



PROMECAFE

al servicio de la caficultura regional

RESPONSABLES

Guillermo Canet Brenes
Secretario Ejecutivo PROMECAFE

Armando García
Editor Técnico

CONTENIDO

- EDITORIAL
- PROMECAFE EN MARCHA
- PANORAMA INTERNACIONAL
- PONENCIAS

COLABORADORES

- **Edgar Rojas; Deryhan Muñoz.**
ICAFFE, Costa Rica
- **Moises Mata; Miguel Barquero.**
ICAFFE, Costa Rica

El Boletín PROMECAFE
se distribuye gratuitamente.

Los interesados
pueden dirigirse a:
IICA/PROMECAFE

Apdo. Postal # 1815
Guatemala, Guatemala
Tel./Fax: (502) 2471-3124
Tel.: (502) 2386-5915

Busque el boletín en nuestra
página WEB

E-mail: promecafe@iica.org.gt
[//www.iica.org.gt/promecafe](http://www.iica.org.gt/promecafe)

EDITORIAL

III CONFERENCIA MUNDIAL DEL CAFÉ 2010

La Organización Internacional del Café (OIC), es la principal organización intergubernamental que se ocupa de los asuntos del mundo cafetero, y en ella se reúnen los Gobiernos de los países exportadores e importadores para resolver, mediante la cooperación internacional, los retos con que se enfrenta el sector cafetero mundial.

La III conferencia Mundial del Café 2010, fue realizada por la Asociación Nacional del Café (ANACAFE), Guatemala, en estrecha cooperación con la OIC, del 26 al 28 de febrero. Con el tema "Café para el futuro: Hacia un sector cafetero sostenible", reunió a formuladores de decisiones de los gobiernos y del sector privado de más de 74 países. El tema seleccionado, responde al deseo que nos mueve de examinar todos los elementos que pueden ser esenciales para la vitalidad a largo plazo de esta fascinante bebida, expresó el Director Ejecutivo de la OIC, Señor Néstor Osorio.

Los conferenciantes y participantes, analizaron y debatieron la sostenibilidad del sector cafetero mundial en su dimensión económica, ambiental y social; proporcionando a los países productores y consumidores de café, informaciones para la toma de decisiones. En la sostenibilidad económica, se analizaron las perspectivas en cuanto al consumo de café en los mercados tradicionales, los emergentes y los de los países productores; en las sesiones sobre la sostenibilidad de la producción, se examinó como los agricultores de todo el mundo pueden satisfacer el crecimiento previsto en la demanda al tiempo que hacen frente a los costos cada vez más altos. En materia de medio ambiente se examinó el cambio climático y sus efectos en la producción cafetalera. Finalmente en sostenibilidad social se recordó que millones de personas de países en desarrollo dependen del café, y se revisaron los objetivos de desarrollo del milenio, las mujeres y el café, y los jóvenes y el café.

Además de la conferencia, hubo una exposición donde varias empresas relacionadas con el sector, mostraron sus productos y servicios. PROMECAFE, estuvo presente en este importante foro mundial de café, mostrando su accionar por medio de un stand.

En la 104ª sesión del Consejo Internacional del Café, que se realizó en ANACAFE, Guatemala, del 1 al 4 de marzo entre otros puntos se debatieron los resultados de la conferencia. En estas sesiones de la OIC, PROMECAFE participó como observador.

CERTIFICADO DE LA PRIMERA DENOMINACIÓN DE ORIGEN DEL CAFÉ EN EL SALVADOR

El 26 de enero, se hizo entrega oficial del certificado de la Primera Denominación de Origen del Café, de El Salvador, Café "Apaneca-Ilamatepec"; en acto presidido por el Director Ejecutivo del Centro Nacional de Registro -CNR-, Lic. Fernando Arturo Batlle; Ing. Antonio Arévalo, Miembro de Junta Directiva de PROCAFE; Ing. Rubén Pineda, Presidente del Órgano de Administración de la DO; y Licda. Ana Elena Escalante, Directora Ejecutiva del Consejo Salvadoreño del Café.



El Ing. Antonio Arévalo, Miembro de Junta Directiva de la Fundación PROCAFE, destacó la importancia de este logro para El Salvador, pues PROCAFE, forma parte del Programa Regional de Calidad del Café Vinculada a su Origen, coordinado por PROMECAFE, con apoyo de la AECID y el BID/FOMIN, y este logro ha sido obtenido en el marco de este Programa. Con este certificado de inscripción de la Denominación de Origen del Café Apaneca-Ilamatepec, se ve cumplido este sueño que quedará grabado en la historia de la caficultura de El Salvador.

El Director Ejecutivo del CNR, dijo estar muy satisfecho con el aporte que su institución ha tenido en este logro; que por medio del Registro de Propiedad Intelectual, la

Licda. Diana Hasbun se incorporó a este esfuerzo desde el inicio, acompañando la gestión de la Licda. Vera Mejía de Barrientos, Coordinadora Nacional del Proyecto de Denominación de Origen, y dando asesoría y capacitación a los sectores interesados; esfuerzo ahora culminado con la entrega de la certificación de inscripción oficial. Una Denominación de Origen de café salvadoreño, reconocida internacionalmente, puede ser la llave para importantes mercados, y constituirse en una herramienta clave en el desarrollo económico para nuestros productores, enfatizó el titular del CNR.

El Salvador cuenta con su primera Denominación de Origen, y se espera que esto motive a que cada vez más productores se unan a esta iniciativa de valorización y protección de su café. Con la inscripción de la Denominación de Origen del Café Apaneca-Ilamatepec, se dejan bases firmes para la protección de la calidad de los cafés de la región vinculados con su origen.



FINALIZA FORMACIÓN DE TÉCNICOS DE REDES REGIONALES

Dos talleres regionales fueron realizados en Honduras, del 1 al 5 de febrero, con apoyo del IHCAFE, como parte del fortalecimiento de los procesos de mejoramiento de la calidad del café, en el marco del Proyecto Regional de Protección de la Calidad del Café Vinculado al Origen, que ejecuta PROMECAFE con el acompañamiento de la AECID y el BID/FOMIN.

- **V Taller Red de Catadores, tercer ciclo, 2009**

Catadores de los institutos miembros, recibieron el taller que tuvo el propósito de diseñar y desarrollar metodología de trabajo completa para evaluar la repetitividad, reproducibilidad y consistencia de los analistas sensoriales que forman la Red de Catadores de PROMECAFE; discusión de la propuesta técnica para implementar un proceso de acreditación de los miembros de la Red; ejecución y validación de métodos de ensayo definidos en el “Protocolo de Análisis de Calidad del Café”.



- **V Taller Red de Beneficiadores, tercer ciclo, 2009**

El taller para los técnicos en beneficiado del café, tuvo el objetivo de capacitar a los participantes para efectuar diversos ajustes operativos en aplicación industrial; rutinas de análisis físico de café oro y su utilidad para efectuar estimaciones de la producción por tipos comerciales aplicables al proceso de clasificación industrial; y diagnóstico y cálculo de capacidad operativa de plantas de beneficio húmedo de café. Además, efectuar prácticas en plantas de beneficiado, y validación del “Instrumento de Diagnóstico de estas, en zona de Denominación de Origen”.



Con la presencia del Señor Vicepresidente de la República, Ingeniero Samuel Reyes, el Señor Ministro de Agricultura, Ingeniero Teodoro Regalado, autoridades del IHCAFE, de AECID y del IICA, se cierra, en su tercer año consecutivo, el proceso de capacitación y actualización técnica de los miembros de las redes de catadores y de beneficiadores de PROMECAFE; quienes continuaran con el desarrollo del proyecto en sus respectivos países.

III TALLER REGIONAL DE BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS

Del 22 al 23 de febrero, con apoyo de PROCAFE, se realizó en El Salvador, el III Taller Regional de la Red de Buenas Prácticas Agrícolas de Café-BPAS-, que ha creado un espacio de discusión e intercambio de conocimientos en las mejores prácticas agrícolas a ser implementadas en fincas que producirán café protegido bajo una Denominación de Origen o Indicación Geográfica.

La actividad, se desarrollo en el marco del Programa Regional de Calidad del Café Vinculada a su Origen, que ejecuta PROMECAFE, con apoyo de AECID y BID/FOMIN; y es parte de la formación de bases técnicas para que las instituciones de café participantes en el proyecto fortalezcan sus capacidades para el aseguramiento de la calidad del producto.



En el taller participaron, asesores técnicos, representantes de las instituciones cafetaleras socias de PROMECAFE; y esta vez, en cooperación horizontal con IICA, Región Central, la Doctora Alejandra Diaz, especialista regional en el tema, condujo la revisión final, a nivel técnico, de la “Guía de Buenas Prácticas Agrícolas para fincas protegidas bajo una DO o IG”, que forma parte del trabajo de esta red en el marco del proyecto. La guía que se elabora, cuenta con objetivos, recomendaciones e indicadores de cumplimiento

para cada práctica de cultivo. De esta forma, se dispone de borrador final del documento técnico agrícola que permitirá armonizar normativas de producción para café con DO e IG, que apoyará a técnicos y caficultores en estas acciones que las instituciones socias, realizan sobre calidad del café y su vínculo con el origen, en sus respectivos países.

SEMINARIO-TALLER DE ACTUALIZACIÓN LEGAL SOBRE INDICACIONES GEOGRÁFICAS Y DENOMINACIONES DE ORIGEN



A los fines de ejecutar el componente legal del Programa Regional de calidad, fue realizada la consultoría legal que tuvo por objeto establecer las bases para una normativa modelo regional sobre Indicaciones Geográficas (IG) y Denominaciones de Origen (DO), teniendo como resultados: - un diagnóstico de las legislaciones nacionales sobre IG/DO, y - Elaboración y socialización de una propuesta de normativa sobre IG/DO convertida en una sugerencia de texto legal que contiene elementos mínimos comunes para un sistema de protección de las IIGG-DDOO.

Continuando con el desarrollo del "Programa Regional para la Protección de la Calidad del Café Vinculado con su Origen", que ejecuta PROMECAFE apoyado por la AECID, y en seguimiento al Diagnóstico de las legislaciones nacionales y a la Propuesta de normativa legal sobre IG y DO de Centroamérica, Panamá y República Dominicana; con apoyo de CODOCAFE, se realizó el 18 y 19 de marzo, en República Dominicana, el Seminario-Taller Regional de Actualización legal sobre Indicaciones Geográficas y Denominaciones de Origen, que tuvo el objetivo de Actualizar conocimientos sobre IG-DO de los ejecutivos, asesores legales de los institutos cafeteros y personal directivo de las oficinas de registro de la propiedad industrial de los países participantes en el Programa Regional; buscando con ello continuar el proceso de persuasión y de

sensibilización de las autoridades nacionales del registro de la propiedad intelectual acerca de la necesidad de operar reformas legales en los sistemas de protección de las IG y DO

Participaron, Profesionales del registro de propiedad industrial de cada país; Asesores legales de instituciones cafeteras; Coordinadores nacionales de los países participantes; Miembros del Comité de Dirección del Programa Regional; Consultor legal del Programa Regional; Funcionarios de PROMECAFE; y Expositores invitados.

El Seminario, permitió reunir a profesionales con conocimientos y experiencia en el campo de la propiedad intelectual, con capacidad para guiar o aportar en la planificación y ejecución del plan de acción nacional en materia de reforma legal.



Se puso en circulación, como parte del proceso de divulgación, la publicación del "Diagnóstico de las Legislaciones sobre Indicaciones Geográficas y Denominaciones de Origen de Centroamérica, Panamá y República Dominicana", producto del trabajo del consultor regional en el tema.

Así las oficinas de propiedad industrial y los expositores participantes, tomaron conocimiento de los esfuerzos realizados por IICA-PROMECAFE en este aspecto.

ACCIONES DE COOPERACIÓN TÉCNICA HORIZONTAL

Mediante el mecanismo de cooperación técnica horizontal y en seguimiento a las acciones de PROMECAFE, dirigidas a apoyar los diferentes programas que se llevan a cabo en los institutos cafeteros socios, se realizaron dos acciones de cooperación horizontal:

● Apoyo en Manejo Integrado de Broca

Con el apoyo de ANACAFE, el 1 de marzo, se realizó intercambio de parasitoides al laboratorio de Control Biológico de Broca, del Instituto del Café de Costa Rica (ICAFE), para avanzar en el proceso de multiplicación y liberación en campo de este enemigo natural y fortalecer el programa de control biológico y manejo preventivo de la broca del café que se desarrolla en el país. El intercambio fue realizado por el Ingeniero Oscar Campos, Técnico de la ANACAFE, e incluyó el transporte de Pie de Cría de parasitoides, de Guatemala hacia Costa Rica; trasladados, cumpliendo con los permisos fitosanitarios requeridos por las autoridades fitosanitarias respectivas.

De esta forma, se ha dado respuesta a las solicitudes del ICAFE, gracias al apoyo de ANACAFE, tanto técnico como en la donación de los pie de cría de parasitoides. Corresponde ahora mantener un protocolo de acciones para el seguimiento de producción de estos parasitoides en laboratorio y su correspondiente liberación en el campo, dentro de la acción estratégica de protección contra amenazas sanitarias.

● Apoyo en Producción in vitro y Aclimatación de Plantas

Organizada por PROMECAFE, en coordinación con el IHCAFE, del 16 al 18 de marzo, la Doctora Nelly Vasquez, encargada del laboratorio de biotecnología del CATIE, realizó visita de cooperación y apoyo técnico al laboratorio de cultivo In vitro del IHCAFE, Honduras. Tuvo el propósito de analizar la situación actual, el avance en la implementación de la metodología de multiplicación de híbridos F1 de *Coffea arabica* por medio de embriogénesis somática indirecta, y proyección del trabajo futuro en relación con la multiplicación de los híbridos F1, en beneficio de los institutos socios; así como capacitar a los encargados del laboratorio de cultivo de tejidos, y los responsables de la actividad de aclimatación de plantas en campo; en la producción in Vitro de estos materiales. El apoyo técnico fue realizado en el marco del Proyecto de mejoramiento genético y en seguimiento a acuerdos sobre el desarrollo de estos materiales en la región.

A partir de esta visita y los informes de requerimientos, se constató que este laboratorio cuenta con una infraestructura y equipo ideal para la implementación de dicha metodología, que sumados a su invernadero, permitirán resultados muy alentadores en pocos años. La capacitación recibida por el personal del laboratorio en ocasiones anteriores, con apoyo de IHCAFE y PROMECAFE, están dando los frutos esperados. Las acciones futuras del proyecto, sus perspectivas y necesidades en Honduras, fueron revisadas; y estos resultados, se integrarán al trabajo que constituirá el marco para su continuidad y el desarrollo de estos materiales en el país y en la región de PROMECAFE.

OTRAS ACCIONES DE LA SECRETARIA EJECUTIVA

● III Conferencia Mundial del Café

Coordinada por ANACAFE, se realizó en Guatemala, del 26 al 28 de febrero, la III Conferencia Mundial del Café; con el tema "Café para el futuro: Hacia un sector cafetero sostenible", reunió a formuladores de decisiones de los gobiernos y del sector privado de más de 74 países.

PROMECAFE, estuvo presente en este importante foro mundial de café, mostrando su accionar por medio de un stand; y participó además, como observador en la 104ª sesión de la OIC.



● Reunión Región Central Sede IICA

El Ingeniero Guillermo Canet Brenes, Secretario Ejecutivo de PROMECAFE, participó del 9 al 10 de marzo en la IX Reunión del Comité Ejecutivo del Foro de las Américas para la Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario (FORAGRO), en la que participaron Representantes de los sectores público y privado que desarrollan investigación agropecuaria en las Américas. La reunión se llevó a cabo en la Sede del IICA, San José, Costa Rica, y tuvo el propósito de definir prioridades de trabajo para los próximos años.

FORAGRO es un espacio de diálogo para la cooperación hemisférica que trabaja en promover una mayor articulación y ampliación de posibilidades para alianzas estratégicas entre los diversos actores que conforman el Sistema Regional de Investigación y Desarrollo de los países del hemisferio.

El Director General del IICA, Doctor Víctor M. Villalobos, sostuvo durante la inauguración del encuentro, que "se necesita una agricultura competitiva y más solidaria, para lo cual tenemos que producir más, y como producto de los múltiples fenómenos climáticos, se debe ser más eficiente y reducir la vulnerabilidad a través de la investigación y decidida apuesta por la innovación en tecnología".

Entre otras cosas, se aprobaron los lineamientos de su Plan de Acción 2010-2012, y se espera que el Foro se dedique en los próximos años a: • Desarrollar estudios sobre la situación y desempeño de la agricultura y de la innovación tecnológica en el hemisferio; • Promover el desarrollo de estudios sobre temas que permitan identificar acciones hemisféricas; y • Promover el fortalecimiento de innovaciones institucionales para la investigación y la innovación tecnológica mediante la cooperación entre regiones.

TALLER REGIONAL CAMBIO CLIMÁTICO Y CAFÉ, SOSTENIBILIDAD HACIA EL FUTURO

Los modelos climáticos demuestran que el clima está cambiando; predicen que en los próximos años el cultivo de café pierde su adaptabilidad debido a factores relacionados con la disminución de la precipitación y al aumento de temperatura. En CIAT, han diseñado estrategias y medidas de adaptación basados en el resultado del proceso de evaluación de la vulnerabilidad climática actual y futura.

Como una actividad de cooperación horizontal, PROMECAFE realizó conjuntamente con el CIAT, Colombia y el apoyo del IHCAFE, Honduras, y la AECID, el Taller Regional “Cambio Climático y Café, Sostenibilidad Hacia el Futuro”; el cual se llevó a cabo los días 25 y 26 de marzo y fue dirigido a técnicos de institutos cafeteros socios, como un aporte práctico al fortalecimiento de las capacidades

de su personal. Tuvo el objetivo de revisar las estrategias de adaptación del cultivo del café a los cambios climáticos actuales, y proporcionar herramientas de trabajo para identificar y desarrollar estrategias de adaptación desde el nivel de la finca hasta el nivel nacional, buscando mantener la calidad del café.



Durante el desarrollo del evento, se proporcionó información sobre temas importantes, a cargo de especialistas del CIAT y del IICA, Costa Rica, tales como Presentación de programa DAPA, Información para toma de decisiones; Líneas de trabajo de DAPA CIAT en café; impacto del cambio climático en la caficultura para la región centroamericana; Datos climáticos y modelos de predicción, entre otros.

De esta forma, PROMECAFE, apoya el fortalecimiento institucional y busca que los participantes al evento pongan en práctica sus conocimientos y realicen un efecto multiplicador de los mismos.

PANORAMA INTERNACIONAL

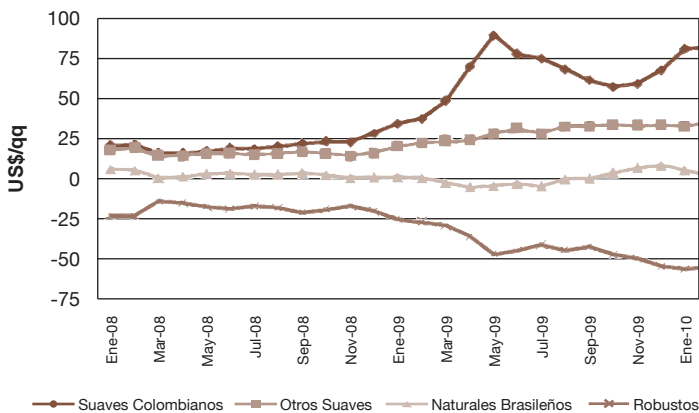
PANORAMA DE LOS DIFERENCIALES DE PRECIOS EN LOS CAFÉS ARÁBICAS SUAVES

Como consecuencia de diversos factores, durante el año 2009 los diferenciales de precios de los cafés arábicas suaves mostraron una fuerte tendencia al crecimiento. Este comportamiento fue particularmente marcado en el caso de los diferenciales del café suave colombiano, los cuales pasaron de ubicarse en un promedio de US\$20/qq a lo largo del año 2008 a alcanzar máximos de US\$90/qq a mediados del año 2009 (ver gráfico 1).

La fuerte caída en la producción de la cosecha de café 2008-09 de Colombia, la cual fue de casi un 31%, unido a un año de ciclo bajo en las cosechas de los países de Centroamérica llevó a que se presentara en el mercado una fuerte escasez de cafés arábicas suaves. Mientras que por el lado de la demanda el crecimiento en el consumo de café se mantuvo estable durante el 2009.

La conjunción de ambos factores, una oferta escasa y una demanda creciente, generó una fuerte presión sobre el mercado en físico, lo que obligó a los tostadores que requerían adquirir café arábica suave para preparar sus mezclas a pagar precios mayores por este tipo de café. Esta situación generó un fuerte crecimiento en los diferenciales de precios de este tipo de café, particularmente durante la primera mitad del 2009.

Gráfico 1
Evolución de los Diferenciales de Café por Tipos, Enero 2008- Febrero 2010



Fuente: Organización Internacional del Café.

Durante la segunda mitad del 2009, conforme aparecían estimativos optimistas sobre la producción de la cosecha de café 2009-10 tanto en Colombia como en Centroamérica, los diferenciales de precios de los cafés colombianos reversaron su tendencia alcista, iniciando un fuerte movimiento a la baja, sin llegar a ubicarse en los niveles normales de años anteriores.

Pese a la caída en los diferenciales de los cafés colombianos, los diferenciales de los cafés centroamericanos se mantuvieron mucho más estables durante la segunda mitad del 2009, continuando la tendencia alcista de meses anteriores.

Conforme avanzaba el año cafetalero 2009-10 empezaron a aparecer revisiones de los primeros estimados de cosecha de los distintos países productores de café arábica suave. En el caso de la producción de Colombia, si bien se estima un repunte de alrededor de 4% este es insuficiente para satisfacer la demanda (gráfico 2). El hecho de que Colombia fuera a experimentar una nueva cosecha inferior a los 10 millones de sacos de 60 kilogramos provocó nueva presión sobre el mercado, lo que llevó a que se diera un nuevo repunte en los diferenciales de precios.

Gráfico 2
Evolución de la Producción Colombiana de Café, Cosechas 2006-07 a 2009-10

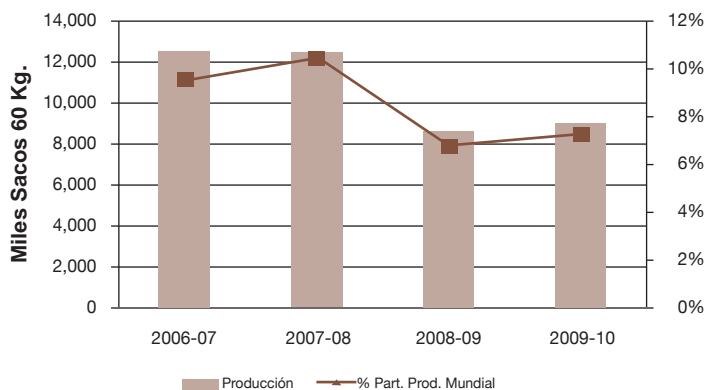
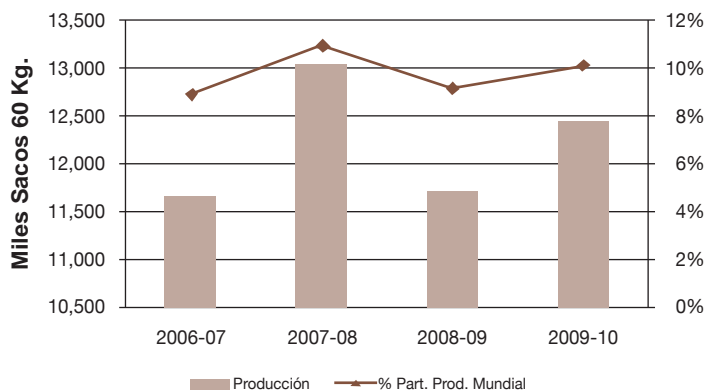


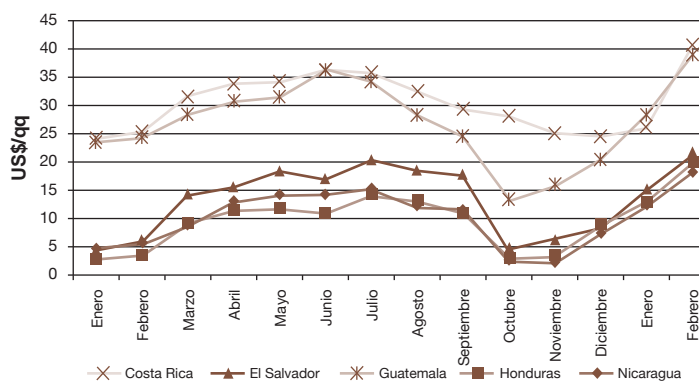
Gráfico 3
Evolución de la Producción Centroamericana de Café, Cosechas 2006-07 a 2009-10



Fuente: Organización Internacional del Café.

En el caso de la producción de Centroamérica, los nuevos estimados de cosecha indicaron que en el caso de algunos países no sólo la cosecha no iba a crecer como se anticipaba, sino que más bien se presentaría una nueva caída en la producción, tal es el caso de Costa Rica y El Salvador. Este hecho significó que la cosecha centroamericana de café se empezó a estimar más pequeña que lo anticipado, lo que generó aún más presión sobre el mercado físico. Así, el nuevo repunte en los diferenciales del café suave colombiano unido al menor crecimiento en la cosecha centroamericana de café (gráfico 3), llevó a que los diferenciales de precios de los distintos orígenes centroamericanos se recuperaran fuertemente a partir del inicio del año cafetalero 2009-10 (gráfico 4).

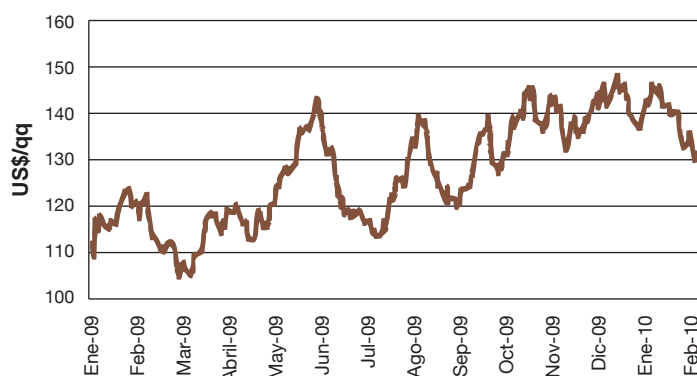
Gráfico 4
Diferenciales de Precios del Café
Centroamericano
Enero 2009-Febrero 2010



Fuente: Complete Coffee Coverage

Esto ha permitido, en conjunto con un repunte en los precios negociados para el Contrato "C" de Café Arábica en la Bolsa de New York (gráfico 5), que los precios promedio que están obteniendo los productores de café suave en general, y los orígenes centroamericanos en particular, sean

Gráfico 5
Evolución Precio Contrato "C"
de Café Arábica,
Enero 2009-Enero 2010



Fuente: Intercontinental Exchange.

mayores. Sin embargo, para determinar si esta tendencia alcista en los diferenciales se mantendrá a futuro habrá que esperar la evolución de las condiciones de oferta y demanda que prevalecen en el mercado de cafés suaves durante los próximos meses.

PONENCIAS



Las ideas expuestas en esta sección son responsabilidad de los autores y no necesariamente representan el criterio del IICA. Los artículos publicados en el Boletín de PROMECAFE están indizados en las bases de la Biblioteca Conmemorativa Orton del IICA-CATIE. orton@catie.ac.cr

EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN SUMERGIDA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* COMO PARTE DE UN PROCESO DE ESCALAMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOPLAGUICIDAS

Moises Mata¹, Miguel Barquero²

Presentado en el II Simposio Nacional de Caficultura, Instituto del Café de Costa Rica, Icafe, 2008.

● Introducción

La plaga que provoca mayores pérdidas en el cultivo del café alrededor del mundo y en Costa Rica es la broca del café (*Hypothenemus hampei*). El daño económico que causa puede provocar una disminución de más del

50% de la cosecha, ya sea por la caída prematura de los frutos o por el rechazo de aquellos dañados que provoca una reducción en el peso. La plaga tiene además potenciales efectos nocivos para la salud, pues la inocuidad de la bebida

¹ Parte del trabajo final de graduación en Ingeniería en Biotecnología del ITCR.

² Unidad de Investigación. Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE).

puede perderse debido a la presencia de ocratoxinas producidas por hongos asociados al insecto (Camilo et al., 2003).

La biología y el comportamiento del insecto, presenta dificultades para su control, ya que el adulto se encuentra protegido en el interior de los frutos, y además se reproduce rápidamente; tales factores han hecho que los métodos tradicionales de control, especialmente las aplicaciones químicas, son poco eficaces (Benavides et al., 2003). Se sabe que el insecto ha desarrollado en algunas latitudes, resistencia al Endosulfán, producto utilizado contra esta plaga (Brun et al., 1994). Como consecuencia, actualmente se trabaja en la utilización de enemigos naturales para el manejo de la broca. Los agentes fúngicos son prometedores, pues actúan por contacto y no necesitan ser ingeridos, además pueden ser producidos en masa y son relativamente específicos. El control biológico con utilización de hongos entomopatógenos (aquellos que parasitan insectos) es una tecnología renovable y accesible para los caficultores (Haraprasad et al., 2001).

El Centro de Investigaciones en Café (CICAFE), participa en el combate de esta plaga, mediante la producción y distribución del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. La producción del hongo se lleva a cabo en matrices sólidas que utilizan arroz como sustrato, técnica artesanal que demanda mucho espacio, tiempo, sustrato y por ende, dinero. La producción del biocontrolador en un sistema que permita una mayor productividad a un menor costo sería de gran ayuda a la institución y a todos aquellos productores que se benefician con su labor. Se reporta el crecimiento de *B. bassiana* y otros hongos biocontroladores en medio líquido, donde ocurre la producción de blastosporas, las cuales pueden ser utilizadas en campo para infectar a distintas especies de insectos (Gallegos et al., 2003; Taborsky, 1992).

Para evaluar la factibilidad de la producción de *B. bassiana* en medio líquido, como parte de un proceso de escalado que permita sustituir la técnica convencional de cultivo sobre sustrato sólido, se planteó la determinación del crecimiento del hongo en distintos sustratos líquidos, llevando a cabo su cultivo en pequeños fermentadores elaborados para tal fin como parte del proyecto.

● Materiales y Métodos

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitopatología del CICAFE, en San Pedro de Barva, Heredia. La investigación constó con dos fases, cada una de las cuales obedeció a objetivos diferentes. En la fase I se construyeron y probaron los fermentadores para la fermentación sumergida del hongo; en la fase II se realizaron los ensayos de fermentación bajo diferentes condiciones, además de un bioensayo de *B. bassiana* sobre la broca del café.

Fase I

Para la elaboración de los fermentadores se utilizaron erlenmeyers de vidrio de 1 litro de capacidad a los que se le colocaron tapones de hule que se ajustaban a la boca de los envases. Con ayuda de un sacabocados N°3 se realizaron tres perforaciones equidistantes en los tapones de hule, por los cuales se introdujeron tres segmentos de varilla de vidrio previamente cortados, correspondientes a la entrada de aire, salida de aire y tubo de muestreo. Seis fermentadores tipo II fueron elaborados.

Mecanismo dual de aireación y agitación: Una parte vital en los fermentadores consistía en el sistema que permitía llevar a cabo la aireación del medio y a la vez la agitación constante del mismo. Para tal propósito se utilizó para cada fermentador una bomba de aire ELITE® 801 con una salida de aire de 2500 cc/minuto y una presión de trabajo de 3.0 PS.I. Cada bomba de aire se conectaba al fermentador por medio de una manguera de 90 cm de longitud. Luego de salir de la bomba, el aire era filtrado al pasar por unidades de filtración Millex® FG de Millipore®; que contaban en su interior con un filtro de membrana de 50mm de diámetro con poros de 0.2 μ m. Las unidades de filtración se unían al tubo de vidrio de entrada de aire por medio de un segmento de manguera de hule. El aire, una vez que emergía del tubo de entrada en forma de burbujas, salía del fermentador por el tubo de vidrio de salida y pasando un segmento de manguera ingresaba a un sujeta-filtro reutilizable de poliacetal marca Pall® en el que se colocaban discos de 25 mm de diámetro de papel filtro P8 Fisherbrand®, a manera de filtro de salida.

Fase II

En esta fase se utilizaron los fermentadores elaborados en la fase I para llevar a cabo ensayos de fermentación sumergida del hongo en los que se evaluó su respuesta frente a distintas variables de cultivo. Se describen las condiciones y las metodologías que se mantuvieron constantes durante los seis ensayos realizados:

- Período de cultivo: cuatro días
- Concentración inicial de cada unidad experimental (fermentador o erlenmeyer control en agitación): 1×10^4 esporas/ml
- Tasa de aireación: 3.125 v/v/m (volumen de aire/volumen de líquido / minuto)
- Volumen de trabajo: 800 ml
- Antiespumante: 400 μ l de aceite de soya
- pH del medio de cultivo: 5.5 (excepto en el ensayo donde la variable fue el pH)

- Temperatura de cultivo: $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (excepto en el ensayo donde la variable fue la temperatura)
- Evaluación del crecimiento y medición del pH durante el 2°, 3° y 4° día de cultivo

Para evaluar el crecimiento de *B. bassiana*, se realizó el conteo de esporas en la cámara de Neubauer (hemocitómetro) para determinar la concentración por mililitro. Cuando se realizó la evaluación del crecimiento utilizando el hemocitómetro, para cada tratamiento se realizaron dos conteos que se trataron como repeticiones. La determinación del pH se realizó mediante un pHmetro digital. El análisis estadístico de los datos recopilados se realizó en el programa STATISTICA® versión 5.5.

Se evaluó el efecto de siete factores sobre el crecimiento del hongo: medios de cultivo, relación FC:FN, concentración de reactivos, temperatura, luminosidad, pH y cepas. A continuación se presentan los tratamientos utilizados en cada ensayo:

Evaluación de diferentes medios de cultivo

Se prepararon seis medios de cultivo para evaluar el crecimiento del hongo sobre diversos sustratos. La fuente de carbono utilizada fue la misma, mientras que como fuente de nitrógeno y otros nutrientes se probaron cinco sustratos complejos y un sustrato químicamente definido. Además, se preparó un control con la composición utilizada en el CICAPE, el cual se mantuvo en agitación a 150 rpm. De esta manera se completaron siete tratamientos.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de *B. bassiana* en diversos sustratos líquidos.

Nº de tratamiento	Composición del medio	
	Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno y otras sustancias
1	25 g/l de sacarosa	10 g/l de triptona Oxoid
2	25 g/l de sacarosa	10 g/l de peptona Sigma
3	25 g/l de sacarosa	10 g/l de extracto de levadura Oxoid
4	25 g/l de sacarosa	10 g/l de extracto de malta Bacto
5	25 g/l de sacarosa	10 g/l de cebada malteada Sigma
6	25 g/l de sacarosa	6g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 3.5g/l de KH_2PO_4 + 1g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0.1g/l de NaCl + 0.1g/l de CaCl_2
Control	25 g/l de sacarosa	10 g/l de extracto de levadura Oxoid

Evaluación de diferentes relaciones FC:FN

Una vez que se determinó cuales sustancias al ser utilizadas como sustrato, permitían un mayor crecimiento del hongo, se evaluaron medios en los que la variable fue la relación entre la cantidad de fuente de carbono y la cantidad de fuente de nitrógeno utilizada (FC:FN). Se evaluaron tres distintas relaciones, y dos fuentes de nitrógeno diferentes. Se utilizó también un control en agitación a 150 rpm, cuya composición y relación FC:FN eran las utilizadas normalmente en el CICAPE para medios líquidos.

Cuadro 2. Tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de *B. bassiana* en sustratos con distintas relaciones FC:FN.

Nº de tratamiento	Descripción del tratamiento	Composición del sustrato	
		Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno y otras sustancias
1	FC:FN 2:1	25 g/l de sacarosa	12.5 g/l de extracto de levadura
2	FC:FN 2:1 con 2/3 parte de Fuente N peptona	25 g/l de sacarosa	4.2 g/l de extracto de levadura y 8.3 g/l de peptona
3	FC:FN 5:1	25 g/l de sacarosa	5 g/l de extracto de levadura
4	FC:FN 5:1 con 2/3 parte de Fuente N peptona	25 g/l de sacarosa	1.7 g/l de extracto de levadura y 3.3 g/l de peptona
5	FC:FN 10:1	25 g/l de sacarosa	2.5 g/l de extracto de levadura
6	FC:FN 10:1 con 2/3 parte de Fuente N peptona	25 g/l de sacarosa	0.83 g/l de extracto de levadura y 1.67 g/l de peptona
7	Control (FC:FN 5:1)	25 g/l de sacarosa	5 g/l de extracto de levadura

Evaluación de distintas concentraciones y relaciones FC:FN

En este ensayo, además de evaluar dos distintas relaciones FC:FN, se evaluaron para cada relación tres concentraciones de los componentes agregados. Es decir, manteniendo una misma relación se modificó la cantidad de sustancia agregada.

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para evaluar el crecimiento de *B. bassiana* en sustratos con distintas concentraciones y relaciones FC:FN.

Nº de tratamiento	Descripción del tratamiento	Composición del sustrato	
		Fuente de Carbono	Fuente de Nitrógeno y otras sustancias
1	FC:FN 2:1 Concentración baja	12.5 g/l de sacarosa	2.08 g/l de extracto de levadura y 4.17 g/l de peptona
2	FC:FN 2:1 Concentración media	25 g/l de sacarosa	4.17 g/l de extracto de levadura y 8.33 g/l de peptona
3	FC:FN 2:1 Concentración alta	50g/l de sacarosa	8.33 g/l de extracto de levadura y 16.67 g/l de peptona
4	FC:FN 1:1 Concentración baja	12.5 g/l de sacarosa	4.17 g/l de extracto de levadura y 8.33 g/l de peptona
5	FC:FN 1:1 Concentración media	25 g/l de sacarosa	8.33 g/l de extracto de levadura y 16.67 g/l de peptona
6	FC:FN 1:1 Concentración alta	50 g/l de sacarosa	16.67 g/l de extracto de levadura y 33.33 g/l de peptona
7	Control (FC:FN 5:1)	25 g/l de sacarosa	1.67 g/l de extracto de levadura y 3.33 g/l de peptona

Evaluación de diferentes temperaturas de cultivo y condiciones de luminosidad

En este ensayo se utilizaron ocho diferentes tratamientos mediante los que se evaluaron tres temperaturas de cultivo a intervalos de 5°C , así como dos condiciones diferentes de luminosidad. Dos de los tratamientos eran controles en agitación (150 rpm) y los otros seis eran fermentadores con burbujeo. Una de las condiciones lumínicas consistía en crecimiento bajo luz natural, manteniendo los fermentadores o los erlenmeyers control (ambos de vidrio transparente) en un cuarto con ventanas por donde podía entrar la luz. La otra condición lumínica, de total oscuridad, se consiguió envolviendo completamente los fermentadores y los erlenmeyers control con papel aluminio, de manera

que la luz no ingresaba a los mismos. El medio de cultivo utilizado era igual para todos los tratamientos, con 25 g/l de sacarosa, 4.2 g/l de extracto de levadura y 8.3 g/l de peptona.

Cuadro 4. Tratamientos utilizados en el ensayo de cultivo de *B. bassiana* con diferentes temperaturas y condiciones de luminosidad.

Nº de tratamiento	Temperatura de cultivo	Condición lumínica
1	18°C	Luz natural
2	18°C	Oscuridad
3	23°C	Luz natural
4	23°C	Oscuridad
5	28°C	Luz natural
6	28°C	Oscuridad
7 (control)	23°C	Luz natural
8 (control)	23°C	Oscuridad

Evaluación de distintos valores de pH

Este ensayo contó con cuatro tratamientos, incluyendo el control. El pH de los medios se ajustó a tres diferentes valores, los cuales eran 4.8 para el tratamiento 1, 5.5 para el tratamiento 2 y 6.2 para el tratamiento 3; cada valor se repitió en dos fermentadores. Los controles en agitación tenían un pH de 5.5. Aunque se ajustó el pH inicial, durante los siguientes días de cultivo este no fue regulado.

Evaluación del crecimiento de diferentes cepas

En este ensayo se evaluó el desarrollo en los fermentadores de tres cepas de *B. bassiana* con muy distinta procedencia. Se utilizó la cepa Sar del CICAFAE (tratamiento 1), la cual fue aislada de la broca del café; la cepa D0101 de DIECA (tratamiento 2), aislada del salivazo e ingrediente activo del bioplaguicida Beauvedieca®, y la cepa GHA (tratamiento 3), ingrediente activo del bioinsecticida colombiano MYCOTROL®. El medio de cultivo utilizado era el mismo, con 25 g/l de sacarosa, 4.2 g/l de extracto de levadura y 8.3 g/l de peptona.

Bioensayo sobre broca del café

Se llevó a cabo un bioensayo sobre la broca del café para evaluar la patogenicidad de las esporas de *B. bassiana* producidas mediante fermentación sumergida.

Desinfección de las brocas: En el laboratorio, se tomaron 1000 brocas para someterlas a un proceso de desinfección. Los insectos se colocaron en bolsas de tergal, se sumergieron

por 1 minuto en una solución de cloruro de benzalconio al 2% y se lavaron por 5 segundos en agua destilada, el proceso se repitió dos veces y luego se secaron las brocas con ayuda de un ventilador. Las brocas que mostraron verse afectadas por el proceso de desinfección fueron descartadas.

Aplicación del hongo: Las brocas se colocaron sobre papel toalla en dos cajas plásticas de 40 x 30 cm, correspondientes al tratamiento con el hongo y al tratamiento control; en una caja se colocó el doble de brocas. La caja con menos brocas se asperjó con 5 ml de agua destilada estéril, luego de lo cual se pasaron 30 brocas a dos placas Petri (15 a cada una) que sirvieron como controles. La caja que contenía mayor cantidad de insectos fue asperjada con 8 ml de un cultivo líquido de *B. bassiana* con una concentración de 1.25×10^7 esporas/ml que llevaba 4 días de crecimiento en un fermentador. De esta caja se tomaron brocas suficientes para 6 repeticiones con 15 individuos cada una. Todas las placas Petri de los dos tratamientos contaban con un papel filtro en su interior, el cual se humedeció con 2 ml de agua destilada estéril momentos antes de colocar las brocas, para formar una cámara húmeda. Las placas se sellaron con papel parafilm® y se colocaron en un cuarto a 22°C, donde fueron evaluadas al cabo de 10 días.

● Resultados

Fase I

Los fermentadores que se construyeron (figura 1) demostraron ser efectivos para el uso requerido, pues permitían una adecuada aireación y agitación del medio.

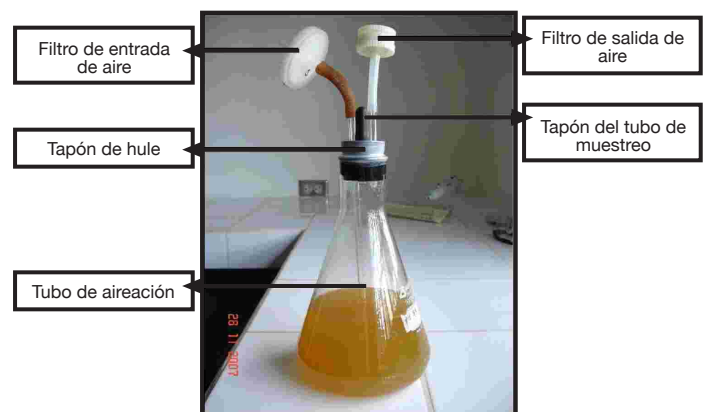


Figura 1. Fermentador tipo II para la producción de *B. bassiana*

Fase II

El crecimiento del hongo resultó muy satisfactorio en la mayoría de los tratamientos evaluados. De manera general se observó una tendencia al aumento exponencial de la concentración de esporas de *B. bassiana* en el medio de cultivo.

Evaluación de diferentes medios de cultivo

El desarrollo del hongo fue diferente en todos los sustratos, como se muestra en figura 2. En la primera evaluación (día dos) la mayor concentración se presentó en el tratamiento 2 donde se utilizó como fuente de nitrógeno peptona, mientras que el medio químicamente definido presentaba el menor desarrollo del microorganismo. La evaluación del último día de cultivo mostró que la proliferación fue mejor en los tratamientos 3 ($2,77 \times 10^8$ esporas/ml) y 5 ($1,96 \times 10^8$ esporas/ml), donde se usó como fuente de nitrógeno extracto de levadura y cebada molida respectivamente. En el tratamiento con triptona se observó en todas las evaluaciones un nivel considerable de contaminación por bacterias de diversa morfología, incluyendo cocos y bacilos.

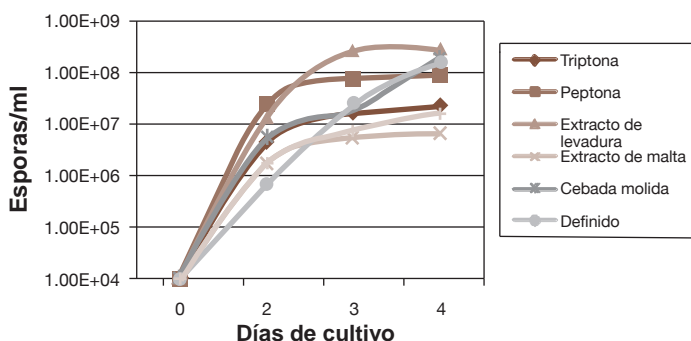


Figura 2. Evolución de la concentración de esporas de *B. bassiana* en siete medios líquidos de diversa composición (tratamientos) durante cuatro días de cultivo.

Evaluación de diferentes relaciones FC:FN

En la curva de crecimiento del hongo (figura 3) se observó un comportamiento muy similar entre los tratamientos, aunque el control se desarrolló en una proporción mucho menor. La mayor concentración para todos los días de evaluación se presenta en el tratamiento 2, que estadísticamente es el único con un mejor rendimiento que todos los demás para el día final del ciclo de cultivo, cuando se determinó una concentración de $3,35 \times 10^8$ esporas/ml.

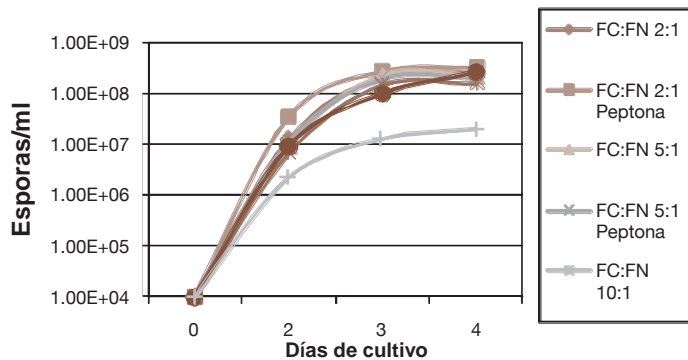


Figura 3. Evolución de la concentración de esporas de *B. bassiana* en medios de cultivo con diferentes relaciones FC:FN durante cuatro días de cultivo.

Evaluación de distintas concentraciones y relaciones FC:FN

El crecimiento del hongo en los seis primeros tratamientos de este ensayo fue muy parecido, como se observa en la figura 4. Al cabo de cuatro días de cultivo, el rendimiento de los diversos tratamientos fue similar, pues aparte del control solo el tratamiento 1 fue estadísticamente inferior a los demás. Entre los restantes cinco tratamientos no se presentó diferencia estadística. Sin embargo, resulta interesante notar que los tratamientos 1 y 4, en los cuales se utilizó la más baja concentración de sacarosa (12,5 g/l), presentaron los menores rendimientos al final de la semana.

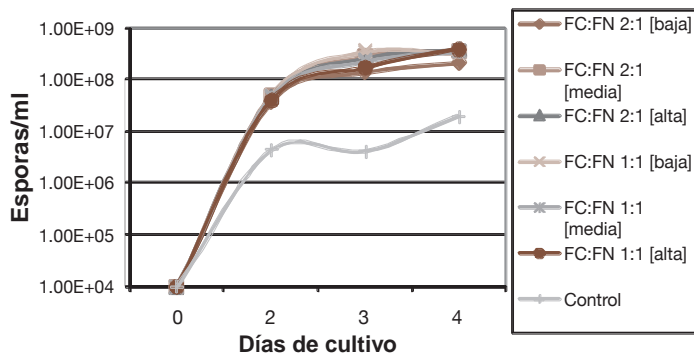


Figura 4. Evolución de la concentración de esporas de *B. bassiana* en medios de cultivo con diferentes relaciones FC:FN y diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno.

Evaluación de diferentes temperaturas de cultivo y condiciones de luminosidad

La temperatura influyó de manera muy evidente en el desarrollo del hongo en los fermentadores. La figura 14 muestra la concentración del entomopatógeno en los

diferentes tratamientos a través del tiempo. La temperatura más baja (18°C) provocó un lento crecimiento, que al final sería incluso superado por el control en agitación. La temperatura intermedia (23°C) hizo que *B. bassiana* creciera de una manera similar a como lo hizo en ensayos anteriores, alcanzando la máxima concentración en el cuarto día de cultivo. Algo muy diferente ocurrió cuando la temperatura de cultivo fue más alta (28°C), pues el hongo alcanzó la mayor concentración en el medio tan solo tres días después de haber sido inoculado, disminuyendo ésta en el día cuatro como se observa en la figura 5.

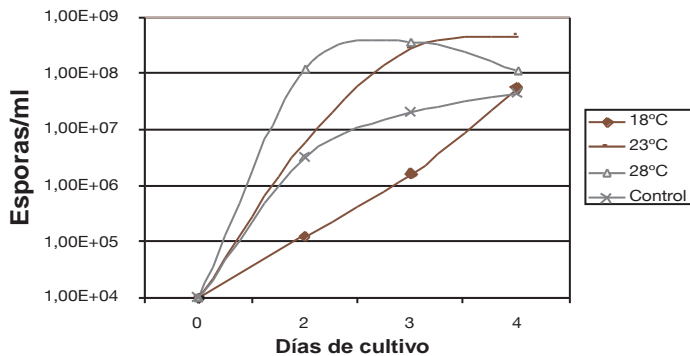


Figura 5. Evolución de la concentración de esporas de *B. bassiana* en medios de cultivo con diferentes temperaturas.

A diferencia de lo ocurrido con la temperatura, la condición lumínica en que se llevó a cabo el crecimiento pareció influir muy poco o nada en el desarrollo del hongo. En promedio, la variable luz/oscuridad no provocó diferencias significativas en la concentración.

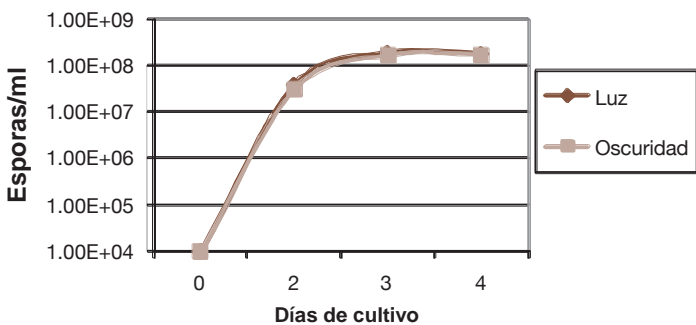


Figura 6. Evolución de la concentración de esporas de *B. bassiana* en medios de cultivo líquidos bajo dos condiciones lumínicas.

Evaluación de distintos valores de pH

En la figura 7 se observa claramente que el desarrollo del hongo en los fermentadores fue muy similar sin

importar el pH inicial. Estadísticamente, al analizar las concentraciones de los cuatro tratamientos de este ensayo en el día 4, no se encuentran diferencias entre los mismos, excepto con el control en agitación.

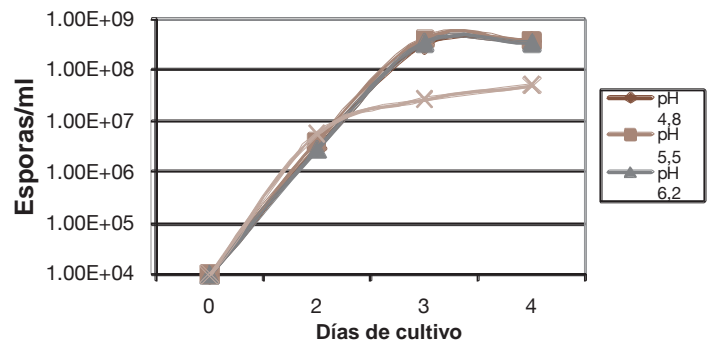


Figura 7. Evolución de la concentración de esporas del hongo *B. bassiana* en medios de cultivo con diferentes valores iniciales de pH.

En la figura 8 se muestra el comportamiento del pH en los cuatro tratamientos de este ensayo. Aunque en un principio se encontraban distanciados, el pH de los tres tratamientos converge a un valor similar hacia el final del ciclo de cultivo, aproximadamente 4,5. El pH del control en agitación no desciende tanto como los demás, finaliza con un valor de 5,1.

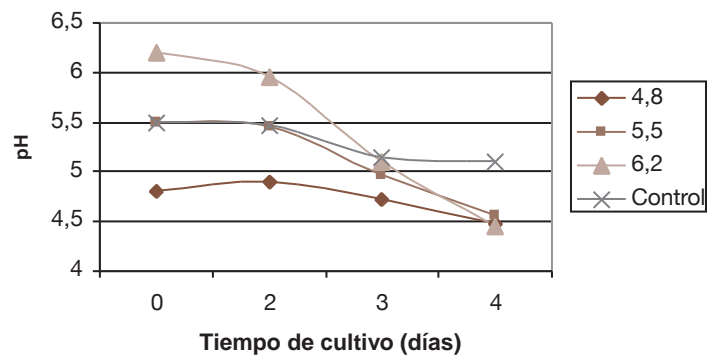


Figura 8. Evolución del pH en los tratamientos en los que se evaluó el efecto de este parámetro.

Evaluación del crecimiento de diferentes cepas

Las evaluaciones realizadas el día 2 mostraron un crecimiento similar de las 3 cepas en este ensayo, aunque se presentó una pequeña diferencia significativa entre GHA y D0101. En los siguientes días, el comportamiento cambió. Para el día 3, la concentración de la cepa Sar fue muy superior a las de las otras dos, entre las cuales no se observó diferencia estadística.

En el último día de cultivo, la cepa Sar alcanzó el doble o más de la concentración de las otras cepas. Entre D0101 y GHA no se presentó diferencia significativa.

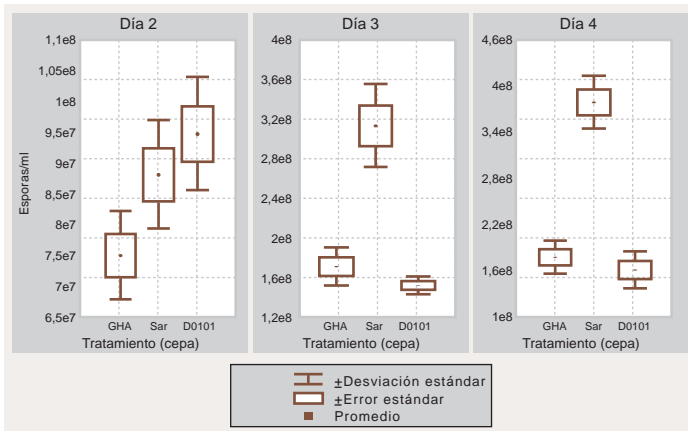


Figura 9. Rendimiento de diferentes cepas de *B. bassiana* cultivadas en medio líquido.

Bioensayo sobre broca del café

Luego de 10 días de incubación de las brocas tratadas con blastosporas de *B. bassiana* se observó que la mayoría de los individuos se hallaban cubiertos en mayor o menor medida con una capa blanca algodonosa. Del total de brocas tratadas, un 86.7% mostraba colonización externa por parte de las estructuras del hongo. Una de las placas control presentó dos individuos muertos con la misma capa blanca 5.

Cuadro 5. Resultados del bioensayo de infección de brocas con un cultivo líquido de *B. bassiana* después de 10 días de inoculado.

Tratamiento	1.25x10 ⁷ esporas/ml						Control	
Repetición	1	2	3	4	5	6	1	2
Brocas parasitadas	13	11	14	13	12	15	2	0
Promedio	13						1	
Porcentaje de mortalidad	86.7%						6.7%	

En las brocas examinadas al estereoscopio, se observó que la capa blanca era diferente entre los individuos. En algunos casos se trataba de un crecimiento micelial filamentososo muy espeso (figura 10A), mientras que en otros tenía una apariencia polvosa en forma de pequeños gránulos (figura 10B).

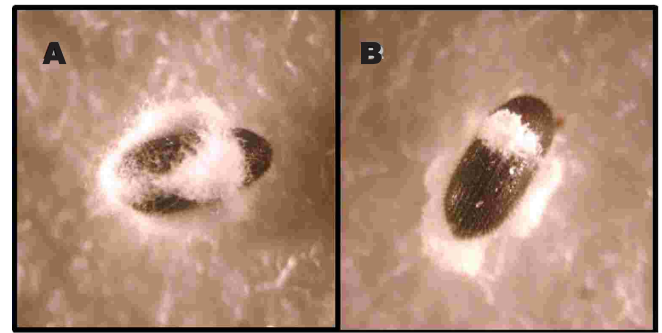


Figura 10. Adultos de broca del café con crecimiento externo de *Beauveria bassiana*, a 10 días de inoculadas. Crecimiento micelial (A); esporulación (B). Aumento: 20X.

● Discusión

Fase I

El uso de fermentadores o biorreactores con control automático de las condiciones de cultivo es la técnica más adecuada para producir microorganismos a gran escala. Pese a esto, los cultivos discontinuos (batch) pueden ser utilizados de igual manera para verificar y corregir cuando sea necesario las metodologías de laboratorio y así dar paso al escalado del proceso (Taborsky, 1992). Los fermentadores diseñados y utilizados en esta investigación constituían un sistema discontinuo, aunque no totalmente cerrado, donde *B. bassiana* se desarrollaba bajo el efecto de distintos parámetros ambientales.

Debido al pequeño volumen de los fermentadores (1 litro), la sola presión con que ingresaba el aire era suficiente para agitar el medio de cultivo, que circulaba hacia arriba en la zona central de los fermentadores y descendía en el espacio cercano a las paredes del contenedor, para luego subir nuevamente. Aunque la mayoría de los fermentadores de escala industrial utilizan dispositivos de agitación mecánicos, denominados impulsores, existe otro tipo de fermentadores que llevan a cabo la agitación del medio mediante la inyección de aire en la base de los mismos. A estos últimos se les denomina fermentadores de torre o "air lift" (Taborsky, 1992). Este mismo principio fue el que se utilizó en la elaboración de los fermentadores, aunque debido a la forma de los mismos se necesitó de un flujo de aire mayor que el utilizado normalmente, pues se dice que el diseño para este tipo de agitación debería ser el de un cilindro largo y delgado, y las botellas y erlenmeyers utilizados no tenían esa forma.

Fase II

A lo largo de todas las pruebas que se realizaron en esta segunda etapa de la investigación se obtuvieron muy buenos rendimientos en los fermentadores (figura 11), tomando

en cuenta que se trataba de sistemas muy sencillos. Como se observa en las curvas de crecimiento, en la mayoría de los casos la concentración de esporas que se obtuvo en los fermentadores era aproximadamente diez veces la concentración obtenida en los controles en agitación, con valores que rondaban los 400 millones (4×10^8) de esporas por mililitro de medio de cultivo. Esto indica que las condiciones que se presentaban dentro de los fermentadores favorecían el desarrollo del hongo en mayor manera que las condiciones de aquellos cultivos que se encontraban en agitación.

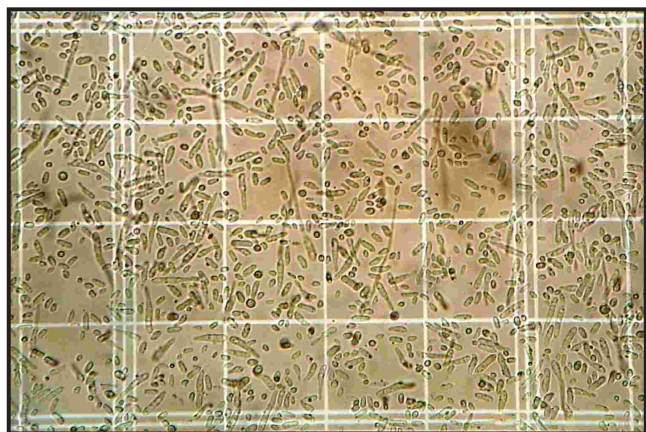


Figura 11. Cultivo líquido de *B. bassiana*, tres días de inoculado, que ilustra las altas concentraciones en los fermentadores tipo II. Aumento: 400x.

El oxígeno disuelto en el medio es un nutriente esencial para aquellos organismos que se desarrollan en condiciones aeróbicas. Se trata de un nutriente que es muy poco soluble en medios líquidos, de manera que debe ser aportado continuamente al cultivo; esto puede realizarse mediante agitación o aireación forzada (Madigan *et al.*, 2004). Cuando un microorganismo se cultiva en medio líquido utilizando cristalería de laboratorio en agitación, como por ejemplo un erlenmeyer, se sabe que la tasa de transferencia o transporte de oxígeno (OTR por sus siglas en inglés) al medio es muy lenta, pues la interacción entre las dos fases está limitada a la superficie del líquido (Taborsky, 1992). Esto ocurría con los controles, donde esa menor cantidad de oxígeno daba como resultado el lento crecimiento del hongo. En los fermentadores, el oxígeno era inyectado al medio por la bomba de aire, creándose una mayor OTR gracias a la formación continua de burbujas que ascendían desde el fondo del líquido.

Evaluación de diferentes medios de cultivo

Algunos hongos, como el fitopatógeno *Colletotrichum truncatum*, deben crecer vegetativamente y luego diferenciarse para producir conidias. Este tipo de hongos

requieren el agotamiento de los nutrientes esenciales para que se desencadene la esporulación, de manera que se benefician con los bajos niveles de nutrientes presentes en los medios pobres. Otras especies de hongos, se benefician de los medios nutricionalmente ricos con una acumulación óptima de biomasa, como es el caso de aquellos que producen blastosporas (Vega *et al.*, 2003; Jackson, 1997). *B. bassiana* se encuentra dentro de este grupo, y como se observó en los diferentes tratamientos con medios complejos, la producción de esporas ocurría prácticamente en el momento en que el sistema era inoculado.

Las marcadas diferencias de desarrollo que se presentaron en los distintos tratamientos tuvieron su origen en la variada naturaleza de las sustancias que se agregaron como fuente de nitrógeno y otras sustancias, pues la fuente de carbono fue igual para todos. El porcentaje de nitrógeno que hay en cada una de las sustancias evaluadas es muy variable y probablemente jugó un papel decisivo en el rendimiento final de cada tratamiento. Como se puede observar en el cuadro 6, el extracto de malta contiene la menor concentración de nitrógeno, lo cual provocó que en este medio se diera el crecimiento más pobre de *B. bassiana*, incluso menor que el control. A pesar de que la triptona posee un alto contenido de nitrógeno, el reactivo utilizado pertenecía a un lote viejo del CICAPE, que había sido abierto en el 2005. Probablemente, la antigüedad del reactivo, además de provocar la pérdida de cualidades del mismo, fue la causa de la gran contaminación (mucho mayor que en otros tratamientos) que se presentó en este medio de cultivo. La peptona es la sustancia que presenta un mayor porcentaje de nitrógeno, con un 16%. Si se analiza la curva de crecimiento para este ensayo, se puede observar que esta sustancia fue la que permitió un desarrollo más rápido del hongo al inicio del cultivo, pero para los días 3 y 4 este disminuyó de manera notable. Puede ser que otro tipo de nutrientes que se necesitan en pequeñas cantidades, los micronutrientes, no se encontraban en la peptona en las cantidades necesarias para satisfacer las necesidades del microorganismo conforme pasaba el tiempo. La gran diversidad de componentes del extracto de levadura, así como su alto contenido de nitrógeno crearon el balance necesario para que fuera en este sustrato donde ocurriera el mayor desarrollo del hongo. De igual manera, al tratarse de un material poco procesado, probablemente la cebada poseía tales características, que la convirtieron en el segundo mejor sustrato.

Cuadro 6. Contenido de nitrógeno de algunas sustancias utilizadas comúnmente para la elaboración de medios de cultivo.

Sustancia	Triptona	Peptona	Extracto levadura	Extracto malta
Porcentaje de Nitrógeno	13.3%	16%	10.9%	0.3%

Fuente: Oxoid, 1998; BD Bionutrients, 2006.

Evaluación de diferentes relaciones FC:FN

Para este ensayo los medios a evaluar serían dos, uno fue el medio que permitió el mayor rendimiento en el primer ensayo, compuesto por azúcar y extracto de levadura, y el otro fue un medio nuevo en el que además del azúcar se combinó el extracto de levadura con peptona como fuente de nitrógeno. Esta combinación se eligió al observar que durante el ensayo anterior el hongo creció inicialmente con mayor velocidad en el medio con peptona, posible evidencia de una rápida disponibilidad de nutrientes en este sustrato, a pesar de que globalmente no fue el mejor.

Después de cuatro días de cultivo, fue en el nuevo medio con peptona y extracto de levadura donde ocurrió el mejor desarrollo del hongo (figura 10). Este ha sido usado en otras ocasiones para la fermentación sumergida de *B. bassiana*, aunque a diferencia de la presente investigación, la fuente de carbono utilizada ha sido glucosa o dextrosa, recibiendo el medio el nombre de YPG o YPD respectivamente (Hegedus *et al.*, 1992; Haraprasad *et al.*, 2001).

Durante la realización de este y el siguiente ensayo se hizo referencia a la relación entre la cantidad de fuente de carbono y la cantidad de fuente de nitrógeno que se utilizaba en cada tratamiento, designada como FC:FN. Cabe destacar que no se trataba de la relación C:N como tal, pues debido a la falta de tiempo y equipo necesario, era muy difícil determinar la concentración exacta de cada uno de estos elementos en el medio, por lo que se indicaba la relación entre las sustancias que se usaban como fuente de los respectivos elementos. Vega *et al.* (2003) realizaron un estudio similar donde utilizaron concentraciones de carbono altas y bajas (36 y 8 g/l respectivamente) y distintas relaciones C:N (10:1, 30:1 y 50:1) para evaluar el rendimiento de varios hongos entomopatógenos. Encontraron que en general, el mejor crecimiento se presentaba en medios con alta concentración de carbono y relaciones C:N de 10:1. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en esta investigación, pues de manera similar, los mejores rendimientos se obtuvieron en el medio con un relación FC:FN más pequeña, y aunque no se observaron grandes diferencias provocadas por la concentración, los tratamientos con concentraciones medias y altas permitieron obtener rendimientos superiores a aquellos con bajas concentraciones de carbono.

Evaluación de diferentes temperaturas de cultivo y condiciones de luminosidad

Con base en los resultados de este ensayo, la variable luz/oscuridad no pareció tener un efecto importante en el desarrollo del hongo en estudio. Aunque se observó una pequeña diferencia entre los tratamientos 1 y 2 (con

temperatura de cultivo de 18°C) y los tratamientos 7 y 8 (controles), ésta pudo obedecer a otros factores diferentes. En el caso de los controles en agitación, durante el transcurso de los 4 días de cultivo se presentó un problema con el agitador orbital, de manera que el control en oscuridad debió ser colocado en otro equipo en el cual no se pudo regular la velocidad de agitación. Por otra parte, los tratamientos que se mantuvieron a baja temperatura presentaron un desarrollo muy lento del hongo, como se observa en la curva de crecimiento. Debido a esto, ocurrió un mayor desarrollo de las bacterias que normalmente estaban presentes a muy bajas concentraciones en ambos fermentadores, pero el grado de contaminación fue mayor en el tratamiento 2 (en oscuridad) provocando posiblemente un mayor impedimento en el crecimiento del hongo.

Contrariamente a lo ocurrido con la luminosidad, la temperatura tuvo un efecto determinante en el crecimiento del hongo, lo cual se evidenció al ser la concentración del hongo en el medio estadísticamente diferente para las tres temperaturas. Al igual que ocurre con otros organismos, las tasas de desarrollo de los hongos entomopatógenos varían dependiendo de la temperatura, de acuerdo a las características de la cepa, incluso dentro de una misma especie (Shimazu, 2004). *Beauveria bassiana* puede ser encontrado en un amplio rango de temperaturas que va desde los 15°C a los 30°C (Godoy *et al.*, 2007), sin embargo, numerosos estudios han demostrado que un número considerable de aislados de *B. bassiana* presentan la mayor tasa de crecimiento a 28°C, un poco por encima del rango común de otros entomopatógenos, que se ubica entre los 20°C y 25°C (Shimazu, 2004). Esto concuerda con los resultados obtenidos, pues es evidente que la cepa utilizada en la investigación resultó favorecida en su desarrollo por la temperatura más alta evaluada, que fue de 28°C. En investigaciones realizadas en el pasado se han utilizado distintas temperaturas para llevar a cabo la producción de *B. bassiana*; éstas por lo general se han mantenido dentro de un rango estrecho, con valores un poco por encima y por debajo de 28°C. Dalla *et al.* (2005) cultivaron el hongo a 26°C, Hegedus *et al.* (1990) utilizaron la temperatura de 27°C, Vega *et al.* (2003) obtuvieron buenos resultados a 28°C, mientras que Solís *et al.* (2006) realizaron la fermentación a 30°C.

A 23°C, la cepa Sar tardó un día más en alcanzar una concentración de esporas/ml similar a la del tratamiento que se mantuvo a una temperatura superior, donde la mayor producción se alcanzó con tan solo 3 días de cultivo. Por otra parte, a 18°C ocurrió un crecimiento muy pobre del hongo, tanto que incluso no fue sino hasta el final que logró igualar el rendimiento del control en agitación. Esa significativa diferencia se debió al metabolismo del hongo,

que respondió de manera diferente ante las condiciones del entorno. Es probable que muchas de las reacciones enzimáticas que forman parte de la maquinaria celular de esta cepa se vieran favorecidas por la mayor temperatura de los tratamientos 5 y 6, de manera que el microorganismo podía crecer más rápidamente. En el tratamiento con menor temperatura, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas era mucho menor, de manera que la asimilación de nutrientes del medio por parte de las células ocurría con lentitud (Curtis y Barnes, 2001).

Evaluación de distintos valores de pH

El crecimiento óptimo de los hongos entomopatógenos puede darse en un amplio rango de pH. Los tres tratamientos utilizados en este ensayo, donde el pH inicial era 4.8, 5.5 o 6.2, no tuvieron un impacto significativo en el crecimiento del hongo, pues este se desarrolló de manera muy similar en los medios de cultivo que poseían diferentes pH. De hecho, si se analiza la curva que muestra la evolución del pH a lo largo del ciclo de cultivo, se observa que el pH del medio en los tres tratamientos tendió a igualarse hacia el último día, lo cual podría ser indicio de una gran capacidad del hongo para regular el pH del medio que lo rodea, mediante la liberación de distintas sustancias. En un trabajo similar, Jackson et al. (2004) encontraron que también el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* disminuía de manera natural el pH del medio durante la producción de blastosporas, y, al igual que en la presente investigación no se presentaban diferencias significativas en el rendimiento después de tres días de cultivo en medios con pH inicial de 3.5, 4.0, 4.5 o 6.5. Hallsworth y Magan (1996), señalan que los hongos entomopatógenos pueden regular el pH citosólico más efectivamente que muchas otras especies de hongos. De igual manera, pareciera que pueden regular el pH de su ambiente externo para así crear condiciones que favorezcan su crecimiento.

Evaluación del crecimiento de diferentes cepas

Diferentes cepas de una misma especie de microorganismo pueden presentar patrones de crecimiento muy distintos. Al estudiar el impacto de la nutrición en la producción de esporas para varios hongos entomopatógenos, Vega et al. (2003) encontraron un comportamiento muy distinto entre dos cepas de *Beauveria bassiana* procedentes de África y Estados Unidos. La cepa estadounidense producía rendimientos de hasta cinco veces los rendimientos de la otra.

En las cepas utilizadas en esta prueba, se observaron marcadas diferencias entre el patrón de esporulación de la cepa del CICA FÉ y las otras dos. Cuando se realizó el

cultivo de los inóculos de las tres cepas en PDA (figura 12) se observó un comportamiento que podría relacionarse con el crecimiento observado en los fermentadores. Tanto la cepa GHA de Mycotrol como la cepa D0101 de DIECA crecen sobre la superficie del agar como colonias pequeñas que se dispersan y producen una profusa esporulación color crema, sin mostrar mucho desarrollo micelial. Por el contrario, la cepa Sar crece generalmente en las placas como una sola colonia que se expande hacia los bordes, con un profuso crecimiento micelial que le otorga una apariencia algodonosa, presentando rara vez esporulación.

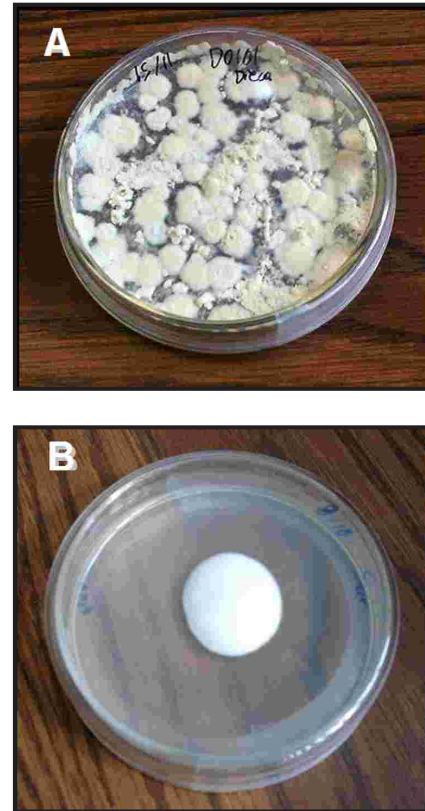


Figura 12. Dos cepas de *B. bassiana* que crecen en medio sólido. A) Cepa D0101 muestra poco desarrollo micelial y densa esporulación. B) Cepa Sar no esporula pero su desarrollo micelial le da un aspecto abultado.

Se sabe que las blastosporas son estructuras producidas de forma vegetativa, pudiendo considerárseles como segmentos hifales (Hegedus et al., 1990). Esto podría explicar por qué Sar, que presenta un mayor crecimiento micelial sobre PDA, rindió el doble de concentración de blastosporas en medio líquido que las otras cepas, pues estas han sido seleccionadas como ingrediente activo de bioinsecticidas por su mayor esporulación, y no crecimiento micelial, sobre sustrato sólido.

Bioensayo sobre broca del café

Las blastosporas producidas en los fermentadores resultaron ser altamente infectivas contra la broca del café. A pesar de que no se obtuvo una mortalidad absoluta, el 86.7% de mortalidad ocurrido indica el gran potencial de la cepa Sar para controlar esta plaga. En el CICAPE nunca se había realizado un ensayo que pusiera a prueba la virulencia de las blastosporas de esta cepa, no sus conidias, contra *H. hampei*. Por esta razón, y a pesar de que no era parte de los objetivos, la realización de la misma resultaba imprescindible, considerando que se planea escalar el proceso de fermentación evaluado.

El grado de virulencia de *B. bassiana* sobre la broca del café es muy variable, y depende en gran parte de la cepa utilizada. En un bioensayo realizado por Haraprasad *et al.* (2001), se encontró que incluso dentro de un grupo de aislados que habían sido todos obtenidos de brocas parasitadas, los niveles de mortalidad fluctuaban desde un 20% hasta un 93%. Otros factores, además de la cepa utilizada, tuvieron un efecto sobre la mortalidad obtenida.

Es sabido que la temperatura y humedad tienen gran importancia en la germinación, sobrevivencia y penetración de las esporas en la cutícula del hospedero (Godoy *et al.*, 2007). El bioensayo con las blastosporas no se realizó bajo las mejores condiciones de humedad y temperatura, y probablemente la mortalidad se vio disminuida por esta razón.

● Conclusiones

En la investigación se demostró la factibilidad de producir unidades infectivas del hongo *Beauveria Bassiana* en medio líquido mediante la utilización de fermentadores elaborados para tal fin. El hecho de producir el hongo en los fermentadores dio como resultado muy altos rendimientos (rondando los 500 millones de esporas/ml) y lo que es más importante, en tan solo cuatro días de cultivo. La producción no se vio afectada por el pH inicial del medio ni por la condición lumínica, mas la temperatura y la composición del medio sí influyeron decisivamente. Las esporas producidas resultaron ser altamente virulentas hacia la broca.

● Bibliografía

BAKER, P. y LEA, S. 1998. Integrated Management of the Coffee Berry Borer. <<http://www.cabi-commodities.org/Coffee/Cfp/CfpcplMC.htm>> (18/06/07).

BD BIONUTRIENTS. 2006. Technical Manual. Advanced Bioprocessing. Estados Unidos. 67 pp.

BENAVIDES, P.; BUSTILLO, A.; CÁRDENAS, R. y MONTOYA, E. 2003. Análisis Biológico y Económico del Manejo Integrado de la Broca del Café en Colombia. Revista Cenicafe. Colombia. 54(1): 5-23.

BRUN, L.; MARCILLAUD, C. y GAUDICHON, V. 1994. Cross resistance between insecticides in coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from New Caledonia. Bulletin of Entomological Research. Reino Unido. 84(2): 175-178.

CAMILO, J.; OLIVARES, F. y JIMÉNEZ, H. 2003. Fenología y reproducción de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) durante el desarrollo del fruto. Agronomía Mesoamericana. Costa Rica. 14(1): 59-63.

CURTIS, H. y BARNES, N. 2001. Biología. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 1496 pp.

DALLA, H.; DALLA, O.; BRAND, D.; PORTO DE SOUZA, L. y SOCCOL, C. 2005. Spore Production of *Beauveria bassiana* from Agroindustrial Residues. Brazilian Archives of Biology and Technology. Brazil. 48: 51-60.

GALLEGOS, G.; HUITRÓN, C.; GUERRERO, E.; OLAYO, R. y CEPEDA, M. 2003. Producción de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Bals) en medios de cultivo líquido para el control de picudos de la yema del manzano. Memoria XXVI Congreso Nacional de Control Biológico, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Guadalajara, Jalisco, México. UAAAN, México. pp 91-93.

GODOY, J.; VALERA, R.; GUÉDEZ, L.; CAÑIZALEZ, C. y CASTILLO, C. 2007. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. Maracaibo, Venezuela. Rev. Fac. Agron. Universidad del Zulia. 24: 415-425.

HALLSWORTH, J. y MAGAN, N. 1996. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. Applied and Environmental Microbiology. 62(7): 2435-2442.

HARAPRASAD, N.; NIRANJANA, S.; PRAKASH, H.; SHETTY, H. y WAHAB, S. 2001. *Beauveria bassiana* – A Potencial Mycopesticide for the Efficient Control of Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India. Biocontrol Science and Technology. Inglaterra. 11: 251-260.

HEGEDUS, D.; BIDOCHKA, M. y KHACHATOURIANS, G. 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Alemania. 33(6): 641-647.

HEGEDUS, D.; BIDOCHKA, M.; MIRANPURI, G. y KHACHATOURIANS, G. 1992. A comparison of the virulence, stability and cell wall surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36(6): 785-789.

JACKSON, M. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. Alemania. 19: 180-187.

JACKSON, M.; PAYNE, A y ODELSON, D. 2004. Liquid-culture production of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus* using portable fermentation equipment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 31: 149-154

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. y PARKER, J. 2004. *Brock. Biología de los Microorganismos*. Pearson Educación. Madrid, España. 1011 pp.

OXOID. 1998. *The OXOID Manual*. 8ª Edición. Hamsphire, Inglaterra.

SHIMAZU, M. 2004. Effects of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*. 39(3): 469-475.

SOLIS, S.; GARCÍA, C.; GONZÁLEZ, M.; MEDRANO, H. y GALÁN, L. 2006. Toxicidad de blastospóras de *Beauveria bassiana* (Vuill) contra palomilla del manzano *Cydia pomonella* L. (Lepidóptera: Tortricidae). *Folia Entomológica Mexicana* 45(2): 195-200. Xalapa, México.

VEGA, F.; JACKSON, M.; MERCADIER, G. y POPRAWISKY, T. 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 19: 363-368.



PROMECAFE

al servicio
de la caficultura regional

