VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE PATOGENICIDAD *IN VITRO* DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* (Balsamo) SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei* (Ferrari)

CATALINA GRISALES MARÍN
JUAN CAMILO MEDINA GARCÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA.
ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE.
CENTRO COMUNITARIO DE ATENCIÓN VIRTUAL EJE CAFETERO.
PROGRAMA DE AGRONOMÍA Y PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL.

DOSQUEBRADAS – RISARALDA
2017

VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE PATOGENICIDAD *IN VITRO* DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* (Balsamo) SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei* (Ferrari).

Catalina Grisales Marín
Juan Camilo Medina García

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar a los títulos de: Agronomía e Ingeniería Agroforestal

Directora Patricia Marín Bacterióloga Esp.

Asesora: Catalina Muñoz Monsalve. Ing. Agroindustrial. Esp.

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA.
ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE.
CENTRO COMUNITARIO DE ATENCIÓN VIRTUAL EJE CAFETERO.
PROGRAMA DE AGRONOMÍA Y PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL.

DOSQUEBRADAS – RISARALDA
2017

Dedicatoria

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

Gracias a Dios por nuestras vidas y salud para culminar este proceso, a la universidad por nuestra formación, a nuestros padres que fueron los más grandes promotores de este proyecto y a todas las personas que de alguna forma estuvieron involucradas en este proceso.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a:

El Laboratorio Control de Bioinsumos, por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.

A la Bacterióloga Esp. Patricia Marín, por liderar, asesorar y aportar todos sus conocimientos y apoyo para la realización de esta validación, la cual favorece no solo al laboratorio sino también a la caficultura colombiana.

A Manuel Francisco Polanco por su asesoría y apoyo constante durante todo el proceso de la tesis.

A María Catalina Botero L. Microbióloga M.Sc., Experta técnica en control de calidad de Bioinsumos agrícolas – Auditora Norma 17025, Fitopatologa ICA, por su asesoría en este proyecto.

Al Doctor Pablo Benavides Machado Ph.D., Líder de la disciplina de Entomología del Centro Nacional de Investigaciones de Café – CENICAFÉ por aportar materiales como las brocas y los granos de café, para el desarrollo exitoso de esta investigación en bienestar de la caficultura Colombiana.

Al personal del laboratorio Control de Bioinsumos por el apoyo en los montajes de los ensayos: Luisa Fernanda Monsalve, Angie Milena Toro Castaño, por su valiosa colaboración.

Hernán González, Investigador de CENICAFÉ, por su aporte en el desarrollo estadístico de esta tesis de investigación.

Rubén Darío Medina R. Investigador de CENICAFÉ, por su aporte en el desarrollo estadístico de esta tesis de investigación.

A Catalina Muñoz, Ingeniera Agroindustrial Esp. Alimentación y Nutrición, por su asesoría en este proyecto de investigación por parte de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).

1. RESUMEN

La Validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para uso específico previsto. Se propuso realizar la validación de la prueba de Patogenicidad *in vitro* del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*. Las pruebas se realizaron en el laboratorio Control de Bioinsumos ubicado en CENICAFÉ disciplina de Entomología. Las brocas y los granos utilizados para las pruebas las suministro el Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFÉ). En esta prueba se evaluó la mortalidad de la broca del café causada por el hongo *Beauveria bassiana*. Para la evaluación el tratamiento está constituido por 4 unidades experimentales, cada unidad experimental está compuesta por 10 viales cada uno con una broca de café. Cada tratamiento es replicado 10 veces para determinar la consistencia o variabilidad de la prueba de patogenicidad. Para cada evaluación se utiliza un testigo compuesto de adultos de broca que no entran en contacto con el hongo y su montaje es exactamente igual al tratamiento. De cada tratamiento se realizan 10 réplicas con el hongo y un testigo para cada réplica. En los resultados obtenidos bajo las condiciones del ensayo, se presentaron mortalidades de *Hypothenemus hampei* causadas por el hongo *Beauveria bassiana* superiores al 90%. Adicional a esta prueba se realizó una comparación de dos sustratos utilizados para la supervivencia de la broca, discos de papel toalla esterilizados y café pergamino seco más discos de papel toalla esterilizados. Se encontró que el papel toalla permite la supervivencia de la broca durante el tiempo de la prueba. Por tanto, se recomienda utilizarlo como sustrato ya que hace más eficiente y económica la evaluación.

Palabras claves: Mortalidad, Patogenicidad, Norma Técnica Colombiana ISO/IEC 17025, *Beauveria bassiana, Hypothenemus hampei*, Validación.

ABSTRACT

Validation is the confirmation by testing and producing evidences that particular requirements are fulfilled for a specific intended use. This investigation was proposed to validate an *in vitro* pathogenicity test of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for controlling the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. The experiments were performed in the laboratory "Control de Bioinsumos" at the National Coffee Research Center "CENICAFE", Department of Entomology. The insects and coffee beans used in this investigation were provided by CENICAFE. The test assess the insect mortality caused by *B. bassiana*. For the evaluation, the treatment consisted of 4 experimental units, each experimental unit involved 10 glass tubes each containing a single insect. The treatment was replicated 10 times in order to estimate the variability of the pathogenicity test. Each evaluation included a control treatment of insects that were not exposed to *B. bassiana*. The results showed that under the conditions used for the test the *H. hampei* mortality caused by *B. bassiana* was higher than 90%. Additionally, two different substrates used for the survival of the *H. hampei* were compared: dried coffee seeds on sterilized paper discs and sterilized paper discs only. The results indicated that the sterilized paper discs only allow the survival of the insect during the time of the test. Therefore, it is recommended as a more efficient and economical substrate for the pathogenicity tests.

Key words: Mortality, Pathogenicity, Colombian Technical Standard ISO/IEC 17025, *Beauveria bassiana, Hypothenemus hampei*, Validation.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN 5
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 12
4. JUSTIFICACIÓN 13
5. OBJETIVOS 14
5.1 OBJETIVO GENERAL 14
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14
6. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA 15
6.1 NORMA INTERNACIONAL NTC-ISO/IEC 17025:2005 (REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN) 15
6.2 VALIDACIÓN 15
6.3 EL CULTIVO DE CAFÉ 15
6.4 BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei* (Ferrari) 16
6.4.1 Distribución de la broca 16
6.4.2 Duración del ciclo biológico 17
6.4.3 Dinámica de la Infestación de la broca 17
6.5 CONTROL BIOLÓGICO 18
6.6 HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* 18
6.6.1 *Beauveria bassiana* en el control de la broca 19
6.7 PATOGENICIDAD 19
6.7.1 Concepto de Patogenicidad 19
6.7.2 Prueba de patogenicidad. 19
6.8 PRUEBA ESTADÍSTICA “t-Student” 22
7. MATERIALES Y MÉTODOS 23
7.1 MATERIALES 23
7.2 MÉTODOS 24
7.1.1 Obtención de la Cepa de *Beauveria bassiana* (Bb9205) y pruebas microbiológicas. 24
7.1.1.1 Descripción de cada prueba microbiológica: 25
7.1.2 Obtención de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) y granos de Café pergamino seco 28
7.1.3 Procedimiento de la prueba de patogenicidad. 28

7.1.3.1 Diseño experimental para la validación de la prueba de patogenicidad. 29
7.1.4 Cumplimiento de requisitos generales para la validación del ensayo de la prueba de patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei.* 32
7.1.4.1 Plan de muestreo. 32
7.1.4.2 Mantenimiento y Calibración de equipos 32
7.1.4.3 Manuales de equipos. 32
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 34
8.1 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE CONCENTRACIÓN DE ESPORAS, GERMINACIÓN DE ESPORAS Y PRUEBA DE VIABILIDAD Y PUREZA MICROBIOLÓGICA DE LA CEPA *Beauveria bassiana* (Bb9205) 34
8.2. ESTANDARIZACIÓN DEL SUSTRATO CON EL CUAL SE REALIZA LA PRUEBA DE PATOGENICIDAD 35
8.3 PRUEBA DE PATOGENICIDAD 36
8.4 DETERMINAR EL PORCENTAJE Y EL TIEMPO PROMEDIO DE MORTALIDAD DEL HONGO *Beauveria bassiana* SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei* 38
9. CONCLUSIONES 40
10. RECOMENDACIONES 41
11. BIBLIOGRAFÍA 42
12. ANEXOS 45
12.1 CERTIFICADO DE LA CEPA DE *Beauveria bassiana* cepa (Bb 9205) 45
12.2 CALIBRACIÓN DE EQUIPOS 47
12.2.1 Calibración Balanza Analítica. 47
12.2.2 Calibración Cabina de Flujo Laminar Vertical. 48
12.2.3 Calibración Microscopio 49
12.2.4 Calibración Estereoscopio. 50
12.2.5 Calibración Termohigrógrafo 51
12.3 MANUALES DE LOS EQUIPOS REQUERIDOS PARA LOS MONTAJES 52
12.3.1 Manual Balanza. 52
12.3.2 Manual Cámara de Flujo Laminar 53
12.3.3 Manual Microscopio. 54
12.3.4 Manual Estereoscopio. 55
12.3.5 Manual Instrucciones Termohigrógrafo. 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de la estandarización del método y actualizaciones en el tiempo. 20
Tabla 2.Materiales utilizados en las pruebas realizadas para la validación. 23
Tabla 3. Resultados de las pruebas de calidad del hongo Beauveria bassiana (Bb9205). 34
Tabla 4. Promedio de supervivencia de las brocas del café en dos sustratos. 35
Tabla 5. Porcentaje de la desviación estándar para la prueba de supervivencia en dos sustratos.....36
Tabla 6. Porcentaje promedio de mortalidad de B. bassiana sobre H. hampei en cada una de las réplicas evaluadas. 37
Tabla 7. Tiempo promedio de mortalidad de H. hampei causado por el hongo B. bassiana a los 10 días de evaluación para cada replica. 38
Tabla 8. Tiempo de supervivencia de H. hampei a los 10 días de evaluación. 39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cepa de Beauveria bassiana (Bb 9205). Medio de cultivo PDA 25
Figura 2. Cámara de Neubauer utilizada en la prueba de concentración de esporas. 26
Figura 3. Prueba de germinación de esporas. A) Adición de las alícuotas que contienen las esporas del hongo B. bassiana. B) Adición de azul de lactofenol a cada alícuota.....27
Figura 4. Prueba de pureza microbiológica. 27
Figura 5. Broca de café y granos de café pergamino seco. 28
Figura 6. Proceso de infección del hongo Beauveria bassiana sobre Hypothenemus hampei. 30
Figura 7. Montaje de la prueba de B. bassiana sobre H. hampei. 31
Figura 8. Montaje completo de la prueba de patogenicidad del hongo Beauveria bassiana sobre Hypothenemus hampei. 32
Figura 9. Porcentaje de supervivencia de la broca en ambos sustratos del ensayo. 36
Figura 10. Porcentaje promedio de mortalidad de la prueba de patogenicidad de B. bassiana sobre H. hampei. 37
Figura 11. Promedio e intervalos de confianza para el tiempo de supervivencia de H. hampei a los 10 días de evaluación. 39

2. INTRODUCCIÓN

La broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari), es el principal problema entomológico que afecta la caficultura en muchos países del mundo, debido a que ataca los frutos directamente y reduce su valor comercial. Las condiciones climáticas de la zona cafetera en Colombia hacen que este problema sea aún mayor que en otras partes del mundo.

El control biológico con *Beauveria bassiana,* siendo un hongo entomopatógeno para el control de esta plaga es una excelente opción para su manejo. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin es un controlador natural de la broca que se encuentra infectando este insecto plaga en casi todas las regiones de Colombia y a su vez es una opción que favorece al medio ambiente.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar y validar la Prueba de Patogenicidad *in vitro* del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*. Esta validación sería la primera realizada en el Laboratorio Control de Bioinsumos y con ella se pretende dar mayor rigor a una de las pruebas de calidad más importantes del hongo *Beauveria Bassiana* sobre esta plaga, ya que determina si el insecto realmente muere a causa del hongo que se esté evaluando. Igualmente, se pretende aumentar la competencia en la realización de métodos desarrollados por el propio laboratorio bajo la norma 17025. Este laboratorio es referencia en control de calidad a nivel Nacional para la mayoría de empresas productoras de biológicos utilizados en la agricultura en Colombia.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

“Dentro del Sistema Integrado de Gestión (SIG) adoptado, se está implementando los referentes normativos aplicables a la misión y función que El Instituto Nacional de Metrología de Colombia dentro de su rol como pilar del Subsistema Nacional de Calidad (Infraestructura Nacional de la Calidad) y que conjugan las funciones descritas en el Decreto 4175 de 2011; en la cual estipula la Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025: 2005”. (Instituto Nacional de Metrología de Colombia. 2016)

“La Norma Icontec NTC-ISO/IEC 17025: 2005 establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos y/o calibraciones, incluido el muestreo. Cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio” (Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025: 2005, pág. 1).

Control de Bioinsumos es un laboratorio que certifica la calidad de productos biológicos utilizados para control de plagas en la Agricultura Colombiana y se encuentra desarrollando sus procesos bajo la Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025: 2005 para cumplir con sus requerimientos y acreditación. Para que esto se haga posible es necesario validar todos los procesos propios del laboratorio entre los cuales se encuentra la prueba de patogenicidad *in vitro* del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*. ¿Con la validación de la prueba de patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*, se puede dar garantía de la efectividad de un producto biológico a base de hongos? Para dar respuesta a este interrogante, se hace necesario validar esta prueba, igualmente este trabajo se podría tomar como referencia para los laboratorios de calidad en sus futuras validaciones.

Esta validación sería la primera realizada en el Laboratorio Control de Bioinsumos y con ella se pretende dar mayor rigor a la prueba de calidad más importante del hongo *Beauveria Bassiana* sobre esta plaga que es tan común en los cultivos de café en Colombia. Igualmente, aumentar la competencia en la realización de métodos desarrollados por el propio laboratorio bajo la norma 17025.

4. JUSTIFICACIÓN

El proyecto de investigación propuesto se realiza con el fin de hacer la Validación de la Prueba de Patogenicidad *in vitro* del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*. Esta validación favorece al Laboratorio Control de Bioinsumos ubicado en el Centro Nacional de Investigaciones de Café "CENICAFÉ", Disciplina de Entomología, Chinchiná, Caldas; en la ejecución de la Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025:2005, para cumplir con sus requerimientos y por medio de la validación brindar mayor seguridad en los procesos de calidad realizados a formulaciones comerciales de productos biológicos utilizados en el control de plagas de diferentes cultivos de la agricultura del país.

El laboratorio Control de Bioinsumos es certificador de la calidad de bioinsumos, por tanto, es responsable de brindar seguridad en los análisis a sus clientes con idoneidad y confiabilidad, lo que redunda en asegurar al consumidor final un producto de máxima eficacia cuando este cumple con los estándares de calidad.

Finalmente se está favoreciendo a un gran grupo de personas vinculadas directa e indirectamente con la agricultura biológica lo cual es muy positivo para el país ya que estamos con el propósito de reducir el uso de agroquímicos en la producción agrícola y por ende disminuir los daños causados por estos productos a la flora, fauna e incluso al mismo hombre.

Esta investigación no tiene impacto ambiental negativo ya que se trabaja con microorganismos benéficos para la agricultura y los medios que se utilizarán son fácilmente descartables en el medio ambiente. El tiempo estimado para empezar a ver los beneficios de esta validación será de 12 meses aproximadamente, y el aporte que puede brindar a otras investigaciones servirá para futuras validaciones de los procesos de laboratorios de calidad de bioinsumos agrícolas.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Validar la prueba de Patogenicidad *in vitro* del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar las pruebas microbiológicas de concentración de esporas, germinación de esporas y prueba de viabilidad y pureza microbiológica de la cepa *Beauveria bassiana* (Bb9205).
- Estandarizar el sustrato con el cual se realiza la prueba de patogenicidad.
- Realizar el montaje de la prueba de patogenicidad *in vitro* con 10 réplicas del tratamiento para comparar el porcentaje de mortalidad de cada una.
- Determinar el porcentaje y el tiempo promedio de mortalidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei.*

6. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

6.1 NORMA INTERNACIONAL NTC-ISO/IEC 17025:2005 (REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE LOS LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN)

La primera versión de esta norma fue publicada en 1999 y su revisión se realizó en Mayo de 2005. Algunos países o regiones la adoptaron con diferente nomenclatura (Instituto Nacional de Salud, 2013):

- NMX-EC-17025-IMNC-2006 (México).
- UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 (España).
- IRAM 301:2005 (Argentina).
- NTC-ISO/IEC 17025:2005 (Colombia).
- NCh-ISO 17025f2005 (Chile).

6.2 VALIDACIÓN

La Validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para su uso específico previsto. El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos desarrollados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto. (NTC-ISO/IEC 17025, 2005, Pág. 17).

6.3 EL CULTIVO DE CAFÉ

El café pertenece al género *coffea* con aproximadamente 100 especies. No obstante, únicamente 3 de estas se mencionan como cultivadas comercialmente, destacándose las 2 primeras según el siguiente orden: *Coffea arabica L., C. Canephora pierre exFroencher* y *coffea liberica exHierm*. (Mora, 2008).

El árbol de café es un arbusto de hoja perenne de las familias de las Rubiáceas, de hojas opuestas, de margen liso, flores de color blanco, estas flores crecen en grupos en las axilas de las hojas, son aromáticas. A partir de ellas se produce su fruto siendo drupas de color rojizo y de un tamaño similar a una cereza, el fruto es carnoso y en su interior contiene dos semillas cubiertas de una capa membranosa de textura acartonada siendo estas semillas las que se aprovechan comercialmente para la agroindustria (Botanical on-line, 2016).

El cultivo de café arábigo se originó en el país de Etiopia (Anthony *et al*. 1996), una evidencia que corrobora está hipótesis es que en las áreas montañosas de este país y áreas vecinas de Sudan actualmente el café arábigo crece en forma silvestre sobre los 1500 metros sobre el nivel del mar (León, 2000). Las primeras introducciones del café al continente americano se dieron a inicios del siglo XVIII. Desde Ámsterdam enviaron unas plantas a Guayana Holandesa (hoy Surinam) y de Paris a las islas de Martinica en las Antillas, de donde en 1719 el cultivo se extendió rápidamente hacia la Guayana Francesa, y luego en 1727 hacia Brasil (Chevalier y Dagron 1928, citado por Anthony *et al*., 1999).

En Colombia se puede decir que el establecimiento de la industria cafetera sucedió entre 1880 - 1910, teniendo tres zonas de asentamiento, primero en los Santanderes hacia 1880, luego en Cundinamarca - Tolima entre 1880 - 1910, y finalmente Antioquia y Caldas a finales del siglo XIX y primera década del presente. Sin embargo, a principios de siglo el peso de la producción provenía de oriente, la zona antioqueña apenas empezaba a dar los primeros pasos (Machado, 2001).

6.4 BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei* (Ferrari)

6.4.1 Distribución de la broca. La broca fue introducida al continente americano por Brasil en 1913. Se encuentra prácticamente en todos los países productores de café (Le Palley, 1968). Este insecto está distribuido en varios países dentro de los cuales se encuentran Colombia, Bolivia, Ecuador, Perú y Venezuela, los cuales hacen parte de Sur América y en Centro América se encuentra en los países de Costa Rica, Cuba, El Salvador, Guatemala, Honduras, Jamaica, México, Nicaragua y República Dominicana (Barrera, 2002., Pág. 18).

Originaria de África Ecuatorial, la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (*Coleóptera: Scolytidae*), fue reportada por primera vez en Colombia en el año de 1988 y se considera la principal plaga de la caficultura Colombiana (Benavides *et al*., 2012). “Es la mayor plaga del cultivo de café en Colombia y la plaga más limitante en la producción de café en el mundo, es una especie monófaga, que se alimenta exclusivamente de la almendra del café, pertenece a la familia

Coleóptera, es un insecto negro, muy pequeño; mide 1.5 mm de longitud, todos sus estados se desarrollan dentro de la almendra del café. El macho dura entre 50 y 75 días, mientras que la hembra puede sobrevivir de 100 a 150 días. La hembra entra en la cereza por medio de un orificio que ella perfora en lo que se conoce como el ombligo del fruto de café, hace túneles y deposita huevos de dos a tres por día de un total de 25 días aproximadamente (Bustillo, 2008). El período crítico para la proliferación de esta plaga es cuando aumentan las lluvias y la humedad relativa es más alta, igualmente por el estado fisiológico del fruto, es decir cuando los frutos de café alcanzan un 20% de peso en materia seca o 120 días de desarrollo". (FNC, Cenicafé, 2013., Tomo II, pág. 216)

El uso de hongos entomopatógenos para el control de la broca, en particular *Beauveria bassiana*, ha tenido más desarrollo que el de otras alternativas biológicas de control. Su éxito ha radicado en su relativa facilidad de propagación, formulación y aplicación, así como en lograr importantes porcentajes de mortalidad en campo en tiempos relativamente cortos. (Barrera, 2002, pág. 19)

La Broca del café es considerada como la plaga más importante de este cultivo. Es una "plaga directa" pues daña directamente el producto que se desea cosechar, es decir, el grano. Su ataque reduce el rendimiento y merma la calidad del grano. Los daños más característicos son: pudrición de granos en formación por efecto de microorganismos saprófitos que entran por la perforación; caída de frutos jóvenes por efecto del ataque; disminución de peso del grano por efecto de la alimentación del insecto. Con 100% de frutos perforados al momento de la cosecha, la broca puede causar de 30 a 35% de pérdidas en el rendimiento. Si la cosecha se efectúa muy tardíamente, las pérdidas pueden ser aún mayores. Todas las variedades y especies comerciales de café son atacadas por este insecto; aparentemente, presenta cierta preferencia por el café robusta y su multiplicación también es más alta en los granos de esta especie de café. (Vega & Mercadier, 1998, pág. 543-544).

6.4.2 Duración del ciclo biológico. A una temperatura base de 21°C la incubación del huevo dura 9 días, la larva 19 días, la pupa 11 días y la melanización del adulto 7 días, el ciclo de vida desde huevo hasta adulto dura en total 45 días aproximadamente (Ruiz, 1996).

6.4.3 Dinámica de la Infestación de la broca. La dinámica de infestación de la broca está influenciada por los factores climáticos como la precipitación y la humedad relativa y el estado fisiológico de los frutos del café, siendo el período crítico para el café cuando los frutos han alcanzado un 20% de peso en materia seca, es decir, cuando han alcanzado 120 días (Ruiz,1996), en los frutos sobre maduros y secos que quedan en el árbol y en el suelo después de la cosecha se puede albergar desde 10 hasta 150 adultos que se reproducen en la almendra hasta que las condiciones ambientales les sea favorables para volar. Cuando comienza el periodo de lluvias, los adultos emergen de las cerezas infestadas y

colonizan nuevos frutos en el árbol. Este vuelo de brocas se incrementa considerablemente después de periodos prolongados de déficit hídrico ocasionados por los eventos climáticos del niño, dado que la reproducción se favorece (FNC, 2013).

6.5 CONTROL BIOLÓGICO

"Los primeros microorganismos que se identificaron como causantes de enfermedades en insectos fueron los hongos, debido a que era posible observar su crecimiento sobre el cuerpo de estos. Los hongos patógenos de insectos, conocidos como hongos entomopatógenos, penetran, invaden y se multiplican dentro de los insectos. En el grupo de los patógenos de insectos, una característica particular de los hongos es que no requieren ser ingeridos por los insectos para causar la enfermedad, ya que pueden penetrar a través de su cutícula. Su crecimiento y desarrollo está limitado principalmente por las condiciones medioambientales adversas, especialmente la radiación solar, la baja humedad y las altas temperaturas. Las unidades de reproducción de los hongos son llamadas esporas o conidias, que usualmente infectan a los insectos. El proceso de infección se puede dividir en 3 etapas: 1. Adhesión de las esporas a la cutícula del insecto y germinación, 2. Penetración de la cutícula del insecto, 3. Desarrollo del hongo en el interior del insecto, que generalmente termina en la muerte de este" (Tanada y Kaya, 1993).

6.6 HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana*

Góngora (Como citó a Vélez y Benavides, 1990). "*Beauveria bassiana* es la especie de entomopatógeno comercialmente más utilizada alrededor del mundo, contra un gran número de insectos plaga. En Colombia, este hongo se registró atacando la broca del café, tan pronto como ésta hizo su aparición en el sur del país" [1].*Beauveria bassiana* es un controlador natural de esta plaga del café, se encuentra infectando el insecto prácticamente en todos los países donde se ha dispersado (Góngora, 2013).

"La tasa de crecimiento de *Beauveria bassiana* es moderadamente rápida, las colonias pueden alcanzar un diámetro de 3 cm después de un tiempo de incubación de 7 días a 27°C en Agar de Glucosa de Papa. El ataque de los insectos inicia solo por contacto infectándolo de adentro hacia afuera con esporas que al germinar liberan enzimas que atacan y disuelven la cutícula del insecto al igual que la producción de *bauvericina* que es una toxina que debilita el sistema inmune del huésped (Herrington, 2006).

6.6.1 *Beauveria bassiana* en el control de la broca. El hongo *Beauveria bassiana* se encuentra naturalmente infectando la broca en casi todas las regiones en donde este insecto aparece. CENICAFÉ posee 102 aislamientos procedentes de diferentes países y colectados localmente, de los cuales aproximadamente la mitad han mostrado actividad contra broca (Posada y Bustillo, 1994). Con el fin de masificar el uso de este hongo la investigación inicial se centró en procesos de producción artesanal (Marín y Bustillo 2002, Antia *et al*. 1992) e industrial (Morales *et al.* 1991). Esto permitió adelantar evaluaciones sobre su eficacia en los cafetales y tener inoculo del hongo disponible para que el agricultor pudiera producirlo en su finca. Además financiado por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, se pudo llevar a cabo un programa nacional de introducción del hongo en toda la zona cafetera infestada por la broca. La tecnología generada a nivel industrial se ha transferido a productores particulares para que se encarguen de la producción del hongo. En la actualidad existen varios laboratorios comerciales con licencia del Instituto Colombiano Agropecuario "ICA", que suministran hongo formulado para el control de la broca (Bustillo, 2006). El hongo *Beauveria bassiana* es usado para el control de un gran número de insectos plaga y es la especie de entomopatógeno comercialmente más utilizado alrededor del mundo (Góngora *et al.*, 2009).

6.7 PATOGENICIDAD

6.7.1 Concepto de Patogenicidad. El establecimiento definitivo del concepto de patogenicidad se debió principalmente a Anton De Bary, Médico Alemán dedicado al estudio de los hongos. De Bary, considerado el padre de la fitopatología demostrando a través de sus estudios que las esporas de los hongos son el medio de diseminación y reproducción de los mismos que al establecerse en los tejidos sanos causan enfermedades, creciendo como plantas distintas dentro del tejido de la planta hospedante. A esta teoría se llamó "Teoría de los Gérmenes" y fue demostrada al mismo tiempo en relación a los animales por Robert Koch, con el bacilo del antrax (González, 1981). Por tanto patogenicidad se refiere a la capacidad o incapacidad de un microorganismo para producir una enfermedad sobre un huésped (Universidad pública de Navarra, 2005)

6.7.2 Prueba de patogenicidad. Esta es la prueba más importante en el análisis de calidad de una formulación de hongos entomopatógenos, ya que determina si el patógeno realmente ataca la plaga para la cual está recomendada. Sin embargo, no asegura que bajo condiciones de campo su eficacia va a ser igual a la registrada en laboratorio. Requiere asegurar que los insectos permanezcan vivos en el tratamiento testigo durante la prueba.

Las pruebas de patogenicidad se diseñan para proporcionar condiciones ideales en el momento de la exposición al patógeno, para que ocurra la germinación e invasión del hospedante y en la conidiogénesis, para favorecer la esporulación del hongo sobre el insecto y poder confirmar que la mortalidad se debió al tratamiento con el hongo (CENICAFE, 1997, Pág. 17, Marín y Bustillo, 2002).

A continuación se describen los procedimientos que se han realizado con la prueba de patogenicidad desde el año 1993 hasta el 2017,a partir de los cuales se realizará una actualización de uno de los pasos de la prueba, con el fin de estandarizar la metodología de forma que con esta se continúe el proceso de validación.

Tabla 1. Información de la estandarización del método y actualizaciones en el tiempo.

Factores de evaluación	**González G., M. T.; Posada F., F. J.; Bustillo P., A. E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei.* CENICAFÉ: 44(3): 93-102 (1993).**	**CENICAFÉ, Boletín Técnico No. 17. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de los hongos entomopatógenos.**
	Diseño experimental: Evaluación de tres tratamientos: el primero con el aislamiento Bb 9205 aislado directamente de *D. saccharalis* denominados 9205DS, segundo tratamiento fue la misma cepa pasada por broca que se denominará Bb-9205 BFC y el tercero el testigo. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y se emplearon 30 insectos por repetición.	**Diseño experimental :** Se toman 40 brocas al azar, distribuidas en 4 repeticiones cada una con 10 individuos. Para cada evaluación se utiliza un testigo compuesto de adultos de broca que no entran en contacto con el hongo.
1.1 Concentración de esporas	1×10^7	1×10^7
1.2 Germinación de esporas	>80% en SDA acidificado e incubado a 25 ± 1°C	>85% AGAR en un tiempo de incubación de 24 horas
1.3 Prueba de pureza	No se evaluó este ítem.	> 90% en formulaciones comerciales
PASO 1	Los insectos se desinfectan por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante 10 minutos y tres enjuagues con Agua Destilada Estéril (ADE). Se sumergieron los individuos por dos minutos en agua destilada estéril. Se seleccionaron las brocas más activas, completamente sanas, negras o melanizadas y de una edad inferior a ocho días en promedio para garantizar la homogeneidad del material biológico utilizado en el experimento	Los insectos se desinfectan en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% durante 10 minutos y se lavan en Agua Destilada Estéril (ADE) usando mallas de tul esterilizadas que sirven de colador. De estas brocas se seleccionan las que tengan mayor actividad.

PASO 2	La inoculación de las brocas de cada tratamiento se hizo sumergiéndolas durante 2 minutos. Cumplido el tiempo de exposición se retiró el exceso de inóculo de las brocas invirtiendo la caja de Petri sobre una toalla de papel seca.	Las brocas se sumergen en una suspensión de esporas del hongo ($1x10^7$ e/ml) durante 2 minutos y se mantiene en agitación manual. Luego estas brocas se pasan a una caja Petri que contiene papel toalla esterilizado.
PASO 3	Con la ayuda de un pincel, se colocaron los insectos individualmente en los frascos. Las brocas del testigo solo se trataron con agua destilada estéril durante 2 minutos y se dispusieron en forma individual dentro de frascos de vidrio transparente de 2 cm de diámetro y 4 cm de altura que tenía un disco de papel filtro húmedo. Estos se taparon con una mota de algodón bien ajustada para impedir la salida de las brocas y mantener las condiciones de humedad. El proceso es igual para los tratamientos que llevan inoculado el hongo. Las repeticiones de todos los tratamientos se confinaron en cajas galleteras con una gota de algodón húmedo, buscando mantener una atmosfera saturada de humedad propicia para desencadenar el procesó de la patogénesis	Se coloca un broca por vial de vidrio con un disco de papel toalla previamente humedecido con ADE y se tapa con una mota de algodón esterilizada bien ajustada al vial.
PASO 4	Al cabo de 24 horas se adicionó a cada uno de los frascos un grano de café pergamino seco de agua de 45 % de humedad previamente tratado con tiabendazol y recubierto con cera natural.	Al cabo de 24 horas se adiciona como sustrato a cada vial, un grano de café pergamino seco de 45% de humedad, es decir sin ningún proceso de secado mecánico
PASO 5	La mortalidad de las brocas se evaluó diariamente durante 10 días después de la inoculación	Diariamente y durante diez días se evalúa la mortalidad causada por el hongo en estudio observando al estereoscopio los síntomas y signos de la enfermedad en las brocas.
PASO 6	Para mantener la humedad (>90% HR) en cada uno de los frascos, diariamente se adicionaron 0,2 ml de ADE con una jeringa manteniendo las condiciones naturales de luz a temperatura de 25 ± 1°C	Diariamente se adiciona agua destilada estéril con una jeringa, hasta humedecer el disco de papel sin que quede agua libre.
PASO 7	Con los datos obtenidos se estimó el porcentaje de mortalidad, la distribución de la mortalidad diaria, el tiempo en el cual el 50% de la población muere en la concentración evaluada (TL_{50}) y las etapas del desarrollo del hongo sobre la broca muerta.	Con el registro diario de patogenicidad se establece el ciclo de desarrollo del hongo sobre la broca, el porcentaje de mortalidad y el promedio de tiempo de mortalidad.

RESULTADOS	Porcentaje de mortalidad Bb 9205 BFC: 100% Mortalidad diaria: Antes de las 12 horas de inoculación. Mayor porcentaje a las 56.66% a las 60 horas. La etapas del desarrollo del hongo sobre la broca: Se identificaron 5 etapas: 1. Inoculación a muerte. 2. Muerte a inicio de micelio. 3. Muerte a cubrimiento de micelio. 4. Muerte a conidiogénesis. 5. Muerte a liberación de conidias.	El ciclo de desarrollo del hongo sobre la broca: 1. Muerte del insecto. 2. Inicio del micelio. 3. Cubrimiento del micelio. 4. Formación de esporas. 5. Esporulación. El porcentaje de mortalidad es de: 95 ± 5,7. Promedio de tiempo de mortalidad: 3,6 ± 1,8 días.

6.8 PRUEBA ESTADÍSTICA “t-Student”

Es una prueba estadística para evaluar si dos grupos difieren entre sí de manera significativa respecto a sus medias, se simboliza en estadística con la letra “**t**”, y parte de la hipótesis de diferencia entre dos grupos. La hipótesis de investigación propone que los grupos difieren significativamente entre sí y la hipótesis nula propone que los grupos no difieren significativamente (Gómez, 2006). Supongamos que se dispone de una muestra de una población y que en cada individuo de la muestra se mide la variable X, que se ajusta a una distribución normal. La prueba “**t-student**” se utiliza para contrastar la hipótesis nula de la que la muestra procede de una población en la que la media de X es igual a una determinada constante m. La prueba “**t-student**” para una muestra consiste en comparar teniendo en cuenta la dispersión de los datos, la media observada en la muestra con la esperada bajo la hipótesis nula. Si el p-valor asociado al estadístico de contraste es mayor que **α** se asumirá la hipótesis nula, lo que significará que la muestra pertenece a la población.

En el caso de la prueba “**t-student**” para dos muestras relacionadas se efectúa para contrastar la hipótesis nula de no-existencia de diferencias significativas entre las medias de dos variables (X e Y) Con distribución normal, medidas en los mismos sujetos, o bien la no-existencia de diferencias significativas entre la medida de una misma variable medida en los mismos sujetos en situaciones diferentes (por ejemplo, antes y después de un tratamiento). La aplicación de la prueba exige el mismo número de sujetos en ambas situaciones. Si el p-valor asociado al estadístico de contraste es mayor que **α**, se aceptara la hipótesis nula. Por el contrario si el p-valor es menor que **α** se aceptara la hipótesis alternativa de diferencias significativas entre las medias de ambas variables, al nivel de significación **α** (Tomás-Sábado, 2009).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIALES

Tabla 2.Materiales utilizados en las pruebas realizadas para la validación.

Materiales	Cantidad
Cepa *Beauveria bassiana*(Bb 9205)	1
Brocas del café	2200
Granos de Café pergamino seco	40
Cámara de flujo laminar	1
Cajas galleteras	44
Frascos de antibiótico	880
Algodón	1 bolsa
Dispensadores de agua destilada estéril	2
Cuarto de Incubación	1
Tubos de ensayo	20
Cajas Petri	20
Tween 80	10 ml
Medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar)	200 ml
Medio de Cultivo Agar – Agar	50 ml
Pinceles	40
Jeringas de 10 ml	40
Guantes	1 caja
Tapabocas	1 caja
Batas de laboratorio	4
Zapatos de laboratorio	2 pares
Gorro de laboratorio	4
Balanza analítica	1
Toallas ecológicas estériles blancas	3 paquetes
Micropipeta de 1 ml	1
Micropipeta de 10µl	1
Puntas para micropipeta	1
Determinador de pH	1
Determinador de humedad	1
Rastrillos bacteriológicos	10
Papel osmótico (Cristaflex)	1 caja
Timer	1
Vortex	1
Incubadora	1
Alcohol de 70 y 90 grados	1 litro de cada uno
Mecheros	4
Microscopio	1
Estereoscopio	1
Marcadores para vidrio	2
Muselinas	2
Hipoclorito de sodio	1 litro
Beacker de 200 ml	5

7.2 MÉTODOS

La metodología consta de 4 pasos, en los cuales se realiza el ensayo para proceder a la validación de la prueba de patogenicidad *in vitro* del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei.*

Los puntos para la validación del método son:

- 7.1.1 Obtención de la cepa de *Beauveria bassiana (Bb 9205*) y pruebas microbiológicas.
- 7.1.2 Obtención de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) y granos de Café pergamino seco.
- 7.1.3 Procedimiento de la prueba de patogenicidad para validar el método.
- 7.1.4 Cumplimiento de requisitos generales para la validación del ensayo de la prueba de patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari).
    - Plan de muestreo.
    - Calibración de equipos.
    - Plan de mantenimiento de equipos.

A continuación se describe cada punto para la validación del método:

7.1.1 Obtención de la Cepa de *Beauveria bassiana* (Bb9205) y pruebas microbiológicas.

Esta cepa la proporciona el laboratorio Control de Bioinsumos con su respectiva certificación. La cepa corresponde al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* aislamiento Bb9205 (Anexo 1).

A la cepa de *Beauveria bassiana* se le realizan las pruebas de calidad microbiológicas de concentración de esporas, germinación de esporas y prueba de viabilidad y pureza microbiológica, para garantizar que el hongo cumple con las condiciones óptimas de calidad necesarias para el montaje.

En la Figura 1 se observa la cepa del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* aislamiento Bb 9205.

Figura 1. Cepa de Beauveria bassiana (Bb 9205). Medio de cultivo PDA

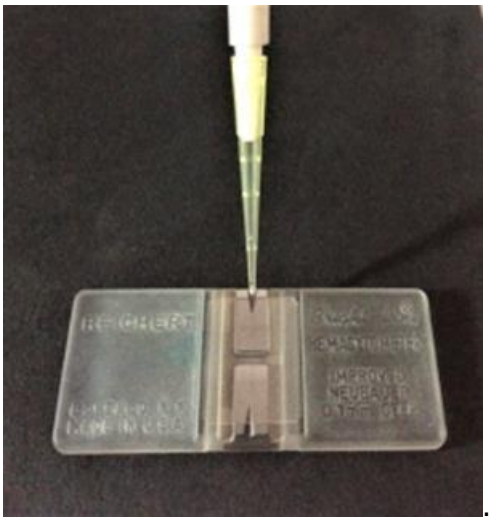
Para la realización de estas 3 pruebas se utilizaron los procedimientos descritos en el Boletín Técnico Nº 17. CENICAFÉ. 1997.

7.1.1.1 Descripción de cada prueba microbiológica:

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

Procedimiento: Se toma un cultivo del hongo *Beauveria bassiana* de 25 días de desarrollo en sustrato de arroz. De allí se extrae 1g y se lleva a 10 ml de una preparación de agua más tween 80 al 0,1 %, de esta forma se obtiene la suspensión madre, después se homogeniza la muestra con la ayuda de un Vortex por un minuto. De esta suspensión se toma 1 ml y se deposita en un tubo con 9 ml de ADE (agua destilada estéril), así se obtiene la dilución 10^{-1}, y así sucesivamente hasta obtener una dilución 10^{-4} o la dilución apropiada que permita el conteo para estimar el número de esporas por ml. Luego con la ayuda de una cámara de Neubauer se procede a realizar el conteo (Figura 2).

Figura 2. Cámara de Neubauer utilizada en la prueba de concentración de esporas.

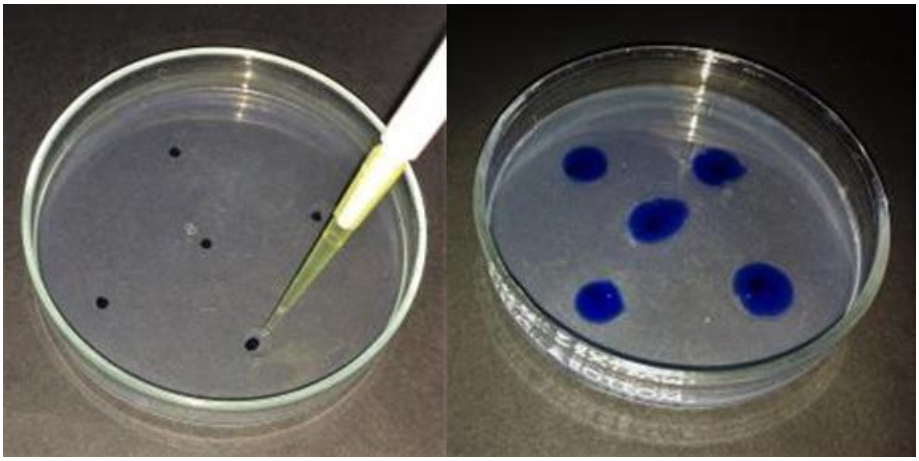


Prueba de germinación de esporas: Esta prueba establece el porcentaje de germinación de las esporas del hongo en un tiempo determinado.

Procedimiento: se prepara de 10 a 15 ml de agar agua al 1.5% sin acidificar en cajas Petri. Se marcan 5 puntos en la superficie externa inferior de la caja, correspondientes a los puntos en los cuales se depositan las alícuotas que contienen las esporas (Figura 3). De la dilución 10^{-3} preparada en la prueba de concentración y previamente agitada, se toman 10 microlitros y se depositan en cada uno de los puntos marcados en la caja Petri y se incuban a 25 ± 2 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se agrega una gota de azul de lactofenol a cada alícuota con el propósito de detener la germinación y a la vez teñir las esporas del hongo; luego se cortan las alícuotas depositándolas sobre una lámina portaobjetos y se cubren con una laminilla.

La observación se hace por medio del microscopio con el objetivo 40x contando un mínimo de 100 esporas por alícuota. Se registran las esporas germinadas y no germinadas. Con los datos obtenidos se calcula el porcentaje de germinación (CENICAFÉ, 1997, Pág. 12-13).

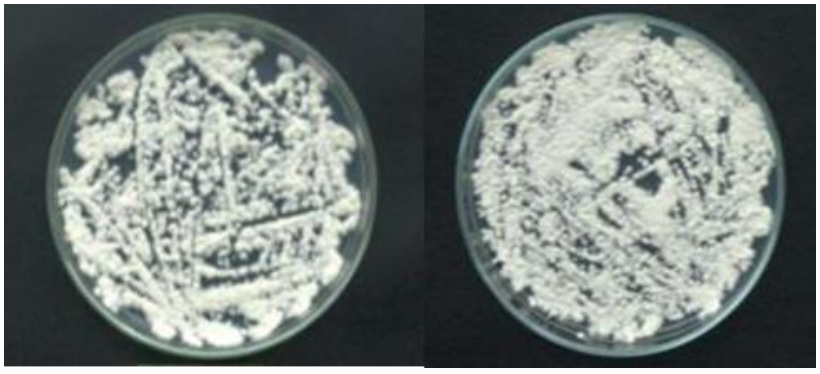
Figura 3. Prueba de germinación de esporas. A) Adición de las alícuotas que contienen las esporas del hongo *B. bassiana*. B) Adición de azul de lactofenol a cada alícuota.



Prueba de viabilidad y pureza microbiológica: Tiene como finalidad establecer la proporción del agente biológico en la formulación e identificar los microorganismos contaminantes, contribuyendo a mejorar el proceso de producción y formulación de los entomopatógenos.

Procedimiento: Se toman los tubos de la dilución 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} y de cada uno se depositan 100 microlitros en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) más ácido láctico al 0,1%, por duplicado, y se llevan a incubación a una temperatura de 25 ± 2 °C para promover el desarrollo de unidades formadoras de colonia (UFC). Diariamente y durante 7 días se contabiliza el número de UFC en cada una de las cajas. Al final de las lecturas se identifican los microorganismos presentes y se anota el número de UFC del entomopatógeno en estudio y otros hongos, bacterias o levaduras contaminantes encontradas y a partir de estas lecturas se determinan el porcentaje de pureza (CENICAFÉ, 1997,Pág. 7-19). (Figura 4).

Figura 4. Prueba de pureza microbiológica.



7.1.2 Obtención de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) y granos de Café pergamino seco.

Las brocas del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) y los granos de café pergamino seco con 45% de humedad, se obtienen de la unidad de cría de broca de CENICAFÉ Planalto, las brocas se proporcionan de una cría en la que se utiliza café cereza infestado bajo una temperatura de 25± 1°C y una humedad relativa del 75%. De las brocas recibidas se seleccionan las hembras y machos más activos eligiendo las brocas que vuelan (Figura 5). Estas brocas son entregadas por el líder de la Disciplina de Entomología, Doctor Pablo Benavides Machado. Ph.D.

Figura 5. Broca de café y granos de café pergamino seco.

7.1.3 Procedimiento de la prueba de patogenicidad.

Esta es la prueba más importante en el análisis de calidad de una formulación, ya que determina si el patógeno realmente ataca la plaga para la cual está recomendado. Sin embargo, no asegura que bajo condiciones de campo su eficacia va a ser igual a la registrada en laboratorio. Requiere asegurar que los insectos permanezcan vivos en el tratamiento testigo durante la prueba. Las pruebas se diseñan para proporcionar condiciones ideales en el momento de la exposición al patógeno, para que ocurra la germinación e invasión del hospedante y en la conidiogénesis, para favorecer la esporulación del hongo sobre el insecto muerto y poder confirmar que la mortalidad se debió al tratamiento con el hongo (CENICAFÉ, 1997, Pág. 17).

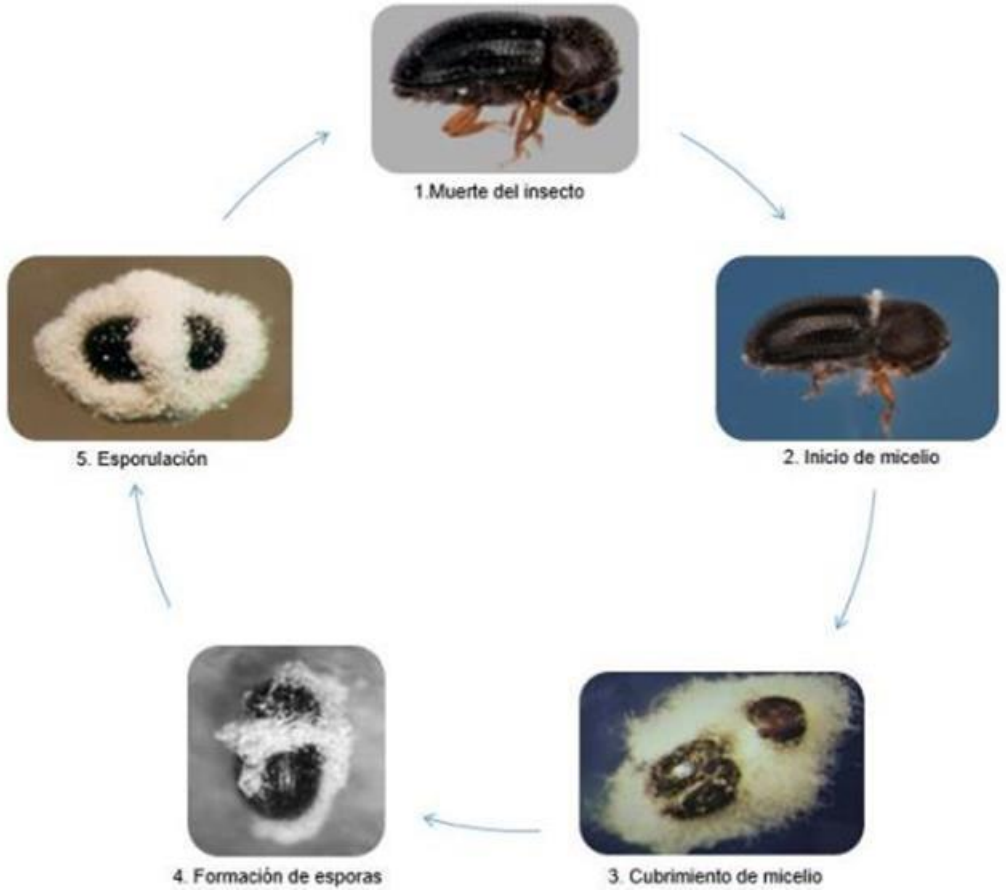
En la metodología de la prueba de patogenicidad propuesta por González *et al.* (1993), se adiciona al cabo de 24 horas un grano de café pergamino seco (humedad del 45%) como sustrato a cada vial, con el fin de asegurar la sobrevivencia de los insectos por el tiempo de duración del bioensayo. En la actualidad este proceso no se utiliza por la poca practicidad y aumento de costos en la consecución de granos de café pergamino certificados y los largos tiempos de evaluación, por consiguiente se hace necesario realizar un ensayo alterno

donde se demuestre la hipótesis actual de que no se requiere el grano de café como sustrato para la supervivencia de la broca y que con un disco de papel toalla esterilizado dentro del vial humedecido es suficiente para que la broca sobreviva durante el tiempo de evaluación de esta prueba.

En el ensayo de patogenicidad se evalúa la supervivencia de las brocas por medio del testigo y la mortalidad de las brocas a causa de la patogenicidad del hongo en el tratamiento establecido. Esta mortalidad debe de estar por encima del 80% en 10 días de evaluación como lo describe el Boletín Técnico Nº 17. “Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos” CENICAFÉ. 1997.

7.1.3.1 Diseño experimental para la validación de la prueba de patogenicidad. El diseño experimental para la validación del método de la prueba de patogenicidad de la cepa de hongo *Beauveria bassian*a aislamiento Bb9205 consta de un diseño completamente al azar con un tratamiento y un testigo. El tratamiento está constituido por 4 unidades experimentales, cada unidad experimental está compuesta por 10 viales cada uno con una broca de café. Cada tratamiento es replicado 10 veces para determinar la consistencia o variabilidad de la prueba de patogenicidad. Para cada evaluación se utiliza un testigo compuesto de adultos de broca que no entran en contacto con el hongo y su montaje es exactamente igual al tratamiento.
La concentración de inóculo empleado para cada uno de los tratamientos es de $1x10^7$ e/ml (esporas por mililitro) suspendidas en agua + tween 80 al 0,1%. Las brocas se sumergen en la suspensión de esporas del hongo durante 2 minutos, la cual se mantiene en agitación manual. Luego estas brocas se pasan a una caja Petri con papel toalla esterilizada. Una vez las brocas están activas, se coloca una broca por vial de vidrio (frasco de antibiótico), con un disco de papel toalla previamente esterilizado y humedecido con ADE y se tapa con una mota de algodón esterilizado bien ajustada a la boca del vial. Estas réplicas se llevan a un cuarto de incubación a 25±2 °C (CENICAFÉ, 1997).
Diariamente y durante 10 días se evalúa la mortalidad causada por el hongo en estudio, observando al estereoscopio los síntomas y signos de la enfermedad en las brocas. El ciclo de la enfermedad sobre el insecto consta de las siguientes 5 etapas: 1. Muerte del insecto. 2. Inicio del micelio. 3. Cubrimiento del micelio. 4. Formación de esporas. 5. Esporulación (CENICAFÉ, 1997). Las cuales son observadas durante el proceso de evaluación (Figura 6).

Figura 6. Proceso de infección del hongo Beauveria bassiana sobre Hypothenemus hampei.



Fuente: CENICAFÉ, 1997.

Las brocas vivas o muertas deben permanecer en los viales para que no se interrumpa el desarrollo normal del hongo en el insecto (González *et al.*, 1993). También diariamente se adiciona agua destilada estéril con una jeringa, hasta humedecer el disco de papel sin que quede inundado el disco ni las paredes del frasco. La humedad puede ser considerada el factor más importante en el desarrollo de una micosis en las etapas de germinación de las esporas y conidiogénesis.

Con el registro diario de patogenicidad se establece el ciclo de desarrollo del hongo sobre la broca, el porcentaje y el tiempo promedio de mortalidad, que constituyen otros criterios importantes en la calidad biológica del hongo en estudio (CENICAFÉ, 1997).

Para esta validación se realiza un ensayo que evalúa la supervivencia de la broca del café en dos tipos de sustrato: discos de papel toalla esterilizados y café pergamino seco más discos de papel toalla esterilizados, con el fin de determinar el tiempo de supervivencia de la broca para ambos sustratos, que debe ser superior a 10 días, tiempo en el que se evalúa la prueba de patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hyphotenemus hampei* (Figura 7).

Figura 7. Montaje de la prueba *de B. bassiana* sobre *H. hampei.*

El diseño experimental empleado, fue el de completamente al Azar con dos tratamientos y cuatro repeticiones de 10 brocas cada una, como se describe a continuación:

- Tratamiento 1: 40 brocas distribuidas en 4 Unidades Experimentales (UE), cada UE con 10 viales de antibiótico, cada vial conteniendo 1 disco de papel toalla esterilizado.

- Tratamiento 2: 40 brocas distribuidas en 4 Unidades Experimentales (UE), cada UE con 10 viales de antibiótico, cada vial conteniendo un grano de café pergamino seco más un disco de papel toalla esterilizado.

Con los resultados obtenidos se inicia el proceso de validación de la Prueba de Patogenicidad *in vitro* del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Figura 8).

Figura 8. Montaje completo de la prueba de patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei.*

7.1.4 Cumplimiento de requisitos generales para la validación del ensayo de la prueba de patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei.*

7.1.4.1 Plan de muestreo.

- La Cepa de *Beauveria bassiana* Bb9205 se obtiene del cepario de hongos del laboratorio Control de Bioinsumos.
- Las brocas y los granos de café se obtienen del Centro Nacional de Investigaciones de Café “CENICAFÉ”.

7.1.4.2 Mantenimiento y Calibración de equipos.Todos los implementos y equipos que se utilizaron para este ensayo son del laboratorio Control de Bioinsumos y/o CENICAFÉ, estos mantenimientos y calibraciones son realizadas por empresas externas, los formatos se encuentran en los anexos y fueron proporcionados por estas entidades (Anexo 2).

7.1.4.3 Manuales de equipos.

- Balanza
- Cámara de flujo laminar
- Estereoscopio
- Microscopio
- Termohigrógrafo

El laboratorio cuenta con los manuales de los equipos requeridos para los montajes. (Anexo 3).

SOFTWARE VALIDADO. El análisis estadístico se realizó a través de la Prueba t student 5% realizado mediante una hoja de cálculo de Excel.

El Computador utilizado para manejo de la información de la validación tiene usuario y clave de ingreso a la cual solo tienen acceso las personas involucradas con los procesos, como el personal de confianza del laboratorio y los encargados de la validación, este computador se encuentra ubicado en el laboratorio Control de Bioinsumos.

Computador: COMPAQpresario CQ40
S/N: CND9084N2H
P/N: NN793LA#ABM
Servicetag: Hp

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE CONCENTRACIÓN DE ESPORAS, GERMINACIÓN DE ESPORAS Y PRUEBA DE VIABILIDAD Y PUREZA MICROBIOLÓGICA DE LA CEPA *Beauveria bassiana* (Bb9205)

Los resultados obtenidos en las pruebas de calidad de concentración de esporas, germinación de esporas y la prueba de viabilidad y pureza microbiológica de la cepa de *Beauveria bassiana* (Bb 9205) utilizada para la validación de la prueba de patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei* se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de las pruebas de calidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bb9205).

Microorganismo	Concentración de esporas esp/g	Germinación de esporas %	Viabilidad y Pureza UFC/g	Humedad %	pH Grado de acidez	Patogenicidad %	Observaciones
Beauveria bassiana **Bb9205**	$1x10^{10}$ ± $0,1x10^{10}$	99,99 ± 1,6	Viabilidad: $1x10^{10}$ Pureza: 100%	36,17	6,5	100	La cepa fue reactivada sobre broca.

En el Boletín Técnico No. 17. CENICAFÉ, se define que una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas. Lo anterior, debido a que al asperjar el hongo en el campo debe tener un rápido efecto sobre la población del insecto que está atacando y un corto periodo de exposición a condiciones naturales adversas.

En la prueba de viabilidad y pureza microbiológica la proporción del agente biológico debe tener un porcentaje mínimo del 90% de pureza y se debe identificar los organismos contaminantes, que no deben ser patógenos, para garantizar mejoras en el proceso de producción y formulación.

Las pruebas de patogenicidad de los productos comerciales deben causar mortalidades superiores al 80%, para garantizar que el hongo entomopatógeno es el causante dela mortalidad del insecto plaga (CENICAFÈ, 1997).

En la tabla 3, se observa que los parámetros del control de calidad de la cepa Bb9205 cumplieron con los valores establecidos y comparando con lo registrado en el Boletín Técnico No. 17, se muestra que las pruebas microbiológicas

presentaron resultados por encima de los indicadores, con lo cual se puede asegurar que la cepa del hongo *B. bassiana* con la que se trabajó estaba en excelentes condiciones de calidad, garantizando que cumplía con los requerimientos necesarios para el montaje de la prueba de patogenicidad sobre *H. hampei*.

8.2. ESTANDARIZACIÓN DEL SUSTRATO CON EL CUAL SE REALIZA LA PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Ensayo 1. Resultados de comparación de sustratos.

Con los resultados de la comparación de sustratos (Tablas 4 y 5, y Figura 9) se realizó un análisis estadístico de prueba t- Student. No se evidenciaron diferencias estadísticas significativas en los tratamientos T1 (discos de papel toalla esterilizados) y T2 (grano de café pergamino seco más discos de papel toalla esterilizados); no obstante, se observó que el promedio de supervivencia de T1 superó el promedio de supervivencia del T2, lo cual indica que el T1 puede ser utilizado como sustituto del café pergamino seco ya que permite la supervivencia de los insectos durante el tiempo de evaluación de la prueba de patogenicidad. Teniendo en cuenta este resultado se seleccionó el papel toalla como sustrato para las pruebas de patogenicidad con las cuales se realizó la validación. En conversaciones con la Doctora Patricia Marín, directora del laboratorio Control de Bioinsumos se puede asumir que la sobrevivencia de las brocas bajo las condiciones del tratamiento 1 se deben a que estas se pueden alimentar de la celulosa con la que está fabricado el papel, generándole las condiciones necesarias para que las brocas se alimenten durante el tiempo de evaluación.

Tabla 4. Promedio de supervivencia de las brocas del café en dos sustratos.

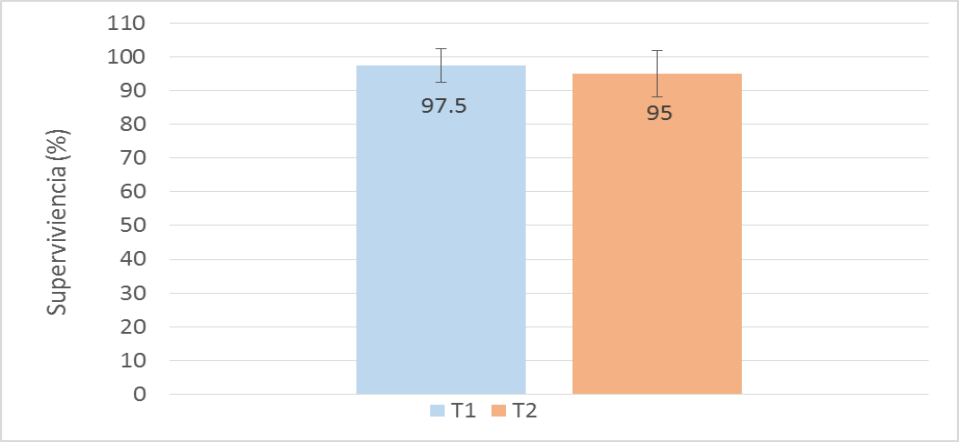
Tratamiento	**% SUPERVIVENCIA (Promedio)**
T1. Discos de Papel Toalla esterilizados	97.5
T2. Café pergamino seco más discos de Papel Toalla esterilizados	95

Tabla 5. Análisis de varianza para la prueba de supervivencia de la broca del café en dos sustratos.

Etiquetas de fila	DS dé % SUPERV	Intervalo (95%)
T1	15.8113883	4.89990996
T2	22.07214279	6.84010223

DS: Desviación Estándar.

Figura 9. Porcentaje de supervivencia de la broca en ambos sustratos del ensayo.

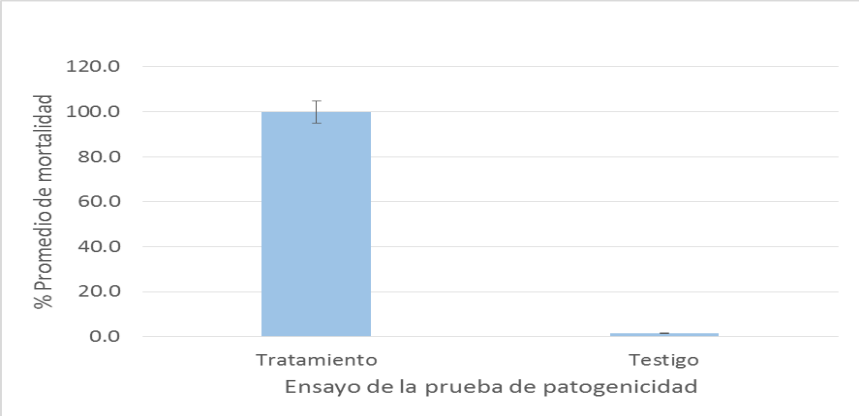


8.3 PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Ensayo 2: Validación de la prueba de patogenicidad.

El porcentaje promedio de mortalidad por el hongo *B. bassiana* sobre *H. hampei* para la prueba de patogenicidad fue de 99.8% (Figura 10). Estos resultados demuestran la eficacia del hongo *B. bassiana* sobre la broca del café bajo las condiciones del bioensayo. En el tratamiento testigo se presentó una mortalidad del 1.5% de los insectos evaluados (6 en total), ninguno de estos mostró presencia del hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Tres de los insectos no presentaron signos de muerte por microorganismos, dos insectos mostraron presencia del hongo *Fusarium* sp .y uno de *Aspergillus* sp, estos son hongos saprofitos del ambiente, por tanto, asumimos que su presencia se debió a las condiciones propicias de humedad y temperatura del ambiente en donde se realizó el bioensayo, ya que estas facilitan el crecimiento de estos hongos como contaminantes.

Figura 10. Porcentaje promedio de mortalidad de la prueba de patogenicidad de *B. bassiana* sobre *H. hampei*.



En la tabla 6 se pueden observar las variaciones en los resultados de cada una de las réplicas tanto del tratamiento como del testigo. Estos resultados no muestran diferencias significativas, marcando una tendencia lineal en cada uno de las evaluaciones obtenidas.

Tabla 6. Porcentaje promedio de mortalidad de *B. bassiana* sobre *H. hampei* en cada una de las réplicas evaluadas.

Réplica	Tratamiento		Testigo	
	%Mortalidad	DS	% Mortalidad	DS
1	100.0	0.00	5.0	21.8
2	100.0	0.00	0.0	0.0
3	100.0	0.00	0.0	0.0
4	100.0	0.00	2.5	15.6
5	100.0	0.00	0.0	0.0
6	100.0	0.00	2.5	15.6
7	100.0	0.00	2.5	15.6
8	100.0	0.00	2.5	15.6
9	97.5	15.61	0.0	0.0
10	100.0	0.00	0.0	0.0
Promedio general	99.8	1.6	1.5	8.4

DS= Desviación estándar.

8.4 DETERMINAR EL PORCENTAJE Y EL TIEMPO PROMEDIO DE MORTALIDAD DEL HONGO *Beauveria bassiana* SOBRE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei*

Con el registro diario de la muerte de los insectos, se estableció el tiempo promedio de mortalidad de *H. hampei* causado por el hongo *Beauveria bassiana* (Bb 9205) mediante un análisis de frecuencia. Los resultados mostraron que la mortalidad promedio fue causada en 3.7 días. El rango de mortalidad del hongo sobre el hospedero se presentó entre 3.3 y 4.1 días (Tabla 7).

Tabla 7. Tiempo promedio de mortalidad de *H. hampei* causado por el hongo *B. bassiana* a los 10 días de evaluación para cada replica.

Réplica	**Broca con hongo (Tratamiento)**	
	Días $\overline{X}$	**DS**
1	3.9	0.05
2	3.3	0.08
3	3.5	0.37
4	3.8	0.34
5	3.3	0.29
6	4.1	0.06
7	4.0	0.05
8	4.1	0.17
9	3.6	0.37
10	3.8	0.22
Promedio general	3.7	0.2

$\overline{X}$: Días promedio. DS: Desviación Estándar.

Igualmente se analizó el tiempo de supervivencia de las brocas en los diferentes tratamientos, aplicando el método de la diferencia significativa mínima de Fisher (LSD).

En la tabla 8 observamos que los resultados presentaron diferencias estadísticas significativas en la medición de los intervalos de confianza en cada una de las réplicas, comparando Broca con hongo (Tratamiento) vs. Broca sin hongo (Testigo).

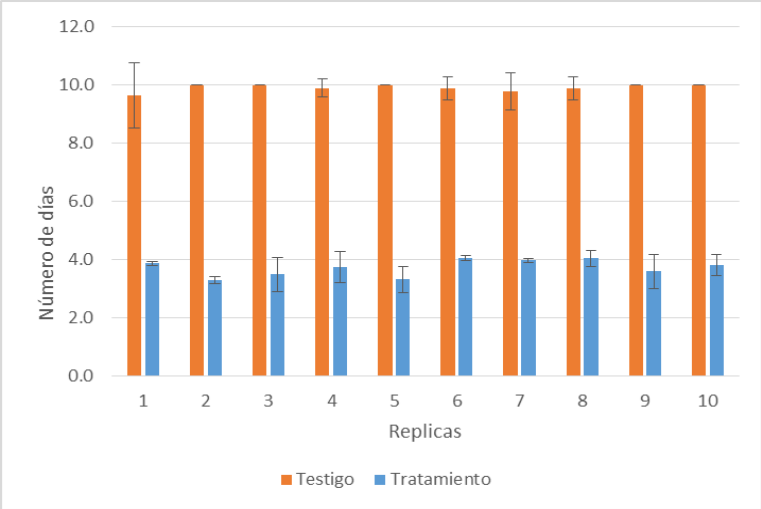
Tabla 8. Tiempo de supervivencia de *H. hampei* a los 10 días de evaluación.

Réplica	Broca con hongo (Tratamiento)				Broca sin hongo (Testigo)			
	Promedio		Std	E. estimación	Promedio		Std	Error de estimación
1	3.9	b	0.05	0.08	9.7	a	0.70	1.11
2	3.3	b	0.08	0.13	10.0	a	0.00	0.00
3	3.5	b	0.37	0.58	10.0	a	0.00	0.00
4	3.8	b	0.34	0.54	9.9	a	0.20	0.32
5	3.3	b	0.29	0.46	10.0	a	0.00	0.00
6	4.1	b	0.06	0.09	9.9	a	0.25	0.40
7	4.0	b	0.05	0.08	9.8	a	0.40	0.64
8	4.1	b	0.17	0.28	9.9	a	0.25	0.40
9	3.6	b	0.37	0.58	10.0	a	0.00	0.00
10	3.8	b	0.22	0.35	10.0	a	0.00	0.00

Para cada réplica, letras no comunes indican diferencias estadísticas, según prueba LSD, al 5%

En el tiempo de supervivencia de la prueba de patogenicidad se encontró que el hongo *Beauveria bassiana* (Bb 9205) causo la muerte del hospedante entre 3 y 4 días bajo las condiciones evaluadas, con un intervalo de confianza entre 0.08 y 0.58, siendo la estimación del parámetro confiable. Además, comparando los resultados con los estimados en el testigo se puede observar que los días de supervivencia de la broca del café están entre 9.7 y 10 días, con un intervalo en la medición que va desde 0.40 a 1.11 (Figura 11). Al momento de terminar la evaluación del ensayo de patogenicidad, el 99.8 % de las brocas del testigo continuaban vivas.

Figura 11. Promedio e intervalos de confianza para el tiempo de supervivencia de *H. hampei* a los 10 días de evaluación.



9. CONCLUSIONES

1. En el análisis estadístico del ensayo de la comparación de los sustratos: T1-discos de papel toalla esterilizados y T-2 grano de café pergamino seco más discos de papel toalla esterilizados no se presentaron diferencias significativas. Por tanto, se puede continuar evaluando con cualquiera de los dos sustratos. No obstante, se observó que el promedio de supervivencia de T1 superó el promedio de supervivencia del T2, lo cual indica que el T1 puede ser utilizado como sustituto del café pergamino seco ya que permite la supervivencia de los insectos durante el tiempo de evaluación de la prueba de patogenicidad.

2. Los resultados obtenidos en el ensayo de patogenicidad mostraron un porcentaje promedio de mortalidad de 99,8% en un tiempo promedio de 3,7 días. Los resultados entre réplicas no presentaron diferencias estadísticas significativas, por lo que se concluye que se aprueba la validación de la prueba de patogenicidad *in vitro* del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei.*

3. Con la validación de la prueba de patogenicidad *in vitro* del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*, se puede dar garantía de la efectividad de un producto biológico a base de hongos entomopatógenos, siempre que el producto cumpla con los estándares de calidad necesarios para su efectividad.

4. Esta prueba de patogenicidad se viene usando desde hace casi 20 años para evaluar la calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos sobre *H. hampei*, pese a que se habían realizado cambios, no se había actualizado la prueba y nunca se había realizado una validación, lo que hace muy interesante este trabajo al demostrar que a pesar de los cambios que han podido suceder tanto en el hongo como en la broca, *Beauveria bassiana* continua siendo una excelente opción de control biológico, si se tiene la cepa adecuada y el control de calidad del producto a utilizar, donde se demuestre su patogenicidad y su eficacia.

10. RECOMENDACIONES

1. Con esta validación se recomienda al Laboratorio Control de Bioinsumos, tomar como base esta tesis para las validaciones de todos sus procesos.

2. Continuar realizando la prueba de patogenicidad con el sustrato de discos de papel toalla esterilizados, ya que con este sustrato se hace más fácil la evaluación, disminuye tiempo y a su vez es más económico.

3. Para los laboratorios de calidad se recomienda realizar las validaciones de todos sus métodos ya que esto disminuirá el error en sus procesos y pueden tomar como referente este trabajo de tesis.

4. Con las aplicaciones de hongos entomopatógenos para el control de insectos plagas en los cultivos se tiende a disminuir el uso de agroquímicos que puedan causar grandes impactos adversos en los agroecosistemas. Con la aplicación de *Beauveria bassiana* par ale control de la broca del café se puede remplazar eficazmente el uso de ingredientes activos de síntesis química (Endosulfan, fenitrothion y clorpirifos, entre otros) que tanto afectan los ecosistemas cafeteros incluyendo animales y al mismo hombre.

11. BIBLIOGRAFÍA

Machado, A. C. (2001). El café de Colombia a principios del siglo XX. Bogotá. Colombia.79-80.

Anthony, F; Astorga, C; Berthaud, J. (1999). Los recursos genéticos: las bases de una solución genética a los problemas de la caficultura latinoamericana. In Bertrand, B; Rapidel, B. Eds. *Desafíos de la caficultora en Centroamérica. San José*, CR, IICA. 369-406.

Barrera, J. F. (2002), Tres plagas del café en Chiapas, Tapachula, Chiapas, México.

Benavides, P.; Góngora, C.; Bustillo, A.E. (2012). IPM program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia. In: Insecticides – *Advances in Integrated Pest Management*. 510 - 513. ISBN 978-953-307-780-2.

Botanical on-line(1999-2016). Características del café (*coffea sp)*. Recuperado de http://www.botanical-online.com/cafe.htm

Bustillo P. A,E. (2006).Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleóptera: Curcunilionidae: Scolytidae) en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 32(2), 101-116.

Bustillo P. A,E. (2008). Aspectos sobre la broca del café *Hypothenemus hampei*, en Colombia. En: Bustillo P., A.E. Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. Chinchiná. CENICAFÉ. Editorial Blanecolor Ltda., Manizales, Colombia.388-418.

CENICAFÉ, (1997). Técnicas para el Control de Calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Boletín Técnico No. 17, Chinchiná, Caldas.

FNC, Cenicafé. (2013). Plagas del Café: Broca, minador, cochinillas harinosas, arañita roja y monalonion. En Benavides, Gil, Constantino, Villegas, Giraldo (Ed.), *Manual del cafetero colombiano, Investigación y tecnología para la sostenibilidad de la caficultura, Tomo II. 216- 217.* Chinchiná, Colombia.

Gómez, M. M (2006). Introducción a la metodología de la investigación. Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.

Góngora, (2013). Nuevos hallazgos en el control biológico de la broca del café. En E. Becerra (Presidencia), Control de plagas en café: presente y futuro. Simposio llevado a cabo en el *40ºCongreso de SOCOLEN*, Bogotá, Colombia.

Góngora B., C.E; Marín M. P.; Benavides M., P. (2009). Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. *Avance técnico No. 384*, CENICAFÉ. Chinchiná, Caldas. 2-3.

González, L. C. (1981). Introducción a la fitopatología. San José, Costa Rica. 11-13.

González, M.T., Posada, F.J., Bustillo, A.E. (1993). Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei.* CENICAFÉ, 44(3): 93-102.

Herrington, K. (2006). *http://www.mst.edu/*. Recuperado el 10 de 11 de 2015, de Missouri University of science and Technology: http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2006/B_bassiana.htm

Instituto Nacional de Metrología de Colombia. (2016). Sistema Integrado de Gestión. Recuperado el 18 de Abril de http://www.inm.gov.co/index.php/el-inm/sistema-integrado-de-gestion

Instituto Nacional de Salud, (2013), Generalidades de la Norma NTC-17025:2005, Seminario Taller de Citogenética y discusión de resultado 2012-2013 del Programa EEDDCARIO, Bogotá, Colombia. Recuperado de http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/Citogentica%20Clnica/Generalidades%20de%20la%20norma%2017025%20-INS-2013%20f.pdf

Le Palley. R. H.,(1968).Pests of coffee. London,. 590.

Leon, J.(2000). Botánica de los cultivos tropicales. 3 Ed. aum. Y rev. San José, CR, IICA. 350-364.

Marín, P.; Bustillo, A. E. (2002). Producción artesanal de hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. En*: memorias curso internacional teórico-práctico. Sección I. Entomopatógenos de la broca del café*. CENICAFÉ, Chinchiná, Marzo 11 al 15 del 2002. 125-131. Colombia.

Mora, S. (2008). *Agrocadena de café*. Ministerio de agricultura y ganadería. Costa Rica

Morales, E., Cruz, F., Ocampo, A., Rivera, G., Morales, B. (1991). Una aplicación de la biotecnología para el control de la broca del café. En: Colloque Scientifique International sur Le Café, 14. San Francisco. 14 -19 Juillet, ASIC.521–526. Paris.

NTC-ISO/IEC 17025 (2005). Norma Técnica Colombiana. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración (Primera Edición).* Bogotá DC.

Ruiz. C., R.(1996). Efecto en la fenología del fruto del café sobre los parámetros de la tabla de vida de la broca del café; *Hypothenemus hampei (Ferrari).* Manizales: Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. p87, Tesis: Ingeniero Agrónomo.

Tanada, Y., y Kaya, H.K,(1993). Chapter 10, Fungal infection. *Insect pathology*. Academy press.318-366.

Tómas-Sábado, J. (2009). Fundamentos de bioestadística y análisis de datos para enfermería. Bellaterra, España: Universidad Autónoma de Barcelona. 89-92.

Universidad Pública de Navarra. (2004-2005). Microbiología clínica, Curso 2004-2005 (grupo 1). Recuperado de: http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema05.pdf

Vega, F .E. & G. Mercadier (1998). Insects, coffee, and ochratoxin A. *Florida Entomologist* 81: 543- 544.

Notas:

(1) Góngora (Vélez, P. E.; Benavides, G. M. 1990). Registro e identificación de *Beauveria bassiana* en *Hypothenemus hampei* en Ancuya, departamento de Nariño, Colombia. Cenicafé. Chinchiná (Colombia). 50 – 57p.

(2) Federación Nacional de Cafeteros. Circular Interna – Uso de *B. bassiana*, abril 8 – 2016. Germinación de esporas y prueba de pureza.

12. ANEXOS

12.1 CERTIFICADO DE LA CEPA DE *Beauveria bassiana* cepa (Bb 9205)

CONTROL de Bioinsumos

Resoluciones ICA 2670, 1548 y 3129 para hongos, bacterias y extractos vegetales
www.controldebioinsumos.com

CERTIFICADO DE CEPAS DE REFERENCIA DE MICROORGANISMOS

Procedencia de la muestra Empresa/ Nit/ Dirección /Tels. /E-mail	**CONTROL DE BIOINSUMOS. NIT: 30.289.299-5** Disciplina de Entomología. Cenicafé Planalto. Km 4 Vía Antigua a Manizales, Chinchiná, Caldas Teléfonos. Conm. (6)8506550 Ext. 334-363. Fax: (6)8506630. Cel.: 3148391241 E-mail: patricia.marin@controldebioinsumos.com
Nombre del contacto en la empresa / Cargo:	Patricia Marín – Directora
Nombre comercial del producto/Lote/Pase	Cepa de Referencia LCB-Bb-01. Lote: 22. Pase: Reactivado sobre *Hypothenemus hampei*
Composición garantizada (Género – especie):	*Beauveria bassiana*
Actividad biológica:	Entomopatógeno
REPORTE DE LA IDENTIFICACION	
Código interno asignado a la muestra	CR-LCB-Bb-01 Lote 22
Fecha de siembra:	23 de Septiembre de 2015
Pureza microbiológica:	100%
Descripción de la técnica	A partir de una muestra de trabajo de *B. bassiana* preservada en nuestro laboratorio se realizó reactivación del hongo sobre adultos de *Hypothenemus hampei*. Una vez los insectos presentaron los signos y síntomas de infección por el hongo, se sembraron en medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar) más extracto de levadura al 1%. Luego de su crecimiento, se realizó observación macroscópica de las características de la colonia del hongo recuperado. Igualmente, se realizaron directos y se observaron las estructuras microscópicas características del hongo. Mediante comparación taxonómica se corroboro que el hongo corresponde a *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. La identificación de este hongo fue confirmada por el Dr Harry C. Evans D. Sc.. Research Group Co-ordinator. Del CABI Bioscience (Ascot).
Temperatura de almacenamiento y Fecha de Vencimiento	El cultivo de este hongo en PDA más Ácido Láctico al 0,2% se puede conservar hasta por 35 días a T° ambiente (25±2°C.). A T° de refrigeración esta viabilidad se puede conservar hasta por 12 meses más (2 a 8 °C.).

FIRMAS:

Patricia Marín. Bacterióloga, Esp.
Directora Laboratorio

Catalina Grisales. Agr.
Coordinadora Laboratorio

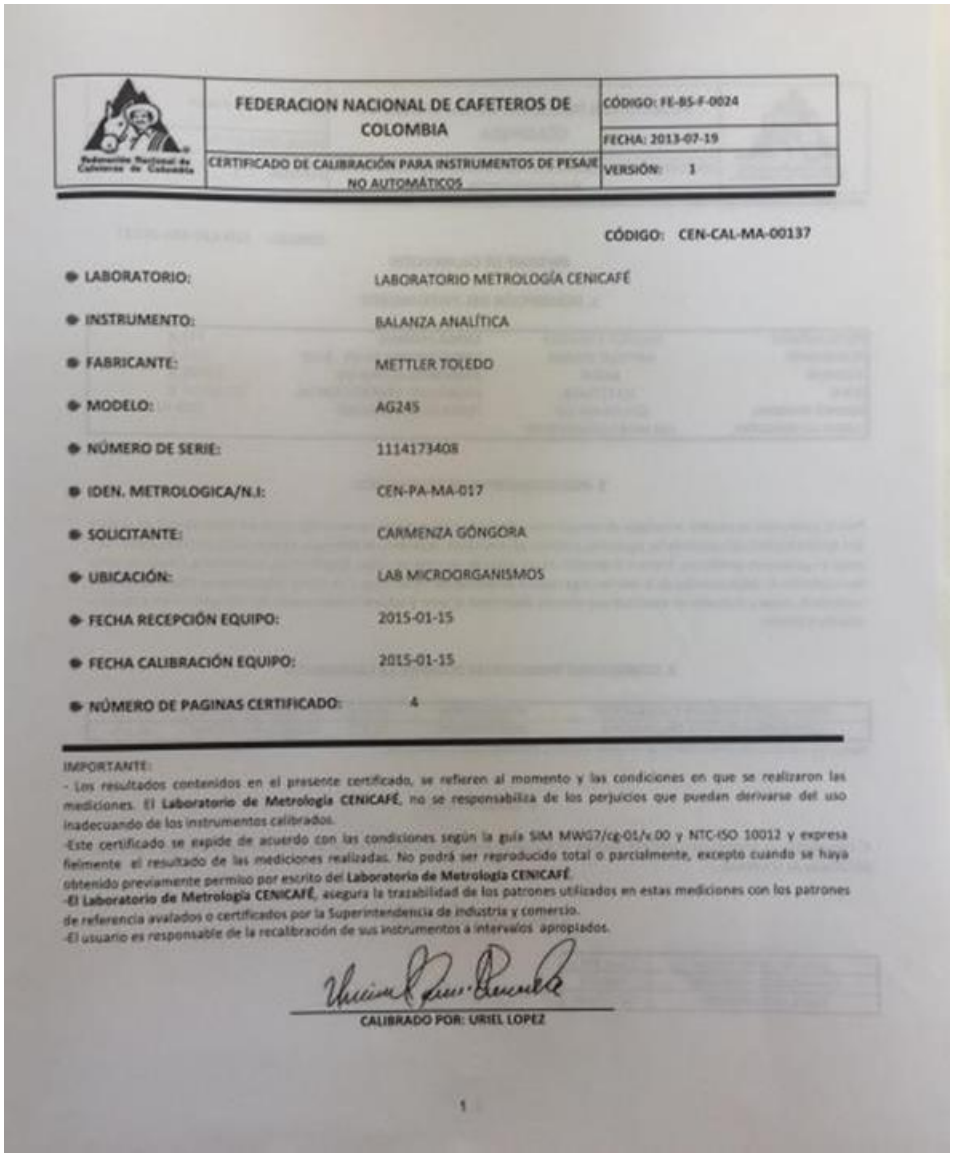
Documento con firma digital enviado en formato PDF

Fecha de emisión: Febrero 27 de 2016. **Página:** 1/1

Nota: Este reporte de resultados no se debe reproducir, sin aprobación por escrito del laboratorio.

12.2 CALIBRACIÓN DE EQUIPOS

12.2.1 Calibración Balanza Analítica.



Federación Nacional de Cafeteros de Colombia	FEDERACION NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA	CÓDIGO: FE-BS-F-0024
		FECHA: 2013-07-19
	CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN PARA INSTRUMENTOS DE PESAJE NO AUTOMÁTICOS	VERSIÓN: 1

CÓDIGO: CEN-CAL-MA-00137

- **LABORATORIO:** LABORATORIO METROLOGÍA CENICAFÉ
- **INSTRUMENTO:** BALANZA ANALÍTICA
- **FABRICANTE:** METTLER TOLEDO
- **MODELO:** AG245
- **NÚMERO DE SERIE:** 1114173408
- **IDEN. METROLOGICA/N.I:** CEN-PA-MA-017
- **SOLICITANTE:** CARMENZA GÓNGORA
- **UBICACIÓN:** LAB MICROORGANISMOS
- **FECHA RECEPCIÓN EQUIPO:** 2015-01-15
- **FECHA CALIBRACIÓN EQUIPO:** 2015-01-15
- **NÚMERO DE PAGINAS CERTIFICADO:** 4

IMPORTANTE:
- Los resultados contenidos en el presente certificado, se refieren al momento y las condiciones en que se realizaron las mediciones. El **Laboratorio de Metrología CENICAFÉ**, no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuando de los instrumentos calibrados.
-Este certificado se expide de acuerdo con las condiciones según la guía SIM MWG7/cg-01/v.00 y NTC-ISO 10012 y expresa fielmente el resultado de las mediciones realizadas. No podrá ser reproducido total o parcialmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso por escrito del **Laboratorio de Metrología CENICAFÉ**.
-**El Laboratorio de Metrología CENICAFÉ**, asegura la trazabilidad de los patrones utilizados en estas mediciones con los patrones de referencia avalados o certificados por la Superintendencia de Industria y comercio.
-El usuario es responsable de la recalibración de sus instrumentos a intervalos apropiados.

CALIBRADO POR: URIEL LOPEZ

1

12.2.2 Calibración Cabina de Flujo Laminar Vertical.

FECHA DE EMISIÓN: DICIEMBRE 19 DE 2015	TÍTULO: INFORME DE VALIDACIÓN CABINA DE FLUJO LAMINAR	SHIELD CORP

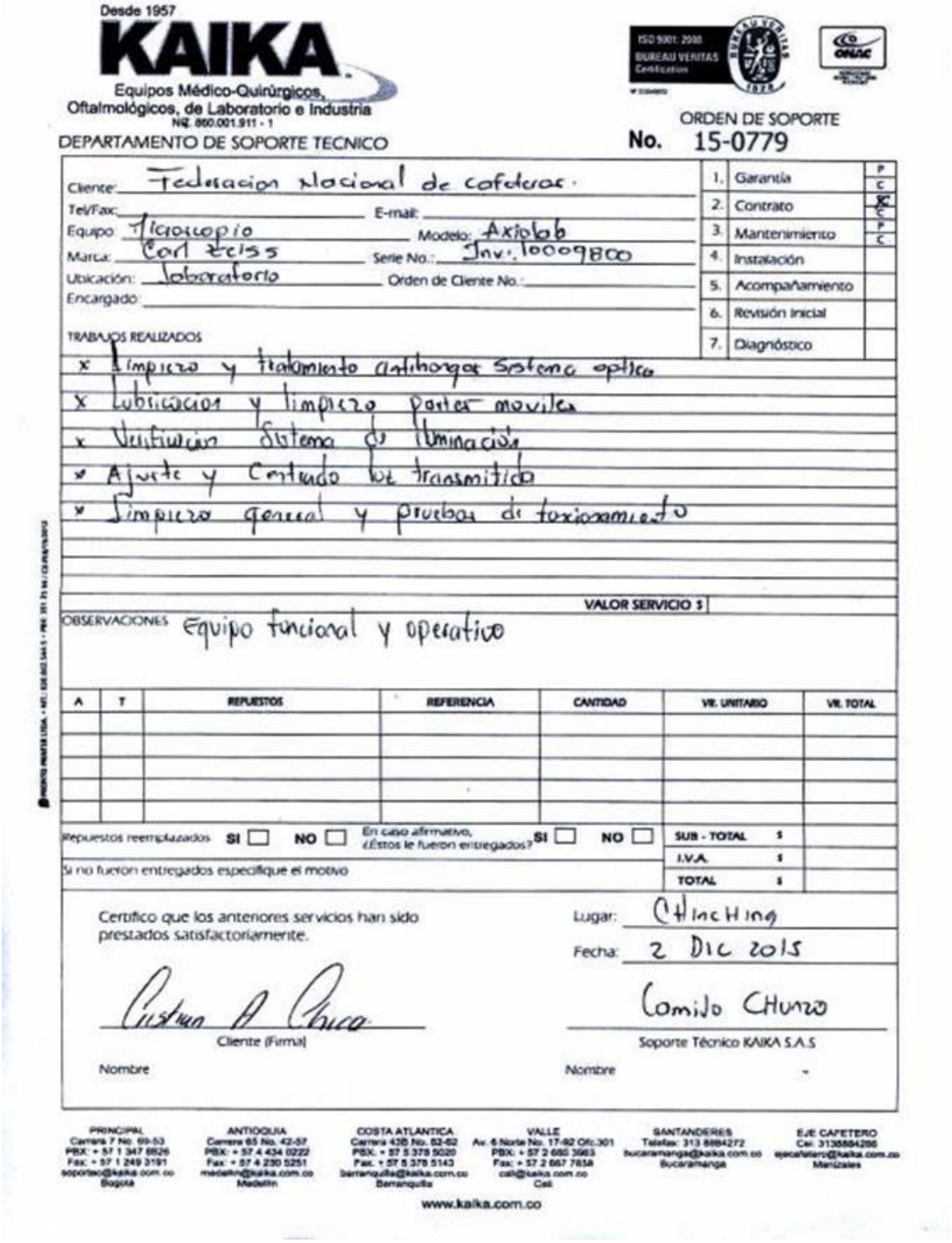
SHIELD

VALIDACION DE CABINA DE FLUJO LAMINAR VERTICAL
MARCA HOLTEN / MODELO HV MINI
SERIE: 042634 A
IDENTIFICACION INTERNA 10009797
REF. DOCUMENTO: 101215 – 5

CLIENTE: CENICAFE
UBICACIÓN: LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD

Carrera 56 No. 13 – 129. Tel. / Contactos: 57(2)3970043,3152832091, 3158835976
E-mail: shield_co2003@yahoo.com.mx/servicios_shield@yahoo.com.co
Cali – Colombia

12.2.3 Calibración Microscopio



Desde 1957

KAIKA

Equipos Médico-Quirúrgicos, Oftalmológicos, de Laboratorio e Industria

NIT. 860.001.911 - 1

DEPARTAMENTO DE SOPORTE TECNICO

ISO 9001: 2000 BUREAU VERITAS Certification

ORDEN DE SOPORTE

No. 15-0779

Cliente: Federacion Nacional de cafeteros

Tel/Fax: E-mail:

Equipo: Microscopio Modelo: Axiolab

Marca: Carl Zeiss Serie No.: Inv.: 10009800

Ubicación: Laboratorio Orden de Cliente No.:

Encargado:

1.	Garantía	P / C
2.	Contrato	P / C X
3.	Mantenimiento	P / C
4.	Instalación	
5.	Acompañamiento	
6.	Revisión Inicial	
7.	Diagnóstico	

TRABAJOS REALIZADOS

x Limpieza y tratamiento antihongos Sistema optico

x Lubricacion y limpieza partes moviles

x Verificacion Sistema de Iluminación

x Ajuste y Centrado luz transmitida

x Limpieza general y pruebas de funcionamiento

VALOR SERVICIO $

OBSERVACIONES Equipo funcional y operativo

A	T	REPUESTOS	REFERENCIA	CANTIDAD	VR. UNITARIO	VR. TOTAL

Repuestos reemplazados SI ☐ NO ☐ En caso afirmativo, ¿Estos le fueron entregados? SI ☐ NO ☐

Si no fueron entregados especifique el motivo

SUB - TOTAL	$	
I.V.A.	$	
TOTAL	$	

Certifico que los anteriores servicios han sido prestados satisfactoriamente.

Lugar: Chinching

Fecha: 2 Dic 2015

Cristian A Chica

Cliente (Firma)

Nombre

Camilo Chunza

Soporte Técnico KAIKA S.A.S

Nombre

PRINCIPAL Carrera 7 No. 99-53 PBX: + 57 1 347 8826 Fax: + 57 1 249 3191 soporteac@kaika.com.co Bogotá

ANTIOQUIA Carrera 65 No. 42-57 PBX: + 57 4 434 0222 Fax: + 57 4 230 5251 medellin@kaika.com.co Medellín

COSTA ATLANTICA Carrera 43B No. 82-62 PBX: + 57 5 379 5020 Fax: + 57 5 379 5143 barranquilla@kaika.com.co Barranquilla

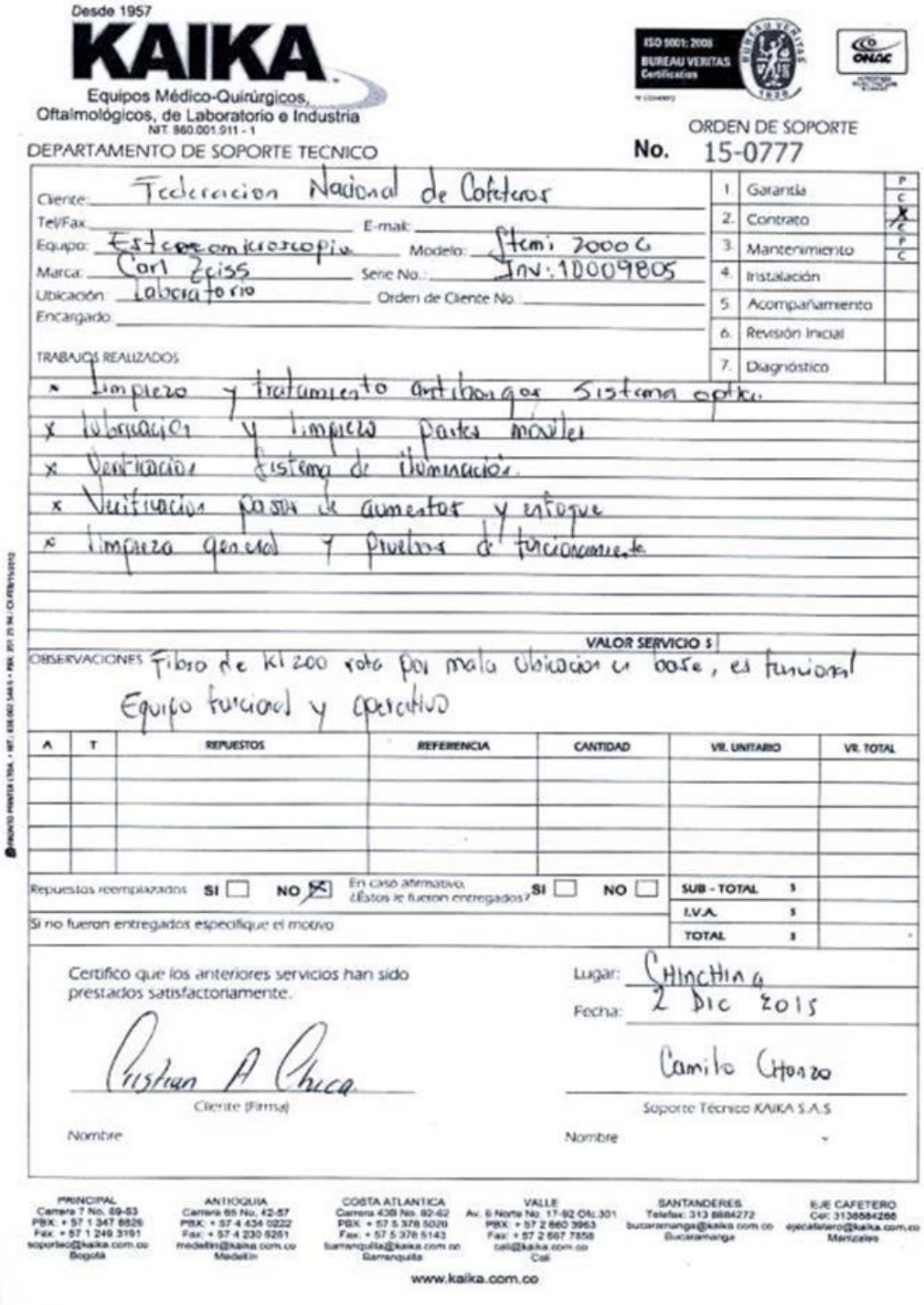
VALLE Av. 6 Norte No. 17-92 Ofc.301 PBX: + 57 2 660 3983 Fax: + 57 2 667 7858 cali@kaika.com.co Cali

SANTANDERES Teléfax: 313 8884272 bucaramanga@kaika.com.co Bucaramanga

EJE CAFETERO Cel: 3138884286 ejecafetero@kaika.com.co Manizales

www.kaika.com.co

12.2.4 Calibración Estereoscopio.



Desde 1957

KAIKA

Equipos Médico-Quirúrgicos, Oftalmológicos, de Laboratorio e Industria

NIT. 860.001.911 - 1

ISO 9001: 2008 BUREAU VERITAS Certification

ONAC

DEPARTAMENTO DE SOPORTE TECNICO

ORDEN DE SOPORTE No. 15-0777

Cliente: Federacion Nacional de Cafeteros

Tel/Fax: E-mail:

Equipo: Estereomicroscopio Modelo: Stemi 2000 C

Marca: Carl Zeiss Serie No.: Inv: 10009805

Ubicación: Laboratorio Orden de Cliente No.:

Encargado:

		P	C
1.	Garantía		
2.	Contrato		X
3.	Mantenimiento	P	C
4.	Instalación		
5.	Acompañamiento		
6.	Revisión Inicial		
7.	Diagnóstico		

TRABAJOS REALIZADOS

- x Limpieza y tratamiento Antihongos Sistema optico.
- x Lubricación y limpieza partes móviles
- x Verificación Sistema de iluminación.
- x Verificación pasos de aumentos y enfoque
- x Limpieza general y pruebas de funcionamiento.

VALOR SERVICIO $

OBSERVACIONES Fibra de KL200 rota por mala Ubicación en base, es funcional Equipo funcional y operativo

A	T	REPUESTOS	REFERENCIA	CANTIDAD	VR. UNITARIO	VR. TOTAL

Repuestos reemplazados SI ☐ NO ☒ En caso afirmativo, ¿Estos le fueron entregados? SI ☐ NO ☐

Si no fueron entregados especifique el motivo

SUB - TOTAL	$	
I.V.A.	$	
TOTAL	$	

Certifico que los anteriores servicios han sido prestados satisfactoriamente.

Lugar: Chinchina

Fecha: 2 Dic 2015

Cliente (Firma)

Nombre

Camilo Cifuentes

Soporte Técnico KAIKA S.A.S

Nombre

PRINCIPAL Carrera 7 No. 69-53 PBX: + 57 1 347 8826 Fax: + 57 1 249 3191 soporteo@kaika.com.co Bogotá

ANTIOQUIA Carrera 65 No. 42-57 PBX: + 57 4 434 0222 Fax: + 57 4 230 6261 medellin@kaika.com.co Medellín

COSTA ATLANTICA Carrera 43B No. 82-62 PBX: + 57 5 378 5029 Fax: + 57 5 378 5143 barranquilla@kaika.com.co Barranquilla

VALLE Av. 6 Norte No. 17-92 Ofc. 301 PBX: + 57 2 660 3963 Fax: + 57 2 667 7858 cali@kaika.com.co Cali

SANTANDERES Telefax: 313 8884272 bucaramanga@kaika.com.co Bucaramanga

EJE CAFETERO Cel: 3136584266 ejecafetero@kaika.com.co Manizales

www.kaika.com.co

12.2.5 Calibración Termohigrógrafo.

Federación Nacional de Cafeteros de Colombia	FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA	FECHA: 27/May/2016
		ACL-RC-110
	REGISTRO DE CALIBRACIÓN INTERNA	

IDENTIFICACIÓN DEL INSTRUMENTO

Termohigrógrafo Marca Lambrecht; **SERIE: 52487; TIPO: 252**; **PLACA DE INVENTARIO**:10010971; **EMPLAZAMIENTO:** ENT-Cuarto de Cría. Los rangos de medida son de –20-0-60 °C y resolución 1.0 °C para la temperatura y de 100-0 % con resolución 5 % para la Humedad Relativa.

MÉTODO Y PATRÓN DE COMPROBACIÓN O CALIBRACIÓN

Las recomendaciones de la Organización Meteorológica Mundial (OMM) contenidas en la Guía de Instrumentos y Métodos de Observación Meteorológica No. 8, edición 2008*. Psicrómetro Lambrecht No. 730892.0001 con Certificado de Calibración MET-LT-CC 3219 y MET-LH-CC 2080 del 20011-07-29 de Metrolabor Ltda.

OBSERVACIONES

Retirado para su respectiva CI y/o Cal.

RESPUESTA DE SENSORES

	THG	Psicro.	Error de Medición	Corrección a la Indicación
	Vmedido	Vreferencia	Vm-Vr	(-) Em
Ofic. Metrología	23.7	22.2	1.5	-1.5
	24.6	23.1	1.5	-1.5
	23.2	22.5	0.7	-0.7
	22.8	21.5	1.3	-1.3
	22.8	22.0	0.8	-0.8
	24.4	23.1	1.3	-1.3
	26.0	25.1	0.9	-0.9
	26.8	25.5	1.3	-1.3
	26.9	25.6	1.3	-1.3
	26.2	25.2	1.0	-1.0
	25.8	25.0	0.8	-0.8
	26.5	25.2	1.3	-1.3
Suma	299.7	286.0	13.7	-13.7
Media	25.0	23.8	1.1	-1.1
	Se ajusta en -1.1 °C			
Ofic. Metrología	21.8	22.0	-0.2	0.2
	22.5	22.5	0.0	0.0
	22.7	23.0	-0.3	0.3
	22.9	23.2	-0.3	0.3
	23.5	23.2	0.3	-0.3
	23.5	23.9	-0.4	0.4
	23.6	24.0	-0.4	0.4
	23.7	23.6	0.1	-0.1
	25.0	25.0	0.0	0.0
	25.6	25.2	0.4	-0.4
	25.9	25.6	0.3	-0.3
	26.0	25.6	0.4	-0.4
	26.6	26.4	0.2	-0.2
	27.2	27.1	0.1	-0.1
	27.4	27.0	0.4	-0.4
	27.9	27.4	0.5	-0.5
Suma	395.8	394.7	1.1	-1.1
Media	24.7	24.7	0.1	-0.1

	THG	Psicro.	Error de Medición	Corrección a la Indicación
	Vmedido	Vreferencia	Vm-Vr	(-) Em
Ofic. Metrología	66	74	-8	8
	64	73	-9	9
	63	71	-8	8
	58	64	-6	6
	67	70	-3	3
	68	71	-3	3
	72	73	-1	1
	73	74	-1	1
	77	75	2	-2
	77	75	2	-2
	77	77	0	0
	78	80	-2	2
	85	80	5	-5
	86	84	2	-2
Suma	760	759	1	-1
Media	54	54	0	0

*La Humedad Relativa (Ht) resulta de la comparación del valor del Termómetro seco y el Termómetro húmedo en la Tabla Psicrométrica

DETERMINACIONES

Se realiza Ajuste en –1.1°C en Temperatura.

RESPONSABLES:

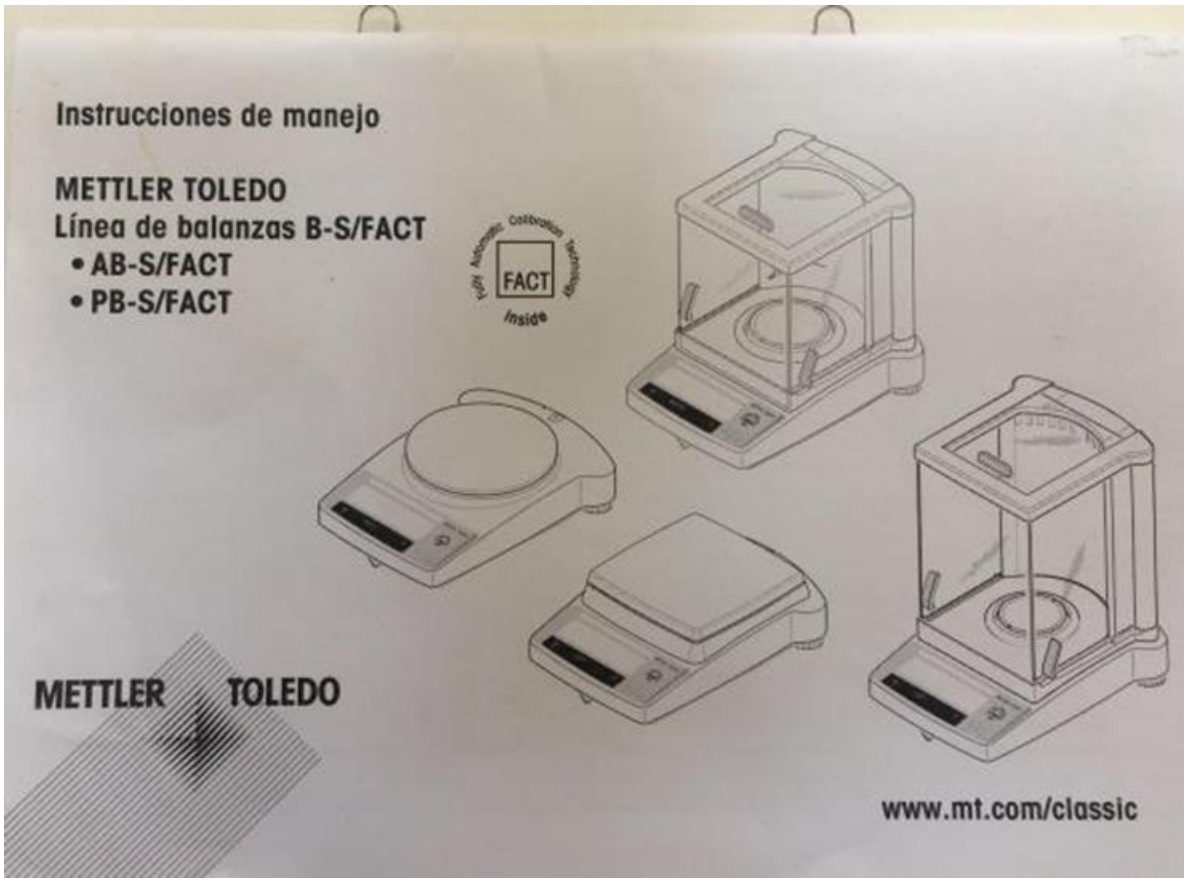
ORIGINAL FIRMADO
LUIS FERNANDO TORRES QUINTERO
Auxiliar I de Investigación

ORIGINAL FIRMADO
Ing. CAROLINA JARAMILLO GIRALDO
Coordinadora Disciplina

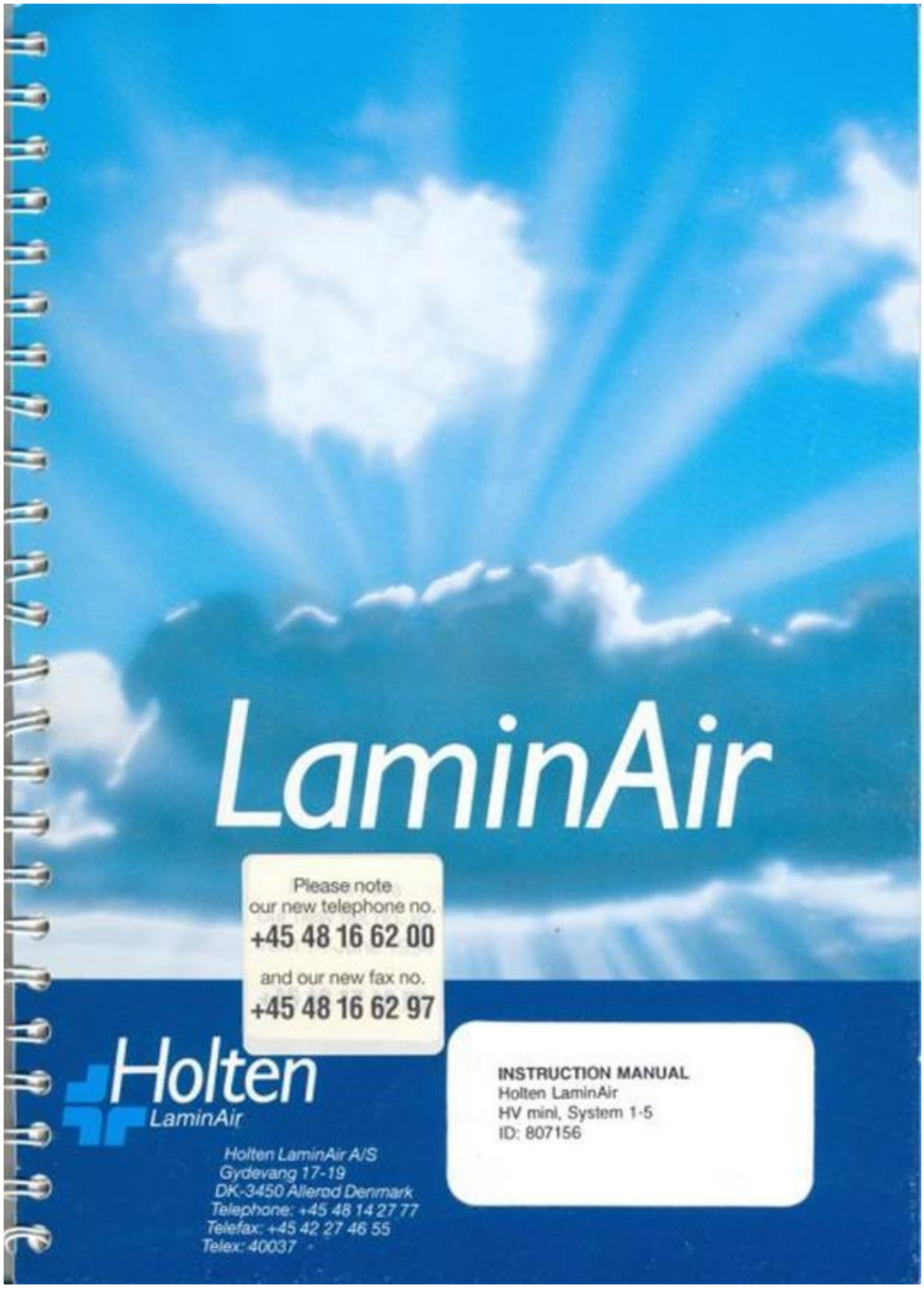
* http://www.wmo.int/pages/prog/www/IMOP/publications/CIMO-Guide/CIMO_Guide-7th_Edition-2008.html

12.3 MANUALES DE LOS EQUIPOS REQUERIDOS PARA LOS MONTAJES

12.3.1 Manual Balanza.



12.3.2 Manual Cámara de Flujo Laminar.



12.3.3 Manual Microscopio.

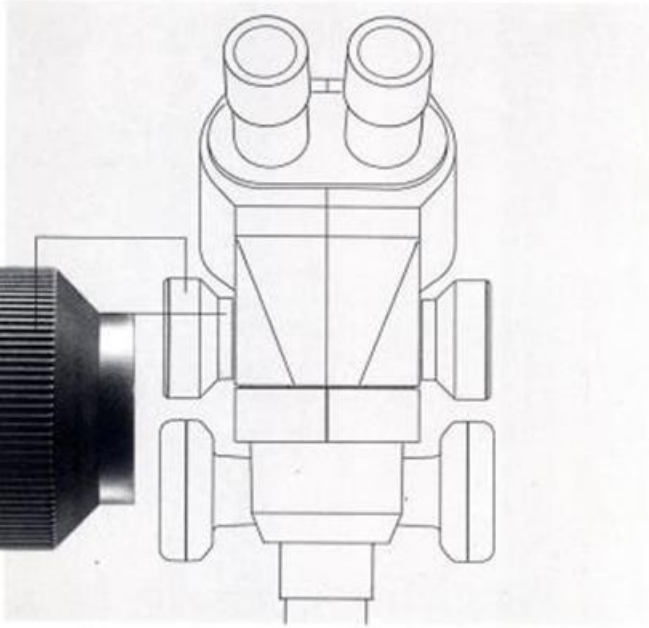
Instrucciones de manejo

Microscopio Axiolab

para luz transmitida y epifluorescencia

12.3.4 Manual Estereoscopio.

Stemi 2000
Stereomicroscope



Operating manual

ZEISS

12.3.5 Manual Instrucciones Termohigrógrafo.

MANUAL INSTRUCCIONES TERMOHIGROGRAFOS

El termohigrógrafo es un aparato que mide la temperatura y la humedad relativa ambiente y las registra en una banda de papel gráfico durante un período generalmente de siete días. Existen aparatos con distintos rangos de medición, siendo adecuados para la mayoría de los casos en el interior de las salas un rango de temperatura de - 10 a + 50° C, y de 0 a 100 por 100 de humedad relativa. La gráfica de registro, con divisiones de 1 °C de temperatura y 5 por 100 de humedad relativa, se fija a un tambor que funciona por medio de un mecanismo de relojería accionado por cuerda manual.
También hay termohigrógrafos que tienen la posibilidad de ajustar el mecanismo de relojería a períodos de 24 horas ó 31 días, y efectuar el registro en bandas gráficas adecuadas para esos períodos. Los registros de 24 horas son indicados para observar cambios rápidos en corto espacio de tiempo, mientras que los de 31 días son adecuados para registro de condiciones estables con escasas fluctuaciones.

Estos aparatos son apropiados, tanto por los datos que suministran como por su coste de adquisición y mantenimiento, para indicación de las condiciones ambientales en museos, bibliotecas, archivos y salas de exposición.
El o los aparatos, en el caso de disponer de varios, han de ser calibrados y ajustados periódicamente in situ, manteniéndose siempre en el mismo lugar de medición.
Los aparatos han de estar protegidos contra la acción involuntaria o la curiosidad del público, evitando los golpes y manipulaciones poco cuidadosas. Y deben situarse a una altura del suelo a la que se encuentren las obras de arte (entre 0.80 y 1.50 m generalmente).

Cambio de gráfica.

El cambio ha de efectuarse semanalmente, en el caso de registros de siete días, *todos los lunes a las 9.00 horas aproximadamente*. En caso de no poder realizarlo a esta hora habitualmente, se puede hacer a cualquier otra en el intervalo entre las 6.00 y las 10.00 horas. Para realizar el cambio de gráfica proceder de la siguiente forma:

a) Poner la fecha y el número del aparato o situación en la que se encuentra ubicado, en la esquina superior izquierda de cada gráfica de recambio antes de realizar el cambio.

b) Abrir la carcasa del aparato accionando el mando de cierre, cuyo mecanismo depende de cada modelo, para acceder a la gráfica.

c) Separar los brazos de las plumillas registradoras de la banda de papel por medio de la palanca de separación.