectó, al igual que cualquier otro tipo de insecto muerto encontrado, con el fin de evaluar si la causa de la posible muerte era por micosis (9).

Todas las muestras recolectadas fueron transportadas al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología (FaCyT) de la Universidad Nacional de Itapúa (UNI) para ser procesadas.

2.2. Obtención y mantenimiento de los cultivos fúngicos

Para la obtención y mantenimiento de los cultivos fúngicos en tubos con agar inclinado y tubos cónicos de 50 mL y 1,5 mL, se utilizó agar Sabouraud enriquecido con 1 % de extracto de levadura (Marca OXOID). Para preparar las diluciones se utilizó Agua peptonada con buffer (Marca OXOID).

El mantenimiento de los cultivos fúngicos se realizó en condiciones controladas de temperatura ($4 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad ($> 85\%$) y fotoperiodo (24 h oscuridad) con la finalidad de conservar la viabilidad de estos, disminuyendo en la mayor manera posible su crecimiento y desarrollo.

2.3. Obtención de cultivos fúngicos puros

Para el aislamiento de hongos entomopatógenos nativos se utilizaron dos técnicas distintas de acuerdo con el tipo de muestra a ensayar. A partir de las muestras de suelo obtenidas se realizó la técnica de dilución seriada en agua peptonada y se sembraron en placas de Petri con el medio de cultivo selectivo agar Sabouraud enriquecido con 1 % de extracto de levadura (15).

Las muestras de insectos muertos recolectados se incubaron en cámaras húmedas para fomentar la esporulación, luego se sembraron por punción directa en placas de Petri con el mismo medio de cultivo descrito previamente. Todas las placas se incubaron en condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad ($> 85\%$) y fotoperiodo (24 h oscuridad), descritas como óptimas para el desarrollo de cultivos fúngicos (16, 17). En la figura 1 se observan insectos adultos de *Gyropsilla* muertos sobre la superficie de las hoja de yerba mate atacada por el rulo o ampolla (A) bajo lupa con aumento 100 X (B) y en (C) los cultivos de insectos muertos en cámara húmeda para favorecer el desarrollo fúngico.

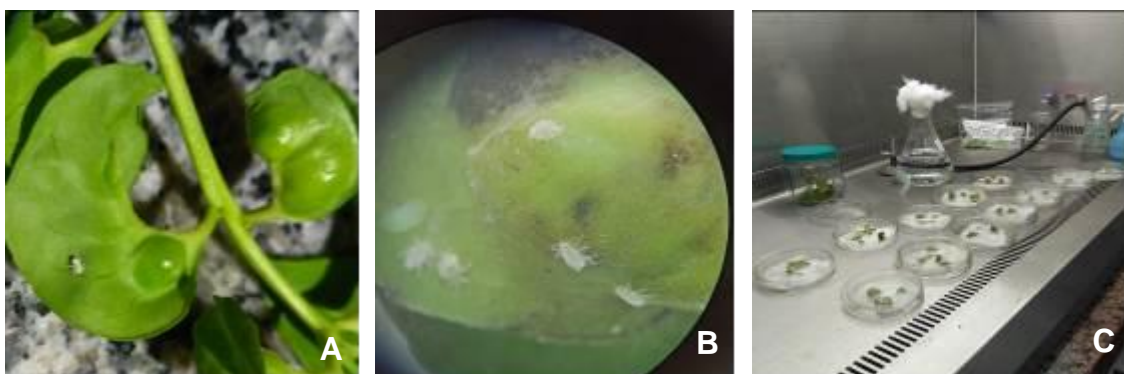


Figura 1. En A se observan ampollas, en B Insectos adultos y en C cultivos en cámaras húmedas

2.4. Caracterización de los aislamientos obtenidos

Luego de transcurrido el tiempo adecuado de incubación (entre 7 a 10 días aproximadamente), se observaron las colonias fúngicas desarrolladas en las placas y se caracterizaron macro y microscópicamente las colonias. Para la caracterización macroscópica de las colonias se tuvieron en cuenta ciertos parámetros, como ser: color anverso y reverso, tamaño, forma, textura, presencia de exudado, tipo de borde, entre otras, debido a que son de gran ayuda en la identificación fúngica (16–18). Complementariamente se realizaron observaciones en fresco para la caracterización microscópica mediante la técnica de montaje con el colorante lactofenol azul de algodón y la observación de estructuras vegetativas y reproductivas que fueron comparadas con claves taxonómicas (19, 20). Para todas las observaciones microscópicas se utilizó un microscopio óptico con contraste de fases (400 y 1000 ×).

2.5. Confección de un cepario de interés

Todos los aislamientos nativos obtenidos de hongos entomopatógenos se encuentran a disposición del personal para estudios posteriores y fueron depositados en el cepario de interés biotecnológico del Instituto de Biotecnología Misiones “Dra María Ebe Reca” en tubos con agar inclinado, tubos cónicos de 50 mL y tubos de 1,5 mL con agar extracto de malta como medio de cultivo.

3. Resultados y Discusión

Los hongos se hallan presentes en cualquier ambiente donde haya humedad, temperatura adecuada y sustratos orgánicos disponibles (21). El Departamento de Itapúa presenta clima principalmente cálido y húmedo, definido como subtropical sin estación seca, precipitaciones abundantes, uniformes que sumado al continuo rocío, mantienen alto grado de humedad superficial del suelo; todas estas características generan condiciones apropiadas para el crecimiento y desarrollo de un gran número de especies fúngicas (19).

Durante el primer semestre del año 2020 se realizaron sucesivos muestreos en las diferentes estaciones del año en las plantaciones orgánicas de la Empresa Pajarito SA con el fin de evaluar y localizar la posible presencia de hongos entomopatógenos en ellos a partir de lo cual, fue posible observar una gran diversidad de microorganismos fúngicos de diferentes géneros y especies, provenientes de los ambientes en estudio.

En la naturaleza los hongos son comúnmente colectados de muestras de suelo o insectos muertos, y por lo tanto para su uso en investigación necesitan ser aislados y purificados en distintos medios de cultivo para la obtención de cultivos puros y su posterior identificación y

multiplicación (22–24). En el presente trabajo, la metodología adecuada empleada permitió obtener cepas fúngicas de interés en cultivo puro.

Asimismo, para su correcto aislamiento e identificación fueron de gran utilidad las características físicas de las colonias. Cada microorganismo crece de manera diferente, forman colonias de distinto color, forma, tamaño, textura, olor y brillo (18). A partir de todo el proceso descrito fue posible obtener dos cepas con potenciales capacidades entomopatogénicas las que fueron seleccionadas y conservadas en el cepario de interés biotecnológico citado previamente (InBioMis). En la figura 2 se observa el proceso para la obtención de cultivos puros de hongos. En la figura 2 A se observa el crecimiento de diversas colonias fúngicas en placas de Petri y en la figura 2 B un cultivo puro inoculado mediante estriado en un tubo de ensayo con agar inclinado.

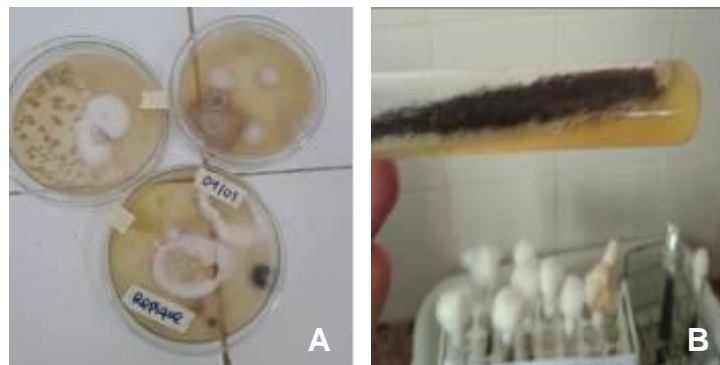


Figura 2. Colonias de hongos y un cultivo aislado en tubo agar inclinado.

Las cepas con potenciales capacidades entomopatogénicas aisladas se repicaron en agar Sabouraud y se observaron colonias de crecimiento rápido de color blanco con una apariencia pulverulenta con abundantes conidios; a nivel microscópico se observó principalmente micelio septado, células conidiógenas sencillas, hinchadas en la base y de extremos distales ahusados que se presentaron con una disposición en forma de zig-zag; con conidios unicelulares y hialinos. Estas características morfológicas corresponden en gran medida al género fúngico *Beauveria* (25, 26). En la figura 3 se puede observar el micelio de un hongo y su cuerpo fructífero, las características micromorfológicas permitieron identificar a esta colonia como perteneciente al género fúngico *Beauveria*. En A se observa una fotografía del campo microscópico a 400X y en la figura B se observa el mismo campo a 1000X.

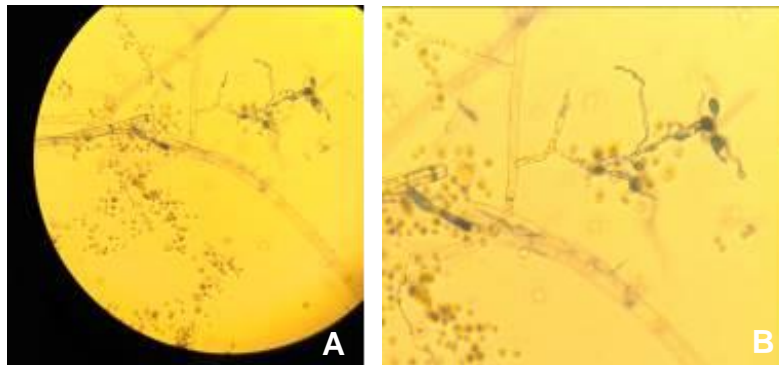


Figura 3. Microscopia de micelios de hongos aislados en aumento 400X y 1000X.

Finalmente, como resultado de la metodología empleada, fue posible generar una colección biológica viva mediante la creación de un cepario donde se preservaron las dos cepas potencialmente entomopatogénicas de *Beauveria* y demás cepas fúngicas aisladas, como ser: hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Absidia*, *Rizhopus*, entre otros que son parte de la microbiota asociada al ambiente muestreado. Una descripción más detallada acerca de su identificación tanto por claves morfológicas como por métodos moleculares para cada aislamiento obtenido, así como los referencias sobre su distribución, serán motivos de futuros trabajos.

4. Conclusiones

Fue posible aislar e identificar macro y microscópicamente dos cepas del género *Beauveria* aisladas de los yerbales orgánicos de la empresa Pajarito S.A. del departamento de Itapúa del Paraguay. Estas cepas han sido conservadas a disposición del personal en el cepario de interés biotecnológico del InBioMis. Por lo que mediante el presente trabajo fue posible crear un cepario específicamente de hongos entomopatógenos. El aislamiento e identificación de cepas fúngicas nativas de Paraguay servirá como material de partida a partir del cual se realizarán estudios y ensayos para evaluar la potencialidad de su aplicación en procesos de control biológico del principal organismo causante del rulo de la yerba mate, *G. spegazziniana*.

Contribución de los autores: Todos los autores del presente trabajo trabajaron arduamente en la ejecución del mismo. C.E. González llevó a cabo la dirección del proyecto en donde se enmarcó esta línea de investigación, dirigió todo el proceso de toma de muestra y aislamiento de cepas fúngicas en el laboratorio. ML Albrecht colaboró en el proceso aislamiento de cepas fúngicas de interés y en la caracterización de los cultivos obtenidos. GA Bich y ML Castrillo colaboraron en la identificación micro-morfológica de los aislamientos obtenidos y en los

métodos de conservación de las cepas puras. Todos los autores colaboraron en gran medida en la redacción y preparación del manuscrito, así como también en la supervisión del mismo.

Conflicto de interés: Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés con respecto a la publicación de este artículo.

Agradecimientos: se agradece a la Empresa Yerbatera Pajarito SA por poner a disposición la asistencia técnica de la Ing. Agrónoma Anita Teresinha Schneider Both a cargo de la toma de las muestras de los yerbales de la empresa durante todo el tiempo que duró la investigación y a las alumnas, Belén Itatí Giménez Mieres, Melissa Gabriela Silveyra Gómez y Patricia Anabell Vallovera Barrios de la cátedra de Microbiología II de la FaCyT por su colaboración en la preparación de los medios de cultivos y las observaciones macro y microscópicas de los Hongos.

Bibliografía

1. LACZESKI, M.E., ONETTO, A.L., CORTESE, I.J., MALLOZZI, G.Y., CASTRILLO, M.L., BICH, G., GORTARI, F., ZAPATA, P.D. y OTEGUI, M.B. Isolation and selection of endophytic spore-forming bacteria with plant growth promoting properties isolated from *Ilex paraguariensis* St. Hil. (yerba mate). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2020. Vol. 92, p. 1-20. DOI 10.1590/0001-3765202020181381.
2. ACHON F., F., CABRAL P., L., PARINI T., G., ALLO S., N., GODOY L., S. y CABRERA J., W. Efectos de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en los niveles plasmáticos de glucosa, lípidos, urea y creatinina de ratas Wistar. *Rev. ANACEM (Impresa)*. 2013. P. 67-69.
3. BURTON, O.J. Yerba mate : Manual de producción. . 2006. No. 03756, p. 1-52.
4. BRECHELT, A. Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades. *Red de Acción en plaguicidas y sus alternativas para América latina*. 2004. P. 1-36.
5. WYLIE, F.R. y SPEIGHT, M.R. *Insect Pests in Tropical Forestry*. Oxford : CABI, 2012. ISBN 9781845936365.
6. SCHAPOVALOFF, M.E., ANGELI ALVES, L.F., URRUTIA, M.I. y LÓPEZ LASTRA, C.C. Ocurrencia natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. abril 2015. Vol. 47, no. 2, p. 138-142. DOI 10.1016/j.ram.2015.03.005.
7. BARRERA, J.F. Manejo holístico de plagas: más allá del MIP. En : *XXX Congreso Nacional de Control Biológico-Simposio del IOBC*. 2007. p. 1-18.
8. GODOY, M.F.P., VICTOR, S.R., BELLINI, A.M., GUERREIRO, G., ROCHA, W.C.,

- BUENO, O.C., HEBLING, M.J.A., BACCI, M., DA SILVA, M.F.G.F., VIEIRA, P.C., FERNANDES, J.B. y PAGNOCCA, F.C. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2005. Vol. 16, no. 3 B, p. 669-672. DOI 10.1590/S0103-50532005000400031.
9. GORTARI, F., NOWOSAD, M.I.P., LACZESKI, M.E., ONETTO, A., CORTESE, I.J., CASTRILLO, M.L., BICH, G.A., ALVARENGA, A.E., LOPEZ, A.C., VILLALBA, L., ZAPATA, P.D., ROCHA, P. y NIELLA, F. Biofertilizers and biocontrollers as an alternative to the use of chemical fertilizers and fungicides in the propagation of yerba mate by mini-cuttings. *Revista Arvore*. 2019. Vol. 43, no. 4. DOI 10.1590/1806-90882019000400012.
 10. LACZESKI, M., ONETTO, A., CORTESE, I., MALLOZZI, G., CASTRILLO, M., BICH, G., GORTARI, F., PD, Z. y OTEGUI, M. Isolation and selection of endophytic spore-forming bacteria with plant growth promoting properties isolated from *Ilex paraguariensis* St . Hil . (yerba mate). *An Acad Bras Cienc*. 2020. Vol. 92, p. 1-20. DOI 10.1590/0001-3765202020181381.
 11. VALENCIA, S.M. *Efectos de microorganismos entomopatógenos y antagónicos como potenciales agentes de control biológicos de hormiga arriera Atta cephalotes (Hymenoptera: Myrmicinae)*. Universidad del Valle, 2015.
 12. VEGA, F.E., GOETTEL, M.S., BLACKWELL, M., CHANDLER, D., JACKSON, M.A., KELLER, S., KOIKE, M., MANIANIA, N.K., MONZÓN, A., OWNLEY, B.H., PELL, J.K., RANGEL, D.E.N. y ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*. 2009. Vol. 2, no. 4, p. 149-159. DOI 10.1016/j.funeco.2009.05.001.
 13. GÓNGORA BOTERO, C.E., MARÍN MARÍN, P. y BENAVIDES MACHADO, P. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bessiana* como controlador biológico de la broca del café. *Avances Técnicos Cenicafé*. 2009. No. 16, p. 3-8.
 14. BICH, G.A., CASTRILLO, M.L., KRAMER, F.L., VILLALBA, L.L. y ZAPATA, P.D. Morphological and Molecular Identification of Entomopathogenic Fungi from Agricultural and Forestry Crops. *Floresta e Ambiente* [en línea]. 22 enero 2021. Vol. 28, no. 2, p. 1-11. DOI 10.1590/2179-8087-FLOAM-2018-0086. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/floram/a/sYL5dwS8ZtYDnH4RNs9rzgv/?lang=en>
 15. JERKE, G., HORIANSKI, M.A., CASTRILLO, M.L. y CHADE, M.E. *Guía de prácticas de laboratorio 1º cuatrimestre / 2da. Ed. Cátedra de Microbiología e Inmunología*. Posadas, 2019.
 16. PITT, J.I. y HOCKING, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. Springer US, 2009.
 17. PIONTELLI LAFORET, E. *Manual de microhongos filamentosos comunes*. Viña del

Mar. Chile, 2017.

18. CASTILLO TAMAYO, É.C. *Aislamiento y caracterización morfológica y enzimofuncional de hongos lignino-celulolíticos procedentes de la corteza de aliso (Alnus acuminata), Arrayán (Myrcianthes hallii) y Pumamaqui (Oreopanax heterophyllum) presentes en del Pasochoa, bajo condic.* Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, 2011.
19. SAMSON, R.A., EVANS, H.C. y LATGÉ, J.-P. *Atlas of entomopathogenic fungi.* Springer Berlin Heidelberg, 1998.
20. PRATS, G. *Microbiología Clínica.* Buenos Aires, 2007.
21. CALDERON MONTENEGRO, C.C. y TORRES GRANADOS, L.A. Manual para el desarrollo de huertas urbanas con compostaje casero para conjuntos residenciales en Bogotá. [en línea]. 2021. Disponible en: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/1932/
22. LECUONA, R. *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga.* 1996. Buenos Aires : Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
23. LACEY, L. *Manual de Técnicas en Patología de Insectos.* 1997.
24. TEIXEIRA ALVES, R. y FARIA, M. *Pequeño Manual sobre Fungos Entomopatogénicos.* 2010. Embrampa.
25. SEIFERT, K.A. Compendium of Soil Fungi. *European Journal of Soil Science.* 2008. Vol. 59, no. 5, p. 1007-1007. DOI 10.1111/j.1365-2389.2008.01052_1.x.
26. BUSTILLO, A. *Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia.* 2001. Bogotá : Sociedad Colombiana de Entomología.