

Evaluación de procedimientos de laboratorio
y muestreo para estudios de persistencia de
Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin en
frutos de café

Carlos Enrique Carpio Ochoa

ZAMORANO
Departamento de Protección Vegetal

Abril, 1999

946

Evaluación de procedimientos de laboratorio y muestreo para estudios de persistencia de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en frutos de café

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura.

Caracas, E.E.

presentado por

Carlos Enrique Carpio Ochoa

MICROISIS:	_____
FECHA:	_____
ENCARGADO:	_____

Zamorano-Honduras

Abril, 1999

DEDICATORIA

A Dios

A mi familia

A Joysee

A mi tierra Loja

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores Dr. Allan Hruska y Dra. Sally Gladstone.

Al Profesor Miguel Avedillo por el tiempo invertido y por sus consejos.

A mi familia en Honduras: Giuseppe, Dña. Martha, Rubén y Olenka.

A todo el personal del Departamento de Protección Vegetal.

A Lourdes, Dña. Nolvía, Elsa Carolina, Dña. María y Geovani.

A Oscar García por toda la colaboración prestada.

A mis amigos de la AGP: Marco, Bely, Frances, Jorge, Joffre y Emilio.

A Jorge por las mil horas de machete, plástica y malas noches compartidas.

A mis colegas-amigos de la clase PLA: Juan Pablo, Dante, Paola, Claudia, Angel, Ingrid, Gisela, Fabiola, Stefan, Zamir, Rodrigo, Mildrelena, Erika, Cristhian y Fredy.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A la Deutsche Stiftung für internationale Entwicklung (D.S.E.) por financiar mis estudios en el Programa de Agrónomo.

Al Departamento de Protección Vegetal por ayudarme financiar mis estudios de cuarto año.

A la empresa Mycotech por el financiamiento de la tesis.

RESUMEN

Carpio, Carlos. 1999. Evaluación de procedimientos de laboratorio y muestreo para estudios de persistencia de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin en frutos de café. Proyecto especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 60 p.

Una alternativa al control químico de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) es el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. La persistencia, es decir, la capacidad que muestran las conidias para permanecer viables en el campo, es un factor que afecta la efectividad del hongo. El objetivo general de este trabajo fue evaluar los procedimientos de laboratorio y muestreo para el estudio de la persistencia del hongo en frutos de café, usando la metodología de recolección de frutos, lavado e inoculación en medio artificial para conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). En la primera parte del estudio se probaron para el lavado, dilución e inoculación dos volúmenes de agua, tres diluciones y tres cantidades de inóculo. Se determinó que para frutos recogidos inmediatamente después de la aplicación del hongo deben usarse 2.5 ml de agua/fruto para el lavado, una dilución 1:10 en agua destilada estéril del agua obtenida del lavado y 100 µl de inóculo por plato petri. La segunda parte del trabajo se desarrolló en dos fases y tuvo como objetivo determinar un medio selectivo para aislar *B. bassiana* de frutos de café. Primero, se probaron 19 recetas y se seleccionó la receta que menos contaminación presentó para trabajar en la segunda etapa. Con los tres antibióticos que contenía esa receta (dodine, ciclohexamida y cloranfenicol) se realizó un experimento para probar tres dosis de cada uno y sus combinaciones. Se usó un arreglo factorial 3^3 en un Diseño Completamente al Azar (DCA). A los 6, 9 y 12 días se evaluó UFC, porcentaje del área del plato con contaminación bacteriana (PCB) y porcentaje del área del plato con contaminación fungosa (PCH). El análisis de los datos se realizó usando varias metodologías progresivas y complementarias (ANDEVA, regresiones, correlaciones y optimización de las respuestas). Sólo en el 5% de las observaciones se presentaron porcentajes de contaminación mayores a 10%. Para obtener un máximo de UFC se recomienda hacer las evaluaciones el día 9 después de la inoculación y usar las dosis mínimas probadas de los tres ingredientes (dodine 300 mg/l, ciclohexamida 0 mg/l y cloranfenicol 300 mg/l). Para dar recomendaciones sobre el tamaño de la muestra en estudios de persistencia se trabajó en un ensayo de campo. Se usó un DCA con 4 repeticiones de 3 tratamientos: dosis alta de *B. bassiana* (1×10^{13} esporas/ha), dosis baja (5×10^{12} esporas/ha) y un testigo sin aplicar. Inmediatamente después de la aplicación, de cada parcela de cuatro árboles se tomó una muestra de 40 frutos (10 frutos de una rama seleccionada de cada árbol). De cada muestra en el laboratorio se inocularon 3 platos petri y se evaluó la cantidad de UFC desarrolladas. Se analizó la fluctuación del coeficiente de variación al incrementar el número de muestras y se calculó el tamaño óptimo en tres posibles escenarios de exigencia de la precisión. Poblaciones menores del hongo exigen tamaños de muestra mayores a un mismo grado de precisión exigido; sin embargo, con un máximo de ocho muestras observadas no se pueden dar recomendaciones concluyentes sobre el tamaño de muestra adecuado.

Palabras claves: antibióticos, hongos entomopatógenos, medios selectivos, muestreo estadístico.

NOTA DE PRENSA

¿COMO MEDIR LA SUPERVIVENCIA DE LOS HONGOS USADOS PARA CONTROLAR LA BROCA DEL CAFÉ?

En la búsqueda de alternativas menos dañinas al ambiente y al hombre, en Zamorano, Honduras, se están evaluando algunos métodos de control biológico para las plagas. Para el control de la broca se están haciendo estudios con un hongo (*Beauveria bassiana*) que se ha encontrado atacando en forma natural al insecto.

De este hongo ya existen en el mercado algunos productos comerciales de compañías que lo han aislado del campo y lo han formulado para venderlo como un insecticida natural. Sin embargo, aunque parece ser una alternativa muy prometedora sus resultados en el campo no siempre son tan buenos como se esperaría.

Uno de los problemas que se ha presentado es que el hongo, como todo organismo vivo, es afectado por las condiciones del ambiente. Por la tanto, si no se consigue que este hongo *Beauveria* pueda supervivir en el campo, no podrá ejercer un control efectivo sobre la plaga.

Como la respuesta a la pregunta de cuánto puede supervivir *Beauveria* después de su aplicación es de mucha importancia para mejorar su efectividad en el control, en Zamorano se desarrollaron una serie de experimentos para establecer los procedimientos de campo y laboratorio para medir esta supervivencia.

Para poder hacer estas mediciones, como las esporas del hongo (sus semillas) son microscópicas es necesario recoger los frutos del campo y llevarlos al laboratorio. En el laboratorio se lavan los frutos para remover las esporas y se cultivan en un medio especial. Aproximadamente a los 5 días empieza a verse a simple vista el desarrollo del hongo en el medio.

El estudio determinó los procedimientos necesario para recoger los frutos del campo y realizar el cultivo en el laboratorio. Para el cultivo del hongo artificialmente se determinó que una receta conteniendo cercal, agar y los antibióticos cloranfenicol y dodine, facilitaba el crecimiento del hongo y no permitía la presencia de otros organismos contaminantes (otros hongos y bacterias).

Con estos resultados se espera que en el futuro otros investigadores puedan trabajar para responder a la pregunta de ¿cuánto puede supervivir *Beauveria* en el campo?

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Autoría	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
	Resumen	vii
	Nota de prensa.....	viii
	Contenido.....	ix
	Índice de cuadros.....	x
	Índice de anexos.....	xi
1.	INTRODUCCION GENERAL.....	1
1.1.	Alcance y limitaciones.....	4
2.	DETERMINACION DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	5
2.1.	INTRODUCCION.....	5
2.2.	MATERIALES Y METODOS.....	6
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
2.4.	CONCLUSIONES.....	7
2.5.	RECOMENDACIONES.....	8
3.	ELABORACION DE UN MEDIO SELECTIVO	9
3.1.	INTRODUCCION	9
3.2.	MATERIALES Y METODOS.....	10
3.2.1.	Primera etapa.....	11
3.2.1.1.	Elaboración de los medios.....	12
3.2.1.2.	Procedimiento de colocación del medio en el plato, inoculación de diluciones, incubación y evaluación.....	14
3.2.1.3.	Identificación y determinación de la fuente de contaminación.....	15
3.2.2.	Segunda etapa.....	15
3.2.2.1.	Elaboración del medio y procedimiento de inoculación e incubación.....	15
3.2.2.2.	Tratamientos.....	16
3.2.2.3.	Diseño experimental.....	16
3.2.2.4.	Variables medidas.....	16
3.2.2.5.	Análisis de los datos.....	16
3.2.2.5.1.	Análisis generales y depuración de datos.....	18
3.2.2.5.2.	Selección de modelos explicativos.....	18
3.2.2.5.3.	Pronósticos para recomendación de medios óptimos.....	19

3.2.2.5.3.	Pronósticos para recomendación de medios óptimos.....	19
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	20
3.3.1.	Primera etapa.....	20
3.3.2.	Segunda etapa.....	22
3.3.2.1.	Análisis generales y depuración de datos.....	22
3.3.2.2.	Modelos explicativos.....	23
3.3.2.3.	Uso de pronósticos para la recomendación de medios óptimos....	39
3.4.	CONCLUSIONES.....	40
3.5.	RECOMENDACIONES.....	42
4.	RECOMENDACIONES SOBRE MUESTREO EN EL CAMPO.....	43
4.1	INTRODUCCION.....	43
4.2.	MATERIALES Y METODOS.....	44
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
4.4.	CONCLUSIONES.....	46
4.5.	RECOMENDACIONES.....	47
5.	BIBLIOGRAFIA.....	48
6.	ANEXOS.....	52

INDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Unidades formadoras de colonias (UFC)/ plato petri obtenidas de la inoculación de agua proveniente del lavado de 40 frutos de café.....	7
2.	Recetas básicas y modificadas evaluadas como medios selectivos para aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i> de frutos de café.....	12
3.	Identificación de los organismos contaminantes de cinco platos petri inoculados con la dilución obtenida del lavado de frutos de café asperjados con <i>Beauveria bassiana</i>	21
4.	Espectro antimicrobial de la ciclohexamida y el cloranfenicol.....	21
5.	Cuantiles para las variables UFC, PCB y PCH obtenidos de la evaluación de cloranfenicol, yodine y ciclohexamida en tres dosis para la elaboración de medios selectivos para el aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i>	22
6.	Ajuste y significancia de tres modelos estadísticos para las variables UFC, PCB y PCH.....	24
7.	Valores de los coeficientes significativos ($P < 0.10$) de las variables independientes del modelo polinomial aditivo ajustado a las variables UFC, PCB y PCH.....	25
8.	Coefficientes de correlación múltiple ($R = \sqrt{R^2}$) entre las variables UFC, PCB y PCH y tres grupos de variables.....	36
9.	Tendencia estimada de máxima respuesta para UFC en el día 6.....	39
10.	Tendencia estimada de máxima respuesta para UFC en el día 9.....	39
11.	Tendencia estimada de máxima respuesta para UFC en el día 12.....	40
12.	Dosis de antibióticos y valores máximos estimados de UFC en los días 6, 9 y 12.....	40
13.	Posibles tamaños óptimos de muestra para poblaciones naturales y asperjadas de <i>Beauveria bassiana</i> en tres posibles escenarios de exigencia en la precisión deseada para la estimación de la población.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura

1. Diagrama de flujo de las fases del estudio para la determinación de un medio selectivo para el aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i> de frutos de café.....	11
2. Flujograma decisional sobre evaluación estadística de modelos de análisis multivariado para pronósticos	17
3. Correlaciones simples y parciales (efectos directos e indirectos) entre las variables respuesta y correlaciones parciales (efectos directos) entre los ingredientes y las variables respuesta.....	19
4. Efecto de la ciclohexamida y el dodine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 6.....	26
5. Efecto de la ciclohexamida y el dodine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 9 a tres dosis de cloranfenicol: a) 300 mg/l, b) 400 mg/l, y c) 500 mg/l.....	27
6. Efecto del cloranfenicol y el dodine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 9 a tres dosis de ciclohexamida: a) 0 mg/l, b) 125 mg/l, y c) 250 mg/l.....	28
7. Efecto de la ciclohexamida y el cloranfenicol sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 9 a tres dosis de dodine : a) 300 mg/l, b) 450 mg/l, y c) 600 mg/l.....	29
8. Efecto de la ciclohexamida y el cloranfenicol sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 12 a tres dosis de dodine : a) 300 mg/l, b) 450 mg/l, y c) 600 mg/l.....	30
9. Efecto del cloranfenicol y el dodine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 12 a tres dosis de ciclohexamida: a) 0 mg/l, b) 125 mg/l, y c) 250 mg/l.....	31
10. Efecto de la ciclohexamida y el dodine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 12 a tres dosis de cloranfenicol: a) 300 mg/l, b) 400 mg/l, y c) 500 mg/l.....	32
11. Efecto de la ciclohexamida y el dodine sobre el porcentaje de contaminación por hongos (PCH) a tres dosis de cloranfenicol: a) 300 mg/l, b) 400 mg/l, y c) 500 mg.....	34

12. Efecto de la ciclohexamida y el dodine sobre el porcentaje de contaminación por bacterias (PCB) a tres dosis de cloranfenicol: a) 300 mg/l, b) 400 mg/l, y c) 500 mg.....	35
13. Correlaciones simples y parciales (efectos directos e indirectos) entre las variables respuesta y correlaciones parciales (efectos directos) entre cada ingrediente y cada variable respuesta a niveles constantes de los otros dos ingredientes.....	37
14. Correlaciones simples y parciales (efectos directos e indirectos) entre las variables respuesta y correlaciones parciales (efectos directos) entre cada ingrediente y cada variable respuesta a niveles constantes de todas las otras variables.....	38
15. Fluctuación del coeficiente de variación de acuerdo al número de muestras en poblaciones naturales y asperjadas de <i>Beauveria bassiana</i> en cafetales al sol y a la sombra.....	46

INDICE DE ANEXOS

Anexo

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Análisis de laboratorio para la identificación de organismos contaminantes de la primera fase del experimento para la elaboración de un medio selectivo para el aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i> | 52 |
| 2 | Datos de laboratorio de la segunda fase del experimento para elaboración de un medio selectivo para el aislamiento de <i>Beauveria bassiana</i> | 54 |

1. INTRODUCCION

La broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae), llegó a Honduras en 1977 y al igual que en otros países centroamericanos se convirtió en el principal problema entomológico del cultivo (Quezada y Urbina, 1987). La presencia de la broca ocasiona pérdidas económicas al disminuir el rendimiento y la calidad del producto y al incrementar los costos por las nuevas prácticas agrícolas que es necesario introducir para enfrentar el problema.

Para el combate químico de *H. hampei* el insecticida más utilizado ha sido el endosulfán. Aunque el uso de este producto representa un eficiente e inmediato control, ocasiona problemas de contaminación ambiental, daños a la salud de los trabajadores, residuos tóxicos, desbalance ecológico e inclusive desde Nueva Caledonia se ha reportado el primer caso de resistencia de broca al insecticida (Brun *et al.*, 1989). Todo esto ha llevado a los investigadores a buscar otras formas de control eficaces y que no ocasionen problemas ecológicos y/o económicos.

Una alternativa a la que se ha puesto mucho énfasis es el estudio del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), que ha sido encontrado atacando en forma natural a la broca y que además ha sido usado desde muchos años atrás en Rusia, China y Brasil para controlar plagas del suelo y follaje en varios cultivos (Ferrón, 1981).

La infección causada por *B. bassiana* ocurre primariamente a través de la cutícula. Las conidias germinan en un ambiente de alta humedad y los tubos germinativos penetran la cutícula del insecto e invaden el homocelo. El hospedero muere debido a la deleción de los nutrientes del hemolinfa y/o a la toxemia causada por metabolitos tóxicos del hongo. Posteriormente, bajo condiciones de alta humedad, el hongo emerge y esporula en la superficie del cadaver del insecto. Otros investigadores también han encontrado en algunos insectos efectos subletales o secundarios del hongo como reducción en su fertilidad y fecundidad y disminución en el desarrollo de sus huevos (Faizi, 1978; Zhang & Huang, 1988; Ferron *et al.*, 1991; citados por Feng, *et al.*, 1994)

Experimentos de campo realizados en varios países para evaluar la efectividad de *B. bassiana* en el control de la broca del café muestran resultados muy variables. Esto se debe a que la acción de los entomopatógenos está condicionada por: 1) actividad biológica de la formulación, 2) persistencia de las conidias en el campo, 3) tecnología de aspersión y, 4) la oportunidad de los tratamientos con respecto al ataque de la plaga (Bustillo y Posada, 1996; Lacayo *et al.*, 1994).

La persistencia, es decir la capacidad que muestran las conidias para permanecer viables en el campo, ha sido señalada como la más importante restricción para el uso efectivo del hongo (Daoust y Pereira, 1986); por lo tanto, su estudio es una pieza clave para la selección de cepas mejor adaptadas, de formulaciones mejoradas y de posibles estrategias de aplicación que incrementen la supervivencia del patógeno.

La estabilidad del hongo es afectada por factores abióticos como la temperatura, la radiación solar, la humedad y las sustancias químicas.

El rango óptimo de temperatura para la infección, crecimiento y desarrollo de la mayoría de entomopatógenos oscila entre los 10 y 30°C. Las temperaturas sobre los 35 °C generalmente inhiben el crecimiento y desarrollo de los entomopatógenos y además, la viabilidad de la actividad insecticida del inóculo decrece marcadamente con temperaturas sobre los 50 °C. El efecto de la temperatura también está asociado con el tiempo de exposición a ella. La longevidad de las conidias de *Beauveria bassiana* a diferentes regímenes de temperatura es la siguiente: 1) 900 días de longevidad a una temperatura de entre 5 y 10 °C; 2) 85 días a temperaturas entre 20 y 30 °C; y 3) menos de un día a temperaturas de entre 45 y 50 °C (Ignoffo, 1992).

La luz natural (entre 290 y 400 nm.) es el factor ambiental que más afecta la persistencia de los entomopatógenos. La vida media de los diferentes tipos de inóculo (conidias, esporas, viriones, toxinas) expuestas a la luz natural se estima de una hora en las más sensibles a 96 horas en las más resistentes. La forma en que la luz solar inactiva los patógenos puede ser directa o indirecta. El efecto directo incluye delecciones, uniones cruzadas, ruptura de bandas y formación de sitios lábiles en la molécula de ADN. Los efectos indirectos pueden deberse a la generación de radicales altamente reactivos que al activarse destruyen los entomopatógenos (Ignoffo, 1992).

La vida media de las conidias de la mayoría de hongos entomopatógenos expuestos a luz artificial está en un rango de entre 1 a 4 horas, mientras que a luz natural en las plantas el rango se amplía en incrementa de 4 a 200 horas. La diferencia en vida media se debe a la protección dada por la planta. Para *B. bassiana* la vida media de las esporas expuestas a luz artificial va de 1.9 a 2 horas y a luz natural va de 48 a 72 horas en hojas de soya (Ignoffo, 1992).

Para proteger las esporas del efecto de la radiación solar se han probado con algún éxito formulaciones en aceite y protectores solares como Tinopal LPW (Calcofluor blanco) y emulsiones de arcilla (Inglis, *et al.*, 1995; Velez & Montoya, 1993).

Con relación al efecto de la humedad, éste es difícil de separar de su combinación con otros factores ambientales; sin embargo, puede decirse que es un requerimiento primordial para la germinación de las conidias, la esporulación y la dispersión de las esporas. Para la germinación se requiere de una humedad de alrededor del 70% , para la esporulación en el cadáver se requieren humedades relativas altas y para la diseminación son más favorables las humedades relativas bajas (Ignoffo, 1992; Castillo, *et al.*, 1995).

A nivel de campo todos los factores antes mencionados están actuando en conjunto, sin embargo son pocos los trabajos que se han hecho para evaluar la persistencia de *B. bassiana*. Gardner *et al.* (1977), citados por Velez y Montoya (1998) determinaron una pérdida del 50% de la actividad del patógeno en el follaje de soya entre 5 y 10 días después de la aplicación. En otro experimento en repollo bujo invernadero, para control de *Plutella xylostella*, Shelton *et al.* (1998) encontraron un control mayor al 50% aún 7 días después de la aplicación y detectaron presencia del hongo por un tiempo mayor a dos semanas. En cultivos de café al sol y a la sombra se han encontrado disminuciones de las poblaciones de esporas viables del hongo de entre 37,9% y 95,4 % hasta los 28 días post-aplicación (Velez y Montoya, 1998).

Para la medición de la persistencia del hongo en el campo se han usado tres metodologías: 1) en el campo, exponiendo insectos dentro de mangas entomológicas a plantas aplicadas; 2) en el laboratorio, exponiendo insectos a material aplicado y recogido del campo; y, 3) en el laboratorio, realizando conteo de unidades formadoras de colonias(UFC) del lavado de material recogido del campo (Sponagel,1994; Shelton, *et al.*, 1998; Velez y Montoya, 1998)

En la técnica de las mangas entomológicas, insectos dentro de una manga son expuestos en diferentes tiempos post-aplicación a material aplicado con el hongo. Aunque éste procedimiento tiene lugar directamente en el campo, al usar la manga se puede crear un ambiente artificial que favorezca la persistencia y efectividad del hongo.

En laboratorio, el método de exposición de insectos a material recogido del campo en diferentes tiempos post-aplicación, es posiblemente el más efectivo y preciso de los tres métodos. Desde el momento que se recoge el material del campo se evita que éste siga siendo afectado por las muy variables condiciones ambientales naturales. Sin embargo, se requiere mantener una cría del insecto ya que en el experimento se necesitan siempre individuos de aproximadamente la misma edad.

El método del conteo de las UFC es el más sencillo de los tres métodos. Después de hacer aplicaciones en el campo, se recoge material vegetal y se lleva al laboratorio. Este material es lavado y el agua obtenida o una dilución de ella es inoculada en un medio selectivo que únicamente permite el crecimiento de *B. bassiana*.

El objetivo de este trabajo fue elaborar un protocolo para un estudio de persistencia de *Beauveria bassiana* en el cultivo de café usando la metodología del conteo de UFC. El protocolo incluye : 1) procedimientos de laboratorio; 2) composición del medio selectivo óptimo dependiendo de las posibles condiciones que se tengan en el campo; y, 3) recomendaciones sobre el método de muestreo de frutos.

1.1. ALCANCE Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El estudio realizado se vio limitado por los siguientes factores:

1. Algunas de las recomendaciones sobre los procedimientos de laboratorio se limitan a los primeros muestreos de un estudio de persistencia.
2. Falta de conocimientos de microbiología y farmacología que no permitieron identificar específicamente los contaminantes presentes ni discutir con mayor amplitud los efectos de los antibióticos sobre los organismos.
3. El ensayo de optimización de los medios sólo se realizó una vez y con muestras de frutos de café tomadas de un sólo lugar.
4. Los rangos de dosis usadas en el experimento para la determinación del medio óptimo fueron seleccionadas de observaciones aisladas de la primera fase del estudio, siendo que la metodología de superficie de respuesta exige una serie de ensayos sucesivos para la selección de las dosis de ingredientes a usar en los ensayos.
5. Las conclusiones sobre muestreo no vienen de un ensayo planificado para tal efecto sino que se sirvieron de datos de un ensayo de evaluación de la persistencia que no pudo ser concluido.

2. DETERMINACION DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

2.1. INTRODUCCION

El método de conteo de UFC para la evaluación de la persistencia de *B. bassiana* consta de tres etapas: 1) recolección del material vegetal; 2) procesamiento del material en laboratorio; que incluye su lavado, la realización de diluciones, colocación del inóculo en los platos con medio selectivo y la incubación de los mismos; y, 3) conteo de las UFC.

Después de recoger los frutos del campo, la etapa dos deberá resultar en un plato petri con una cantidad de UFC fácil de contar (con un exponente entre 10^2 o 10^1) y que permita al mismo tiempo evaluar adecuadamente su variabilidad.

Para tener al final dicha cantidad de UFC por plato petri deberá tenerse en la última dilución una concentración adecuada de esporas. Esta concentración dependerá de la cantidad de agua usada para el lavado del material vegetal, del número y valores de las diluciones y de la cantidad de inóculo a colocar en cada plato.

La determinación de la cantidad de agua para el lavado puede hacerse en base al peso del material (relación peso del material en gramos/ volumen de agua en ml) o en otros casos puede usarse una cantidad constante de líquido y lo que se mide es el área de la superficie del material vegetal. El número de diluciones a usar dependerá de la concentración de esporas en el agua de lavado, pero deberá balancearse entre hacer por lo menos una para disminuir la carga contaminante, pero no hacer muchas porque cada dilución añade error experimental. Y finalmente, la cantidad de inóculo a colocar en cada plato dependerá también de la concentración de esporas en la dilución final.

Rivera *et al.* (1994) recomiendan usar una proporción de 1:9 (peso de frutos en g/ volumen de agua en ml) para hacer el lavado de los frutos de café. También recomiendan hacer una dilución de 1 en 100 y colocar 0.1 ml de dicha dilución en cada plato petri.

De un trabajo hecho en soya, Daoust y Pereira (1986) recomiendan medir la superficie de cada hoja, lavarla en 7 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.5% y luego inocular 0.3 ml de esta dilución en cada plato petri. Chase *et al.* (1995) para evaluar la persistencia de *B. bassiana* en hojas de trigo usaron 20 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.05 % por cada hoja, luego hicieron una dilución de 1 en 10 y colocaron finalmente 100 µl de dilución en cada plato petri.

La dificultad en la determinación exacta de las cantidades de agua y diluciones a usar es

en la imposibilidad de hacer un conteo directo de esporas en el hemacitómetro con el agua obtenida del lavado. Esta agua a más de las esporas del hongo contiene esporas de otros microorganismos y materiales contaminantes que son fácilmente confundidas con las esporas del hongo. Por eso es necesario hacer todo el proceso y esperar hasta que las UFC aparezcan en el plato con medio selectivo (medio que permita sólo el crecimiento de *B. bassiana*).

El objetivo de este experimento fue determinar: 1) la cantidad de agua para el lavado de los frutos, 2) el número y valores de las diluciones, y 3) la cantidad de inóculo a colocar por plato petri, para tener al final en el plato petri una cantidad de UFC con un exponente de 10^2 o 10^4 .

2.2. MATERIALES Y METODOS

Los ensayos fueron hechos durante el mes de junio 1998 en la Escuela Agrícola Panamericana "El Zamorano", Honduras. Los trabajos de laboratorio se realizaron en el Centro de Inventario Agroecológico y Diagnóstico del Departamento de Protección Vegetal de frutos recogidos de un cafetal al sol del Departamento de Horticultura.

De una planta de café recién asperjada con *B. bassiana* (Mycotrol®) en una dosis de 1×10^{13} esporas/ha, se recogieron en bolsas plásticas dos muestras de 40 frutos. Los frutos fueron recogidos uno por uno usando pinzas para evitar el contacto de las manos con las esporas. Las muestras se llevaron al laboratorio el mismo día para su procesamiento.

En el laboratorio, en la misma bolsa plástica, una muestra se lavó con 1000 ml y la otra con 100 ml de agua destilada estéril y Tween 20 en una concentración del 0.1 %. Aproximadamente unos 100 ml del agua obtenida del lavado de cada muestra se pasaron a bikers y se hicieron tres diluciones: 1 en 10, 1 en 100 y 1 en 1000.

Para la determinación de la cantidad de inóculo a colocar en cada plato se hizo una prueba inoculando 1 ml, 0.1 ml, 0.001 ml (100 µl) del agua proveniente del lavado de frutos. Se observó si en el plato habían acumulaciones del inóculo en ciertas áreas o si éste goteaba cuando se ponía el plato al revés. Al final se determinó que 100 µl era el volumen más adecuado.

Manteniendo el líquido en constante agitación, se tomaron 100 µl tanto del agua del lavado como de las tres diluciones de las dos muestras y en condiciones asepticas se inocularon en un plato petri con medio selectivo (20 g/l de Gerber baby oatmeal, 20 g/l de bacto-agar, 0.6 g/l de yodine, 1 ml/l de gentomicina). Usando un rastrillo, el inóculo fue distribuido uniformemente en el plato. De cada concentración se inocularon 5 platos petri. Los platos fueron guardados en la cámara de incubación (27 - 29 °C) y a los 6 días se hizo conteo de UFC.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSION

En relación a la cantidad de inóculo a colocar en cada plato petri, se determinó 100 µl como el volumen más apropiado. Con esta cantidad de inóculo la tensión superficial permite al líquido mantenerse en su posición, mientras que con los otros volúmenes (0.1 y 1 ml) hay acumulación de inóculo en ciertas áreas o caída del mismo cuando se pone el plato al revés en la incubadora.

La cantidad de UFC considerada como la más adecuada para la evaluación de la persistencia (exponente de 10^1) fue obtenida usando 100 ml de agua destilada y una dilución 1 en 10, o también con 1000 ml de agua destilada estéril sin la necesidad de hacer dilución (Cuadro 1). Sin embargo, por facilidad de manejo y por la alta cantidad de muestras con las que se necesita trabajar en las evaluaciones de persistencia se recomienda usar los 100 ml para el lavado y la dilución 1 en 10. Generalizando la recomendación podría sugerirse usar 2.5 ml de agua destilada estéril por cada fruto recogido.

Cuadro 1. Unidades formadoras de colonia (UFC)/plato petri obtenidas de la inoculación de agua proveniente del lavado de 40 frutos de café (promedio^a ± error estándar).

Cantidad de agua para el lavado de frutos (ml)	Diluciones del agua de lavado de frutos en agua destilada estéril			
	1:1	1:10	1:100	1:1000
100	966.00 ± 99.20	95.76 ± 11.64	11.00 ± 3.19	1.50 ± 0.64
1000	80.25 ± 8.77	7.5 ± 1.19	1.25 ± 0.48	0.50 ± 0.50

^a promedio de cinco platos petri

Esta recomendación está basada en el número de frutos usados, difiriendo del criterio de Rivera *et al.* (1994) que basan la cantidad de agua a usar en el lavado en el peso de los frutos usados. Además, la recomendación se restringe para los primeros muestreos post-aplicación de *B. bassiana*, puesto que conforme pasan los días, se disminuye la cantidad de esporas en los frutos. Para muestreos posteriores debe ajustarse las diluciones para tratar de mantener una cantidad adecuada de UFC o si no se quiere hacer ajustes, desde el inicio puede trabajarse con una cantidad mayor de UFC (10^1 o 10^3) (Velez y Montoya, 1998).

2.4. CONCLUSIONES

Para frutos recogidos inmediatamente después de la aplicación de *B. bassiana*, la inoculación de 100 µl de una dilución 1 en 10 obtenida de su lavado con un volumen de 2.5 ml agua destilada/fruto, nos permite obtener en el plato petri una cantidad de esporas con un exponente 10^1 . Esta cantidad resulta fácil de contar y permite al mismo tiempo poder observar diferencias entre tratamientos.

2.5. RECOMENDACIONES

1. Comparar los resultados obtenidos determinando la cantidad de agua para el lavado en base al peso y en base al número de frutos.
2. Hacer un experimento para definir las diluciones en cada fecha de muestreo del estudio de persistencia.

3. ELABORACION DE UN MEDIO SELECTIVO

3.1. INTRODUCCION

Un medio selectivo es aquel que permite únicamente el crecimiento de un organismo o tipo de organismos. Estos medios persiguen proveer al organismo deseado de las características óptimas para su desarrollo y al mismo tiempo presentar características adversas para el crecimiento de otros tipos de organismos. En Fitopatología, por ejemplo, es muy común el uso de medios acidificados que permiten el crecimiento de hongos e inhiben la contaminación por bacterias.

Los medios selectivos son usados frecuentemente para el aislamiento de hongos entomopatógenos Hyphomycetes. Estos medios tienen básicamente dos tipos de ingredientes: 1) los que componen el medio basal, cuya función es proveer sostén y nutrientes a las esporas del hongo; y 2) los agentes anticontaminantes.

Para aislar el hongo *B. bassina* según Chase, *et al.* (1986) el mejor medio basal se compone de 20 g/l de cereal y 20 g/l de agar. Rivera, *et al.* (1994) sugieren en cambio Agar Sabourad Dextrosa (SDA) como medio basal.

En los medios selectivos la mayoría de bacterias y Actinomycetes son inhibidos por un bajo pH, y en general, el crecimiento fungoso puede ser favorecido en medios con un pH menor a 5. Sin embargo, en la mayoría de los casos la inhibición de las bacterias ha sido mejor usando agentes antibacteriales. Los agentes antibacteriales más frecuentemente usados incluyen el cloranfenicol, la gentamicina, la tetraciclina y la estreptomycin. Estos agentes pueden ser usados solos o en combinación. El crystal violeta es comunmente usado como un colorante que provee contraste visual para la observación de las colonias, pero también inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas. Los antibióticos deben ser usados con cuidado puesto que pueden inhibir el crecimiento de algunas cepas de hongos (Goettel e Inglis, 1997). Rivera *et al.* (1994) recomiendan usar junto con SDA acidificado el oxiclورو de cobre como bactericida.

La inhibición de hongos contaminantes es mucho más problemática que la bacterial. Hongos de los géneros *Trichoderma*, *Mucor* y *Rhizopus* tiene crecimiento rápido y pueden en el lapso de 2 o 3 días tapar las colonias de Hyphomycetes, haciendo el aislamiento difícil o imposible. Especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* pueden ser también problemáticas ya que son esporuladoras muy prolíficas (Goettel e Inglis, 1997). Beilharz *et al.* (1982) determinaron que el fungicida dodine (n-dodecylguanidina acetato) en un medio basal de cereal y agar (325 a 650 ppm de ingrediente activo) actúa selectivamente para *B.*

bassiana evitando la proliferación de otro tipo de hongos. Disminuyendo la concentración de dodine a 0.46 g/l y añadiendo 0.38 mg/l de benomyl, Chase *et al.* (1986) también obtuvieron buenos resultados aislando *B. bassiana*. Rivera *et al.* (1994) recomiendan el uso de Alto® (cyproconazol) y del oxiclóruo de cobre como fungicidas.

Las recomendaciones sobre composición de medios selectivos para *B. bassiana* varían de un autor a otro y además cada uno de estas recetas puede ser variada dependiendo de las características del sistema en el que se esté evaluando la persistencia del hongo (presencia mayor o menor de bacterias u hongos).

El objetivo de este trabajo fue determinar un medio selectivo para aislar *B. bassiana* de frutos de café y además recomendar posibles variaciones en su composición para que se adapte a otras condiciones de presencia de mayor cantidad y/o diversidad de hongos, bacterias y levaduras.

3.2. MATERIALES Y METODOS

Los ensayos fueron hechos durante el mes de junio 1998 en la Escuela Agrícola Panamericana "El Zamorano", Honduras. Los trabajos se realizaron en el Centro de Inventario Agroecológico y Diagnóstico del Departamento de Protección Vegetal de frutos recogidos de un cafetal al sol del Departamento de Horticultura.

El experimento se realizó en dos etapas. En la primera, se probaron un conjunto de medios, recopilados de la literatura y por recomendación de la empresa Mycotech (fabricante de Mycotrol®, producto comercial de *B. bassiana*). En la segunda fase se trabajó con los tres ingredientes del mejor medio de la primera fase, para la determinación de un medio selectivo óptimo para las condiciones presentes (Figura 1).

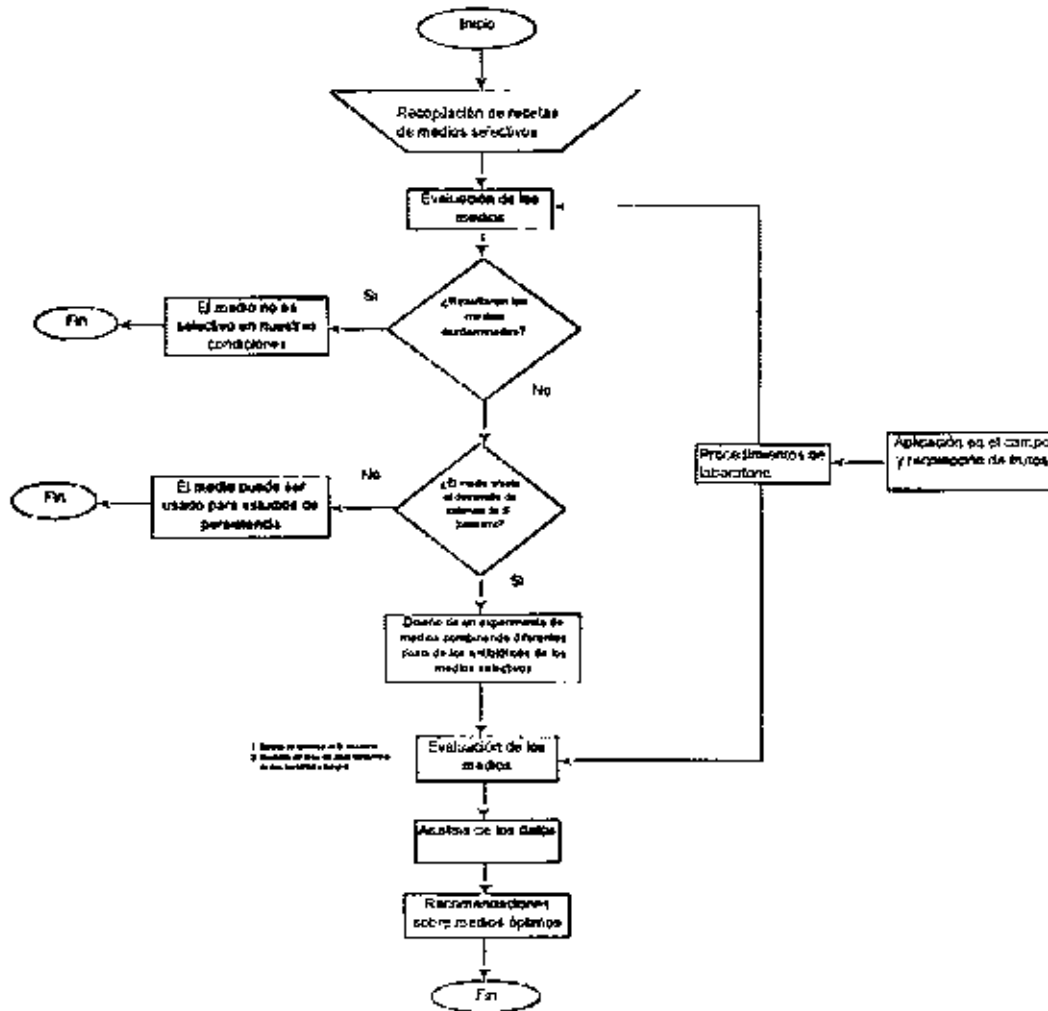


Figura 1. Diagrama de flujo de las fases del estudio para la determinación de un medio selectivo para el aislamiento de *Beauveria bassiana* de frutos de café.

3.2.1. Primera etapa

En esta etapa, en total siete medios básicos y 12 variantes a los mismos fueron probadas (Cuadro I). De cada receta se hicieron 10 platos petri.

Cuadro 2. Recetas básicas y modificadas evaluadas como medios selectivos para el aislamiento de *Beauveria bassiana* de frutos de café.

Receta	Fuente	Modificaciones
ODA ^a + gentamicina	Jaronsky, 1998	7
ODA + estreptomina	Jaronsky, 1998	2
ODA + cloranfenicol + ciclohexamida	Jaronsky, 1999	1
ODA + cloranfenicol + benlate	Jaronsky, 1999	2
SDA ^b + cobre + Alto	Rivera y Lopez, 1992	-
ODA + penicilina + estreptomina	Inglis <i>et al.</i> , 1995	-
PDA ^c + ácido láctico	Ramos, 1998 ^d	-

a cereal dodine agar

b saborad dodine agar

c papa dextrosa agar

d RAMOS, N, 1998. Elaboración de un medio selectivo para hongos. El Zamorano, Hond. Departamento de Protección Vegetal, Escuela Agrícola Panamericana "El Zamorano" (Comunicación personal).

3.2.1.1 Elaboración de los medios

A continuación se presenta los ingredientes y los procedimientos para la elaboración de los medios selectivos evaluados:

Medio ODA + gentamicina

20 g/l cereal para bebé

20 g/l bacto-agar

0.6 g/l dodine (Cyprex 65-W)

1 ml/l gentoncin (sulfato de gentamicina 50 mg/ml)

Se autoclavó el cereal con el agua destilada durante 20 minutos a 15 psi. Se coló la suspensión, se añadió el bacto agar, el dodine y la gentamicina, y se ajustó el volumen a 1 litro. La mezcla se autoclavó nuevamente durante 20 minutos a 15 psi.

Se probaron también las siguientes variantes:

- Aplicación del antibiótico después del autoclavado.
- Incremento de dosis del antibiótico en 5, 10, 25, 50 y 100%.
- Antibiótico más 10 mg/l de cristal violeta.

Medio ODA + sulfato de estreptomina

20 g/l cereal para bebé

20 g/l bacto agar

0.6 g/l dodine (Cyprex 65-W)

10 mg/l de sulfato de estreptomina

Se autoclavó el cereal con el agua destilada durante 20 minutos a 15 psi. Se coló la suspensión, se añadió el bacto agar, el dodine y se ajustó el volumen a 1 litro . La mezcla se autoclavó nuevamente durante 20 minutos a 15 psi. La estreptomina fue añadida en condiciones asépticas cuando el medio estaba enfriando entre los 50 y 55 °C.

Se probaron también las siguientes variantes:

- a) Incremento de la dosis de estreptomina a 30 mg/l
- b) Adición de 10 mg/l de cristal violeta a las dos dosis.

Medio ODA + cloranfenicol y ciclohexamida

20 g/l cereal para bebé
 20 g/l bacto-agar
 0.6 g/l dodine (Cyprex 65-W)
 500 mg/l cloranfenicol
 250 mg/l ciclohexamida

Se autoclavó el cereal con el agua destilada durante 20 minutos a 15 psi. Se coló la suspensión, se añadió el bacto agar, el dodine y se ajustó el volumen a 1 litro . La mezcla se autoclavó nuevamente durante 20 minutos a 15 psi. El cloranfenicol y la ciclohexamida fueron añadidos en condiciones asépticas cuando el medio estaba enfriando entre los 50 y 55 °C.

Medio ODA + cloranfenicol, benlate y cristal violeta

20 g/l cereal para bebé
 20 g/l bacto-agar
 0.3 g/l dodine
 0.25 g/l cloranfenicol
 0.8 mg/l benlate (benomyl 50%)
 10 mg/l cristal violeta

Se autoclavó el germen con el agua destilada durante 20 minutos a 15 psi. Se coló la suspensión, se añadió el bacto agar, el dodine y el benlate y se ajustó el volumen a 1 litro. La mezcla se autoclavó nuevamente durante 20 minutos a 15 psi. El cloranfenicol, la ciclohexamida y el cristal violeta fueron añadidos en condiciones asépticas cuando el medio estaba enfriando, entre los 50 y 55°C.

SDA + Cobre + Alto® (cyproconazol).

SDA (Sabouraud dextrosa agar)

ácido láctico 0.37%

0,4 g/l oxiclورو de cobre

27 microlitros/l Alto 100 SL (cyproconazol)

Los ingredientes en mezcla en un litro de agua destilada se autoclavaron durante 20 minutos a 15 psi.

Medio ODA + penicilina y estreptomicina .

35 g/l cereal agar

5 g/l agar

0.9 g/l yodine

5 mg/l cristal violeta

0.4 g/l penicilina

1 g/l estreptomicina

Se autoclavaron en mezcla el cereal agar, el agar y el yodine en un litro de agua, durante 20 minutos a 15 psi. La penicilina, la estreptomicina y el cristal violeta fueron añadidos en condiciones asépticas cuando el medio estaba enfriando, entre los 50 y 55°C.

Papa dextrosa agar (PDA) + ácido láctico al 25%.

39 g/l PDA

100 gotas/l ácido láctico

Se autoclavaró el PDA en un litro de agua, durante 20 minutos a 15 psi. El ácido láctico se añadió en condiciones asépticas cuando el medio estaba enfriando, entre los 50 y 55°C.

3.2.1.2 Procedimiento de colocación del medio en el plato, inoculación de diluciones, incubación y evaluación.

Bajo la cámara de flujo laminar y en condiciones asépticas se colocó aproximadamente 15-20 ml de medio en cada plato petri. Se esperó que solidificara y se tapó el contorno con papel parafina.

Los platos petri con medio se colocaron 24 horas en la incubadora (27-29 °C) para observar una posible contaminación en el medio .

Después de las 24 horas, en cada plato se inocularon 100 µl de la dilución 1 en 10 obtenida

del lavado de 40 frutos con 100 ml de agua destilada estéril y Tween 20 al 0.1%. Los frutos se recogieron de una planta asperjada con Mycotrol®, en una dosis de 1×10^{13} esporas/ha.

Los platos petri inoculados se colocaron en la incubadora (27-29 °C). La evaluación se hizo a los 4 y 5 días, observando en el plato la presencia de UFC de *B. bassiana* o de hongos y bacterias contaminantes. Se eliminaron los medios en los que la contaminación era en promedio mayor al 20%.

3.2.1.3. Identificación y determinación de la fuente de contaminación.

Para la identificación de los contaminantes, de los diferentes medios probados, se tomó una muestra al azar de cinco platos petri inoculados y contaminados. La identificación de los contaminantes y el análisis de coloración de Gram fue realizada en el laboratorio de CESCO (Centro de Estudios y Control de Contaminantes) de Tegucigalpa (Anexo 1).

Para determinar la fuente de contaminación, se realizó un ensayo para averiguar si ésta venía del campo en los frutos, de alguno de los ingredientes, o del ambiente del laboratorio.

Cada una de las siguientes sustancias fue inoculada sobre cinco platos petri con medio ODA+ sulfato de estreptomicina y cristal violeta:

- Agua destilada estéril
- Agua más la formulación de *B. bassiana* (Mycotrol®)
- Agua más Tween 20 al 0.1%
- Agua de la dilución obtenida del lavado de los frutos.

3.2.2. Segunda etapa

En esta fase se diseñó un experimento con los ingredientes del medio ODA + cloranfenicol y ciclohexamida. Se escogió este medio porque fue el único que presentó en la primera etapa contaminaciones de hongos y bacterias menores al 20% , y se decidió probar con diferentes niveles de los ingredientes para superar los problemas de bajo crecimiento de UFC que presentó inicialmente.

3.2.2.1. Elaboración de medio y procedimiento de inoculación e incubación.

La elaboración del medio y el procedimiento fueron idénticos a los usados en la primera etapa para el medio ODA + cloranfenicol y ciclohexamida.

3.2.2.2. Tratamientos

Los 27 tratamientos fueron todas las combinaciones posibles de las tres dosis de los ingredientes dodine, cloranfenicol y ciclohexamida.

Las dosis de dodine usadas fueron: 0.6 g/l, 0.45 g/l y 0.3 g/l. El primer nivel fue la misma concentración recomendada para el medio en la etapa anterior. Los otros dos niveles se escogieron en base a la recomendación hecha por Chase, *et al.* (1986), quienes recomiendan usar siempre niveles de dodine mayores a 0,32 g/l.

Las dosis de cloranfenicol utilizadas fueron: 500 mg/l, 400 mg/l y 300 mg/l. El primer nivel fue la misma concentración usada en este medio en la etapa anterior. La menor concentración fue la usada en el medio ODA + cloranfenicol, benlate y cristal violeta en el que se observó cierto grado de control de las bacterias. El nivel de 400 g/l es el intermedio del primer y tercer nivel.

Las tres dosis de ciclohexamida empleadas fueron: 250 mg/l, 125 mg/l y 0 mg/l. El primer nivel fue la misma concentración usada en este medio en la etapa anterior. Se probaron también una concentración de 0 mg/l para ver que pasaba en ausencia de este ingrediente y una dosis intermedia.

3.2.2.3. Diseño experimental

Se usó un arreglo factorial de 3^3 en un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. La metodología empleada en este experimento también se conoce como ajuste de superficies de respuestas.

3.2.2.4. Variables medidas

A los 6, 9 y 12 días después de la inoculación de los plato petri se evaluaron las siguientes variables:

1. Cantidad de UFC por plato petri.
2. Porcentaje del área del plato petri contaminada por hongos (PCH).
3. Porcentaje del área del plato petri contaminada por bacterias (PCB).

3.2.2.5. Análisis de los datos.

El análisis estadístico fue realizado usando varias metodologías progresivas y complementarias (Figura 1). Para los cálculos se utilizó el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1985).

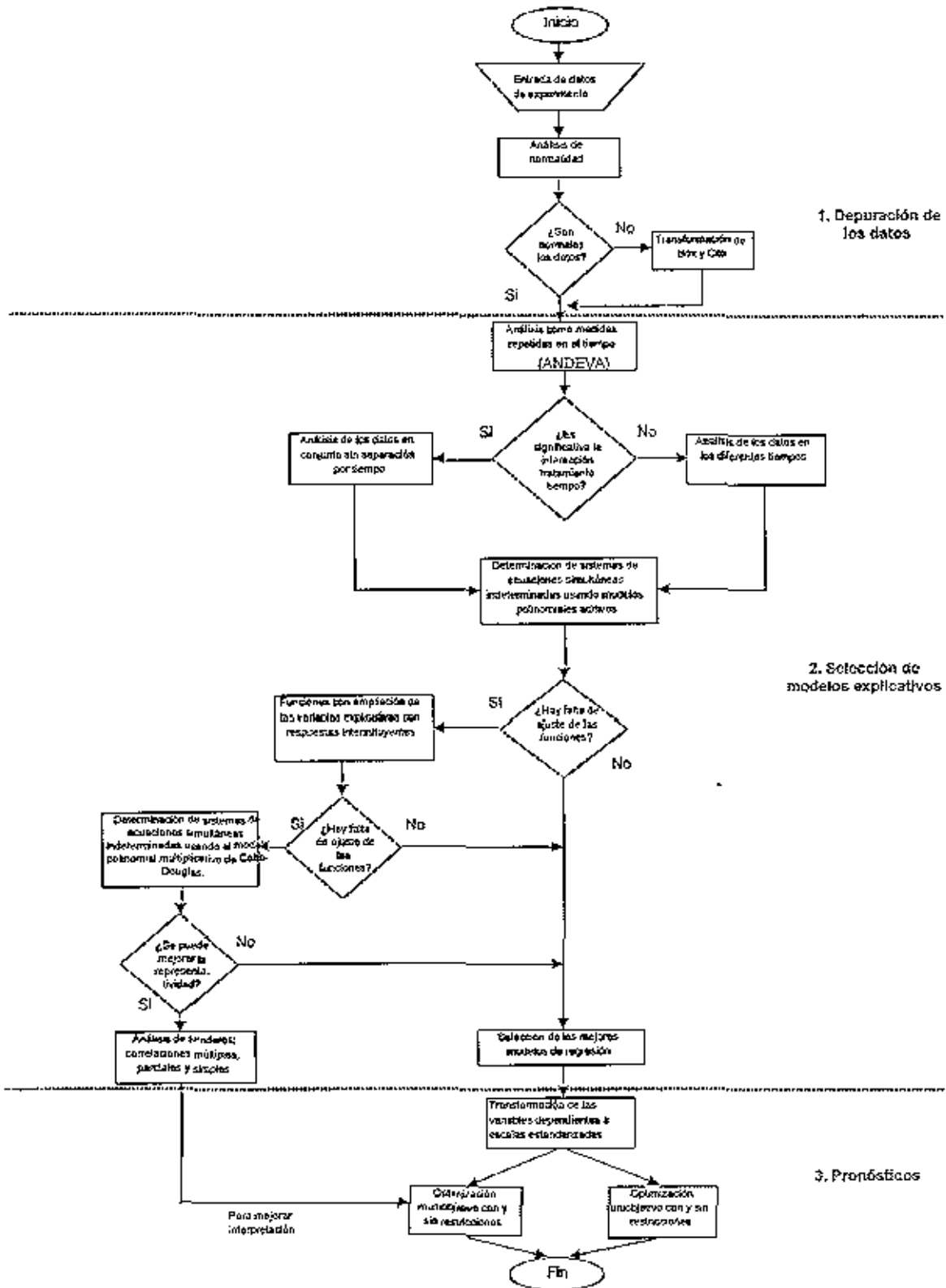


Figura 2. Flujograma decisional sobre evaluación estadística de modelos de análisis multivariado para pronósticos de medios óptimos para aislamiento de *Beauveria bassiana* de frutos de café.

3.2.2.5.1. Análisis generales y depuración de los datos

Primero se analizó la normalidad de los datos y se aplicó el método de Box y Cox¹ para la elección de la mejor transformación de las variables de respuesta. En las tres variables dependientes: UFC, PCH y PCB se aplicó la siguiente transformación:

$$f(y) = [\log(y+1)] \quad [1]$$

El efecto del tiempo (días de muestreo) y de los tratamientos fue analizado usando un análisis de varianza factorial (ANDEVA), con tratamientos y tiempo como factores fijos.

3.2.2.5.2. Selección de modelos explicativos

Se determinó un sistema de ecuaciones simultáneas usando funciones polinómicas aditivas con los términos lineales, cuadráticos y las interacciones simples de las variables independientes. Las funciones usadas fueron de la siguiente forma:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_1^2 + \beta_5 x_2^2 + \beta_6 x_3^2 + \beta_7 x_1 x_2 + \beta_8 x_1 x_3 + \beta_9 x_2 x_3 \quad [2]$$

En donde:

y = UFC, PCB o PCH

x₁ = cloranfenicol

x₂ = ciclohexamida

x₃ = dódine.

En búsqueda de un mayor ajuste de las funciones de PCB y PCH, se amplió las variables explicativas con las variables respuesta, bajo la hipótesis de que éstas eran interinfluyentes. Es decir, en la Ecuación 2 se incluyó, con los términos lineales, cuadráticos y las interacciones simples las variables:

x₄ = UFC

x₅ = PCB o PCII (dependiendo de cual era en ese momento la variable dependiente)

Se ajustó también las funciones al modelo multiplicativo de Cobb- Douglas, bajo la hipótesis de una potenciación del efecto de los ingredientes con dosis incrementales (Freund y Littell, 1992). El modelo mencionado es el siguiente:

$$y = e^{\beta_0} x_1^{\beta_1} x_2^{\beta_2} x_3^{\beta_3} \quad [3]$$

¹ CAÑAS, L. 1998. Método de Box y Cox para transformación de variables respuesta. El Zamorano, Hond. Departamento de Protección Vegetal, Escuela Agrícola Panamericana "El Zamorano" (Comunicación personal).

La optimización uniojetivo y restringida fue realizada en el programa estadístico SAS con el procedimiento "PROC RSREG", que calcula la superficie de respuesta, y el comando "RIDGE" que hace el análisis de las tendencias hacia los máximos o mínimos (Freund y Littell, 1992). Los demás procedimientos de optimización se realizaron con el programa matemático EUREKA, usando las mejores regresiones calculadas.

3.2. RESULTADOS Y DISCUSION

3.3.1. Primera etapa.

Los medios SDA+ cyproconazol y oxiclortuoro de cobre y PDA+ ácido láctico resultaron totalmente contaminados tanto por hongos como por bacterias.

Las recetas conteniendo ODA no presentaron en ninguno de los casos problemas de contaminación con hongos. El fungicida dodine actuó muy bien inhibiendo su crecimiento en las tres dosis usadas: 0.3, 0.6 y 0.9 g/l. Chase *et al.* (1986), obtuvieron también resultados de inhibición de hongos contaminantes con dosis de dodine mayores a 0.32 g/l en medios con avena agar.

Con relación a la contaminación por bacterias, sólo en los dos medios conteniendo cloranfenicol se obtuvo controles aceptables. El medio ODA+ cloranfenicol (500 mg/l) y ciclohexamida presentó porcentajes de contaminación menores al 5%; mientras que el medio ODA + cloranfenicol (250 mg/l), benlate y cristal violeta presentó contaminaciones entre 20 y 30%.

Aunque la literatura los cita como selectivos, los medios conteniendo otros antibióticos (penicilina, estreptomina y gentamicina) resultaron con altos grados de contaminación bacterial. Esto puede deberse a las diferentes condiciones ecológicas presentes en cada lugar y cultivo y que dan lugar a la presencia de diversos tipos de organismos con variables niveles de susceptibilidad a los antibióticos.

No se descarta tampoco la posibilidad del uso de antibióticos en mal estado, aunque tanto para estreptomina como para gentamicina las dosis incrementales fueron hechas usando frascos diferentes.

Del análisis de laboratorio para la identificación de los contaminantes hecho por CESCO se determinó que las contaminantes predominantes eran las bacterias gramnegativas y las bacterias grampositivas. En uno de los platos se encontraron también levaduras (Cuadro 3).

Cuadro 3. Identificación de los organismos contaminantes de cinco platos petri inoculados con la dilución obtenida de frutos de café asperjados con *Beauveria bassiana*.

Organismo contaminante	Número de colonias
Bacterias:	
Cocos Gram +	4
Cocos Gram -	6
Cocobacilos Gram -	1
Levaduras:	1

Estos resultados explican la ineffectividad de la estreptomycinina ya que este antibiótico es prácticamente inactivo frente a cocos grampositivos y negativos (Lab. NORMON, 1990).

Los rangos conocidos de actividad antimicrobial de la ciclohexamida y el cloranfenicol (Cuadro 4), que cubren muy bien a los contaminantes presentes, explica los buenos resultados obtenidos con el medio conteniendo estos antibióticos.

Cuadro 4. Espectro antimicrobial de la ciclohexamida y el cloranfenicol.

Organismo	Ciclohexamida	Cloranfenicol
Bacterias:		
Gram +	0	2
Gram -	0	3
Hongos:		
Patógenos de plantas	2	0
Patógenos de animales	1	0
Saprófitos	2	0
Levaduras	3	0

Clave:
 0: Crecimiento completo
 1: Efecto en solo algunos
 2: Efecto en muchos
 3: Efecto en la mayoría

Fuente: Goldberg y Luckey (1959), adaptado por el autor.

De los dos medios conteniendo cloranfenicol, ODA + cloranfenicol y ciclohexamida, aunque presentó bajos porcentajes de contaminación, no permitió un buen crecimiento de UFC de *B. bassiana*; en cambio, ODA + cloranfenicol, bentea y cristal violeta permitió un mejor desarrollo de UFC, pero al mismo tiempo niveles mayores de contaminación. Las dosis incrementales de yodine (de 0.3 a 0.6 g/l) y de cloranfenicol (de 250 a 500 mg/l) más el efecto de la ciclohexamida parecen actuar inhibiendo la contaminación, y al mismo tiempo el crecimiento de UFC de *B. bassiana*. Esto contradice lo expresado por Chase *et al.* (1986) quienes concluyeron que dosis de yodine entre 0.32 y 0.62 g/l no influyen en la recuperación de *B. bassiana*; también son contrarios a lo expuesto en Goldberg y Luckey (1959), quienes

cloranfenicol no tiene prácticamente ningún efecto sobre hongos. De por medio queda la posibilidad de algún tipo de sinergia entre los ingredientes o de actividad antibiótica más amplia al incrementar las concentraciones de los mismos.

Los resultados antes mencionados sirvieron de base para la segunda etapa del estudio. Lo que se buscaba en esta segunda fase era un medio que permitiera al mismo tiempo bajos porcentajes de contaminación y una alta recuperación de *B. bassiana*.

En el ensayo para la identificación de la fuente de contaminantes sólo los platos petri inoculados con dilución del agua obtenida del lavado de los frutos resultaron contaminados. Es decir, que la fuente de contaminación bacteriana venía del campo en los frutos de café.

3.3.2. Segunda etapa

3.3.2.1. Generalidades

Aunque los valores observados de las tres variables estudiadas fluctuaron entre rangos relativamente amplios, en todos los casos, los datos tendieron a concentrarse en valores bajos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Cuantiles para las variables UFC¹, PCB² y PCH³ obtenidos de la evaluación de cloranfenicol, dodine y ciclohexamida en tres dosis para la elaboración de medios selectivos para el aislamiento de *Beauveria bassiana*

UFC (unidades)	PCB (%)	PCH (%)	Cuantiles
197	15	80	100% (máximo)
116	0.8	0.7	75%
16	0	0	50% (mediana)
0	0	0	25%
0	0	0	0% (mínimo)

¹ Unidades formadoras de colonias

² Porcentaje de contaminación por hongos

³ Porcentaje de contaminación por hongos.

Lo anterior nos lleva a concluir que en general, en el experimento, los valores de PCB y PCH se mantuvieron dentro de los límites aceptables (menos del 10%); sin embargo, la mayoría de valores UFC no alcanzaron el valor mínimo aceptable (100 UFC/plato petri). Más específicamente, el rango máximo de contaminación del 10% sólo fue superado en el 1% de los casos en PCB y en 3.7% en PCH. Para UFC únicamente el 27.2% de los valores superaron las 100 UFC.

Del ANDEVA para determinar el efecto del tiempo (días de muestreo) se determinó que para las variables PCB y PCH, la interacción entre tratamiento y tiempo era significativa, por lo

que los demás análisis fueron hechos sólo para el día 9 que es el de mayor contaminación; mientras que para la variable UFC en la que dicha interacción sí resultó significativa, los demás análisis se hicieron para cada día.

3.3.3.2. Modelos explicativos de la variación de UFC, PCB y PCH.

Para las tres fechas (6, 9 y 12 días) en que se analizó, la variable UFC presentó un muy buen ajuste ($R^2 > 0.82$) al modelo polinomial aditivo propuesto (Ecuación 2). Para las variables PCB y PCH el ajuste para el mismo modelo resultó bajo (Cuadro 6).

Al incluir UFC y PCB o PCH como variables explicativas en la Ecuación 2, los ajustes a los modelos no se incrementaron significativamente (Cuadro 6). Aunque parece razonable pensar que el crecimiento de un organismo afecta al crecimiento de otro, parece ser que a los niveles bajos de crecimiento observados esto no sucede, teniendo mayor influencia en el desarrollo de *B. bassiana* la composición del medio. Si por ejemplo, se tuvieran PCB de un 80%, esto afectaría el desarrollo de los hongos contaminantes y de las colonias de *B. bassiana*.

Los ajustes de las variables PCB y PCH al modelo multiplicativo de Cobb- Douglas (Ecuación 3) resultaron menores que los ajustes a los modelos aditivos (Cuadro 6). Esta falta de ajuste sugiere que no hay una potenciación simultánea de los tres ingredientes en el control de los contaminantes.

En general, la falta de ajuste de las funciones estudiadas a las variables PCB y PCH pudo deberse a que las especies de contaminantes presentes en el experimento escapaban el espectro de control de los antibióticos empleados, en el rango de dosis usadas, o también a una mala identificación de las variables respuesta. Las funciones ajustadas para estas dos variables sólo explicarían la variabilidad de los contaminantes sobre los cuales los antibióticos sí tienen efecto.

Cuadro 6. Ajuste y significancia de tres modelos estadísticos para las variables UFC^a, PCB^b y PCH^c.

Modelo usado para la regresión	Variable dependiente	R ² de la regresión	P > F para la regresión
Polinomial aditivo ^d	UFC (día 6)	0.99	0.0001
	UFC (día 9)	0.82	0.0001
	UFC (día 12)	0.87	0.0001
	PCB	0.38	0.0001
	PCH	0.44	0.0001
Polinomial aditivo ampliado ^e	PCB	0.36	0.0001
	PCH	0.40	0.0001
Multiplicativo de Cobb-Douglas ^f	PCB	0.25	0.0001
	PCH	0.30	0.0001

a. Unidades formadoras de colonias.

b. Porcentaje de contaminación por bacterias.

c. Porcentaje de contaminación por hongos.

d. $y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_4 + \beta_5x_5 + \beta_6x_6 + \beta_7x_7 + \beta_8x_8 + \beta_9x_9 + \beta_{10}x_{10} + \beta_{11}x_{11} + \beta_{12}x_{12} + \beta_{13}x_{13} + \beta_{14}x_{14} + \beta_{15}x_{15} + \beta_{16}x_{16} + \beta_{17}x_{17} + \beta_{18}x_{18} + \beta_{19}x_{19} + \beta_{20}x_{20} + \beta_{21}x_{21} + \beta_{22}x_{22} + \beta_{23}x_{23} + \beta_{24}x_{24} + \beta_{25}x_{25} + \beta_{26}x_{26} + \beta_{27}x_{27} + \beta_{28}x_{28} + \beta_{29}x_{29} + \beta_{30}x_{30} + \beta_{31}x_{31} + \beta_{32}x_{32} + \beta_{33}x_{33} + \beta_{34}x_{34} + \beta_{35}x_{35} + \beta_{36}x_{36} + \beta_{37}x_{37} + \beta_{38}x_{38} + \beta_{39}x_{39} + \beta_{40}x_{40} + \beta_{41}x_{41} + \beta_{42}x_{42} + \beta_{43}x_{43} + \beta_{44}x_{44} + \beta_{45}x_{45} + \beta_{46}x_{46} + \beta_{47}x_{47} + \beta_{48}x_{48} + \beta_{49}x_{49} + \beta_{50}x_{50} + \beta_{51}x_{51} + \beta_{52}x_{52} + \beta_{53}x_{53} + \beta_{54}x_{54} + \beta_{55}x_{55} + \beta_{56}x_{56} + \beta_{57}x_{57} + \beta_{58}x_{58} + \beta_{59}x_{59} + \beta_{60}x_{60} + \beta_{61}x_{61} + \beta_{62}x_{62} + \beta_{63}x_{63} + \beta_{64}x_{64} + \beta_{65}x_{65} + \beta_{66}x_{66} + \beta_{67}x_{67} + \beta_{68}x_{68} + \beta_{69}x_{69} + \beta_{70}x_{70} + \beta_{71}x_{71} + \beta_{72}x_{72} + \beta_{73}x_{73} + \beta_{74}x_{74} + \beta_{75}x_{75} + \beta_{76}x_{76} + \beta_{77}x_{77} + \beta_{78}x_{78} + \beta_{79}x_{79} + \beta_{80}x_{80} + \beta_{81}x_{81} + \beta_{82}x_{82} + \beta_{83}x_{83} + \beta_{84}x_{84} + \beta_{85}x_{85} + \beta_{86}x_{86} + \beta_{87}x_{87} + \beta_{88}x_{88} + \beta_{89}x_{89} + \beta_{90}x_{90} + \beta_{91}x_{91} + \beta_{92}x_{92} + \beta_{93}x_{93} + \beta_{94}x_{94} + \beta_{95}x_{95} + \beta_{96}x_{96} + \beta_{97}x_{97} + \beta_{98}x_{98} + \beta_{99}x_{99} + \beta_{100}x_{100}$

x₁, x₂ y x₃ (cloranfenicol, ciclohexamida y dclidina)

y (UFC, PCB o PCH)

e. Se amplía 1 con PCH y PCH como variables independientes.

f. $y = a \cdot x_1^{b_1} \cdot x_2^{b_2} \cdot x_3^{b_3}$

Efecto de los antibióticos sobre UFC

La selección de los modelos de regresión con las variables cuyo aporte al poder predictivo es significativo ($P < 0.10$), nos permite evaluar el efecto de cada uno de los ingredientes en las variables respuesta (Cuadro 7) (Figuras 1-13).

Cuadro 7. Valores de los coeficientes significativos ($P < 0.10$) de las variables independientes del modelo polinomial aditivo^a ajustado a las variables UFC^b, PCB^c y PCH^d.

Variable independiente	Variable dependiente ^e				
	UFC (día 6)	UFC (día 9)	UFC (día 12)	PCH	PCB
Intercepto	4.14949	5.47720	-1.36801	0.00671	4.84633
Cloranfenicol		-0.02134			
Ciclohexamida	-0.05437	-0.02109		-0.01971	-0.02037
Dodine	0.00263	0.02032	0.03194	14.68535	
(Cloranfenicol) ²		0.00003		-0.000002	
(Ciclohexamida) ²	0.00013		-0.00003	0.00003	0.00003
(Dodine) ²	-0.000006	-0.00003	-0.00004	-22.13122	
Dodine x cloranfenicol					-0.01329
Dodine x ciclohexamida	0.00001	0.00001		0.01743	0.01512
Cloranfenicol x ciclohexamida			-0.00001		

^a $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_5 x_5 + \beta_6 x_1^2 + \beta_7 x_2^2 + \beta_8 x_3^2 + \beta_9 x_4^2 + \beta_{10} x_5^2 + \beta_{11} x_1 x_2 + \beta_{12} x_1 x_3 + \beta_{13} x_1 x_4 + \beta_{14} x_1 x_5 + \beta_{15} x_2 x_3 + \beta_{16} x_2 x_4 + \beta_{17} x_2 x_5 + \beta_{18} x_3 x_4 + \beta_{19} x_3 x_5 + \beta_{20} x_4 x_5$

^b $x_1, x_2, y = d$ (cloranfenicol, ciclohexamida y dodine)

^c y (UFC, PCB o PCH)

^d Unidades formadoras de colonias.

^e Porcentaje de contaminación por bacterias.

^f Porcentaje de contaminación por hongos.

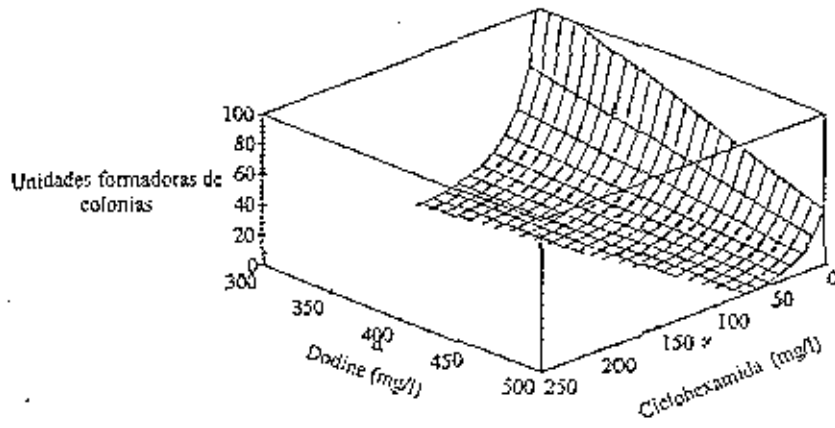
^g Transformadas según la ecuación: $f(y) = \log((y + 100) / (y_{max} + 1))$

Para la variable UFC el ingrediente que tiene mayor efecto es la ciclohexamida. En los tres días en que se evaluó la función, a dosis incrementales de ciclohexamida hay una marcada disminución de UFC (Figuras 4, 5, 7, 8 y 9). En el día 6, en la dosis más baja de dodine (300 mg/l), con apenas 125 mg/l de ciclohexamida se inhibe por completo el desarrollo de UFC (Figura 4). Además, a dosis incrementales de ciclohexamida el efecto de los otros dos ingredientes tiene menor influencia (Figura 6).

Siguiendo en importancia, con relación al efecto detrimental sobre UFC, tenemos al dodine. Su efecto en el día 6 comienza con aproximadamente 320 mg/l y en el día 9 y 12 con 400 mg/l, sin embargo este efecto disminuye conforme se incrementan las dosis de ciclohexamida (Figuras 4, 5, 6, 9 y 10). El cloranfenicol es el ingrediente que menos afecta esta variable; en el día 6 no aparece en la función y en los subsiguientes días tiene apenas un leve efecto en la variabilidad de las colonias de *B. bassiana* (Figuras 4, 6, 7, 8 y 9).

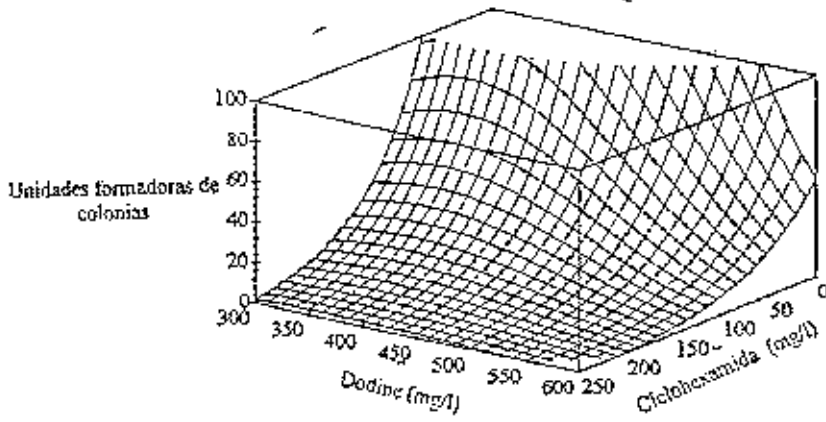
Estos últimos resultados contradicen nuevamente lo expresado por Chase *et al.* (1986) quienes concluyeron que dosis de dodine entre 0.32 y 0.62 g/l no influyen en la recuperación de *B. bassiana* y son contrarios también a lo expuesto en Goldberg y Luckey (1959),

quienes afirman que ciclohexamida tiene poco efecto sobre hongos patógenos de animales.

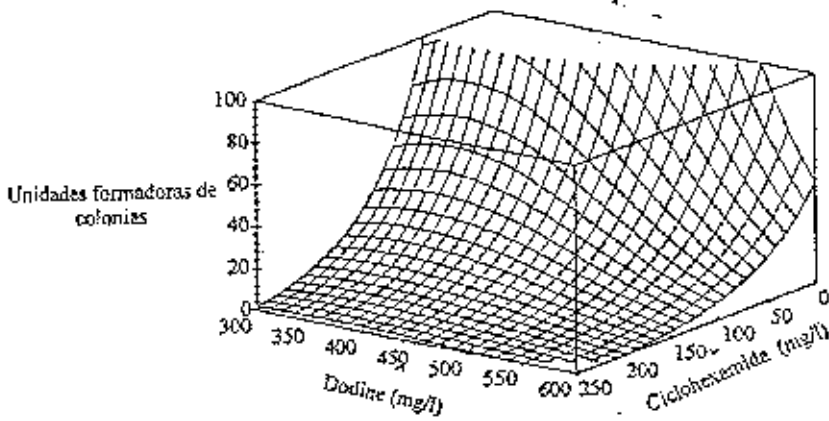


a)

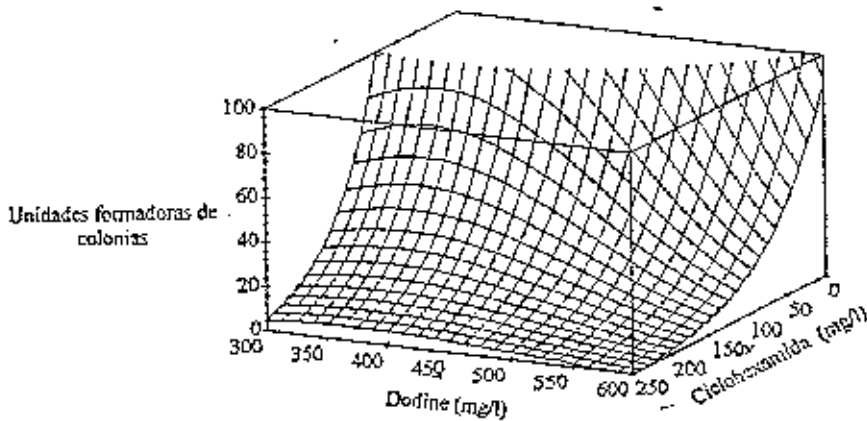
Figura 4. Efecto de la ciclohexamida y el yodine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 6.



a)

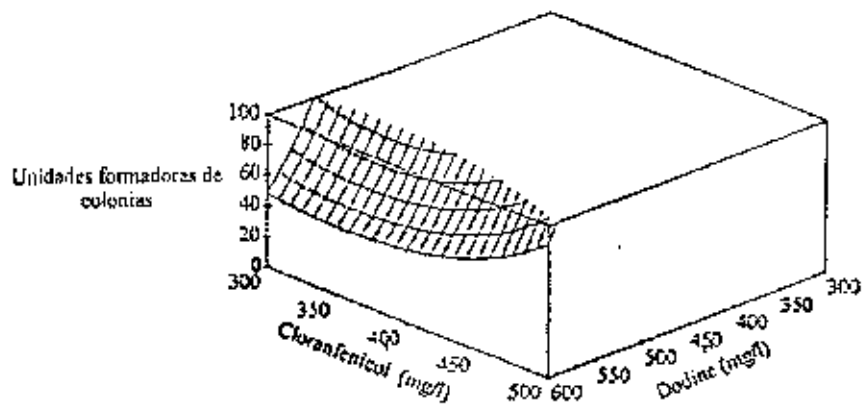


b)

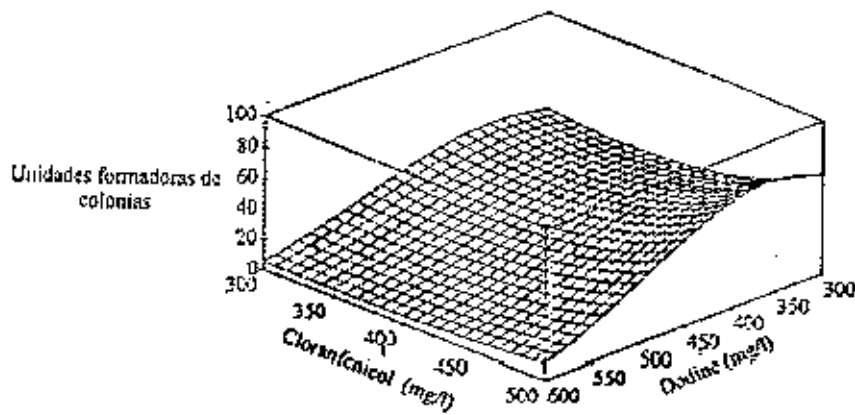


c)

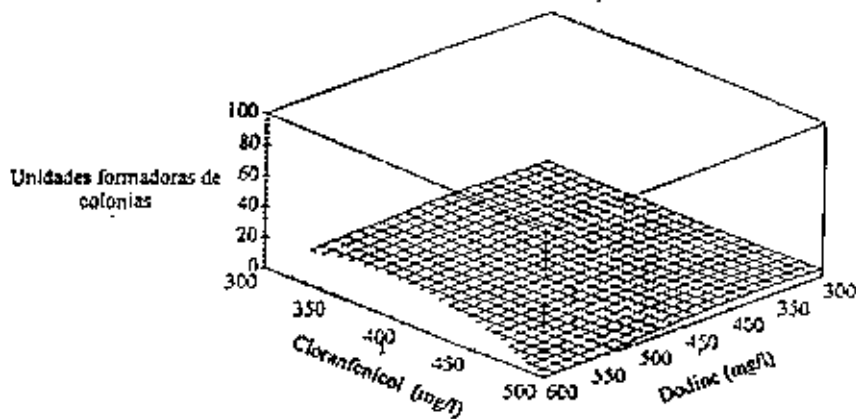
Figura 5. Efecto de la ciclohexamida y el dordine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 9 a tres dosis cloranfenicol: a) 300 mg/l, b) 400 mg/l, y c) 500 mg/l.



a)



b)



c)

Figura 6. Efecto del cloranfenicol y el dodine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 9 a tres dosis de ciclohexamida: a) 0 mg/l, b) 125 mg/l y c) 250 mg/l.

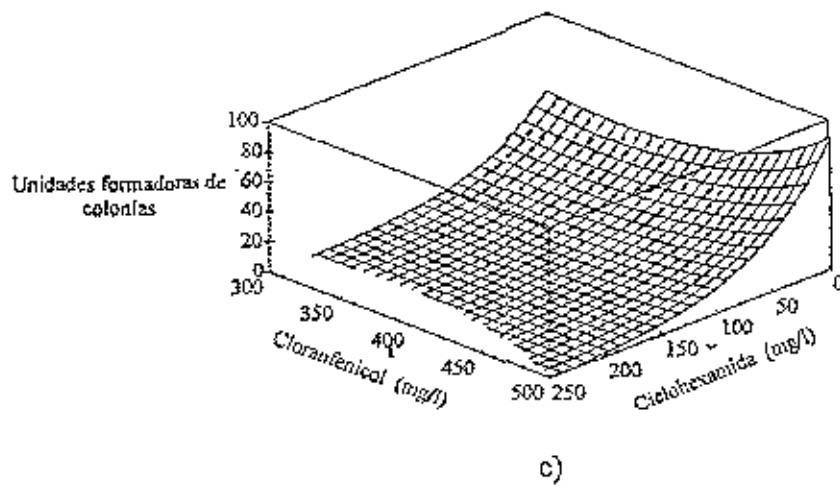
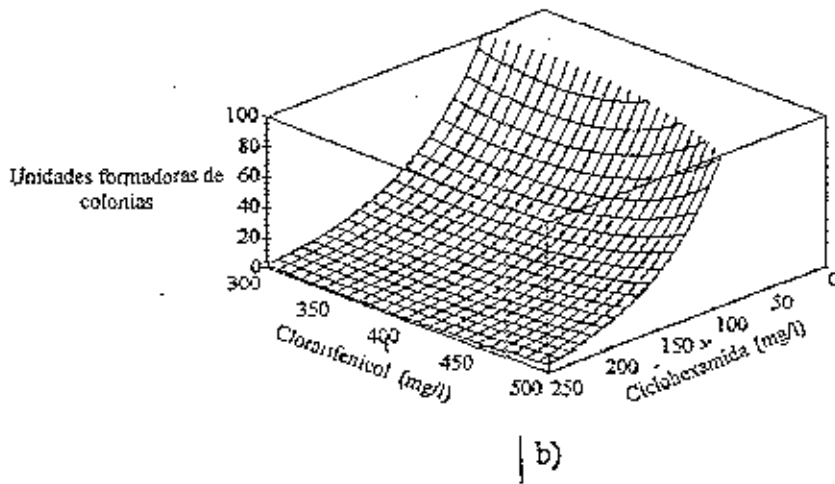
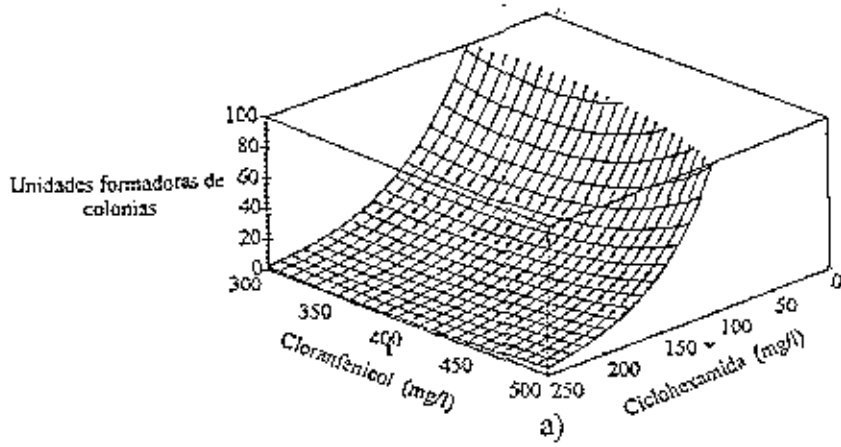
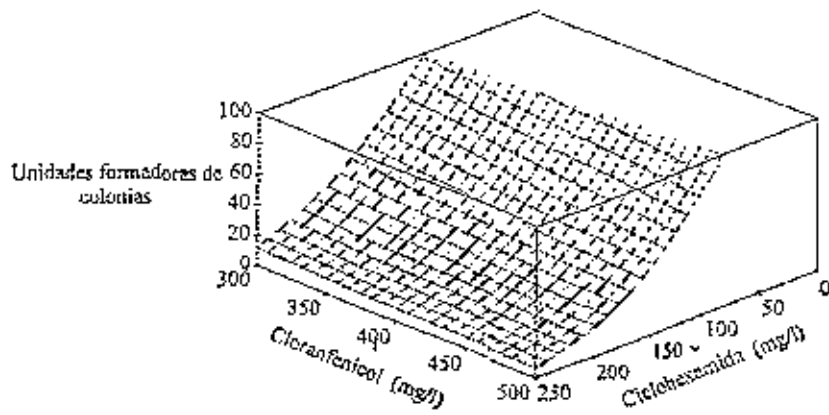
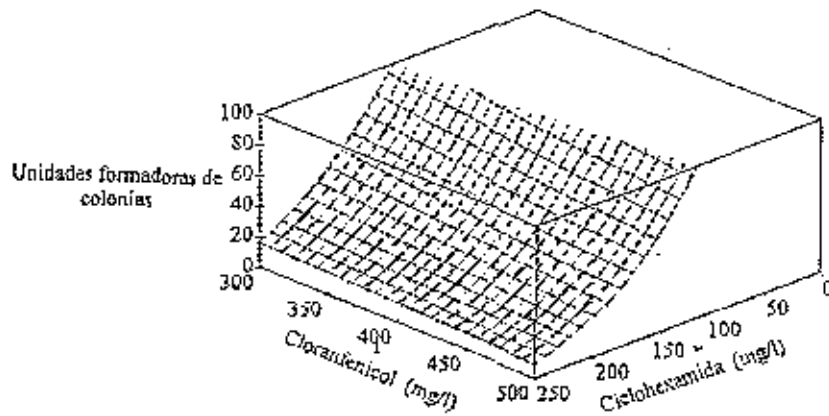


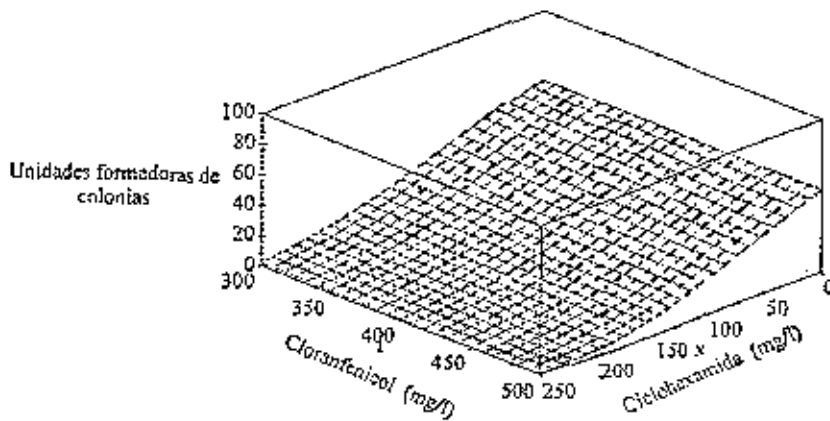
Figura 7. Efecto de la ciclohexamida y el cloranfenicol sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 9 a tres dosis de dodecine : a) 300 mg/l, b) 450 mg/l, y c) 600 mg/l.



a)



b)



c)

Figura 8. Efecto de la ciclohexamida y el cloranfenicol sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 12 a tres dosis de yodine : a) 300 mg/l, b) 450 mg/l y c) 600 mg/l.

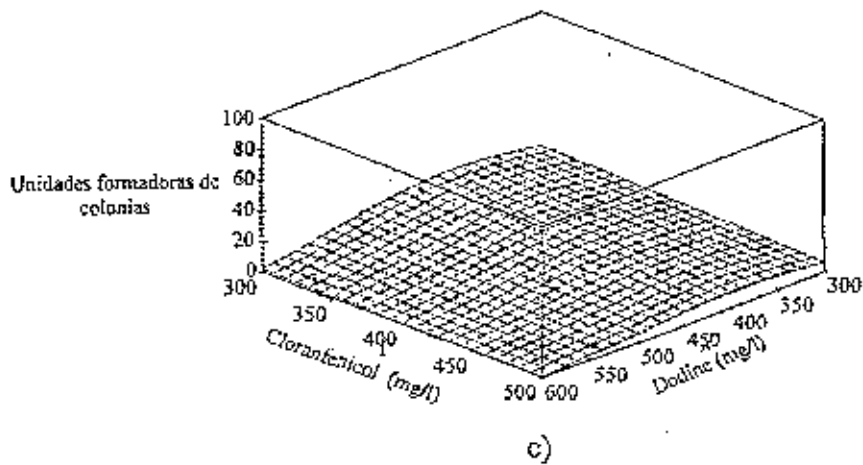
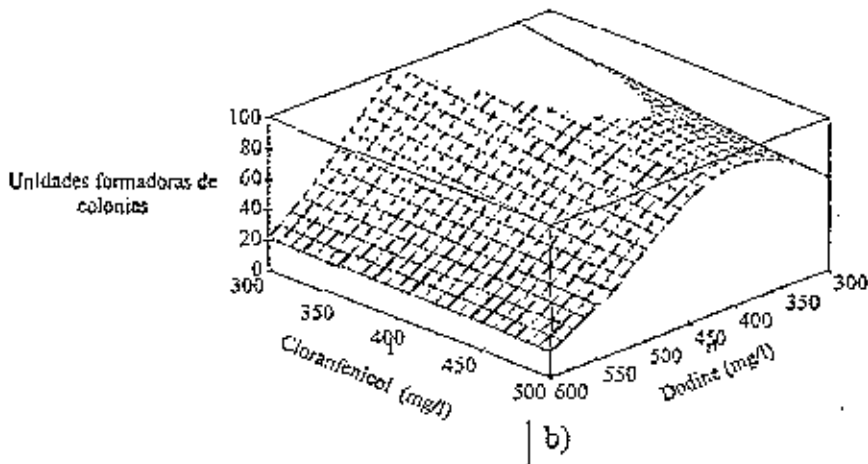
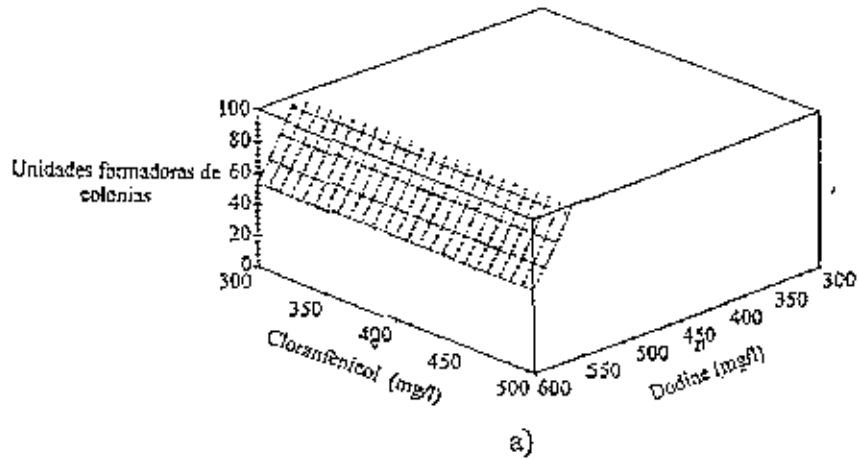


Figura 9. Efecto del cloranfenicol y el dodine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 12 a tres dosis de ciclohexamida: a) 0 mg/l, b) 125 mg/l y c) 250 mg/l.

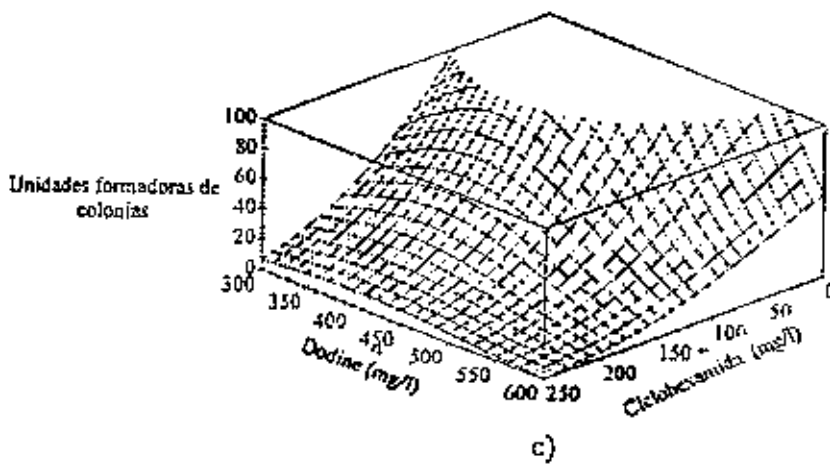
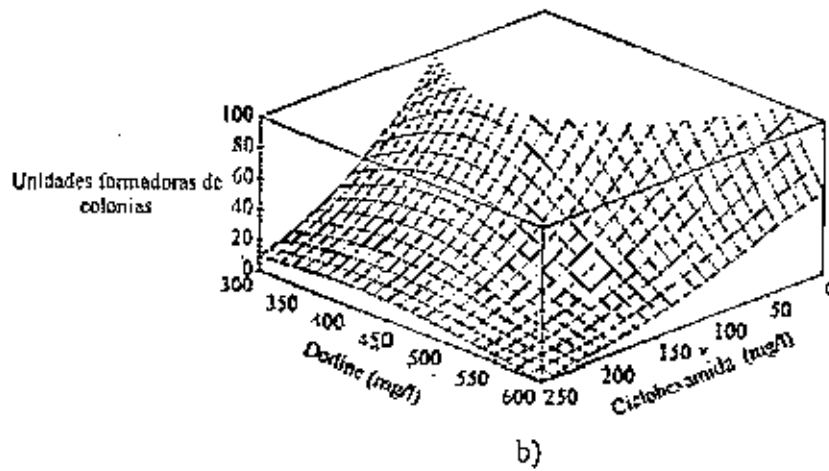
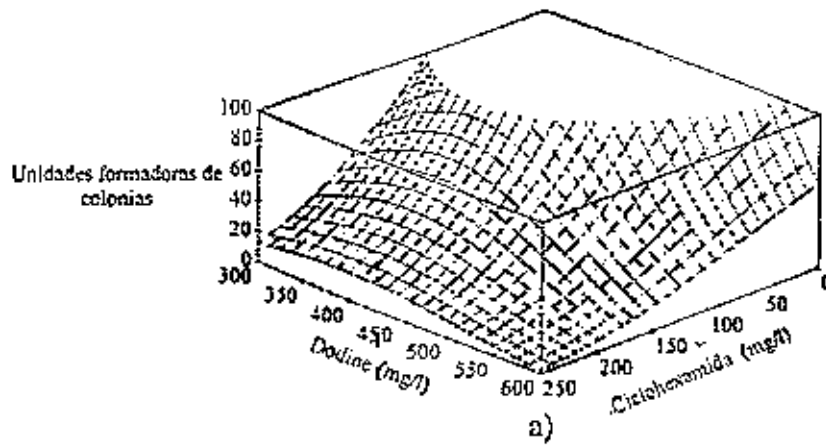


Figura 10. Efecto de la ciclohexamida y el dordine sobre unidades formadoras de colonia (UFC) en el día 12 a tres dosis de cloranfenicol: a) 300 mg/l, b) 400 mg/l, y c) 500 mg/l.

Efecto de los antibióticos sobre PCB y PCH

Como mencionamos antes, los ajustes de las funciones para las variables PCH y PCB no fueron altos debido probablemente a la presencia de contaminantes que salen del espectro de control de estos ingredientes dentro de los rangos estudiados y/o a una mala identificación de las variables respuesta.

Dentro de los rangos de dosis usadas los valores estimados de las variables respuesta estimadas son negativos (Figuras 11 y 12). Además, tanto para PCB como para PCH las superficies de respuesta estimadas son planos casi paralelos al plano formado por los ejes x y y . Es decir, el efecto de los antibióticos dentro de los rangos usados fue mínimo. Prácticamente no existe diferencia entre el uso de una dosis alta o baja de los mismos.

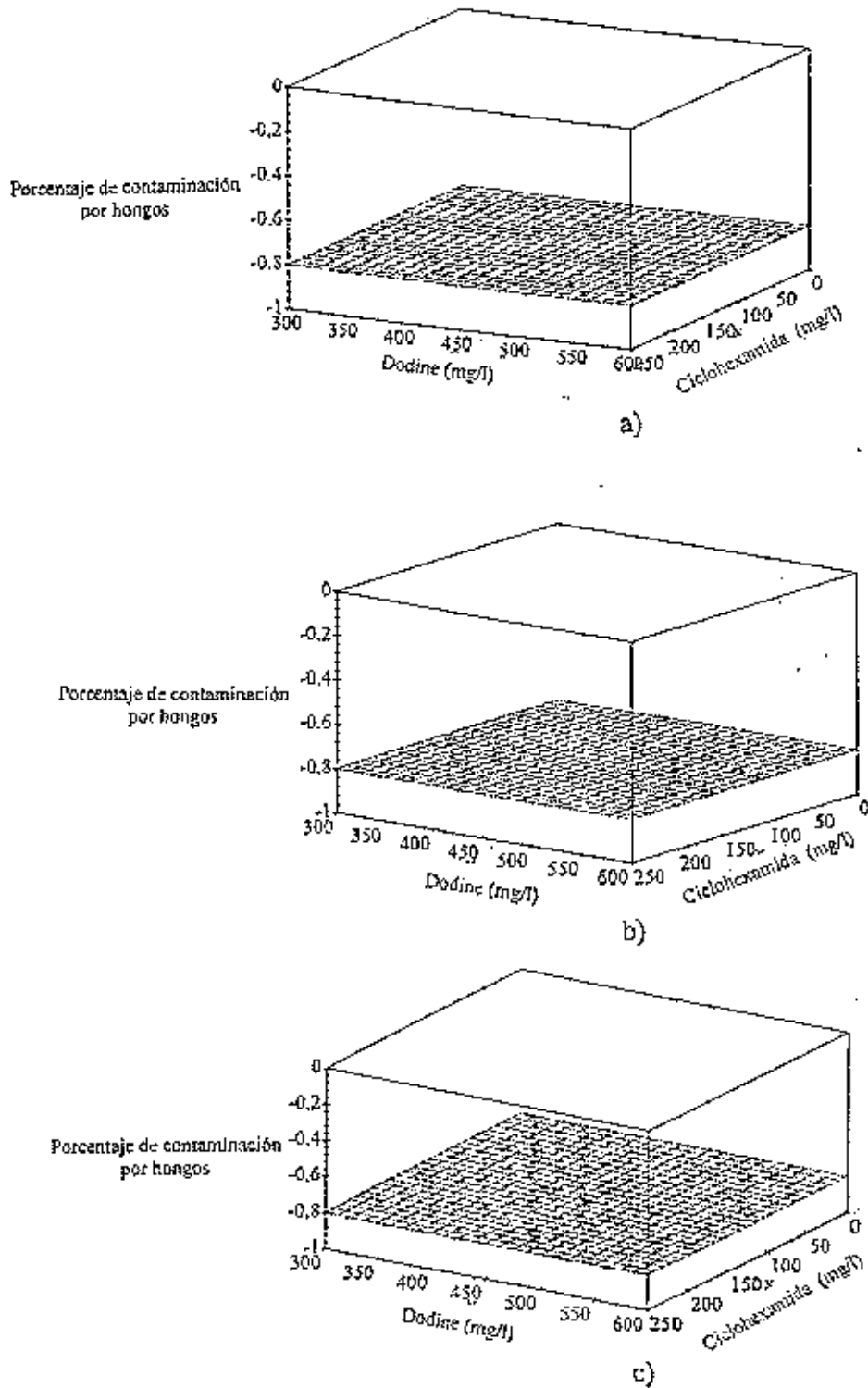
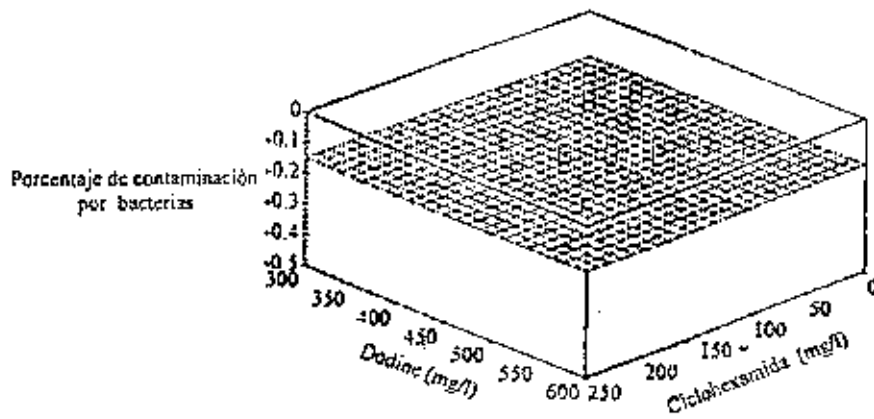
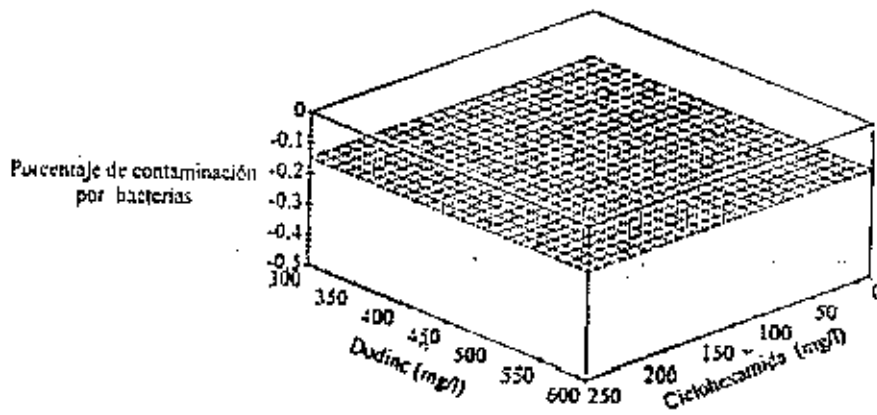


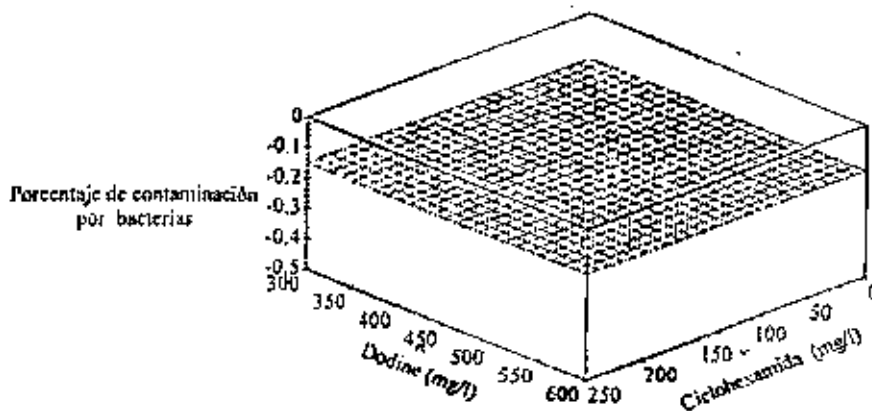
Figura 11. Efecto de la ciclohexamida y el dodiene sobre el porcentaje de contaminación por hongos (PCH) a tres dosis de cloranfenicol: a) 300 mg/l, b) 400 mg/l y c) 500 mg/l.



a)



b)



c)

Figura 12. Efecto de la ciclohexamida (x) y el dordine (d) sobre el porcentaje de contaminación por bacterias (PCB) a tres dosis de cloranfenicol: a) con 300 mg/l, b) con 400 mg/l, y c) con 500 mg/l.

Análisis de las correlaciones simples, parciales y múltiples

Los coeficientes de correlación simple entre las variables respuesta resultaron mayores a los respectivos coeficientes parciales, lo que da a entender el efecto de otras variables en las relaciones. Además, puesto que estos coeficientes de correlación parcial resultaron con valores muy bajos, puede decirse que el desarrollo de contaminantes no afectó el crecimiento de colonias de *B. bassiana* (Figura 17).

Para relacionar los antibióticos y las variables respuesta se calcularon los coeficientes de correlación parcial entre cada variable respuesta y cada ingrediente manteniendo constante: primero, los otros dos antibióticos usados; y segundo, los otros dos antibióticos y las otras dos variables respuesta. Los coeficientes de correlación parcial manteniendo constantes sólo los otros antibióticos resultaron mayores a los coeficientes de correlación parcial manteniendo constantes todas las otras variables (Figura 17). El diferencial entre los coeficientes antes mencionados explica el hecho de que al mantener a un mismo nivel los ingredientes (dentro de los rangos usados), hay un cierto efecto detrimental de las otras dos variables respuesta (Figuras 17 y 18). Lo ideal sería no tener ninguna interrelación entre las variables.

Los valores de los coeficientes de correlación parcial entre cada variable respuesta y cada antibiótico manteniendo constantes todas las otras variables resultaron bajos en todos los casos, excepto para ciclohexamida y UFC que presentó una relación media (Figura 18). Esto indica que definitivamente el efecto de los ingredientes en el control de los contaminantes fue muy baja; sin embargo, ciclohexamida afectó negativamente el desarrollo de UFC.

Los coeficientes de correlación múltiple entre cada variable respuesta y: 1) todas las otras variables, 2) los antibióticos y 3) solamente dodine y ciclohexamida; al no presentar gran diferencia confirman nuevamente el efecto predominante de esos dos ingredientes en la variabilidad de los organismos. Así mismo, tanto en PCB y PCH se observa de nuevo un buen porcentaje de variabilidad que no explica la relación (Cuadro 8).

Cuadro 8. Coeficientes de correlación múltiple ($R=\sqrt{R^2}$) entre las variables UFC^a, PCB^b y PCH^c y tres grupos de variables

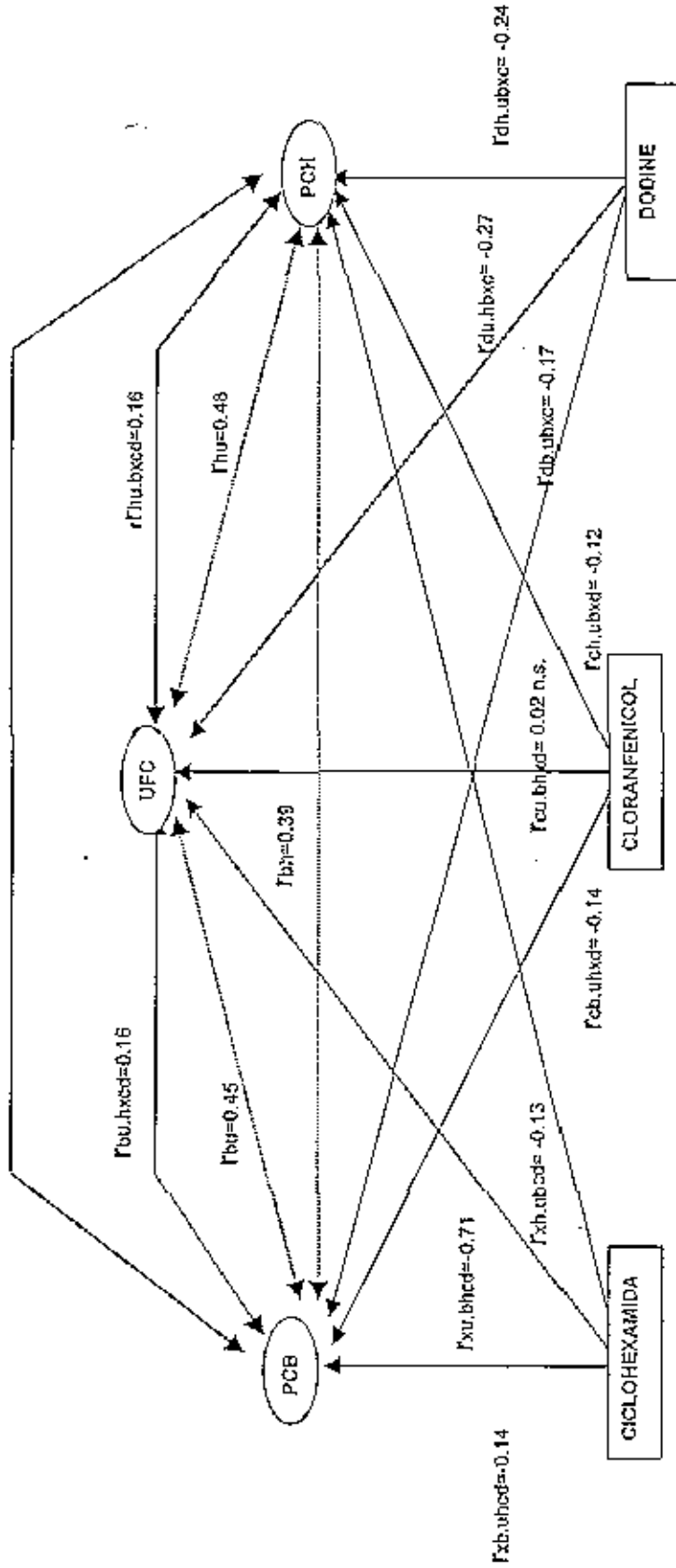
Variable respuesta	Grupo de variable con que se relaciona		
	Todas las otras variables	Antibióticos ciclohexamida, dodine y cloanfenicol	Antibióticos dodine y ciclohexamida
UFC	0.56	0.52	0.51
PCB	0.53	0.50	0.48
PCH	0.81	0.80	0.80

a Unidades formadoras de colonias

b Porcentaje de contaminación bacterial

c Porcentaje de contaminación por hongos

$r_{bh,uxcd}=0.1$



UFC=ue unidades formadoras de colonias
 PCB=ta porcentaje de contaminación bacterial
 PCH= te porcentaje de contaminación por hongos
 x= ciclohexamida
 ca= clorfenicol
 do= doxina
 r_{bh}, r_{bu}, r_{hu} = coeficientes de correlación simples
 r_{bu,ubcd}, r_{hu,ubcd}, etc = coeficientes de correlación parcial entre ingredientes y variables respuesta a niveles constantes de los otros dos
 r_{bu,ubcd}, r_{hu,ubcd}, etc = coeficientes de correlación parcial entre ingredientes y variables respuesta a niveles constantes de los otros dos
 n.s. = no significativo. Todos los demás valores significativos con una P<0.05

Figura 14. Correlaciones simples y parciales (efectos directos e indirectos) entre las variables respuesta y correlaciones parciales (efectos directos) entre cada ingrediente y cada variable respuesta a niveles constantes de todas las otras variables.

3.3.3.3. Uso de pronósticos para la recomendación de medios óptimos.

La opción RIDGE del SAS (Freund y Littell, 1992) nos permite analizar la tendencia de los valores de las variables independientes hacia los óptimos de las variables respuesta, teniendo siempre como punto de partida del análisis las dosis medias de los ingredientes.

La maximización de la variable UFC, en los tres días de estudio, se consigue manteniendo prácticamente constante el cloranfenicol, disminuyendo un poco el dódine y disminuyendo significativamente la ciclohexamida (Cuadros 9, 10 y 11).

Cuadro 9. Tendencia estimada de máxima respuesta para UFC¹ en el día 6

Respuesta estimada UFC	Dosis (mg/l)	
	Dódine	Ciclohexamida
1.27	450	125
1.82	448	100
3.49	446	75
7.85	444	50
20.90	443	25
65.37	441	0.3

¹ Unidades formadoras de colonias

Cuadro 10. Tendencia estimada de máxima respuesta para UFC¹ en el día 9

Respuesta estimada UFC	Dosis (mg/l)		
	Cloranfenicol	Dódine	Ciclohexamida
10.81	400	450	125
16.44	400	440	101
25.03	400	431	77
37.71	400	423	53
56.26	400	415	29
84.75	401	408	5

¹ Unidades formadoras de colonias

Cuadro 11. Tendencia estimada de máxima respuesta para UFC¹ en el día 12

Respuesta estimada UFC	Dosis (mg/l)		
	Cloranfenicol	Dodine	Ciclohexamida
42.95	400	450	125
57.40	399	436	103
72.24	398	425	80
86.49	397	416	56
100.48	398	409	31
112.17	405	404	6

¹ Unidades formadoras de colonias

Al pasar del día 6 al 9 y del 9 al 12, se incrementan las respuestas estimadas iniciales con las dosis medias de los antibióticos. Es decir, los antibióticos no inhiben totalmente el desarrollo de UFC sino que lo retardan. La obtención de valores altos de UFC con dosis mayores de los antibióticos puede conseguirse haciendo las evaluaciones más tarde.

Por otra parte, los valores óptimos calculados mediante el programa matemático EUREKA muestran resultados similares a los vistos anteriormente (Cuadro 12). Los valores máximos se consiguen con dosis mínimas de ciclohexamida y dosis entre 300 y 400 mg/l de cloranfenicol y ciclohexamida. El valor estimado máximo se consigue en el día 9.

Cuadro 12. Dosis de los antibióticos ciclohexamida, cloranfenicol y dodine para los valores máximos estimados de UFC¹ en los días 6, 9 y 12.

Día	Dosis mg/l			Valores máximos estimados de UFC
	Ciclohexamida	Cloranfenicol	Dodine	
6	0	-	300	159.84
9	0.13	300.00	338.72	351.31
12	0	399.00	399.00	277.90

¹ Unidades formadoras de colonias

3.4. CONCLUSIONES

Primera etapa

1. Antes de que un medio selectivo sea usado en estudios de persistencia, debe ser evaluado para ver si se adapta a las condiciones presentes en el ecosistema en el que se está trabajando.

2. El yodine usado en dosis entre 0.3 y 0.6 mg/l mantiene los niveles de contaminación por hongos a niveles aceptables.
3. Solamente el antibiótico cloranfenicol resultó efectivo en el control de bacterias contaminantes.
4. El medio ODA (ceral yodine agar) más cloranfenicol y ciclohexamida fue el medio que resultó con menores porcentajes de contaminación bacterial; sin embargo, presentó problemas de poco desarrollo de colonias de *B. bassiana*.
5. En orden de importancia los organismos contaminantes presentes, provenientes de los frutos de café fueron bacterias gram negativas, bacterias gram positivas y levaduras.

Segunda etapa

1. En general, las dosis de antibióticos usadas (yodine 300- 600 mg/l, ciclohexamida 0-250 mg/l y cloranfenicol 300-500 mg/l) mantuvieron los niveles de contaminación por debajo del 10% que se fijó como máximo permitido, pero también en la mayoría de los casos no permitieron valores altos de UFC.
2. Los valores de UFC se incrementaron gradualmente de un día de evaluación al otro ya que los antibióticos retardan el desarrollo de las colonias de *B. bassiana*.
3. El día en el que se alcanza el máximo valor de UFC es el día 9.
4. A los niveles de contaminación presentes, la interrelación entre las variables respuesta fue muy baja UFC, PCB y PCH.
5. Los bajos niveles de contaminación presentes no fueron controlados en forma efectiva al incrementar las dosis de los antibióticos.
6. A las dosis usadas no se encontró un efecto de potenciación significativo entre los tres ingredientes.
7. El ingrediente ciclohexamida es el que más afecta la formación de UFC.
8. Yodine empieza a tener efecto detrimental aproximadamente a partir de los 450 mg/l.
9. El desarrollo óptimo de UFC se puede conseguir usando las menores dosis posibles de ciclohexamida, dosis de yodine de medias a bajas (300-450 mg/l) y dosis de cloranfenicol entre 300 y 500 mg/l.

3.5. RECOMENDACIONES

Primera etapa

1. Cada medio selectivo debe ser evaluado antes de realizar un trabajo de estudio de persistencia.
2. Para la evaluación de la persistencia de las aplicaciones de *B. bassiana* en frutos de café el medio más recomendado es uno conteniendo ODA como medio basal y cloranfenicol, ciclohexamida y yodine como antibióticos.

Segunda etapa

1. Para posteriores trabajos de evaluación de medios selectivos, las variables PCB y PCIH deberían ser identificadas con mayor precisión (género, especie, respuesta a coloración de Gram, etc.) para analizar con mayor rigor el efecto de cada uno de los ingredientes sobre éstos organismos específicos. Además, se recomienda hacer nuevos ensayos incluyendo antibióticos en cuyo espectro de control se incluyan los organismos identificados.
2. Evaluar los mismos antibióticos usando rangos de dosis mayores.
3. Llevar a cabo el proceso completo de la metodología de superficies de respuesta para definir los rangos de dosis óptimas para controlar contaminantes y permitir el desarrollo UFC.
4. Evaluar la formación de UFC en el día 9.
5. El medio óptimo para el desarrollo de UFC se consigue con una dosis de 0.13 mg/l de ciclohexamida, 300 mg/l de cloranfenicol y 338 mg/l de yodine.
6. Adquirir un paquete matemático que permita evaluar con facilidad conjuntos de superficies de respuesta.

4. RECOMENDACIONES PARA MUESTREO EN ESTUDIOS DE PERSISTENCIA

4.1. INTRODUCCION

En todo plan de muestreo uno de los principales aspectos a considerar es el tamaño óptimo de la muestra. Si una muestra es muy pequeña, las estimaciones que saquemos de ella pueden ser poco confiables; mientras que si una muestra es demasiado grande, aunque las estimaciones sean muy precisas su costo de realización puede ser elevado.

Según Avcedillo (1992), el tamaño óptimo de muestra es un valor relativo que depende de la determinación previa de tres condiciones:

1. Precisión deseada. Que se establece prefijando el límite máximo de error permisible entre el estimador (\bar{x}) y el verdadero valor poblacional (μ). Este error es más fácil de expresar en forma relativa (E%).
2. Grado de confianza exigido para que se mantenga la precisión deseada. Se establece en forma de probabilidad:
 $P(E\% \text{ de la estimación} \leq E\% \text{ límite prefijado}) = 1 - \alpha$
 α es el nivel de significación en la distribución "t" de Student, según la cual se distribuye el estimador muestral \bar{x} alrededor del parámetro poblacional μ .
3. Variabilidad de la variable aleatoria muestral \bar{x} estimada por su coeficiente de variación (CV%).

Con estas tres condiciones el tamaño óptimo de muestra se calcula con la siguiente fórmula:

$$n = (t_{\alpha}^2 \cdot CV\%^2) / E\%^2 \quad [3]$$

El objetivo de este trabajo fue determinar el tamaño adecuado de muestras para estimar la cantidad de esporas del hongo entomopatógeno *B. hussiana* que se encuentran en los frutos de café en forma natural y también después de una aspersión de un producto comercial del hongo.

4.2. MATERIALES Y METODOS.

4.2.1. Ubicación

El ensayo de campo se realizó en la finca Santa Lastenia localizada a 15 Km al este de la ciudad de Danlí, en la comunidad de Linaca, Departamento de El Paraíso, al sur oriente de Honduras.

Los trabajos de laboratorio fueron hechos durante el mes de diciembre de 1998 en la Escuela Agrícola Panamericana "El Zamorano", Honduras, en el Centro de Inventario Agroecológico y Diagnóstico del Departamento de Protección Vegetal.

4.2.2. Manejo del experimento

Las aspersiones se realizaron en dos lotes: uno al sol y otro a la sombra. Como tratamientos se usaron dos dosis de Mycotrol® (*B. bassiana*) y una parcela sin aplicar. Las dosis usadas fueron:

Dosis 0: Sin aplicar

Dosis baja: 5×10^{12} esporas/ha.

Dosis alta: 1×10^{13} esporas/ha.

Las aspersiones se hicieron con una bomba manual de espalda Matabi® por los dos lados de las filas de la plantación.

Cada lote se dividió en 12 parcelas en las que los tres tratamientos fueron distribuidos al azar. Las parcelas contenían 6 plantas de café en fila y estaban separadas a lo ancho por una fila sin aplicar. Como parcela útil sólo se consideró las 4 plantas centrales.

De cada una de las cuatro plantas que conformaba la parcela se escogió una rama y se tomaron 10 frutos, resultando al final en una muestra de 40 frutos que fueron colocados en una bolsa plástica. Los frutos fueron recogidos uno por uno usando pinzas para evitar el contacto de las manos con las esporas. Las muestras se llevaron al laboratorio el mismo día para su procesamiento.

En el laboratorio, en la misma bolsa plástica, la muestra se lavó con 100 ml de agua destilada estéril y Tween 20 en una concentración del 0.1 %. Con el agua del lavado se hizo una dilución 1:10 en agua destilada estéril. Para cada muestra se prepararon 3 platos petri con medio selectivo (20 g/l de Gerber baby oatmeal, 20 g/l de bacto-agar, 0.6 g/l de dodine, 1 ml/l de gentomicina) y en cada plato se inocularon en condiciones asepticas 100 µl de la dilución antes mencionada.

Los platos petri inoculados se colocaron en la incubadora (27-29 °C). La evaluación se hizo a los 4 y 5 días, contabilizando en el plato la presencia de UFC de *B. bassiana*.

4.2.3. Análisis de los datos

Se establecieron 4 grupos de muestras:

- Muestras de parcelas con dosis baja
- Muestras de parcelas con dosis alta
- Muestras de parcelas sin aplicar en sombra
- Muestras de parcelas sin aplicar al sol

En el grupo de muestras de parcelas con dosis baja y alta se unieron las muestras de los cafetales al sol y a la sombra. Se consideró que no había diferencia entre las poblaciones puesto que aún no habían sido afectadas por las condiciones ambientales diferentes que presenta cada sistema.

Para determinar el número de muestras en el que se estabiliza el coeficiente de variación, en cada grupo se calculó los coeficientes de variación de subgrupos conteniendo desde una hasta el total de muestras.

Con el coeficiente de variación y definiendo tres posibles escenarios de exigencia de precisión de los estimadores (muy exigente, medianamente exigente y poco exigente) se calculó según la Ecuación 3 los tamaños óptimos de muestra.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los coeficientes de variación calculados cambiaron dependiendo de las dosis usadas en el experimento. A dosis mayores los coeficientes de variación disminuyen. Solamente la curva de datos de dosis alta tiene la forma teórica del número de muestras en función del coeficiente de variación (Figura 19).

La diferencia entre los coeficientes de variación se refleja después en los tamaños de muestras ideales recomendados para la evaluación de la persistencia. Los tamaños de muestras óptimos también se incrementan sustancialmente al pasar de un nivel de menos exigencia a otro de más exigencia, resultando en tamaños demasiado grandes en el caso de las poblaciones naturales con altos o medianos niveles de exigencia (Cuadro 13). Los cálculos de los tamaños óptimos son en todos los casos tentativos puesto que definitivamente en ninguno de los grupos de datos la curva de relación coeficiente de variación y número de muestras llegó a estabilizarse completamente.

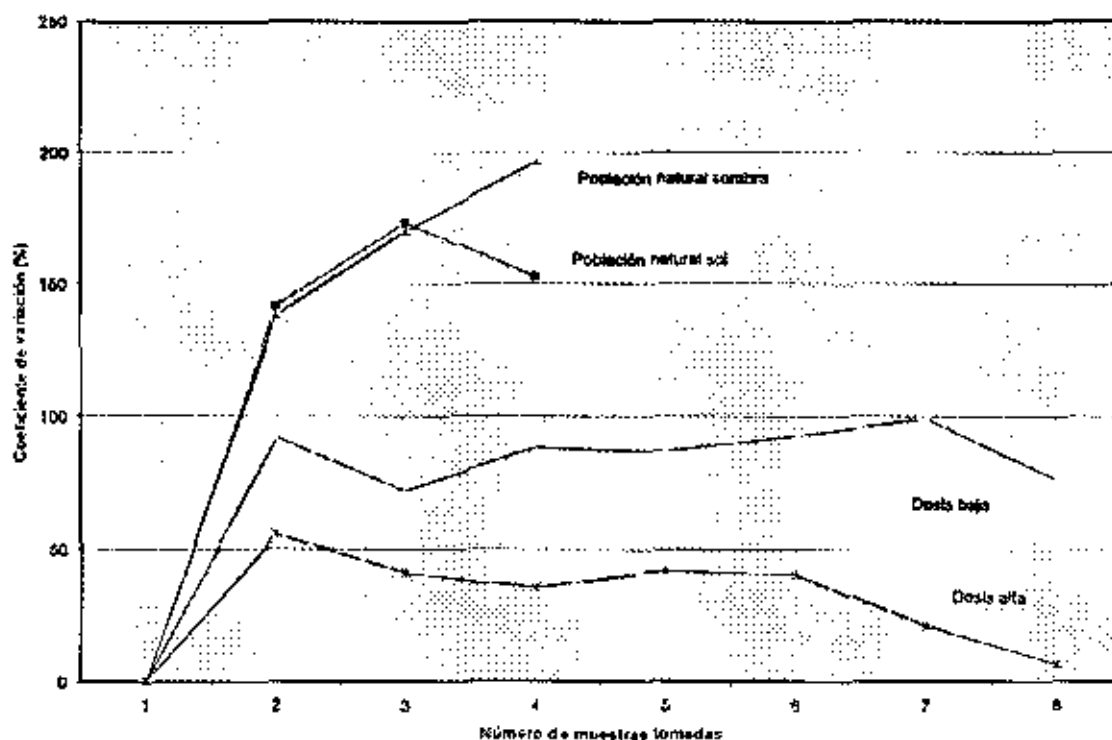


Figura 19. Fluctuación del coeficiente de variación (CV) de acuerdo al número de muestras en poblaciones naturales de *Beauveria bassiana* en cafetales al sol y a la sombra y poblaciones de plantas asperjadas con dos dosis del hongo.

Cuadro 13. Posibles tamaños óptimos de muestra para poblaciones naturales y asperjadas de *Beauveria bassiana* en tres posibles escenarios de exigencia en la precisión deseada para la estimación de la población.

Grado de exigencia en precisión deseada	Población natural sol	Población natural sombra	Dosis baja ^a	Dosis alta ^b
Muy exigente ¹	2364	3914	331	3
Mediamente exigente ²	279	462	53	0.5
Poco exigente ³	58	97	11	0.1

1. 15% - 3% P = 0.95
 2. 15% - 1% P = 0.80
 3. 15% - 0.5% P = 0.70
 a. 5×10^4 esporas/ha
 b. 10×10^4 esporas/ha

4.4. CONCLUSIONES

1. La variabilidad de las poblaciones de *B. bassiana* se incrementan al disminuir su tamaño.
2. La evaluación de persistencia de *B. bassiana* usando dosis altas (esporas/ha) puede ser realizada con una muy buena precisión aún con un tamaño de muestra pequeña.
3. Las evaluaciones de poblaciones naturales de *B. bassiana* para ser precisas requieren tamaño de muestra grandes.

4.5. RECOMENDACIONES

1. En trabajos de evaluación de la persistencia de las aplicaciones de *B. bassiana* dosis menores requieran tamaños de muestra mayores.
2. Durante el desarrollo de los trabajos de persistencia el número de muestras deberá ser incrementado si se desea mantener el mismo grado de precisión. Al pasar el tiempo las poblaciones de esporas viables disminuyen.
3. Realizar un estudio específico para la determinación de un muestreo óptimo usando un mayor número de muestras (del tipo usado en este estudio) y con un diferente tipo de muestreo (más frutos por rama, más ramas por árbol, más árboles por parcela, etc.).

5. BIBLIOGRAFIA

- AVEDILLO, M. s.f. Apuntes para el curso de "Métodos estadísticos para agricultura". Zamorano, Hond., Escuela Agrícola Panamericana "El Zamorano". pp. 52-75
- AVEDILLO, M. 1992. Muestreo estadístico (Apuntes mimeografiados). Zamorano, Hond., Escuela Agrícola Panamericana "El Zamorano". 7 p.
- BEILHARZ, C.; PARBERY, D.G. 1982. Dodine: a selective agent for certain soil fungi. Transactions of the British Mycological Society (G.B.) 79(3): 507-511.
- BRUN, L.O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V.; SUCKLING, D.M. 1989. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. Journal of Economic Entomology (EE.UU.) 82(5): 1311-1316.
- BUSTILLO P., A.E.; POSADA F. 1996. El uso de entomopatógenos en el control de la broca del café. Manejo Integrado de Plagas (C.R.) 42: 1-13.
- CASTILLO, P.; ACOSTA, N.; CILIEZAR, A. 1995. Control Microbiológico de Plagas Artrópodos. In: manual para la enseñanza de control biológico en América Latina. Ed por: R. D. Cave. Zamorano, Hond., Zamorano Academic Press. pp. 51-72.
- CHASE, A.R.; OSBORNE, L.S.; FERGUSON, V.M. 1986. Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. Florida Entomologist (EE.UU.) 69(2): pp.285-292.
- DAOUST, R.; PEREIRA, R.M. 1986. Stability of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on Beetle - attracting Tubers and Cowpca Foliage in Brazil. Environmental Entomology (EE.UU.) 15(6): 1237-1243.
- FAIZI, R. 1978. Effet d' une infection chronique a *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti, Moniliales) sur le potentiel biotique de *Chilo suppressalis* (Walker)(Lepidoptera, Pyralidae, Crambinae). These de 3eme Cycle, Université Paris XI Orsay, Francia.
- Citado por: Feng, M.G.; Poprawski, T.J.; Khachatourians, G.G. 1994. Production, Formulation, and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. Biocontrol Science and Technology (EE.UU.) 4: 3-34.

- FENG, M.G.; POPRAWISKY, T.J.; KHACHATOURIANS, G.G. 1994. Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology* (EE.UU.) 4: 3-34.
- FERRON, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: *Microbial control of pests and plant diseases*. Ed. by H.D. Burges. London, Academic Press Inc. pp. 465-482.
- FERRON, P.; FARGUES, J.; RIBA, G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. In: *Handbook of Applied Mycology*. Ed by D.K. Arora, L. Ajello, K.G. Mukerji. New York, Marcel Dekker Inc. pp. 665-706.
- Citado por: Feng, M.G.; Poprawski, T.J.; Khachatourians, G.G. 1994. Production, Formulation, and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology* (EE.UU.) 4: 3-34.
- FREUND, R.J.; LITTELL, R.C. 1991. *SAS System for Regression*. 2 ed. Cary, NC, EE.UU., SAS Institute Inc. 210 p.
- GARDNER, W.A.; SUTTON, R.M.; NOBLET, R. 1977. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* on Soybean Foliage. *Environmental Entomology* (EE.UU.) 6(3): 616-618.
- Citado por: P.E. Velez - Arango, E.C. Montoya Restrepo. 1993. Supervivencia del hongo *Beauveria bassiana* bajo radiación solar en condiciones de laboratorio y campo. *Cenicafé* (Col.) 44(3):111-122.
- GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Ed by: L. Lacey. San Diego, EE.UU., Academic Press. pp. 213-248.
- GOLDBERG, H.S.; LUCKEY, T.D. 1959. Effects of Antibiotics. In: *Antibiotics: Their Chemistry and Non-Medical Uses*. Ed by H.S. Goldberg. Toronto, Can., D. Van Nostrand Company, Inc. pp. 10-23.
- IGNOFFO, C.M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist* (EE.UU.) 75(4): 516-525.
- INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; JOHNSON, D.L. 1995. Influence of Ultraviolet Light Protectants on Persistence of the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*. *Biological Control* (EE.UU.) 5: 581-590.
- JARONSKY, S.T. 1998. Preparation of Dodine Oat Meal Selective Agar. *Mycotech*

- Corporation, Montana, USA. (Comunicación Personal).
- JARONSKY, S.T. 1999. Recommendations for Preparation of Dodine Oat Meal Selective Agar. Mycotech Corporation, Montana, USA. (Comunicación Personal).
- LACAYO, L.; BARRIOS, A.,M.; JIMENEZ, C.; SANDINO, V. 1994. El uso de hongos entomopatógenos para el manejo de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) en Nicaragua. In: Uso de hongos entomopatógenos para manejo de plagas en Nicaragua. Nic., Proyecto de hongos entomopatógenos CATIE/INTA-MIP. s.p.
- QUEZADA R.,J.; URBINA, N.R. 1987. La broca del cafeto y su control. In: Plagas y enfermedades de caracter epidémico en cultivos frutales de la región centroamericana. Ed. por J. Pinochet. Panamá, CATIE. pp. 48-59.
- RIVERA, M.; LOPEZ, J.C. 1992. Medio selectivo para aislamiento de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin a partir de muestras de suelo. In: Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Manizales, Col., SOCOLEN. p.46.
- RIVERA, M.; LOPEZ, N.; BUSTILLO P., A.E. 1994. Medio selectivo para aislamiento de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. de material vegetal, suelo e insectos infectados. In: Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Medellín, Col., SOCOLEN. p.46.
- SAS INSTITUTE INC. 1985. Sas/Stat Guide: User's Guide for personal computers, 6 ed. Cary, NC, EE.UU. 243 p.
- SHELTON, A.M.; VENDENBERG, J.D.; RAMOS, M.; WILSEY, W.T. 1998. Efficacy and Persistence of *Beauveria bassiana* and Other Fungi for Control of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) on Cabbage Seedlings. Journal of Entomology Science (EE.UU.) 33(2): 142-151.
- SPONAGEL, K.W. 1994. La Broca del Café *Hypothenemus hampei* en las plantaciones de Café Robusta en la Amazonía Ecuatoriana. Trad. por Wilma Miranda-Sponagel. Giessen, Alemania, Wissenschaftlicher Fachverlag. 279 p.
- VELEZ A., P.E; MONTOYA R.,E.C.; 1993. Supervivencia del hongo *Beauveria bassiana* bajo radiación solar en condiciones de laboratorio y campo. Cenicafé (Col.) 44(3):111-122.
- VELEZ A., P.E; MONTOYA R.,E.C.; 1998. Supervivencia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en dos localidades cafeteras colombianas. Cenicafé (Col.) 49(1):51-71.
- ZHANG, Z.G.; HUANG, X.Y. 1988. Study of the influence of *Beauveria bassiana* on oviposition of *Nephotettix cincticeps* and *Nilaparata lugens*. In Study and

Application Of Entomogenous Fungi in China. Ed by Li, Y.W. Li, Z.Z. Li, Z.Q. Liang, J.W. Wu, Z.K. Wu, Q.F. Xu. Beijing, Academic Periodical Press, pp. 85-89

Citado por: Feng, M.G.; Poprawski, T.J.; Khachatourians, G.G. 1994.
Production, Formulation, and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control: Current Status. Biocontrol Science and Technology (EE.UU.) 4: 3-34.

6. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de laboratorio para la identificación de organismos contaminantes de la primera fase del experimento para la elaboración de un medio selectivo para el aislamiento de *Beauveria bassiana*



SECRETARÍA DE RECURSOS NATURALES
 SUB-SECRETARÍA DEL AMBIENTE
 CENTRO DE ESTUDIOS Y CONTROL DE CONTAMINANTES
 CIESCCO
 COSUDE - ERFL - OMS - OPS - GOBIERNO DE HONDURAS
 Unidad de Microbiología Ambiental y de Alimentos

INFORME DE ANÁLISIS

Informe N° 1785 Fecha 31-12-78 Orden de Pago 253 Fecha 31-12-78
 Recibo N° _____ Fecha _____ Valor L. 700.00

Tipo de Muestra <u>Cultivos en placas de petri contaminado con bacterias</u>			
Nombre del Solicitante <u>E.A.P. El Samorano</u>		Dirección del Solicitante <u>El Samorano</u>	
Punto de Recolección <u>El Samorano</u>		Fecha/Hora de Recolección de la muestra	
Fecha/Hora de Recibo de la Muestra		Número Verde al Laboratorio Por el Interésado	
Responsable de la Recolección <u>Carlos Carpio</u>		SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
Análisis <u>Coloración de Gram</u>			
N° Muestra	Determinación	Resultado	Valor Pauta
<u>Placa No. 1</u>	<u>Gram</u>	<u>Cocos GRAM -</u>	
		<u>Cocos GRAM +</u>	
		<u>Coros GRAM +</u>	
		<u>.....otras líneas.....</u>	
Observaciones			


 ANALISTA
LUIS GONZALEZ RODRIGUEZ VEGA


 DIRECTOR CIESCCO
DR. LUIS MONTEA GONZALEZ

CC Interiores
 CC Archivo

Anexo 2. Datos de laboratorio de la segunda fase del experimento para elaboración de un medio selectivo para el aislamiento de *Beauveria bassiana*

tratamiento	dia	ciclohexamida	cloranfenicol	dodine	repeticion	UFC	PCH	PCB
1	6	250	400	600	1	0	0	0
1	6	250	400	600	2	0	0	0
1	6	250	400	600	3	0	0	0
1	6	250	400	600	4	0	0	0
2	6	0	400	600	1	89	0	0
2	6	0	400	600	2	76	0	0
2	6	0	400	600	3	95	0	10
2	6	0	400	600	4	37	0	8
3	6	125	500	600	1	0	0	0
3	6	125	500	600	2	0	0	0
3	6	125	500	600	3	0	0	0
3	6	125	500	600	4	0	0	0
4	6	125	300	600	1	0	0	0
4	6	125	300	600	2	0	0	0
4	6	125	300	600	3	0	0	0
4	6	125	300	600	4	0	0	0
5	6	250	300	450	1	0	0.5	0
5	6	250	300	450	2	0	0	0
5	6	250	300	450	3	0	0	0
5	6	250	300	450	4	0	0	0
6	6	125	500	300	1	0	0	1
6	6	125	500	300	2	0	0	0
6	6	125	500	300	3	0	0	0
6	6	125	500	300	4	0	0	1
7	6	125	400	600	1	0	0	0
7	6	125	400	600	2	0	0	0
7	6	125	400	600	3	0	0	0
7	6	125	400	600	4	0	0	0
8	6	250	300	600	1	0	0	3
8	6	250	300	600	2	0	0	0
8	6	250	300	600	3	0	0	0
8	6	250	300	600	4	0	0	1
9	6	125	300	300	1	0	1	0
9	6	125	300	300	2	0	0	0
9	6	125	300	300	3	0	3	0
9	6	125	300	300	4	0	0	0
10	6	0	500	600	1	45	0	0
10	6	0	500	600	2	41	0	0
10	6	0	500	600	3	43	0	0
10	6	0	500	600	4	56	0	0
11	6	250	500	600	1	0	0	0
11	6	250	500	600	2	0	0	0
11	6	250	500	600	3	0	0	0
11	6	250	500	600	4	0	0	0
12	6	125	300	450	1	0	1	0

12	6	125	300	450	2	0	0	0
12	6	125	300	450	3	0	0	0.5
12	6	125	300	450	4	0	1.5	0
13	6	0	500	300	1	182	0	1
13	6	0	500	300	2	156	10	3
13	6	0	500	300	3	178	0	1
13	6	0	500	300	4	149	20	1.5
14	6	250	500	300	1	0	0	0
14	6	250	500	300	2	0	0	0
14	6	250	500	300	3	0	0	0
14	6	250	500	300	4	0	0	4
15	6	0	300	450	1	146	2	0
15	6	0	300	450	2	140	2	2
15	6	0	300	450	3	116	3	0
15	6	0	300	450	4	122	6	2
16	6	125	500	450	1	0	0	0
16	6	125	500	450	2	0	0	0
16	6	125	500	450	3	0	0	0
16	6	125	500	450	4	0	0	0
17	6	0	400	450	1	130	0.5	2
17	6	0	400	450	2	184	2	0
17	6	0	400	450	3	139	0.5	0
17	6	0	400	450	4	148	0	0
18	6	125	400	450	1	0	0	0
18	6	125	400	450	2	0	0	0
18	6	125	400	450	3	0	0	0
18	6	125	400	450	4	0	0	2
19	6	0	300	600	1	66	0	0
19	6	0	300	600	2	70	0	0
19	6	0	300	600	3	57	0	0
19	6	0	300	600	4	64	0	2
20	6	0	400	300	1	182	1	0
20	6	0	400	300	2	197	2	3
20	6	0	400	300	3	160	0.5	0
20	6	0	400	300	4	134	0	1
21	6	250	400	450	1	0	0	0
21	6	250	400	450	2	0	0	0
21	6	250	400	450	3	0	0	0
21	6	250	400	450	4	0	0	0
22	6	250	500	450	1	0	0	0.5
22	6	250	500	450	2	0	0	0
22	6	250	500	450	3	0	0	0
22	6	250	500	450	4	0	0	0
23	6	250	400	300	1	0	0	0
23	6	250	400	300	2	0	0	0
23	6	250	400	300	3	0	0	0
23	6	250	400	300	4	0	0	0
24	6	250	300	300	1	0	0	1
24	6	250	300	300	2	0	0	0
24	6	250	300	300	3	0	0	0
24	6	250	300	300	4	0	0	1
25	6	125	400	300	1	0	1	5

25	6	125	400	300	2	0	2	0
25	6	125	400	300	3	0	0	0
25	6	125	400	300	4	0	0	2
26	6	0	300	300	1	148	0.5	2
26	6	0	300	300	2	132	2.5	4
26	6	0	300	300	3	117	0	0.5
26	6	0	300	300	4	187	0	1
27	6	0	500	450	1	155	0.5	0
27	6	0	500	450	2	165	0.5	0.5
27	6	0	500	450	3	165	0	1
27	6	0	500	450	4	148	0.5	1
23	9	250	400	300	1	0	0	1
23	9	250	400	300	2	0	1.5	0
23	9	250	400	300	3	0	1	0
23	9	250	400	300	4	0	0	0
20	9	0	400	300	1	182	1.5	0.5
20	9	0	400	300	2	197	2	4
20	9	0	400	300	3	160	1	0
20	9	0	400	300	4	134	2.5	1
21	9	250	400	600	1	0	0	0
21	9	250	400	600	2	0	0	0
21	9	250	400	600	3	0	0	0
21	9	250	400	600	4	0	0	0
22	9	250	500	450	1	0	0	0
22	9	250	500	450	2	0	0	0
22	9	250	500	450	3	0	0	0
22	9	250	500	450	4	0	0	0
2	9	0	400	600	1	89	0	0.5
2	9	0	400	600	2	37	0	15
2	9	0	400	600	3	76	0	0
2	9	0	400	600	4	50	0	10
18	9	125	400	450	1	52	0	0
18	9	125	400	450	2	24	2	0
18	9	125	400	450	3	12	2	0.5
18	9	125	400	450	4	22	3.5	0
8	9	250	300	600	1	0	0	5
8	9	250	300	600	2	0	0	0
8	9	250	300	600	3	0	0	3
8	9	250	300	600	4	0	0	1.5
25	9	125	400	300	1	22	1.5	6
25	9	125	400	300	2	8	3	0
25	9	125	400	300	3	20	0	0
25	9	125	400	300	4	18	0	4
24	9	250	300	300	1	8	1.5	0
24	9	250	300	300	2	0	0	0.2
24	9	250	300	300	3	0	0	1
24	9	250	300	300	4	1	1.5	0
27	9	0	500	450	1	155	0.5	0.2
27	9	0	500	450	2	167	0.5	2
27	9	0	500	450	3	166	5	3
27	9	0	500	450	4	152	5	1.5
26	9	0	300	300	1	149	0	5

26	9	0	300	300	2	134	6	5
26	9	0	300	300	3	118	0.5	0.5
26	9	0	300	300	4	187	1.5	0.5
16	9	125	500	450	1	97	0	0
16	9	125	500	450	2	59	0	0
16	9	125	500	450	3	65	0	0
16	9	125	500	450	4	85	0	0.2
3	9	125	500	600	1	0	0	0
3	9	125	500	600	2	0	0	0
3	9	125	500	600	3	0	0	0
3	9	125	500	600	4	0	0	0
15	9	0	300	450	1	149	5	0
15	9	0	300	450	2	141	6	2
15	9	0	300	450	3	118	10	0.3
15	9	0	300	450	4	122	40	2
13	9	0	500	300	1	182	0.2	3
13	9	0	500	300	2	166	10	3
13	9	0	500	300	3	178	0.2	1
13	9	0	500	300	4	153	30	3
19	9	0	300	600	1	66	0	0
19	9	0	300	600	2	72	0	0.5
19	9	0	300	600	3	57	0	0
19	9	0	300	600	4	40	0	0
17	9	0	400	450	1	132	0.5	2.2
17	9	0	400	450	2	187	4	1
17	9	0	400	450	3	140	2.5	2
17	9	0	400	450	4	148	1	1
11	9	250	500	600	1	0	0	0
11	9	250	500	600	2	0	0	0
11	9	250	500	600	3	0	0	0
11	9	250	500	600	4	0	0	0
21	9	250	400	450	1	0	0	0
21	9	250	400	450	2	0	0	0
21	9	250	400	450	3	0	0	0
21	9	250	400	450	4	0	0	0
14	9	250	500	300	1	0	0	0
14	9	250	500	300	2	0	0	0
14	9	250	500	300	3	0	0	0
14	9	250	500	300	4	0	0	4
12	9	125	300	450	1	99	1.5	2
12	9	125	300	450	2	63	0.5	0
12	9	125	300	450	3	36	0	0.5
12	9	125	300	450	4	43	2.5	0
10	9	0	500	600	1	49	0	0
10	9	0	500	600	2	49	0.2	0
10	9	0	500	600	3	44	0	0
10	9	0	500	600	4	57	0	0
9	9	125	300	300	1	70	1.5	0.2
9	9	125	300	300	2	99	0	0
9	9	125	300	300	3	67	3	2
9	9	125	300	300	4	119	0	0
6	9	125	500	300	1	68	1.5	0

6	9	125	500	300	2	61	0	0
6	9	125	500	300	3	48	0.5	0
6	9	125	500	300	4	55	0	1
5	9	250	300	450	1	0	1	0
5	9	250	300	450	2	0	0	0
5	9	250	300	450	3	0	0	0
5	9	250	300	450	4	0	0	0
4	9	125	300	600	1	0	0	0.5
4	9	125	300	600	2	0	0	0
4	9	125	300	600	3	0	0	0
4	9	125	300	600	4	0	0	0
7	9	125	400	600	1	0	0	0
7	9	125	400	600	2	0	0	0
7	9	125	400	600	3	0	0	0
7	9	125	400	600	4	0	0	0
25	12	125	400	300	1	52	2	6.5
25	12	125	400	300	2	52	4	0
25	12	125	400	300	3	90	0.2	0
25	12	125	400	300	4	88	0	5
8	12	250	300	600	1	0	0	3
8	12	250	300	600	2	1	0	0
8	12	250	300	600	3	4	0	3
8	12	250	300	600	4	4	0	2
18	12	125	400	450	1	120	0	0
18	12	125	400	450	2	79	0	0
18	12	125	400	450	3	76	2.5	0.5
18	12	125	400	450	4	80	4.5	0
2	12	0	400	600	1	89	0	0.5
2	12	0	400	600	2	37	0	15
2	12	0	400	600	3	76	0	0
2	12	0	400	600	4	50	0	10
10	12	0	500	600	1	49	0	0
10	12	0	500	600	2	49	0.5	0
10	12	0	500	600	3	44	0	0
10	12	0	500	600	4	57	0	0
9	12	125	300	300	1	137	0	4
9	12	125	300	300	2	149	0	4
9	12	125	300	300	3	100	3.5	4.5
9	12	125	300	300	4	156	0	4
5	12	250	300	450	1	70	20	0
5	12	250	300	450	2	38	0	0
5	12	250	300	450	3	29	0	0
5	12	250	300	450	4	7	0	0
6	12	125	500	300	1	116	2.5	0.5
6	12	125	500	300	2	114	0	0
6	12	125	500	300	3	96	0	0.5
6	12	125	500	300	4	126	0	1.3
12	12	125	300	450	1	145	3	10
12	12	125	300	450	2	176	0	3
12	12	125	300	450	3	80	0	0.5
12	12	125	300	450	4	111	3.5	0
24	12	250	300	300	1	116	1.5	0

24	12	250	300	300	2	7	0	1.5
24	12	250	300	300	3	13	2	2
24	12	250	300	300	4	12	0	0
14	12	250	500	300	1	14	0	0
14	12	250	500	300	2	0	0	0
14	12	250	500	300	3	5	0	0
14	12	250	500	300	4	4	0	1
3	12	125	500	600	1	4	0	0
3	12	125	500	600	2	14	1	0
3	12	125	500	600	3	10	0	0
3	12	125	500	600	4	0	0	0
16	12	125	500	450	1	128	0	0
16	12	125	500	450	2	116	0	0
16	12	125	500	450	3	114	0	0
16	12	125	500	450	4	127	0	1.5
21	12	250	400	450	1	15	0	0
21	12	250	400	450	2	10	0	0.45
21	12	250	400	450	3	17	0	0
21	12	250	400	450	4	3	0	5
11	12	250	500	600	1	4	0	0
11	12	250	500	600	2	7	0	0
11	12	250	500	600	3	2	0	0
11	12	250	500	600	4	3	0	0
20	12	0	400	300	1	182	30	1
20	12	0	400	300	2	147	4	10
20	12	0	400	300	3	160	2.5	2
20	12	0	400	300	4	134	13	3.5
23	12	250	400	300	1	5	0	1
23	12	250	400	300	2	4	2	0
23	12	250	400	300	3	18	1.5	0
23	12	250	400	300	4	12	2	0
22	12	250	500	450	1	10	0	0.5
22	12	250	500	450	2	16	0	0
22	12	250	500	450	3	17	0	0
22	12	250	500	450	4	16	0	0
1	12	250	400	600	1	1	0	0
1	12	250	400	600	2	0	0	0
1	12	250	400	600	3	0	0	0
1	12	250	400	600	4	0	0	0
4	12	125	300	600	1	7	0	0.5
4	12	125	300	600	2	6	0	0
4	12	125	300	600	3	7	0	0
4	12	125	300	600	4	1	0	0.8
7	12	125	400	600	1	18	0	0
7	12	125	400	600	2	26	0	0
7	12	125	400	600	3	9	0	0
7	12	125	400	600	4	30	0	0
19	12	0	300	600	1	66	1	2
19	12	0	300	600	2	72	0	3
19	12	0	300	600	3	57	0	0
19	12	0	300	600	4	40	0	1
13	12	0	500	300	1	182	1	6

13	12	0	500	300	2	156	12	7
13	12	0	500	300	3	178	0.6	3
13	12	0	500	300	4	153	35	4
15	12	0	300	450	1	149	8	5
15	12	0	300	450	2	141	25	4
15	12	0	300	450	3	118	30	3
15	12	0	300	450	4	122	80	2
26	12	0	300	300	1	149	2	6
26	12	0	300	300	2	134	6.5	2.5
26	12	0	300	300	3	118	0.5	1
26	12	0	300	300	4	187	2	1
27	12	0	500	450	1	155	0.5	0.2
27	12	0	500	450	2	167	0.7	3
27	12	0	500	450	3	166	10	3.5
27	12	0	500	450	4	152	14	1
17	12	0	400	450	1	132	1.5	3
17	12	0	400	450	2	187	7	1
17	12	0	400	450	3	140	3	5
17	12	0	400	450	4	148	1.5	4