

**ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE UN PELETIZADO CON UN
HONGO ENTOMOPATÓGENO**

**KAREN DANIELA DUQUE CASTIBLANCO
JENIFER NATALY PACHÓN CASTILLO**

**FUNDACION UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA QUÍMICA
BOGOTA D.C
2018**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE UN PELETIZADO CON UN
HONGO ENTOMOPATÓGENO**

**KAREN DANIELA DUQUE CASTIBLANCO
JENIFER NATALY PACHÓN CASTILLO**

**Proyecto Integral de Grado para optar el título de:
INGENIERO QUÍMICO**

**Director
Guadalupe Caicedo Ramírez
Bióloga Entomóloga**

**FUNDACION UNIVERSIDAD DE AMERICA
FACULTAD DE INGENIERIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA QUÍMICA
BOGOTA D.C
2018**

Nota de aceptación:

Ing. Sandra Liliana Mesa E.
Presidente del Jurado

Luz Briceida Pardo
Jurado 1

Elizabeth Torres
Jurado 2

Bogotá D.C, Agosto de 2018

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DIAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dr. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Decano Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director Programa de Ingeniería Química

Dr. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIERREZ

Las directivas de la Fundación Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, pues sin Él nada de esto sería posible.

Con todo el amor la dedico a mis padres Rolando y Margarita que con su esfuerzo y sacrificio puedo ser una profesional, me apoyaron, confiaron en mí y me alentaron en el transcurso de mi carrera universitaria.

A mis hermanos y demás familia por siempre estar conmigo.

Gracias a todos.

Karen Daniela Duque.

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios por guiarme, darme sabiduría durante el desarrollo de este trabajo de grado y por demostrarme su fidelidad en cada momento de mi vida.

De manera especial a mi papá Cenen Pachón, mi mamá Nelly Sofía Castillo y mi hermano Juan Manuel Pachón por su amor, apoyo, dedicación y ver en mí las mejores cualidades para alcanzar las metas propuestas.

Nataly Pachón Castillo.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Directora de trabajo Guadalupe Caicedo por su confianza y dedicación en la elaboración de este proyecto.

A Sandra Mesa por una ser una excelente profesional, por su apoyo, orientación y por brindarnos sus conocimientos que fueron indispensables para el desarrollo de nuestro trabajo de grado.

A nuestros amigos que aportaron en muchas ocasiones tiempo y conocimiento.

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	19
INTRODUCCIÓN	20
OBJETIVOS	22
1. MARCO TEÓRICO	23
1.1 JARDÍN BOTÁNICO Y LA CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA	23
1.2 CONTROL DE PLAGAS	23
1.2.1 Tipos	24
1.2.1.1 Control por medio de insecticidas Químicos	24
1.2.1.2 Control Biológico	24
1.2.1.2.1 Enemigos naturales	25
1.3 HONGO ENTOMOPATÓGENO	25
1.3.1 Mecanismo de acción de un hongo entomopatígeno	26
1.4 FORMULACIÓN EN EL CONTROL BIOLÓGICO	26
1.4.1 Tipos de formulaciones granuladas	27
1.5 COLEÓPTEROS	27
1.5.1 Pérdidas causadas por coleópteros.	27
2. SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS PARA EL CRECIMIENTO DE LA BIOMASA FÚNGICA	28
2.1 CONDICIONES AMBIENTALES DE CRECIMIENTO	29
2.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES	30
2.3 MEDIO DE CULTIVO – SUSTRATO	30
2.4 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS PARA EL CRECIMIENTO DE LA BIOMASA	31
2.4.1 Carbohidratos	31
2.4.1.1 Arroz	32
2.4.1.2 Harina de maíz	33
2.4.1.3 Arracacha	33
2.4.1.4 Harina de yuca	33
2.4.2 Minerales	33
2.4.2.1 Caolín	34
2.4.3 Vitaminas	34
3. SELECCIÓN DE LA FORMULACIÓN POR MEDIO DE UN DESARROLLO EXPERIMENTAL VARIANDO LA CONCENTRACIÓN DE DISTINTOS CARBOHIDRATOS	38
3.1 DIAGRAMA METODOLÓGICO	38
3.2 PRODUCCIÓN DEL INÓCULO	40

3.3 CONCENTRACIÓN DE MINERALES Y VITAMINAS	41
3.4 CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS	41
3.5 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	42
3.6 ESTERILIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS	44
3.7 INOCULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	44
3.8 ELABORACIÓN DEL PELETIZADO	47
3.9 DETERMINACIÓN DE CURVAS PATRÓN CON BIOMASA MICELIAR	48
3.10 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS	49
3.10.1 Concentración de esporas	50
3.10.2 Germinación de esporas	55
3.11 PRUEBA CON SUSTRATO DE ARROZ	58
4. ESPECIFICACIONES TECNICAS DEL PROCESO A ESCALA PILOTO	61
4.1 ESCALAMIENTO	61
4.1.1 Criterios de escalamiento	62
4.1.2 Requerimientos de oxígeno y rendimiento en reactores biológicos	63
4.2 ETAPAS DEL PROCESO EN LABORATORIO	64
4.2.1 Preparación del medio de cultivo	64
4.2.2 Esterilización, inoculación del medio de cultivo y fermentación	64
4.2.3 Formación del pellet	65
4.3 ETAPAS DEL PROCESO A ESCALA PILOTO	65
4.3.1 Preparación del medio de cultivo	65
4.3.2 Esterilización, inoculación del medio de cultivo y fermentación	66
4.3.3 Formación del pellet	67
4.4 SELECCIÓN DE LA PROPORCIÓN DE MATERIA PRIMA	68
4.5 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO	68
4.5.1 Descripción del proceso	69
4.6 EQUIPOS PARA EL PROCESO A ESCALA PILOTO	69
4.6.1 Mezclador	70
4.6.2 Biorreactor	71
4.6.3 Peletizadora	72
4.7 DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCESOS (PFD)	73
4.7.1 Tablas de información del proceso	75
4.7.2 Balance de masa	75
4.8 DESCRIPCIÓN DE LOS EQUIPOS SELECCIONADOS	80
5. EVALUACIÓN DE COSTOS DE PROCESO A ESCALA PILOTO	81
5.1 INVERSIONES	81
5.1.1 Cotización de equipos	81
5.2 COSTOS DE OPERACIÓN	82
5.2.1 Mano de obra directa	82
5.2.2 Costos indirectos	83
5.2.3 Costos de servicios	83
5.2.3 Costos de materia prima	84
5.3 DEPRECIACIÓN DE LOS EQUIPOS	84

5.4 CAPITAL TRABAJO	85
5.5 VALOR DE SALVAMENTO	86
5.6 INGRESOS	86
5.7 TASA DE OPORTUNIDAD PARA EL PROYECTO	87
5.8 ESTIMADO DEL FLUJO EFECTIVO	87
5.8.1 Tabla flujo de efectivo	88
5.9 INDICADORES DE RENTABILIDAD	88
5.9.1 Valor presente neto (VPN) y tasa interna de retorno (TIR)	88
5.9.2 Relación Beneficio/Costo y periodo de recuperación (PR)	89
6. CONCLUSIONES	91
7. RECOMENDACIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	93
ANEXOS	105

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Ventajas y desventajas para tipos de mezcladores	70
Cuadro 2. Funciones básicas de un biorreactor	71
Cuadro 3. Ventajas y desventajas para tipos de biorreactores para fermentación en medio solido	72
Cuadro 4. Selección de equipos para planta piloto	80

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición nutricional de carbohidratos	35
Tabla 2. Composición másica de carbohidratos	42
Tabla 3. Composición másica del medio de cultivo	43
Tabla 4. Esporulación en medios de cultivo	46
Tabla 5. Conteo en cámara de Neubauer	52
Tabla 6. Concentración de esporas/g	53
Tabla 7. Esporas germinadas y no germinadas	56
Tabla 8. Porcentaje de germinación de esporas	57
Tabla 9. Concentración de esporas en sustrato de arroz	59
Tabla 10. Germinación de esporas en sustrato de arroz	59
Tabla 11. Selección de medio de cultivo	60
Tabla 12. Datos de los biorreactores de 200L y 2000L	62
Tabla 13. Tabla resumen de corrientes PFD	75
Tabla 14. Tabla resumen de corrientes PFD	75
Tabla 15. Balance de masa mezclador	76
Tabla 16. Composición másica corriente 6	77
Tabla 17. Composición equipo R-101	78
Tabla 18. Composición másica corriente 8	79
Tabla 19. Información de las corrientes según balance de masa	79
Tabla 20. Costos de mezcladores	81
Tabla 21. Costos de Biorreactores de lecho fluidizado	81
Tabla 22. Costos de peletizadoras	82
Tabla 23. Costos de equipos seleccionados	82
Tabla 24. Datos de mano de obra directa	83
Tabla 25. Datos de costos indirectos	83
Tabla 26. Datos de costos de servicios	83
Tabla 27. Datos de costos de materia prima	84
Tabla 28. Datos de la depreciación mensual y anual de los equipos	85
Tabla 29. Datos de capital trabajo	86
Tabla 30. Datos del valor de salvamento	86
Tabla 31. Flujo de efectivo	88
Tabla 32. Indicadores de rentabilidad	89
Tabla 33. Indicadores de rentabilidad	90

LISTA DE ILUSTRACIONES

	pág.
Ilustración 1. Diagrama metodológico experimental	39
Ilustración 2. Diagrama metodológico técnicas microbiológica	39
Ilustración 3. Micelio de <i>Beauveria bassiana</i>	40
Ilustración 4. Alícuota de 25 g de micelo en 200ml de jarabe de maíz	40
Ilustración 5. Inoculación del sustrato	44
Ilustración 6. Experimentos en incubación	44
Ilustración 7. Elaboración del pellet	47
Ilustración 8. Presentación del peletizado	47
Ilustración 9. Procedimiento para diluciones	50
Ilustración 10. Aspecto microscópico de <i>Beauveria bassiana</i> en arroz	51
Ilustración 11. Prueba de germinación de esporas	55
Ilustración 12. Aspecto microscópico germinación de <i>Beauveria</i>	57
Ilustración 13. Prueba con sustrato de arroz	58
Ilustración 14. Diagrama de bloques	68
Ilustración 15. Diagrama de proceso	69
Ilustración 16. Diagrama del proceso detallado	79
Ilustración 17. Simulación del crédito de Bancolombia	87

LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
Gráfico 1. Curva patrón medios de cultivo	49

LISTA DE ECUACIONES

	pág.
Ecuación 1. Concentración de esporas/g	52
Ecuación 2. Concentración de esporas/ml	52
Ecuación 3. Volúmen cámara de neubauer	53
Ecuación 4. Porcentaje de germinación	56
Ecuación 5. Balance de masa	76
Ecuación 6. Balance de masa en el mezclador	76
Ecuación 7. Concentración en el mezclador	76
Ecuación 8. Kg de soluto en corriente 6	76
Ecuación 9. kg de soluto corriente 7	77
Ecuación 10. Consumo en cada materia prima	78
Ecuación 11. Consumo total	78
Ecuación 12. Cantidad de micelio	78
Ecuación 13. Depreciación anual y mensual	84
Ecuación 14. Capital trabajo	85
Ecuación 15. Ingresos mensuales	86
Ecuación 16. Ingresos anuales	87
Ecuación 17. Valor presente neto	89
Ecuación 18. Tasa interna de retorno	89
Ecuación 19. Periodo de recuperación	89

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Tablas de absorbancia	106
Anexo B. Cotización de equipos	107
Anexo C. Precio de venta insecticida biológico (Biodipt)	114
Anexo D. Tabla de amortización del crédito	114

GLOSARIO

BEAUVERIA BASSIANA: es un hongo entomopatógeno que penetra, invade y se multiplica dentro de los insectos, permitiendo que bajo condiciones adecuadas sea usado como controlador biológico.

BIOPESTICIDA: son procedentes de materiales naturales como animales, plantas, microorganismos y minerales. Son altamente específicos contra las plagas objetivo y generalmente representan poco o ningún riesgo para las personas o el medio ambiente.

BLASTOSPORAS: espora la cual se forma mediante el proceso de germinación.

BROCA: *Hypothenemus hampei*, insecto que constituye la plaga más importante en cultivos de café a nivel mundial.

CONTROL BIOLÓGICO: el control biológico de plagas consiste en el uso de enemigos naturales y microorganismos para el control de sus poblaciones.

CONIDIOS: conjunto de esporas asexuales provenientes de las hifas del hongo.

ESPORAS: célula reproductiva que es producida por plantas, musgos, helechos y por algunas bacterias y protozoarios.

FRUCTIFICACIÓN: acción y efecto de dar fruto.

HEMOCELE: cavidad del cuerpo en los insectos constituida por líquido circulatorio.

INTEGUMENTO: se denomina al esqueleto de los animales invertebrados. Conformado por tres capas: cutícula, la hipodermis y la membrana basal.

MICELIO: es la masa de hifas que compone el cuerpo vegetativo de un hongo.

PATOGENICIDAD: es la capacidad de las bacterias para causar daño en el hospedero. Se relaciona con la virulencia del organismo y la resistencia del hospedero.

TUBO GERMINATIVO: en los hongos, es un pequeño poro en la pared externa de una espora a través del cual el tubo germinativo sale tras la germinación. La penetración del hongo en las plantas precisa del contacto y la adherencia de las esporas y/o de la primera hifa que resulta de su germinación (tubo germinativo) a la superficie vegetal.

RESUMEN

En este trabajo se busca estandarizar la composición de un medio de cultivo por lo cual realiza una selección de materias primas con base en la composición nutricional que le puedan brindar al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*; en términos de carbohidratos se elige: arracacha, harina de yuca, arroz y maíz, en cuanto a vitaminas y minerales se escoge complejo B y caolín respectivamente. Luego de la selección, se procede a desarrollar experimentalmente un bioinsecticida en pellet con el propósito de combatir la plaga que ataca el roble *Quercus humboldti* del Jardín Botánico de Bogotá, para ello se realizan cinco experimentos variando los carbohidratos y manteniendo constante la proporción de la vitamina y el mineral. Estos experimentos se someten a esterilización y posteriormente se inoculan con 1 ml de micelio correspondiente del microorganismo; para garantizar el crecimiento y por ende la esporulación del hongo se depositan en la incubadora a una temperatura de 26 °C por un tiempo aproximado de 25 días. Una vez transcurre el tiempo estimado, se elabora con la biomasa obtenida los pellets a los cuales se les realiza pruebas microbiológicas para evaluar la viabilidad del hongo en cada medio de cultivo, arrojando resultados favorables hacia el experimento 3, con una concentración de esporas de $2,38 \cdot 10^{11}$ y un índice de germinación del 88,28%. Lo expresado anteriormente da cumplimiento a los dos primeros objetivos de la presente investigación; en el tercer objetivo, se especifican los requerimientos que se deben tener en cuenta para escalar a piloto la experimentación realizada en el laboratorio, por lo tanto, se desarrollan las siguientes actividades: un diagrama de bloques general del proceso, se establecen los equipos (mezclador, biorreactor de lecho fluidizado y peletizadora), se elabora el PFD y su respectivo balance de masa. Por otro lado, el cuarto objetivo se lleva a cabo mediante un análisis financiero del proceso a escala piloto, comenzando por hacer una cotización de los equipos, una estimación de los operarios que requiere el proceso, la mano de obra, los servicios, la tasa de oportunidad, entre otros; puesto que con esos datos se realiza el flujo de efectivo y con los resultados adquiridos se evalúan los indicadores financieros, tales como el VPN con un valor de \$ 85.422.495, la TIR alcanzando un interés del 279%, un beneficio costo de 3,62 y el proyecto con un periodo de recuperación (PR) de 3 años.

Palabras clave: *Beauveria bassiana*, biopesticida, control biológico, bioprocesos, planta piloto.

INTRODUCCIÓN

Para la industria agrícola es fundamental contar con un eficiente control de plagas, práctico y positivo para el ecosistema. Un insecticida químico, aunque es eficaz, causa daños nocivos para el medio ambiente y la salud humana. Por esta razón, diferentes sectores en el mundo buscan opciones que reemplacen el uso de estos. Actualmente los bioinsecticidas componen una posible alternativa en el control de plagas a partir de formulaciones de microorganismos¹. En este momento el uso de hongos entomopatógenos (HEP) es registrado como una opción eficiente para la regulación de plagas agrícolas y su manejo ha aumentado por medio de formulaciones comerciales o artesanales².

El hongo *Beauveria bassiana* es apreciado como un agente de control biológico con excelente eficiencia en el sector agrícola, y su uso ha sido implementado en distintos lugares del mundo en el control exitoso de muchos tipos de plagas, que ocasionan pérdidas en el sector. En un futuro cercano se estima el aumento del uso de microorganismos como alternativa de manejo de insectos debido al incremento de plagas que se convierten resistentes a los insecticidas, y a las normas que impiden el uso de productos químicos por la contaminación que ocasionan al medio ambiente³.

El Jardín Botánico José Celestino Mutis es un centro de investigación distrital que se preocupa por la conservación vegetal, y dado que actualmente registra pérdidas ocasionadas por consumidores generalistas que atacan el roble *Quercus humboldti* una colección vulnerable de la institución⁴; se propone desarrollar un bioinsecticida capaz de combatir el problema, y que disminuya de manera eficaz los daños causados (teniendo en cuenta que en la institución aún no existe alguno), en una presentación granular que proteja al ingrediente activo, en este caso los conidios del hongo entomopatógeno y que además cumpla con su ideal en el uso de tecnologías amigables con el medio ambiente y mantenga en la formulación una máxima permanencia del hongo dentro del pellet requerido y por ende su viabilidad para el control del gorgojo.

Partiendo de lo anterior y tomándolo como base para un próximo escalamiento a nivel piloto, se desarrolla este proyecto en el que se expone la estandarización de la composición de un pelletizado con un hongo entomopatógeno para control biológico. En el capítulo inicial del proyecto se ejecuta la selección de las posibles

¹ JIMENEZ USECHA, Isabel Cristina. Escalamiento para la producción de un biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* subesp. kurstaki en fermentadores de 14 y 250L con base en la transferencia de oxígeno. Trabajo de grado. Ingeniero Químico. Bogotá D.C.: Universidad de los Andes, 2003. 22 p.

² URTUBIA, Irina y FRANCE, Andrés. Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura. INIA Tierra adentro [En línea], noviembre-diciembre 2007. [Citado en 3 de enero de 2018]. Disponible en Internet: <<http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR34779.pdf>>

³ PADILLA MARTIN, Virginia. Bioinsecticidas. Trabajo de grado. Biología. España: Universidad de La Laguna Facultad de ciencias, 2017. 4-7 p.

⁴ Jardín Botánico de Bogotá. [En línea]. [Citado en 13 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://coleccion.es.jbb.gov.co/herbario/especimen/26094>>

materias primas que estarán en el medio de cultivo cumpliendo un papel nutricional dentro de la formulación y las cuales permitirán el crecimiento del hongo dentro de este. En seguida se realiza el desarrollo experimental el cual mediante pruebas microbiológicas y teniendo en cuenta la variable respuesta representada en conidios/gramos se determina la mejor formulación. En el tercer capítulo se realiza una selección de equipos para el proceso a planta piloto a partir del escalado en las etapas relevantes del proceso y por último se realiza una estimación financiera del proyecto estableciendo su rentabilidad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar la composición de un peletizado con un hongo entomopatógeno

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar las materias primas apropiadas para el crecimiento de la biomasa fúngica en el peletizado.
- Seleccionar la formulación por medio de un desarrollo experimental variando la concentración de distintos carbohidratos.
- Establecer las especificaciones técnicas del proceso a escala piloto.
- Evaluar los costos del proceso a escala piloto.

1. MARCO TEÓRICO

En esta sección se expone cuál es la plaga que afecta la agricultura y la manera como esta es neutralizada, mostrando así los distintos tipos de control, entre ellos, el control biológico por medio de hongos entomopatógenos los cuales necesitan de una formulación con los suficientes nutrientes que permitan el desarrollo y la supervivencia de este en la presentación.

1.1 JARDÍN BOTÁNICO Y LA CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA

El Jardín Botánico José Celestino Mutis es una entidad distrital de investigación la cual se encarga de contribuir a la sostenibilidad ambiental y salvaguardar y conservar colecciones vivas de flora para su apropiación⁵. El Jardín Botánico juega un papel importante en la conservación ex situ e in situ de los patrimonios genéticos vegetales y en el control de la pérdida de la diversidad vegetal; por esto la necesidad de proyectos innovadores mediante el uso de material no químico para obtener como producto un bioinsecticida que permita el control y regulación de plagas en la vegetación.

1.2 CONTROL DE PLAGAS

El uso de pesticidas nace de la necesidad de combatir plagas que alteran la sanidad de cultivos o frutos almacenados. Estos se pueden clasificar en sustancias químicas, orgánicas, inorgánicas y por último microbiológicas, los cuales generan efectos tóxicos en la mayoría de organismos vivos⁶. La evolución natural conlleva en los últimos años a que los sistemas de producción agrícola generen nuevos métodos para el control de plagas que sean sustentables y amigables con el medio ambiente.

Además, estas estrategias se encuentran relacionadas con aspectos económicos y ecológicos, donde en un principio implica la degeneración de plantas por la acción de un conjunto de insectos consumidores de follaje; existen dos tipos de plagas: ocasionales las cuales generan pérdidas irascibles y se presentan eventualmente y

⁵ Jardín Botánico de Bogotá. [En línea]. [Citado en 2 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.jbb.gov.co/index.php/nuestro-jardin/mision-y-vision>>
⁶ BEDMAR, Francisco. ¿Qué son los plaguicidas?. Informe especial sobre plaguicidas agrícolas. [En línea], 2011. [Citado en 12 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: <<https://www.agro.uba.ar/users/semmarti/Usotierra/CH%20Plaguicidas%20fin.PDF>>

secundarias provocando pérdidas que no impactan totalmente el desarrollo de las plantas⁷.

1.2.1 Tipos. El control de plagas como se menciona anteriormente se puede contrarrestar con en una gran variedad de sustancias y microorganismos, que dependen específicamente del uso que requiera el consumidor, es por ello que se describe de manera general los más utilizados.

1.2.1.1 Control por medio de insecticidas Químicos. En principio el ataque a microorganismos se realizaba a partir de insecticidas químicos en los que según su estructura se clasifica en compuestos organoclorados, organofosforados, sales inorgánicas y otros. A pesar de su efectividad en el control de diversas plagas, la gran mayoría de estos insecticidas causan problemas tóxicos que afectan directamente la salud del hombre y el medio ambiente, un ejemplo de ello es el episodio de epidemias que producen una tasa elevada de morbilidad⁸. Esta estrategia no se considera viable para el control de plagas, por las consecuencias que estos generan y que frecuentemente se asocia a efectos negativos como: la resurgencia de la plaga, los estallidos de plagas secundarias, y la baja especificidad del plaguicida producto de la resistencia de la plaga⁹.

1.2.1.2 Control Biológico. Este método de control consiste en utilizar microorganismos que reduzcan los efectos de otros organismos que no son deseables y favorecer el desarrollo de cultivos, plantas, entre otros; para llevarlo a cabo se puede considerar la búsqueda de agentes de biocontrol, introducción de agentes biocontroladores y finalmente la implementación de antagonistas naturales¹⁰. Por otro lado, la actividad biológica de un organismo con respecto a otro es determinante para lograr un equilibrio poblacional y que este se pueda implementar para el control en el ámbito de la agricultura¹¹.

Existen diferentes tipos de regulación biológica, se clasifican en: control biológico clásico haciendo referencia a los enemigos naturales que se encuentran en los ecosistemas; control biológico conservativo y aumentativo, los cuales se encargan de aumentar la población de enemigos naturales y a su vez mejorar la actividad de

⁷ JIMÉNEZ, Edgardo. Métodos de control de plagas. Trabajo de grado en Ingeniería en sistemas de protección agrícola y forestal. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía, 2009. 22-27 p.

⁸ FERRER DUFOL, Ana. Intoxicación por plaguicidas. Scielo [En línea], 2003. [Citado en 14 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200009>

⁹ VILLACIDE, José y CORLEY, Juan. Manejo integrado de plagas forestales. INTA [En línea], 2012. [Citado en 4 de agosto de 2017]. Disponible en Internet: <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-img-tapa_serie_plagas.jpg>

¹⁰ EZZIYANI, Mohammed, et al. Control biológico por microorganismos antagonistas. Horticultura [En línea], 2006. [Citado en 6 de agosto de 2017]. Disponible en Internet: <http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh191/08_15.pdf>

¹¹ RODRÍGUEZ, Alejandro, et al. Proyecto demostrativo con implementación de BPA en el cultivo del banano. CORBANA [En línea], 2010. [Citado en 6 de agosto de 2017]. Disponible en Internet: <<http://cep.unep.org/repcar.png/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-corbana/bpa-en-banano>>

ellos¹². En el mercado las formulaciones con hongos, bacterias, nematodos y virus se conocen como bioinsecticidas. Estos productos afectan específicamente a un grupo de insectos en la búsqueda de disminuir el efecto perjudicial que generan en diferentes ámbitos¹³.

1.2.1.2.1 Enemigos naturales. Se denominan controladores biológicos, puesto que su función es regular los sistemas agrícolas de forma natural, reduciendo poblaciones de plagas a cantidades menores de forma transitoria o permanente, pero a su vez esta actividad puede verse afectada por el uso de plaguicidas disminuyendo la cantidad de su especie¹⁴.

1.3 HONGO ENTOMOPATÓGENO

Los hongos entomopatógenos componen un amplio conjunto de micro-organismos que proporcionan bienes a los sistemas ecológicos, es decir, favorecen en diferentes beneficios al trabajo de sistemas agrícolas y de preservación vegetal, entre ellos se puede indicar la capacidad de regular las plagas para mantenerlas en niveles adecuados¹⁵.

Hay más de 700 especies de hongos entomopatógenos incorporados en 100 géneros, pero muy pocos son estudiados. Este microorganismo está relacionado con insectos que existen en diferentes ambientes, sea suelo, agua, o partes aéreas. Por su mecanismo particular de infección, los hongos entomopatógenos son los microorganismos más importantes que transmiten infección a insectos como los coleópteros entre otros.¹⁶ Pueden originar importantes cantidades de conidios asexuales en cultivos a gran escala. Además, se considera que tienen baja toxicidad hacia mamíferos¹⁷.

¹² VILLACIDE, Op.cit.

¹³ LLANO ARANGO, Ana Lucia. Escalamiento del proceso de producción de un insecticida biológico a escala piloto para la empresa productos naturales de la Sabana S.A., Alquería. Trabajo de grado Ingeniería de procesos. Medellín, Colombia: Universidad EAFIT. Escuela de ingeniería. Departamento de ingeniería de procesos, 2007. 26 p.

¹⁴ RUIZ CANCINO, Enrique y CORONADA BLANCA, Juanita. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. En: Forest Health Technology Enterprise Team. Control Biológico. México: VAN DRIESCHE, Roy, et al., 2007. 11-36 p.

¹⁵ MOTTA DELGADO, Pablo Andres y MURCIA ORDOÑEZ, Betselene. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. Amby-Agua [En línea], 2011. [Citado en 2 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: < http://www.ambi-agua.net/seer/index.php/ambi-agua/article/viewFile/465/pdf_455 >

¹⁶ ALATORRE ROSAS, Raquel. Hongos Entomopatógenos. Sociedad Mexicana de Control Biológico [En línea], 2007. [Citado en 2 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: < https://www.ciidroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidroaxaca.ipn.mx/revista/files/pdf/vol9num2/NatyDes_Vol-9-2-Art1.pdf >

¹⁷ TRAVIS, Glare. Biotechnological Potential of Entomopathogenic Fungi. En: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. Vol 21. New Zealand: ARORA, Dilip, 2003. 79 p.

1.3.1 Mecanismo de acción de un hongo entomopatígeno. Una ventaja principal de los hongos entomopatógenos comparado con bacterias y virus es que no demandan ser ingeridos por el insecto plaga para generar la infección, estos microorganismos se adhieren de forma directa al integumento, es decir la piel del gorgojo, cuando el hongo empieza a excretar enzimas como las proteasas, quitinasas y esterases¹⁸ las cuales degradan la cutícula del insecto y permiten el proceso de penetración por presión mecánica en el tubo germinativo.

Una vez que el hongo se encuentre dentro del insecto, empieza la colonización con cuerpos hifales o blastoesporas que se van desarrollando a través del hemocele y atacan diversos tejidos produciendo la muerte del insecto luego de 3 o 4 días de que inicia la infección. Cuando el insecto muere después de que se agoten sus nutrientes, el hongo comienza un crecimiento micelial e irrumpe todos los órganos del hospedero¹⁹. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y germinan a la superficie, donde en entornos ambientales apropiados inician la formación de nuevas esporas²⁰.

1.4 FORMULACIÓN EN EL CONTROL BIOLÓGICO

La formulación del hongo es el proceso por el cual el ingrediente activo, es decir los conidios del hongo, se mezclan con materiales inertes los cuales colaboran e influyen para que el hongo trabaje mejor, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos. Lo mencionado anteriormente se realiza con el objetivo de lograr una buena uniformidad y distribución de las partículas del hongo, para así poder ser manipuladas y aplicadas de manera correcta²¹. El fin de una formulación es impedir prácticas que puedan inhibir o perjudicar el patógeno y, cada vez que sea posible, amplificar la posibilidad de infección.

Para que la formulación sea exitosa, es necesario la elección de un medio de cultivo con un equilibrio nutricional que logre un crecimiento del hongo con el máximo potencial patogénico, con eficiencia económica, asegurarse que permita periodos de almacenamiento prolongados, que sea de una fácil aplicación y que tenga estabilidad en condiciones de campo²¹.

¹⁸ PUCHETA DÍAZ, Micaela, et al. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Scielo [En línea], 2006. [Citado en 10 de septiembre de 2017]. Disponible en Internet: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442006001200006&script=sci_abstract>

¹⁹ RODRÍGUEZ, Dora. Alba. Hongos entomopatógenos registrados en Colombia. Revista Colombiana de Entomología. 1984.

²⁰ MONZÓN, Arnulfo. Producción, Uso y Control de Calidad de Hongos Entomopatógenos en Nicaragua. CATIE [En línea], 2002. [Citado en 13 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: <<http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6723/A2107e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>

²¹ TABORSKY, Vladimir. Small-scale Processing of Microbial Pesticides. En: FAO Agricultural Services. Prague, Czechoslovakia: The Chief, 1992. 50-58 p.

Existen varias presentaciones en las formulaciones con hongos entomopatógenos: líquidas, en polvo o gránulos. En el proyecto se harán pellets, los cuales son presentaciones similares a las formulaciones de gránulos debido a su fórmula. A continuación se muestran los diversos tipos de formulaciones granuladas.

1.4.1 Tipos de formulaciones granuladas. Granulado: Es una formulación sólida, uniforme, en forma de gránulos con dimensiones bien definidas, para aplicación directa; Granulado encapsulado (pellet): Son gránulos para aplicación directa, que poseen una cobertura para protección o para liberación controlada de las sustancias activas²²; y Macrogranulado: Gránulos con rango de tamaño entre 2.000 y 6.000 µm

1.5 COLEÓPTEROS

Dentro del grupo de insectos asociados al follaje, los defoliadores se consideran los más importantes por los impactos significativos que generan en los rodales forestales, lo cual se puede evidenciar en una infestación masiva del insecto provocando la muerte de árboles y ocasionando cambios en la estructura de los rodales, lo cual hace más vulnerable a la especie al ataque de insectos y enfermedades²³. Por otro lado, existen diferentes tipos de ataques por parte de las plagas: las infestaciones primarias se caracterizan por el insecto atacar granos sanos e iniciar la búsqueda por nuevos granos y las infestaciones secundarias, son aquellos insectos que no pueden penetrar la protección del grano, por ende utilizan los granos con daños ocasionados por las plagas primarias o granos que han sufrido algún daño físico²⁴.

1.5.1 Pérdidas causadas por coleópteros. Registran pérdidas significativas en cultivos, plantas y recursos humanos²⁵. Así pues, el gorgojo, una de las especies más comunes en todo el mundo, provocan daños irreversibles en granos, además de formar cortes marginales en hojas anchas de follaje verde y en las hojas de otras plantas hospedadoras²⁶.

²² URTUBIA, Op.cit.

²³ CALDERA HINOJOSA, Florentino. Diagnóstico y evaluación del impacto de insectos asociados al género *Quercus L.* en la sierra madre oriental, en Nuevo León, México. Tesis de maestría en Ciencias Forestales. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Forestales, 1997. 25-29 p.

²⁴ GARCÍA, Cipriano, et al. Manejo integrado de plagas en granos almacenados. En:Tecnologías de granos y semillas. 1ra Edición. México: MARTÍNEZ RUIZ, Rosa, et al., 2009. 211-232 p.

²⁵ ALONSO ZARAZAGA, Miguel Angel. Orden Coleóptera. IDE@- SEA [En línea], 2005. [Citado en 22 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: <http://sea-entomologia.org/IDE@/revista_55.pdf>

²⁶ HOOVER, Gregory. Gorgojo de los invernaderos. College of agricultural Sciences [En línea], 2000. [Citado en 22 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: < <https://ento.psu.edu/extension/factsheets/es/es-black-vine-weevil>>

2. SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS PARA EL CRECIMIENTO DE LA BIOMASA FÚNGICA

En este capítulo se seleccionan las materias primas a partir de revisión bibliográfica. Dichas materias primas, se utilizan como medio de cultivo para el crecimiento del hongo; entre ellas se encuentran carbohidratos, minerales y vitaminas, que según sus propiedades nutricionales proporcionan al hongo entomopatógeno (*Beauveria bassiana*) un óptimo desarrollo en la formulación. Chong, M. (2003), comenta que el control biológico por medio de un microorganismo patógeno se ve afectado por el uso de una formulación inadecuada³⁰. Por otra parte, en la investigación de Urtubia, I. (2007), se evidencian las ventajas del medio de cultivo, las cuales no solo demuestran la protección del ingrediente activo, sino además mejoran el nivel de control³¹. Bajo estas circunstancias es evidente la importancia que tienen las materias primas en el éxito de la formulación.

Los hongos usan carbono, nitrógeno y otros nutrientes y metabolitos, que contienen los residuos sólidos para su propio metabolismo y que requieren para su óptimo crecimiento y producción³². Para la elección de estas materias primas, se deben identificar los factores físicos, químicos y los requerimientos nutricionales de un hongo entomopatógeno que permiten la viabilidad del microorganismo, y por lo tanto demuestran el uso de estos como una alternativa de control biológico.

En específico, con el hongo *Beauveria bassiana* se requiere de un medio de cultivo estéril puesto que se puede ver afectado el crecimiento disminuyendo su velocidad, y la estabilidad del principio activo. Además, se busca encontrar sinergias a través de la adición de componentes en la formulación, probando nuevos carbohidratos y vitaminas, buscando evaluar posibles mejoras en el producto obtenido, siendo el interés del Jardín Botánico potencializar el efecto insecticida de microorganismos patógenos³³.

A continuación, en las siguientes secciones se presentan factores involucrados y componentes esenciales en el crecimiento de la biomasa fúngica, que permiten la viabilidad del hongo dentro de la formulación:

³⁰ CHONG RODRÍGUEZ, Mabelle Julie. Utilización de cultivos líquidos para la obtención de blastoesporas y conidias de *Beauveria bassiana* (Bals.) *Vuillemin* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) resistentes a condiciones ambientales. Trabajo de grado Microbiología. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas, 2003. 12-34 p.

³¹ URTUBIA, Op.cit.

³² NYOCHEMBENG, Leopold, et al. Optimizing edible fungal growth and biodegradation of inedible crop residues using various cropping methods. *Bioresource Technology* [En línea], 2008. [Citado en 12 de noviembre de 2017]. Disponible en Internet: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407009194>>

³³ BALLESTEROS TORRES, Juan Manuel. Factores nutricionales que afectan la actividad insecticida de *Beauveria bassiana* (Balsamo) *Vuillemin* contra *Periplaneta americana* L. y la respuesta inmune del insecto. Tesis de maestría Ciencias con Acentuación en Microbiología. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas, 2013. 33-40 p.

2.1 CONDICIONES AMBIENTALES DE CRECIMIENTO

En la búsqueda de encontrar una formulación que permita un balance nutricional adecuado para el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y obtener una biomasa micelial con un máximo potencial patogénico, es necesario tener en cuenta factores que afectan la reproducción masiva del microorganismo en un sustrato y condiciones del entorno al que se encuentre expuesto³⁴. Los factores ambientales que son determinantes para el desarrollo y acción de los hongos entomopatógenos, son la temperatura y la humedad relativa. Puesto que influyen directamente en el mecanismo de acción que se divide en las siguientes etapas:

- Germinación de esporas
- Desarrollo y penetración del tubo germinativo
- Colonización
- Reproducción

Adicionalmente, la humedad tiende a reducir la propagación de nutrientes, la estabilidad enzimática y la degradación del sustrato³⁵. Castillo S., expone que estos factores pueden afectar la viabilidad de las conidias, es por ello que se debe tener una temperatura óptima para el crecimiento que se encuentra dentro de un rango de 25 y 30 °C y una humedad relativa aproximadamente del 94 %³⁶.

Además de la temperatura y la humedad, el pH es uno de los parámetros que se debe controlar en cualquier medio de cultivo, lo ideal es que se mantenga en un intervalo ligeramente ácido con valores cercanos a 5 para inhibir la formación de otros microorganismos que no son de interés³⁷. En cuanto a la actividad de agua (Aw), Aguirre N., desarrolló pruebas con un hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi*, las cuales demostraron que para realizar sus actividades metabólicas es conveniente utilizar un valor alrededor del 0.998, esto, justificado después de varios ensayos realizados en un sustrato de Extracto de levadura- Extracto de Malta (YM) variando la concentración de agua, donde los resultados arrojaron un porcentaje de germinación 11.33%, mayor en comparación a otras pruebas en las que se reducía

³⁴ MARTÍNEZ CASTRILLÓN, Luis Carlos. Desarrollo de un prototipo de formulación con hongos entomopatógenos para el manejo de *Demostipa neivai* Bondar (Coleóptera: Chrysomelidae). Tesis de maestría Ciencias Agrarias, énfasis en entomología. Bogota D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía, 2010. 17-58 p.

³⁵ RAIMBAULT, Maurice, et al. International training course on solid state fermentation. En: ORSTOM. Octubre, 1998. 26 p.

³⁶ CASTILLO ZENO, Salvador. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia spp.* y *Prosapia spp.*) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala. Trabajo de grado Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 2006. 37 p.

³⁷ MEJÍA CALDERÓN, Gilmar, et al. Evaluación de hongos entomopatógenos como biocontroladores de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* (Homóptera: Psyllide: *Triozinae*) en papa (*Solanum tuberosum*) a nivel laboratorio. Trabajo de Grado Ingeniería Agrónoma. San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas, 2008. 44 p.

la capacidad de germinar las conidias. Lo anterior con el propósito de identificar los efectos en el crecimiento, la esporulación y la germinación³⁸.

2.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Generalmente para el crecimiento y reproducción de un hongo entomopatógeno se requiere de macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes, como el carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno son moléculas que el microorganismo solicita en mayor cantidad por ser fuente de energía que necesita el proceso metabólico y que son de suma importancia para la reproducción celular. Así mismo, los micronutrientes en cuanto a vitaminas, oligoelementos, iones, entre otros, son sustancias que son requeridas en pequeñas cantidades pero que son esenciales para el crecimiento microbiano³⁹.

En diferentes investigaciones se han analizado sustratos naturales como arroz, bagazo de azúcar de caña y trigo, para la producción de hongos entomopatógenos, los cuales han demostrado una buena obtención de conidios; así mismo se usan sustratos sólidos que pueden consistir en granos de cereal, arroz u otros sustratos a base de almidón⁴⁰ que permiten la producción del bioplaguicida.

El propósito de un medio de cultivo es que el principio activo refiriéndose a las conidias del hongo, se mezcle con diferentes materiales que sean de ayuda en el momento de la aplicación⁴¹, por lo tanto se busca enfatizar de manera general la importancia de estos componentes, priorizando la cantidad de carbohidratos que pueden aportar las harinas y granos para una adecuada elección en la formulación de un bioinsecticida.

2.3 MEDIO DE CULTIVO – SUSTRATO

La elección de un sustrato apropiado mejora el desempeño de los conidios por medio de los componentes que se encuentran en un medio de cultivo, existen diferentes medios de cultivos que son adecuados para el desarrollo de un hongo entomopatógeno: un medio de cultivo semisintético en el que su composición no

³⁸ AGUIRRE OTÁLORA, Natalia del Pilar. Determinación del efecto de algunas fuentes de carbono y nitrógeno, del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea riley*. Trabajo de grado Microbiología Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2006. 45 p.

³⁹ MOORE LANDCKER, Elizabeth. Fundamentals of the fungi. En: Fundamentals of the fungi. 4ta Edición. USA: Benjamin Cummin, 1983.

⁴⁰ GOETTEL, Mark. y ROBERTS, Donald. Mass production, formulation, and field application of entomopathogenic fungi. Biological Control of Locusts and Grasshoppers: State of the Art [En línea], 1992. [Citado en 17 de noviembre]. Disponible en Internet: <https://digitalcommons.usu.edu/biology_facpub/1343/>

⁴¹ MARTÍNEZ CASTRILLÓN, Op.cit., p.17-58.

está totalmente definida, es decir, se conforma por compuestos naturales y químicos; por medio de uno sintético en el que sus componentes químicos se conocen con exactitud; o de forma natural, en donde el microorganismo satisface algunos requerimientos nutricionales por la digestión enzimática de sus hospedadores, y compuestos orgánicos por medio de la ingestión de frutas, vegetales y cereales⁴², en la cual los residuos agroindustriales sustituyen la demanda de nutrientes necesaria para los microorganismos a un bajo costo. Dentro de estas materias primas, sólidos naturales, se encuentran el trigo, la melaza, el maíz, pulpa de remolacha, el bagazo de caña y el más usado: el arroz, estos poseen la ventaja de suministrar múltiples nutrientes esenciales para el crecimiento fúngico.

De las tres alternativas expuestas, se elige la última para aplicar al proyecto por los intereses del Jardín Botánico en el desarrollo de propuestas innovadoras y sustentables para el medio ambiente, un ejemplo de ello es el proyecto biodigestor, que consiste en la obtención de energía a partir de residuos orgánicos y el cual, además, ocupó el segundo lugar en los premios Latinoamérica verde en el 2017⁴⁵.

2.4 SELECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS PARA EL CRECIMIENTO DE LA BIOMASA

Con el objetivo de estandarizar la composición de un pelletizado para control biológico es necesario seleccionar adecuadamente las materias primas con las que se va a trabajar, por tanto, se espera encontrar sustratos que en conjunto con *Beauveria bassiana* den resultados óptimos en cuanto a la producción de esporas (principio activo) y que además estos insumos sean económicos y viables para el desarrollo del hongo. Por lo cual, se indaga en cada una de las materias primas su contenido nutricional, respecto a la cantidad de carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas, con el propósito de observar en qué manera puede afectar el crecimiento del microorganismo dentro de la formulación.

2.4.1 Carbohidratos. La composición del sustrato y particularmente la relación Carbono/Nitrógeno es de importancia en los cultivos, debido a que ejerce influencia tanto en el rendimiento de la biomasa obtenida, como en la composición química⁴⁶. Los carbohidratos son la fuente más importante de energía, se considera un importante nutriente estructural; se ha reportado que el trigo y el arroz, son los mejores sustratos para el cultivo de diversas especies, en función de su

⁴² MEJÍA CALDERÓN, Op.cit., p. 44.

⁴⁵ Jardín Botánico de Bogotá. [En línea]. [Citado en 13 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.jbb.gov.co/>>

⁴⁶ CHEGWIN, Carolina y NIETO, Ivonne. Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. Revista mexicana de micología [En línea], 2013. [Citado en 4 de enero de 2018]. Disponible en Internet: <<http://revistamexicanademicologia.org/wp-content/uploads/2013/06/RMM-Tr-256-version-paginada-1-9.pdf>>

composición química, la cual provee una reserva de celulosa, hemicelulo y lignina, que es utilizada por el hongo durante el crecimiento y durante la fructificación⁴⁷.

2.4.1.1 Arroz. El arroz además de ser una fuente de energía inmediata es utilizado como sustrato para la producción de bioplaguicidas, se sabe que tomando como base 100 g de harina de arroz, hay 78,90 g de carbohidratos, 6,80 g de proteínas, fósforo y hierro en 140 mg y 0,80 mg respectivamente y 0,12 mg de tiamina⁴⁸. Adicionalmente, el arroz, el maíz, la yuca, y la caña de azúcar constituyen las fuentes de energía más importantes en las regiones tropicales del mundo⁴⁹. En Colombia constituye el 13% de área cosechada⁵⁰, y se encuentra en proyectos de agroindustrialización que buscan la transformación de insumos de origen agrícola en productos industriales⁵¹. En la investigación de Urtubia y France quedó demostrado que la cascarilla de arroz además de estimular el desarrollo del hongo favorece las características físicas del suelo y de los abonos orgánicos, proporcionando la aireación, absorción de humedad y el filtraje de nutrientes⁵², produciendo mayores índices de germinación, lo que proporcionaría una mayor patogenicidad⁵³. Es también demostrado en el Centro de Investigaciones en Café de Costa Rica que el sustrato que más se usa es el arroz, como pieza del programa de manejo integrado de la broca, la producción del hongo en esta institución se lleva a cabo en matrices sólidas que utilizan arroz como sustrato, técnica considerada artesanal⁵⁴.

Por ser el arroz un sustrato comúnmente implementado, lo que se proyecta en la investigación, es realizar un comparativo en cuanto a composiciones de carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas que puedan aportar al medio de cultivo macro y micronutrientes y con ello proponer el uso de materiales diferentes como:

⁴⁷ YILDIZ, Sibel, et al. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. ScienceDirect [En línea], 2002. [Citado en 4 de enero de 2018]. Disponible en Internet: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959202000407>>

⁴⁸ SOLIS PERLAZA, Julio Alfonso. Elaboración de carbohidratos nutricional infantil con base de harina de arroz y trigo, sustitución de otras harinas. Trabajo de grado Ingeniería Industrial. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Industrial, 2015. 10-13 p.

⁴⁹ FAO/FIDA (Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola/ Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2000.

⁵⁰ MARTÍNEZ COBALEDA, Hector, et al. La cadena del arroz en Colombia. Ministerio de agricultura y desarrollo rural [En línea], 2005. [Citado en 5 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: < <https://sioc.minagricultura.gov.co> >

⁵¹ El Tiempo. [En línea]. [Citado en 13 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.eltiempo.com/archivo/documento/MAM-444791>>

⁵² RESTREPO, Jairo. Abonos orgánicos fermentados experiencias de agricultores en Centroamérica y Brasil. CEDECO [En línea], 2002. [Citado en 4 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: < <https://abonos-organicos-fermentados-jairo-restrepo/>>

⁵³ URTUBIA, Op.cit.

⁵⁴ MATA ASTORGA, Miguel. Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como parte de un proceso de escalamiento y producción de Bioplaguicidas. Trabajo de grado Ingeniería Biotecnológica. Cartago, Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2008. 45 p.

2.4.1.2 Harina de maíz. La harina de maíz, posee por cada 100 gramos: 75,71 g de carbohidratos, 8,31 g de proteínas y 0,44 mg de tiamina; además de fósforo y hierro presentes en 39 mg y 2.40 mg respectivamente⁵⁵, lo que la hace una materia prima ideal para uso como sustrato y soporte, permitiendo así que exista un crecimiento de biomasa óptimo y que el hongo realice una esporulación adecuada.

2.4.1.3 Arracacha. La harina de arracacha conserva un valor nutricional en carbohidratos de 24,0 g contenido en 100 g de parte comestible, proteína en 0,9 g / 100 g, tiamina en 0,06 mg en 100 g de arracacha. Entre las significativas características que posee se encuentra el aporte de calorías, fibra y minerales⁵⁶ con un contenido de fósforo y hierro de 60 mg y 0,7 mg respectivamente, además de ofrecer la posibilidad de emplearse en la fabricación de productos industriales.

2.4.1.4 Harina de yuca. La harina de yuca, también llamada harina de mandioca, cuyo contenido por cada 100 gramos es de 39,10g de carbohidrato, 0,60g de proteína, fósforo de 62 mg / 100 g, hierro en 0,40 mg y tiamina 0,03 mg⁵⁷; la harina de raíces de yuca se destaca especialmente como fuente de energía, que es el nutriente cuantitativamente más importante de las dietas alimenticias, además, consigue reemplazar el maíz con igual contenido de energía, proteínas y minerales⁵⁸.

En el proyecto se realiza una variación significativa en la concentración de carbohidratos en comparación con vitaminas y mineral, puesto que cerca de la mitad de peso seco de las células fúngicas corresponde a carbono, señalando la importancia de esta molécula en la célula⁵⁹.

2.4.2 Minerales. Los minerales componen estructuras solidas que dan sostén o protección, estos compuestos son de gran importancia en el funcionamiento normal de la célula⁶⁰, para el medio cultivo representan estabilidad y soporte además de verse involucrados en el crecimiento del hongo.

⁵⁵ FUNIBER [En línea], 2018. [Citado en 25 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<https://www.composicionnutricional.com/alimentos/HARINA-DE-MAIZ-1>>

⁵⁶ ADETAN, Dare, et al. Characterization of some properties of cassava root tubers. Journal of Food Engineering [En línea], 2003. [Citado en 24 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <https://www.researchgate.net/publication/232389343_Characterisation_of_some_properties_of_cassava_root_tubers>

⁵⁷ JIMÉNEZ, Faviola. Características nutricionales de la arracacha (*arracacia xanthorrhiza*) y sus perspectivas en la alimentación. [En línea], 2005. [Citado en 26 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<https://Características-nutricionales-de-la-arracacha-arracacia-xanthorrhiza-y-sus-perspectivas-en-la-alimentacion-faviola-jimenez.html>>

⁵⁸ AGUILAR BRENES, Edgar, et al. Manual del cultivo de yuca *Manihot* esculenta Crantz. INTA [En línea], 2017. [Citado en 24 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10918.pdf>>

⁵⁹ AGUIRRE OTÁLORA, Op.cit., p. 45.

⁶⁰ VÁSQUEZ CONDE, Rosalino. Metabolismo de los seres vivos. En: Biología 1. 1ra Edición. México, 2016. 104-121 p.

2.4.2.1 Caolín. El caolín es una arcilla en donde predomina la caolinita. El uso de este compuesto en la formulación de hongos entomopatógenos, se fundamenta en la generación de un soporte en el medio de cultivo, con la finalidad de que las esporas tengan mayor tiempo de vida, lo cual se ve expresado en el índice de germinación⁶¹. En los últimos años se han desarrollado investigaciones en la búsqueda de diferentes alternativas para un control biológico amigable con el ambiente, siendo el Caolín una opción que interfiere la relación entre el artrópodo y la planta, disminuyendo los daños que genera la plaga. Además de contribuir positivamente en la fisiología de la especie que está cubierta por dicha película (mineral)⁶².

En un reciente estudio sobre la evaluación del caolín para el control de plagas, se encontró que este mineral de tipo aluminosilicato reduce considerablemente la ovoposición de los insectos sobre las plantas a pesar de las colonias de insectos que se encuentren en el ambiente⁶³.

2.4.3 Vitaminas. Las vitaminas son compuestos orgánicos que un microorganismo necesita en menor cantidad respecto a otros nutrientes, pero que son vitales para el desarrollo celular y por ende para el crecimiento. Ahora bien, en la nutrición microbiana tienen el objetivo de intervenir en funciones celulares específicas de cada microorganismo⁶⁴. Usualmente se encuentran en el interior de las células y son conocidas como las antecesoras de las coenzimas. Tienen la función de regular las reacciones químicas del metabolismo⁶⁵. Las vitaminas que más se utilizan en medios de cultivo son piridoxina más conocida como vitamina B6, tiamina o vitamina B1 y ácido nicotínico⁶⁶. A pesar de ello, el Jardín Botánico de Bogotá incentiva el desarrollo de nuevas alternativas, no solo en cuanto a la implementación de nuevos carbohidratos, sino también en el uso de diferentes vitaminas.

⁶¹ URTUBIA, Op.cit.

⁶² NÚÑEZ LÓPEZ, Diana Carolina. Influencia de caolín (partícula inerte) sobre el desarrollo de poblaciones de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) y la interacción fisiológica en el cultivo de fríjol (*Phaseolus vulgaris*). Trabajo de grado Magister en Ciencias Agrarias énfasis Entomología. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias, 2014. 27-35 p.

⁶³ GONZÁLEZ NÚÑEZ, Manuel, et al. Evaluación del caolín como herramienta de control de plagas en cultivos mediterráneos ecológicos. [En línea], 2011. [Citado en 26 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <https://www.researchgate.net/publication/235435121_Evaluacion_del_caolin_como_herramienta_de_control_de_plagas_en_cultivos_mediterraneos_ecologicos>

⁶⁴ ÁLVAREZ MARTÍNEZ, Oscar. Aminoácidos, proteínas, enzimas, coenzimas y las vitaminas, La biosíntesis proteica. [En línea], 2016. [Citado en 26 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<http://publicacionesdidacticas.com/hemeroteca/articulo/073014/articulo-pdf>>

⁶⁵ RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, Julián Andrés A. Microbiología de las vitaminas. [En línea], 2011. [Citado en 26 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<https://es.scribd.com/doc/61540960/Microbiologia-de-Las-Vitaminas>>

⁶⁶ MUNGUÍA NAVARRETE, Christopher y PADILLA GARCÍA, Luis Ernesto. Micropropagación de ápices caulinares en Plátano (*Musa spp.* AAB) Cuerno Enano en el Laboratorio de Cultivo de Tejido de la UNAN-León. Trabajo de grado Licenciatura en Biología. Nicaragua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Facultad de Ciencias y Tecnología, 2014. 57 p.

Por consiguiente, se propone el uso del complejo B, por ser una vitamina que cuenta con un conjunto de componentes tales como: tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), niacina, ácido fólico, cobalamina (B12), biotina y por último la vitamina C; y muchas de estas vitaminas generalmente se utilizan en medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos. Otro beneficio es la reducción de costos de producción, puesto que solo se necesita de una sola vitamina, como lo es el complejo B, para cumplir con algunos de los requerimientos nutricionales del hongo entomopatógeno.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, las materias primas seleccionadas para el medio de cultivo son: arroz, harina de trigo, de maíz, y de yuca, el caolín como mineral y el complejo B como vitamina; se decide trabajar con ellas puesto que además de tener composiciones nutricionales similares al arroz, componente usado en la mayoría de formulaciones de hongos entomopatógenos, el Jardín Botánico se caracteriza por realizar investigaciones benéficas al medio ambiente, e innovadoras, siendo estos compuestos orgánicos que no afectan el medio que las rodea.

En la tabla número 1 se encuentra la información relacionada con las materias primas seleccionadas y la composición nutricional que aportan al medio de cultivo. Adicionalmente de los componentes traza los cuales son complejo B y caolín, que serán requeridos en mínimas cantidades para apoyar el crecimiento y proceso del microorganismo.

Tabla 1. Composición nutricional de carbohidratos

Nutrientes	Composición nutricional carbohidratos			
	Arroz	Harina de maíz	Harina de yuca	Arracacha
Carbohidratos (g)	78,9	75,71	39,1	24
Proteínas (g)	6,8	8,31	0,6	0,9
Hierro (mg)	0,8	2,4	0,4	0,7
Fosforo (mg)	140	39	62	60
Tiamina (mg)	0,12	0,44	0,03	0,06

Fuente: elaboración propia

- Es oportuno mencionar, que el arroz a nivel mundial, pertenece al segundo lugar detrás del trigo entre los cereales con respecto a la superficie cultivada, es el alimento elemental para gran parte de la población puesto que este cultivo suministra más calorías por hectárea que cualquier de los otros cereales

cosechados, además de ser fuente primaria 100% renovable, alcanzada en su totalidad de la obtención agrícola nacional⁶⁷.

En los últimos años se reconoce una superproducción de arroz a nivel internacional, principalmente en los países del sudeste asiático; esto incide en una considerable baja del costo mundial de arroz debido especialmente a los excedentes de la fabricación mundial⁶⁸, mientras que en el año 2016 Colombia alcanza un área cosechada de arroz histórica que supera toneladas de años pasados y permite observar un movimiento de la agroindustria arrocera⁶⁹.

- Durante la siembra de arracacha se cuenta con un control natural a través de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metharhizium anisopliae* para prever los daños en el cultivo, de lo cual se puede evidenciar una relación primaria del sustrato con el microorganismo que se emplea en esta investigación, considerando una afinidad nutricional entre estos dos.

En el mercado la comercialización de este almidón es utilizado en diferentes industrias: alimentaria, cosmetológica y pecuaria, por su alto contenido calórico; se produce en Colombia, Ecuador, Venezuela y Colombia⁷⁰. Usualmente, esta materia prima provee ingresos a pueblos colombianos específicamente en el municipio de Boyacá en donde sus habitantes por su experiencia conocen el manejo adecuado para este tipo de cultivos. Por otro lado, se propone la arracacha por su elevada oferta en los mercados tradicionales de Colombia, además de adquirir este producto a bajos costos⁷¹.

- El maíz representa uno de los cereales de más dispendio en el mundo por su composición de alrededor del 75% de almidón, favoreciendo la fabricación de diferentes productos que generalmente son de uso comercial, haciendo referencia a la elaboración de edulcorantes, y como insumo para la producción de almidón industrial⁷². Un aspecto a tener en cuenta es que es un carbohidrato de fácil acceso en las centrales de mercado de Bogotá, específicamente en

⁶⁷ BARONA, Edgar. Importancia de la semilla de arroz. FEDEARROZ [En línea], 2010. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.fedearroz.com.co/revistanew/arroz489.pdf>>

⁶⁸ Secretaria de Agricultura y Ganadería. [En línea], 2000. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en internet: <http://www.fedearroz.com.co/fna/documentos/Plan_Estrategico_2011-2020_v3.pdf>

⁶⁹ HERNÁNDEZ LOZANO, Rafael. Federación Nacional de Arroceros. FEDEARROZ [En línea], 2017. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.fedearroz.com.co> >

⁷⁰ ALVARADO GAONA, Álvaro y OCHOA, Lyda. Tecnologías locales de producción de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en el municipio de Boyacá, departamento de Boyacá. Scielo [En línea], 2010. [Citado en 24 de julio de 2018]. Disponible en Internet: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262010000100014&script=sci_abstract&tlng=pt>

⁷¹ ROJAS CRUZ, Diana Lizeth. Análisis de la competitividad del sector arracachero y su entorno productivo en el municipio de Boyacá. Trabajo de grado Administración de Empresas. Tunja, Colombia: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Económicas, Administrativas y Contables, 2014. 19-26 p.

⁷² GRANDE TOVAR, Carlos David y OROZCO COLONIA, Brigitte Sthephani. Producción y procesamiento del maíz en Colombia. Revista Científica Guillermo de Ockham [En línea], 2013. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en internet: <<http://www.redalyc.org/html/1053/105327548008/>>

Corabastos se le atribuye un 85 % al mercado de maíz; por otra parte, la importación de esta materia prima promovió a la adquisición de esta a precios más económicos accesibles a la población colombiana⁷³.

- Por último, la yuca es un cultivo procedente de América Latina, su adaptación a distintos ambientes y su potencial de elaboración la posicionan en una de las bases de la alimentación para la población y en una opción de mercadeo, su fabricación proporciona aproximadamente 130.000 empleos⁷⁴. Sus raíces son ricas en almidón, y sus hojas en proteína; contribuye con vitamina C, complejo B y aporta minerales como calcio y potasio.

De los millones de toneladas de raíces frescas que se cosechan en el mundo cerca de la quinta parte es producida por América Latina y el Caribe⁷⁵. Los precios de producción para el cultivo de la yuca dependen de las circunstancias ambientales y socioeconómicas de la región en que se desenvuelva el cultivo, al igual que de la topografía; los principales departamentos fabricantes de yuca que simbolizan el 50% de la siembra son Antioquia, Bolívar, Magdalena y Sucre⁷².

⁷³ TORRES OTAVO, Jorge. Mercados y producción en agricultura: Café y Maíz en Colombia [En línea],2001. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: <<http://bdigital.unal.edu.co/23805/1/20870-70581-1-PB.pdf>>

⁷⁴ VILA FLÓREZ, Otto. Diagnóstico de la cadena de la yuca en Colombia. MINAGRICULTURA [En línea],2015. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: <<https://sioc.minagricultura.gov.co>>

3. SELECCIÓN DE LA FORMULACIÓN POR MEDIO DE UN DESARROLLO EXPERIMENTAL VARIANDO LA CONCENTRACIÓN DE DISTINTOS CARBOHIDRATOS

Para la selección de la formulación por medio del desarrollo experimental se trabajan con 5 experimentos, cada uno con su respectiva réplica, en los cuales se integran cada una de las materias primas seleccionadas (capítulo 2) con el micelio del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Se muestra el procedimiento llevado a cabo para la preparación del inóculo y así mismo la elaboración de este en el sustrato.

Se ha comprobado en las formulaciones de hongos entomopatógenos que el arroz cuando es usado como sustrato protege el ingrediente activo y estimula el desarrollo del hongo produciendo mayores índices de germinación y concentración lo que traduce en un buen control y regulación de plagas; por otro lado el maíz tiene propiedades interesantes y se puede decir que algunas son similares a las del arroz, además, en Colombia el desarrollo de semillas para la producción de maíz va en aumento lo que incrementa el rendimiento de la producción⁷⁵, es por esto que la experimentación realizada en este capítulo se lleva a cabo usando maíz como base del medio de cultivo para comparar sus beneficios.

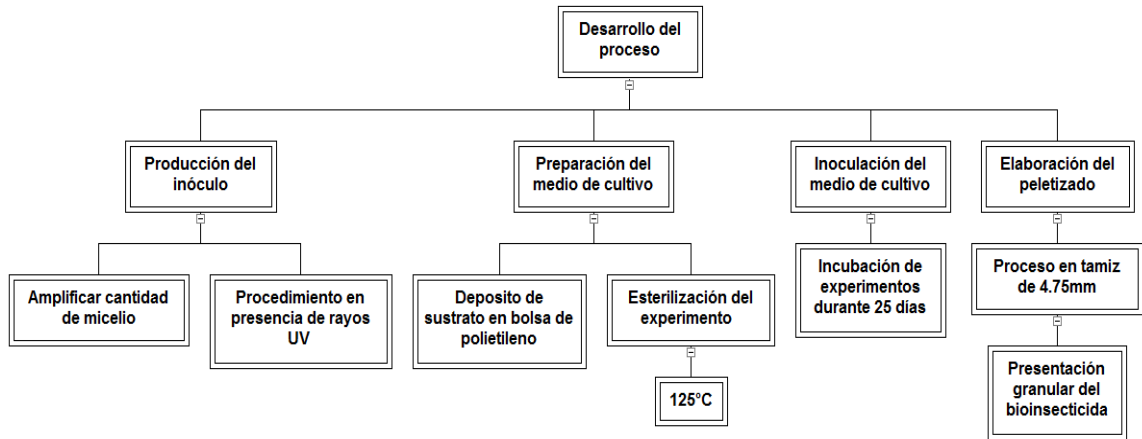
Lo anterior mencionado se hace con una esterilización previa que evite la contaminación en los experimentos realizado y finalmente se realizan unas curvas patrón las cuales permiten ver la conducta de crecimiento del hongo *Beauveria* en cada materia prima indicando en cuál de estas hay un mejor comportamiento de crecimiento, y se llevan a cabo otras pruebas microbiológicas que evidencien la mejor formulación.

3.1 DIAGRAMA METODOLÓGICO

Como se nombra anteriormente, el desarrollo de la formulación con el hongo entomopatógeno para el control de coleópteros requiere una amplificación de micelio, la preparación e inoculación del medio de cultivo y finalmente la elaboración del pellet. Para efectos del análisis microbiológico se realizan dos técnicas de calidad las cuales permiten determinar en cual medio de cultivo *Beauveria bassiana* tiene un mejor comportamiento. Para el entendimiento del desarrollo experimental, se puede observar en las imágenes 1 y 2 las etapas realizadas en el laboratorio para dicho proceso.

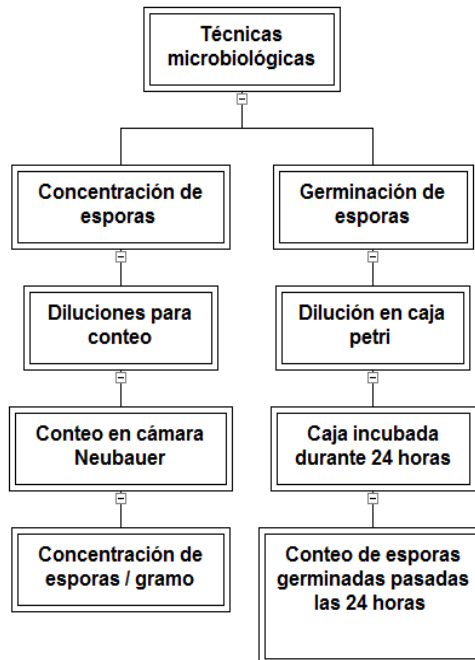
⁷⁵ GRANDE TOVAR, Op.cit.

Ilustración 1. Diagrama metodológico experimental



Fuente: elaboración propia

Ilustración 2. Diagrama metodológico técnicas microbiológicas



Fuente: elaboración propia

3.2 PRODUCCIÓN DEL INÓCULO

La cepa de *Beauveria bassiana* obtenida de las instalaciones del jardín botánico a finales del 2017, por medio de una excavación de suelo y encontrando organismos enfermos es aislada y posteriormente purificada realizando un raspado en la superficie del micelio del hongo para obtener un máximo en concentración de esporas en un medio de cultivo SDA (Sabouraud Dextrosa Agar) utilizado para el aislamiento de diferentes hongos⁷⁹; para el desarrollo de esta investigación se decide amplificar la cantidad de micelio-espora, iniciando por pesar una alícuota de 25g de micelio y diluyéndola en 200ml de jarabe de maíz, posteriormente se agita hasta conseguir una mezcla semi homogénea. Durante todo este procedimiento es necesario la presencia de rayos de luz ultravioleta los cuales se utilizan para eliminar otros organismos indeseables que se encuentran sobre superficies para que no contaminen el inoculo⁸⁰.

Ilustración 3. Micelio de Beauveria bassiana



Fuente: elaboración propia

Ilustración 4. Alícuota de 25 g de micelo en 200ml de jarabe de maíz



Fuente: elaboración propia

⁷⁹ GÓMEZ RAMÍREZ, Hilda, et al. M. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. SENASA [En línea], 2014. [Citado en 1 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: < <https://www.senasa.gob.pe> >

⁸⁰ CAÑEDO, Verónica y AMES, Teresa. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. [En línea], 2004. [Citado en 2 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf> >

3.3 CONCENTRACIÓN DE MINERALES Y VITAMINAS

Se escoge una concentración de caolín de 5% p/v, en cada uno de los experimentos, basado en los resultados arrojados en una investigación sobre el uso de este mineral como una alternativa diferente sobre el control de plagas, en donde el porcentaje de eficacia en referencia a la disminución de la población de adultos es alrededor del 95.5%⁸¹. Como cada concentración se debe expresar en gramos, según (Alean, 2003)⁸², el porcentaje en peso volumen se refiere a la cantidad de gramos de sustrato por 100 ml de solución, dicho lo anterior, el valor respectivo de caolín que se añade al medio de cultivo es de 2 gramos.

La vitamina (complejo B) se añade a cada experimento en una concentración del 0.05 g/l⁸³, por ser las vitaminas componentes que no se necesitan en grandes cantidades, sino que son trazas que se añaden al medio de cultivo.

3.4 CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Para la producción en masa de la cepa *Beauveria bassiana* en distintos almidones, la proporción de carbohidratos seleccionados es mayor en comparación con vitaminas y minerales debido a que la concentración de carbohidratos que almacenan las fuentes nutricionales presentes en el medio de cultivo, hacen que el microorganismo pueda llevar a cabo la síntesis de compuestos necesarios para su desarrollo⁸⁴, como ya se ha mencionado antes, la mitad de peso seco de las células fúngicas corresponde a carbono⁸⁵, durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en carbohidratos representados en los sustratos los cuales son nutrimentos para su crecimiento⁸⁶.

En el capítulo anterior se habla acerca de la importancia de cada una de las materias primas, entre las que se consideran de mayor importancia los carbohidratos, donde el arroz es el sustrato más empleado en la producción de bioplaguicidas y con este se han visto resultados benéficos en el control biológico; sin embargo, en este

⁸¹ NÚÑEZ LÓPEZ, Op.cit., p. 54.

⁸² ALEAN CARREÑO, Irina. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotracheelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Trabajo de grado Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas, 2003. 20-25 p.

⁸³ PUERTA MARÍN, Jennyfer y ZAPATA CARDONA, Paula Andrea. Diseño conceptual de un proceso para elaboración de un producto funcional a partir de *Ganoderma lucidum*. Trabajo de grado Ingeniería de Procesos. Medellín, Colombia: Universidad EAFIT. Departamento de Ingeniería de Procesos, 2006. 15-60 p.

⁸⁴ CRUZ MARTÍNEZ, Lina Carolina. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* mediante fermentación bifásica a escala piloto. Trabajo de grado Microbiología Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2007. 30-33 p.

⁸⁵ AGUIRRE OTÁLORA, Op.cit., p. 27.

⁸⁶ LEGER, Raymond y ROBERTS, Donald. Engineering improved mycoinsecticides. SciencDirect [En línea], 1997. [Citado en 7 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: < <https://www.sciencedirect.com> >

proyecto se deciden realizar los experimentos con base en harina de maíz por ser una propuesta innovadora y teniendo en cuenta que esta materia prima tiene composiciones de nutrientes similares a las del arroz, refiriéndose en términos de carbohidratos, es posible que se logren encontrar resultados favorables, además de generar nuevas referencias para futuros proyectos.

Por lo anterior, la concentración de carbohidratos será mayor en comparación con vitaminas y minerales; por la experiencia del Jardín Botánico, para los experimentos y sus réplicas el medio de cultivo se desarrolla en 40 g de materia prima que se distribuye de la siguiente manera: 20g del carbohidrato seleccionado, y 20g en base maíz.

La tabla número 2 recopila la información explicada en el párrafo anterior, en donde el experimento y su réplica 1,2,3 están combinados por arracacha/maíz, yuca/maíz y arroz/maíz respectivamente ; para el experimento número 4 debido a que la materia prima usada es harina de maíz, son 40g teniendo en cuenta que se encuentra en la base propuesta del medio de cultivo; y finalmente el experimento 5 el cual es la combinación de los carbohidratos, son 60 g teniendo en cuenta que se tienen 3 materias primas cada una de 20g y se busca un equilibrio en el medio de cultivo.

Tabla 2. Composición másica de carbohidratos

Experimentos (base maíz)	Proporciones másicas de carbohidratos			
	Arracacha (g)	Harina de yuca (g)	Arroz (g)	Harina de maíz (g)
EXPERIMENTO 1	20	-	-	20
REPLICA	20	-	-	20
EXPERIMENTO 2	-	20	-	20
REPLICA	-	20	-	20
EXPERIMENTO 3	-	-	20	20
REPLICA	-	-	20	20
EXPERIMENTO 4	-	-	-	40
REPLICA	-	-	-	40
EXPERIMENTO 5	20	20	20	60
REPLICA	20	20	20	60

Fuente: elaboración propia

3.5 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Una vez propuestas las concentraciones para los experimentos, se procede a pesar en una balanza analítica de referencia Pioneer la cantidad de cada materia prima

por experimento y replica.. Después de tener todas materias primas (arracacha, harina de maíz, harina de yuca, y arroz) cada una de ellas en base maíz, deben pasar por un proceso de esterilización.

Como se nombra anteriormente, los experimentos número 1, 2 y 3 consisten en un sustrato solido combinado en una proporción 20 g de carbohidrato y 20 g de harina de maíz, el experimento número 4 se realiza en una proporción de 40 g de harina de maíz, y finalmente el experimento número 5 el cual es la combinación de los carbohidratos, se lleva a cabo en una proporción de 60 g. En cuanto al complejo B y caolín se agregan en una concentración de 1% y 5% respectivamente en cada uno de los experimentos, a pesar de que son componentes esenciales para el crecimiento del microorganismo⁸⁷.

La anterior información se puede ver evidenciada en la tabla 3.

Tabla 3. Composición másica del medio de cultivo

Experimentos	Carbohidrato/ base maíz (40g)	Mineral (2g)	Vitamina (0.05g/l)
EXPERIMENTO 1	Arracacha	Caolín	Complejo B
EXPERIMENTO 2	Harina de yuca	Caolín	Complejo B
EXPERIMENTO 3	Arroz	Caolín	Complejo B
EXPERIMENTO 4	Harina de maíz	Caolín	Complejo B
	Carbohidrato/ base maíz (60g)	Mineral (2g)	Vitamina (0.05g/l)
EXPERIMENTO 5	(Arracacha, Harina de yuca, Arroz, Harina de maíz)	Caolín	Complejo B

Fuente: elaboración propia

⁸⁷ JUNCO DÍAZ, Raquel de los Angeles y RODRÍGUEZ PÉREZ, Carlos. Cultivo y crecimiento de los microorganismos. [En línea],2001. [Citado en 7 de marzo de 2018]. Disponible en Internet:< https://www.researchgate.net/publication/288670374_Cultivo_y_crecimiento_de_los_microorganismos>

3.6 ESTERILIZACIÓN DE MATERIAS PRIMAS

La esterilización de todas las bolsas donde se encuentra la materia prima finalmente pesada se realiza para eliminar los microorganismos que puedan existir. El tiempo de almacenamiento apropiado de sustrato esterilizado en autoclave, en donde la temperatura llega a 121,6°C⁸⁸, es de 3 o 4 días. Este factor es fundamental para que el calor penetre en la masa de esterilización y se absorba, además de impedir que cualquier hongo contaminante crezca y se vuelva visible, evitando las fermentaciones contaminadas. Las bolsas esterilizadas de sustrato sólido, también pueden almacenarse en bolsas externas selladas durante varias semanas a temperatura ambiente⁸⁹, con el fin de brindar una mayor protección.

3.7 INOCULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Una vez establecidos todos los medios de cultivo con sus respectivas concentraciones, se inocula cada bolsa con 1 ml de micelio del hongo *Beauveria bassiana* a través de una micropipeta referencia Science Med. Dicha cantidad se deposita en las orillas y en el centro de la misma para una correcta distribución. Finalizada la siembra, cada experimento con su respectiva replica se ubica en incubadora a una temperatura de 26°C sin luz durante aproximadamente 25 días siendo este el tiempo en que el microorganismo esporula⁹⁰.

Ilustración 5. Inoculación del sustrato



Fuente: elaboración propia

Ilustración 6. Experimentos en incubación



Fuente: elaboración propia

⁸⁸ CAÑEDO, Op.cit.

⁸⁹ JARONSKI, Stefan y JACKSON, Mark. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. En: Mass production of entomopathogenic Hypocreales. 2da Edición. USA: LAWRENCE, Lacey. 2012. 75-80 p.


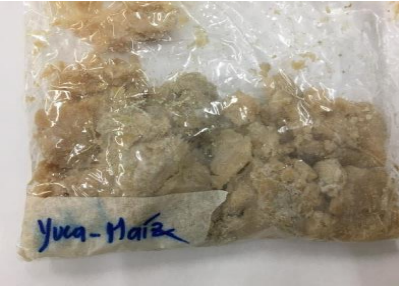
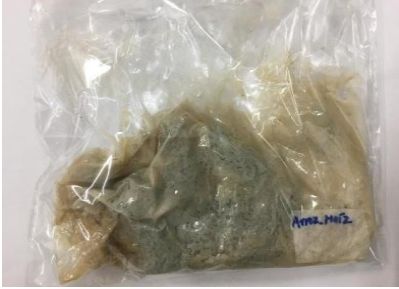
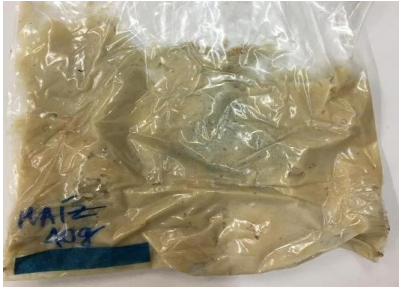

⁹⁰ ALEAN CARREÑO, Op.cit., p.20.

Es importante mencionar que las condiciones ambientales se encuentran vinculadas al desarrollo del microorganismo, por esta razón se almacenan los experimentos en una incubadora como se muestra en la imagen 6, puesto que garantiza dichas condiciones y durante el tiempo que permanecen los experimentos allí el hongo se alimenta de cada uno de los componentes del medio de cultivo para satisfacer sus requerimientos nutricionales, lo cual proporciona al microorganismo un máximo de crecimiento y la obtención de biomasa micelias⁹¹.

Los cambios que se observan días siguientes a la inoculación, son registrados con fotografías y se muestran en tabla 4 , allí se puede ver cómo el microorganismo *Beauveria bassiana* comienza a esporular y se identifica que en el experimento número 3 el cual pertenece a arroz/maíz existe una relación entre el micelio y el medio de cultivo considerable en comparación con el resto de experimentos.

⁹¹ MARTÍNEZ CASTRILLÓN, Op.cit., p

Tabla 4. Esporulaci3n en medios de cultivo

	EXPERIMENTO 1	
	CARBOHIDRATO	Arracacha/Maíz
	VITAMINA	Complejo B
	MINERAL	Caolín
<p>Pasados los 25 días de fermentaci3n, en el experimento 1 se observa una buena colonizaci3n del hongo dentro del medio de cultivo que contiene arracacha lo cual permite inferir una alta virulencia.</p>		
	EXPERIMENTO 2	
	CARBOHIDRATO	Yuca/Maíz
	VITAMINA	Complejo B
	MINERAL	Caolín
<p>Despu3s de la siembra, se percibe que la cantidad de almid3n presente en este medio de cultivo favorece la producci3n de biomasa.</p>		
	EXPERIMENTO 3	
	CARBOHIDRATO	Arroz/Maíz
	VITAMINA	Complejo B
	MINERAL	Caolín
<p>En la imagen se evidencia un crecimiento micelial del hongo <i>Beauveria bassiana</i> el cual se nutre de gran parte del medio de cultivo.</p>		
	EXPERIMENTO 4	
	CARBOHIDRATO	Maíz
	VITAMINA	Complejo B
	MINERAL	Caolín
<p>Del medio de cultivo compuesto en su totalidad por maíz se deduce un buen desarrollo del hongo entomopat3geno por los nutrientes aportados de este carbohidrato ya que esta mol3cula es determinante en la inducci3n de la esporulaci3n.</p>		
	EXPERIMENTO 5	
	CARBOHIDRATO	Arracacha, Maíz, Yuca, Arroz
	VITAMINA	Complejo B
	MINERAL	Caolín
<p>Para el medio de cultivo combinado por los cuatro carbohidratos se observa una esporulaci3n 3ptima para la selecci3n de un agente biol3gico.</p>		

Fuente: elaboraci3n propia

3.8 ELABORACIÓN DEL PELETIZADO

Una vez que ha transcurrido el tiempo en el que el hongo entomopatógeno ha esporulado, se revisan cada uno de los experimentos, los cuales permanecieron en la incubadora durante 25 días. Luego, se seleccionan, y se procede a tomar una parte de la biomasa para elaborar los pellets. El desarrollo de estos pellets se realiza a través de un tamiz en el que manualmente se coloca dicha cantidad de biomasa y se presiona hasta obtener la estructura que se espera, como se observa en la imagen 7.

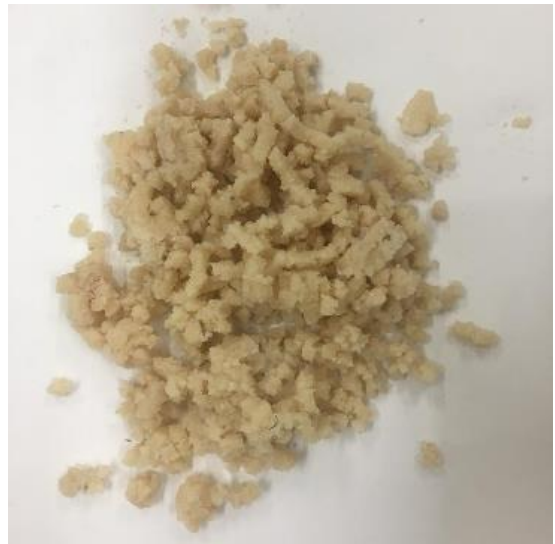
Este procedimiento se hace con cada uno de los experimentos y con sus respectivas replicas. El propósito de la elaboración del peletizado es para determinar las técnicas microbiológicas que permiten cuantificar la cantidad de esporas e identificar en cuál de los cinco experimentos el hongo obtiene una mayor esporulación, además de conseguir una presentación de la formulación como se evidencia en la imagen 8, que por límite de tiempo en la ejecución de este proyecto, no se puede llevar a pruebas de campo, pero que queda en disponibilidad para el uso que el Jardín Botánico de Bogotá requiera.

Ilustración 7. Elaboración del pellet



Fuente: elaboración propia

Ilustración 8. Presentación del peletizado



Fuente: elaboración propia

3.9 DETERMINACIÓN DE CURVAS PATRÓN CON BIOMASA MICELIAR

La curva patrón es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de cada materia prima⁹² y se elabora para tomar como referencia un estándar de la composición de las muestras a trabajar, además de establecer la relación entre la biomasa y la absorbancia⁹³ evaluando el comportamiento del hongo con cada medio de cultivo e identificando por medio de los datos obtenidos de absorbancia (ver anexo A) el crecimiento de la biomasa en cada uno de ellos⁹⁴.

La elección del rango de longitud de onda, concentraciones y diluciones para el procedimiento de las curvas patrón se hace teniendo en cuenta el criterio del Jardín botánico de Bogotá basado en la experiencia y desarrollo de este tipo de investigaciones.

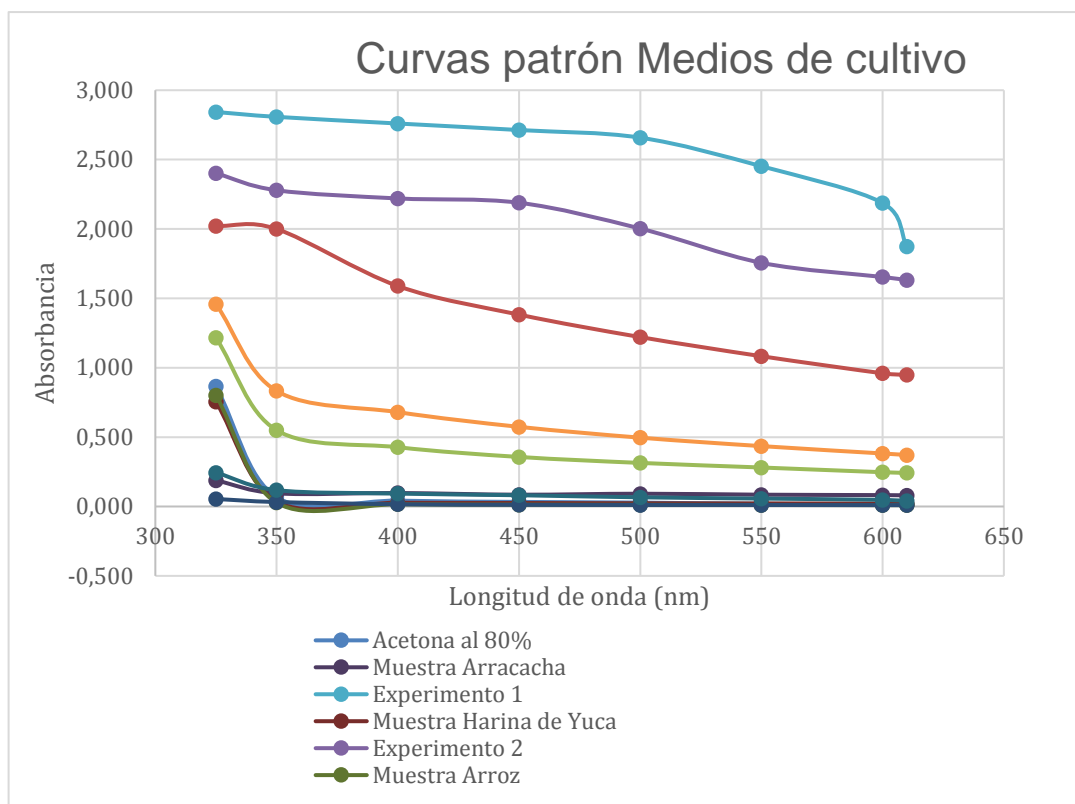
Tanto para las materias primas como para los experimentos se realiza la misma secuencia de pasos, comenzando por pesar 1 g de cada carbohidrato/experimento en una balanza analítica. Después se procede a preparar en tubos de ensayo tres diluciones: agua destilada para calibración, acetona al 80% como patrón, disolvente y una muestra correspondiente al gramo disuelto en 10 ml de agua destilada, de la cual se extraen 3 ml y se disuelven en 7 ml de acetona al 80%. Por su turbidez y pérdida de transparencia como consecuencia de la presencia de partículas que posiblemente impedirían el paso de la luz en el espectrofotómetro, se extraen 0.3 ml de esta solución y se llevan nuevamente hasta 10 ml con acetona al 80%. Posteriormente se transfieren a celdas de cuarzo el agua destilada, la acetona al 80% y la última dilución para que se pueda medir la absorbancia en el espectrofotómetro en un rango comprendido entre 325 y 610 nm.

⁹² DOSAL, María Antonia y VILLANUEVA, Marcos. Curvas de calibración en los métodos analíticos. Introducción a la metrología química [En línea], 2008. [Citado en 4 de abril de 2018]. Disponible en Internet: <http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf>

⁹³ LLANO ARANGO, Op.cit., p. 56.

⁹⁴ LLANO ARANGO, Op.cit., p. 57-59

Gráfico 1. Curvas patrón medios de cultivo



Fuente: elaboración propia

Como se evidencia en la gráfica 1 existe una relación del sustrato con la biomasa, donde se expresa que la absorbancia es proporcional al espesor de la celda y la concentración del medio según la ley de Lambert y Beer; de lo cual se puede inferir que entre menor sea la absorbancia existe mayor concentración miceliar en el medio de cultivo, esto hace referencia al comportamiento de *Beauveria bassiana* y por lo tanto se consigue expresar que el medio de cultivo que proporciona una mayor nutrición para el hongo es el experimento 3.

3.10 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS

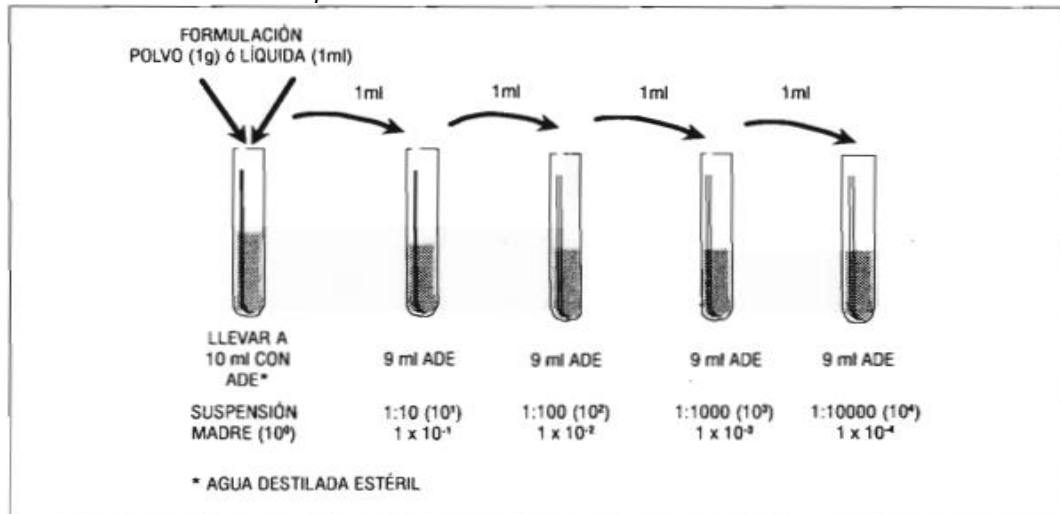
Con el fin de asegurar que la formulación cumpla requisitos mínimos de calidad, además de identificar el sustrato que proporcione condiciones de crecimiento adecuadas para el hongo, se realizan dos pruebas importantes las cuales son concentración y germinación de esporas que permiten establecer el número de unidades infectivas por unidad de peso y determinar la viabilidad del hongo. El desarrollo de las pruebas se realiza según el procedimiento de la Federación

Nacional de Cafeteros de Colombia y el Centro Nacional de Investigaciones de Café para el control de formulaciones de hongos entomopatógenos⁹⁵.

3.10.1 Concentración de esporas. Una vez finalizados los 25 días después de realizar la inoculación, el procedimiento para el conteo de esporas que se realiza para cada uno de los 5 experimentos y sus respectivas replicas es el siguiente:

Para preparar la suspensión madre se toma la bolsa que contiene el medio de cultivo y el hongo esporulado, se extrae un 1g procurando que este contenga gran cantidad de hongo y se lleva a un tubo de ensayo adicionando 10 ml de Tween 80 al 0,1% en agua destilada, esta muestra se agita en un vórtex aproximadamente un minuto. De la suspensión madre se extrae una submuestra para preparar la dilución 0,1 la cual consta de 1ml depositado en un tubo de ensayo llevado hasta 10 ml de agua destilada. De la dilución 10^{-1} se toma 1ml y nuevamente se deposita en un tubo con 9ml de agua destilada quedando una dilución de 10^{-2} , este procedimiento se repite dos veces más hasta llegar a una dilución 10^{-4} la cual es apropiada para hacer una lectura y considerar el número de esporas por gramo del sustrato. El procedimiento anterior se puede apreciar en la imagen 9.

Ilustración 9. Procedimiento para diluciones



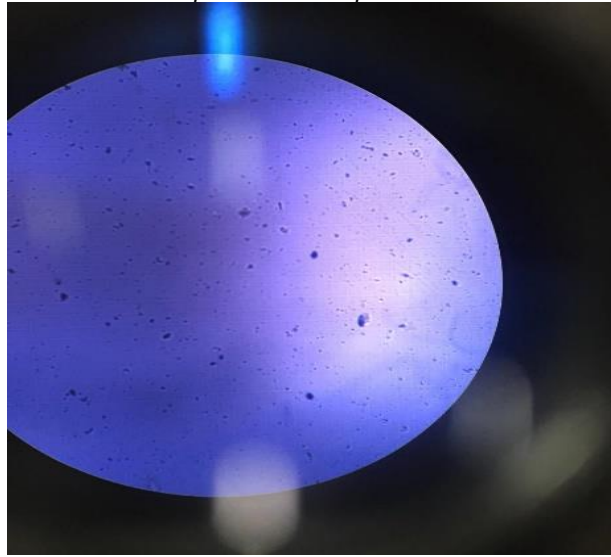
Fuente: VÉLEZ, Patricia, et al. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. [fotografía]. CENICAFÉ.1997. 10 p. Diluciones.

El conteo de esporas se realiza en la cámara de Neubauer marca Boeco tomando 10µl con la micropipeta de la dilución 10^{-4} , se coloca la placa o cubreobjetos sobre la cámara Neubauer y se pone la punta de la pipeta en el borde de este dejando

⁹⁵ VÉLEZ, Patricia, et al. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. CENICAFÉ [En línea],1997. [Citado en 25 de abril de 2018]. Disponible en Internet: <<http://biblioteca.cenicafe.org>>

caer la muestra y procurando que no queden burbujas. Posteriormente, se pone la cámara en la bandeja del microscopio y para el enfoque se utiliza el objetivo de mayor aumento 40X; la imagen 10 muestra las conidias del hongo *Beauveria bassiana* en arroz para uno de los cuadrantes de la cámara. Se realizan 3 conteos para la misma muestra con el fin de asegurarse el mínimo de errores y tener certeza en el cálculo de concentración; la tabla 5 muestra el conteo de cada experimento para los cinco cuadrantes de la cámara y en la tabla 6 se observa la concentración de esporas/ g de cada experimento, para la cual se usa la ecuación 1.

Ilustración 10. Aspecto microscópico de Beauveria bassiana en arroz



Fuente: elaboración propia

Tabla 5. Conteo en cámara de Neubauer.

Conteo en cámara de Neubauer							
Experimento	Repetición	Cuadrantes					Esporas totales (Células)
		1	2	3	4	5	
EXPERIMENTO 1	1	19	23	26	15	20	103
	2	22	21	18	33	21	115
	3	19	19	24	30	17	109
EXPERIMENTO 2	1	28	27	26	34	23	138
	2	34	28	25	46	30	163
	3	31	26	27	43	20	147
EXPERIMENTO 3	1	42	38	57	37	36	210
	2	76	33	62	51	43	265
	3	31	73	55	48	33	240
EXPERIMENTO 4	1	31	45	40	32	33	181
	2	33	43	42	35	45	198
	3	35	49	38	52	30	204
EXPERIMENTO 5	1	24	46	43	58	25	196
	2	40	38	21	42	37	178
	3	42	36	41	39	43	201

Fuente: elaboración propia

Ecuación 1. Concentración de esporas/g

$$\left[\right] \frac{\text{esporas}}{g} = \frac{\left[\right] \frac{\text{esporas}}{ml} * \text{Volumen de la muestra}}{\text{Peso de la muestra}}$$

Ecuación 2. Concentración de esporas/ml

$$\left[\right] \frac{\text{esporas}}{ml} = \text{Esporas Totales} * D * fc$$

Donde:

D: Inverso del factor de dilución

fc: Inverso del factor de la cámara

Para obtener el factor de la cámara de Neubauer es necesario calcular el volumen del cuadrante en el cual se realiza el conteo de esporas de la siguiente manera:

Ecuación 3. Volumen cámara de Neubauer

$$\text{Volumen} = \text{Ancho} * \text{Largo} * \text{Profundidad}$$

$$\text{Volumen} = 1\text{mm} * 1\text{mm} * 0,1\text{mm}$$

$$\text{Volumen} = 0,1\text{mm}^3$$

El número de esporas se obtiene por ml, por lo tanto, la conversión es la siguiente:

$$0,1\text{mm}^3 * \frac{1\text{ml}}{1000\text{mm}^3} = 1 \times 10^{-4}\text{ml}$$

Tabla 6. Concentración de esporas/g

Experimento	Esporas totales (células)			Sumatoria	Promedio
	1	2	3		
EXPERIMENTO 1	103	115	109	327	109
[] esporas/gramo			1,09*10 ¹¹		
EXPERIMENTO 2	138	163	147	448	149,3
[] esporas/gramo			1,49*10 ¹¹		
EXPERIMENTO 3	210	265	240	715	238,3
[] esporas/gramo			2,38*10 ¹¹		
EXPERIMENTO 4	181	198	204	583	194,3
[] esporas/gramo			1,94*10 ¹¹		
EXPERIMENTO 5	196	178	201	575	191,7
[] esporas/gramo			1,92*10 ¹¹		

Fuente: elaboración propia

Los datos obtenidos de la tabla 6 muestran que el experimento 3, en el cual se utiliza arroz y maíz como carbohidratos, es el que mejor resultado arroja en comparación con los demás, debido a que este es el que más esporas registra en el medio de cultivo con un promedio de 238,3 en total. El experimento 4, en el cual se utiliza solamente maíz, también registra un promedio de esporas significativo, pero aun así la diferencia es notoria si se compara con el experimento 3.

Es importante resaltar que el arroz base maíz utilizado en el medio de cultivo arroja como dato una concentración de esporas sobre gramo de $2,38 \times 10^{11}$, lo que permite concluir que este sustrato puede ser empleado para que el hongo esporule y sea usado como bioinsecticida, dando un resultado positivo en efectividad si se compara esa cifra, por ejemplo, con la investigación de Gallegos (2005), la cual registra una concentración de esporas sobre mililitros de 1×10^{13} , (cercano al valor resultante del experimento 3), utilizando arroz como sustrato y soporte obteniendo como resultado un 58% de efectividad en el bioinsecticida para combatir el llamado "picudo de

manzano⁹⁶. Castrillón (2010), usa un medio de cultivo PDA con una cepa del hongo *Beauveria*, obteniendo una concentración de esporas sobre mililitro de $1 \cdot 10^9$ lo que se traduce en un 73,33% de mortalidad en los insectos, una gran cifra de efectividad aun teniendo un nivel de concentración de esporas menor al registrado en el experimento 3 de la investigación actual. Cabe señalar que la prueba de patogenicidad hecha por Castrillón se realizó directamente sobre insectos adultos raspadores del fruto de palma de aceite⁹⁷.

Otra referencia es de Jaramillo González (2012), el cual mediante un medio de cultivo PDA en una mezcla de *Beauveria* y *Metarhizium* logra obtener una concentración de esporas de $2 \cdot 10^{10}$ con el objetivo de controlar la "broca del café" en frutos infestados caídos al suelo. En la prueba de campo su formulación de hongos redujo la infestación en los árboles entre el 18% y 47%⁹⁸, este dato permite analizar que probablemente con la formulación de arroz base maíz se lograría una mayor efectividad en este caso, ya que la concentración obtenida es mayor ($2,38 \cdot 10^{11}$) a la de Jaramillo González. Bustillo (1991) para controlar la "broca del café", emplea un sustrato definido en base a fuentes de Nitrógeno y Carbono. La formulación resultante, la cual tiene una concentración de $2,37 \cdot 10^{11}$ conidias sobre gramo, se lleva a una evaluación en campo y genera un 50% de mortalidad en la plaga que pasado el tiempo alcanza el 69%⁹⁹. Este caso se asemeja bastante a la formulación en el experimento 3, puesto que la concentración de esporas es prácticamente calcada lo que podría asegurar su efectividad para el control biológico.

En la investigación in vitro realizada por Ojeda Chi (2011), la cual busca combatir mediante un hongo entomopatógeno las infestaciones de la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*, obtuvo una concentración de esporas sobre gramo de $1 \cdot 10^7$ y logró una mortalidad de 80% a las 72 horas de haberlo aplicado¹⁰⁰. Por su parte, Cárdenas (2007) utiliza cepas de alta y baja virulencia de *Beauveria bassiana* contra la broca del café. Con el medio nutritivo PDA obtuvo $2 \cdot 10^7$ esporas/rama. Para llevarla a campo se emplearon parcelas de 25 árboles con diez repeticiones, distribuidas bajo un diseño completamente aleatorio, donde se registró la mayor

⁹⁶ GALLEGOS MORALES, Gabriel; et al. Evaluación de formulaciones de *Beauveria bassiana* (Vuill.) en el campo contra el picudo de la yema del manzano *Amphidees spp.* (Coleoptera: Curculionidae) en Arteaga, Coahuila, México. CATIE [En línea], 2005. [Citado en 1 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/6263>>

⁹⁷ MARTÍNEZ CASTRILLÓN, Op.cit.

⁹⁸ JARAMILLO GONZÁLEZ, Jorge Luis. Evaluación y validación de mezclas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin para el control de la broca del café en frutos infestados caídos al suelo. Scielo [En línea], 2012. [Citado en 13 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v41n1/v41n1a15.pdf>>

⁹⁹ BUSTILLO, Alex Enrique, et al. Evaluaciones de campo con el hongo *Beauveria Bassiana* para el control de la broca del café *Hypothenemus Hampei* en Colombia. Cenipalma [En línea], 1991. [Citado en 14 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <https://www.researchgate.net>>

¹⁰⁰ OJEDA CHI, Melina Maribel, et al. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias [En línea], 2011. [Citado en 14 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.scielo.org.mx>>

mortalidad con la mezcla de cepas de baja virulencia (66,6%)¹⁰¹. García y González (2004) en Durango, México, emplean *Beauveria bassiana* como bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas rurales utilizando como medio de cultivo el arroz, arrojando $1,2 \cdot 10^{12}$ esporas para una mortalidad superior al 80% a las 72 horas para el control de mosquita blanca *Bemisia tabaci*¹⁰².

Todos los casos anteriormente expuestos, son datos bibliográficos que auguran un buen rendimiento y resultado en el control de plagas con el medio de cultivo propuesto en este proyecto ya que en la mayoría el hongo entomopatógeno usado es *Beauveria*, sin embargo, es importante mencionar que la prueba de campo es determinante e imprescindible para una completa verificación del objetivo propuesto.

3.10.2 Germinación de esporas. Esta prueba que permite calcular la cantidad de esporas viables en una formulación y la cual es realizada con el mismo procedimiento para cada experimento y su respectiva replica se ejecuta preparando 15 ml de agar-agua al 1,5% en una caja petri¹⁰³, con un marcador se ponen 5 puntos en la superficie inferior externa de la caja los cuales serán de guía para depositar en cada uno 5 μ l de una dilución de 10^{-3} elaborada de la misma forma que para la prueba de concentración de esporas; a continuación la caja petri se lleva a la incubadora a 25°C durante 24 horas como se observa en la imagen 11.

Ilustración 11. Prueba de germinación de esporas



Fuente: elaboración propia

¹⁰¹CÁRDENAS RAMÍREZ, Angela, et al. Eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. CENICAFÉ [En línea], 2007. [Citado en 14 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <[https://www.cenicafe.org/es/publications/arc058\(04\)293-303.pdf](https://www.cenicafe.org/es/publications/arc058(04)293-303.pdf)>

¹⁰² GARCÍA GUTIÉRREZ, Cipriano, et al. Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable [En línea], 2010. [Citado en 15 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://revistas.unam.mx/index.php/rxm/article/view/17881>>

¹⁰³ MARÍN, Patricia, et al. Evaluación de diferentes medios de cultivo para determinar la germinación del hongo *B. bassiana* producido en formulaciones comerciales. CENICAFÉ [En línea], 1994. [Citado en 15 de mayo de 2018]. Disponible en internet: <<biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/709/1/017.pdf>>

Pasadas las 24 horas en incubadora, se agrega una gota de lactofenol el cual es un colorante usado para la observación de hongos en cada punto formado anteriormente con el fin de teñir las esporas y detener la germinación¹⁰⁴; una vez teñidas, con ayuda de una micro espátula se remueve la dilución y se deposita en una lámina de vidrio para análisis en el microscopio nuevamente con el objetivo 40X y haciendo 3 repeticiones. En la tabla 8 se observa el porcentaje de germinación, el cual se obtiene usando la ecuación 4, indicada por el Centro Nacional de Investigaciones de Café que se muestra a continuación

Ecuación 4. Porcentaje de germinación

$$\% \text{ De germinación} = \left(\frac{G}{G + NG} \right) * 100\%$$

Donde:

G: Esporas germinadas

NG: Esporas no germinadas

Tabla 7. Esporas germinadas y no germinadas

Experimento	Repetición	Número de esporas observadas											
		Cuadrantes										Total	
		1		2		3		4		5		G	NG
		G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG
EXPERIMENTO 1	1	33	13	28	11	41	12	48	32	37	14	187	82
	2	20	34	36	37	31	26	32	37	40	28	159	162
	3	35	4	29	3	26	6	27	5	29	2	146	20
EXPERIMENTO 2	1	40	7	33	13	25	8	54	32	36	13	188	73
	2	38	17	58	13	50	28	55	4	43	17	244	79
	3	48	3	49	6	57	8	47	13	56	4	257	34
EXPERIMENTO 3	1	75	11	69	9	80	11	83	12	97	3	404	46
	2	98	5	73	4	75	12	93	9	84	4	423	34
	3	87	13	84	12	88	15	79	17	85	29	423	86
EXPERIMENTO 4	1	72	17	81	4	83	17	94	20	83	29	413	87
	2	59	11	53	10	48	15	31	23	24	8	215	67
	3	48	6	53	9	20	0	22	1	24	3	167	19
EXPERIMENTO 5	1	53	19	49	8	35	16	44	6	46	26	227	75
	2	31	17	46	29	48	32	24	5	23	2	172	85
	3	51	9	39	1	46	2	13	5	28	10	177	27

Fuente: elaboración propia

¹⁰⁴ VÉLEZ, Op.cit., p.11.

Ilustración 12. Aspecto microscópico germinación de Beauveria



Fuente: elaboración propia

Tabla 8. Porcentaje de germinación de esporas

Experimento	Número de esporas observadas									
	1		2		3		Total			
	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G+NG	
EXPERIMENTO 1	187	82	159	162	146	20	164	88	252	
% De Germinación	65,08									
EXPERIMENTO 2	188	73	244	79	257	34	229,67	62	291,67	
% De Germinación	78,74									
EXPERIMENTO 3	404	46	423	34	423	86	416,67	55,33	472	
% De Germinación	88,28									
EXPERIMENTO 4	413	87	215	67	167	19	265	57,67	322,67	
% De Germinación	82,13									
EXPERIMENTO 5	227	75	172	85	177	27	192	62,33	254,33	
% De Germinación	75,49									

Fuente: elaboración propia

Una formulación debe tener una germinación que supere el 85% en un tiempo de incubación de 24 horas debido a que cuando el hongo se aplique en campo debe lograr un rápido efecto sobre la población con miras a interrumpir el proceso reproductivo del insecto y a la vez sobreponerse a condiciones ambientales⁷⁸. La tabla 8 muestra el experimento 3 como el que mejor resultados arroja, puesto que el porcentaje de germinación es mayor al 85%, lo esperado para formulaciones como se explica anteriormente. El experimento 4, aunque registra un porcentaje de

germinación significativo (82%), no alcanzaría a dar resultados esperados si se lleva a prueba de campo, puesto que se necesita como mínimo un 85%.

Para evaluar la viabilidad del hongo *Beauveria bassiana* en la broca del café, Bustillo (1991) en la investigación que ya se menciona con anterioridad, realiza bioensayos en medios SDA acidificado y el resultado de germinación es superior al 89%, lo cual indica, es una buena calidad biológica del patógeno⁸². Por otra parte, Chacin Zambrano (2013), emplea base de arroz en el medio de cultivo para la inoculación del hongo *Beauveria* para controlar un parasito de la abeja en una finca en el Norte de Santander; él aplica el hongo sobre una muestra intencionada de colonias con un resultado favorable de 96% de germinación¹⁰⁵. La formulación de Alvarado (2013), consiste en la siembra del hongo *Metarhizium* en medio agar y determinar la patogenicidad sobre adultos *R. palmarum*, dando como resultado un porcentaje de germinación superior al 80%, llegando a un máximo de 84 %¹⁰⁶.

3.11 PRUEBA CON SUSTRATO DE ARROZ

Para una comparación entre la relación carbohidrato/maíz, y teniendo en cuenta que, bajo la experimentación realizada, los resultados indican que la mejor opción de sustrato es arroz base maíz, se decide realizar un experimento en el que el arroz sea el único sustrato en la formulación con el fin de ver el efecto de este en el medio de cultivo y definir si con maíz se comporta mejor.

El procedimiento es el mismo mencionado en la sección 3.5, una bolsa de polietileno es llenada de 40g de arroz, junto con los porcentajes de vitamina y mineral, esta formulación se esteriliza para luego realizar la inoculación del sustrato y posteriormente es dejada en incubadora durante 25 días para luego realizar pruebas microbiológicas.

Ilustración 13. Prueba con sustrato de arroz



Fuente: elaboración propia

¹⁰⁵ CHACIN ZAMBRANO, Op.cit.

¹⁰⁶ ALVARADO, Hanna, et al. Patogenicidad de cepas de *Metarhizium anisopliae* (L.) y *Beauveria bassiana* sobre *Rhynchophorus palmarum*. CID [En línea],2013. [Citado en 15 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/10842>>

Posteriormente, se procede a realizar las técnicas de concentración y germinación de esporas, obteniendo los resultados mostrados en las tablas 9 y 10. Ejecutando un análisis de dichos valores, se logra concluir que el carbohidrato en base maíz genera un efecto positivo en la formulación, además, se puede confirmar un hecho determinante de la investigación: que el mejor medio de cultivo es arroz/maíz, incluso situándose por encima del que se usa tradicionalmente (el cual se compone de arroz únicamente), si se refiere en términos de viabilidad del hongo dentro de este.

Tabla 9. Concentración de esporas en sustrato de arroz

Experimento	Células totales			Sumatoria	Promedio
	1	2	3		
ARROZ	200	225	198	623	207,7
[] esporas/gramo				2,08E+11	

Fuente: elaboración propia

Tabla 10. Germinación de esporas en sustrato de arroz

Experimento	Número de esporas observadas									
	1		2		3			total		
	G	NG	G	NG	G	NG	G	NG	G+NG	
ARROZ	397	65	355	45	400	83	384	64,33	448,3	
% De Germinación					85,65					

Fuente: elaboración propia

Como se observa en los resultados, el arroz es un buen medio de cultivo para hongos entomopatógenos; en este sustrato *Beauveria bassiana* coloniza totalmente y consume todos sus nutrientes lo que permite un resultado de concentración de $2,08 \cdot 10^{11}$ y germinación de 85%, siendo estos valores aptos para formulaciones si se tiene en cuenta que dicha formulación aplicada en campo podría sobreponerse a condiciones ambientales.

Una vez identificado el experimento en el cual el hongo entomopatógeno tiene un mejor comportamiento (experimento 3), en la tabla 11 se evidencian los 3 medios de cultivo que tienen relevancia en el desarrollo experimental con el fin de identificar sus resultados y determinar la mejor formulación.

Tabla 11. Selección de medio de cultivo

Medio de cultivo				
Carbohidrato	Vitamina	Mineral	Concentración (esporas/gramo)	% de Germinación
Arroz	Complejo B	Caolín	$2,08 \cdot 10^{11}$	85,65
Maíz	Complejo B	Caolín	$1,94 \cdot 10^{11}$	82,13
Arroz/Maíz	Complejo B	Caolín	$2,38 \cdot 10^{11}$	88,28

Fuente: elaboración propia

Del desarrollo experimental variando distintos carbohidratos se concluye que la mejor composición del pellet se compone de arroz en base maíz con una proporción de 20:20 y elementos trazas representados como complejo B y caolín, esto teniendo en cuenta el valor obtenido de la variable respuesta del proyecto dada como número de conidios por gramo, y haciendo también una comparación de datos similares llevados a campo los cuales arrojaron resultados exitosos para control biológico.

4. ESPECIFICACIONES TECNICAS DEL PROCESO A ESCALA PILOTO

En este capítulo se muestran las condiciones para plantear el escalamiento a nivel piloto debido a los intereses del Jardín Botánico por llevar a la práctica sus investigaciones de la producción en masa del pellet a partir del hongo *Beauveria bassiana* de acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo anterior. Se identifican las etapas, variables relevantes, y posterior a esto se proponen equipos, junto con diagramas de bloques y el balance de masa del proceso.

4.1 ESCALAMIENTO

En laboratorio se manejan matraces de aproximadamente 500 ml, se experimentan mecanismos de control, se mejoran las cepas de producción, y se usan fermentadores con capacidades pequeñas esperando nuevos productos. Para el escalamiento en planta piloto se estudian capacidades de 5000 L, en varios casos los fermentadores poseen instrumentos para conectarse a una computadora con el fin de estudiar la dinámica del cultivo y de ser posible, establecer un control por retroalimentación, y por último en la planta industrial, los fermentadores de producción son de hasta 400000 L y deben operar siguiendo un calendario fijo¹⁰⁷.

En el trabajo realizado por Llano Arango (2007), se evalúa la producción de biomasa y se propone un escalado de 2000L logrando conservar constante la cantidad de biomasa acumulada en cada biorreactor y consiguiendo resultados favorables para el bioinsecticida; siguiendo sus indicaciones y datos reportados, en este proyecto se trabaja con el mismo criterio en los cuales se investigan efectos de aireación, temperatura y control de pH.

El objetivo del escalado es mantener constante la concentración de biomasa en los biorreactores, por lo tanto, el escalado se ejecuta a partir de los patrones obtenidos por Doran (1999), pero sin tener en cuenta similitud geométrica puesto que en laboratorio se usaron matraces de máximo 1000 ml para el proceso de fermentación. En la práctica es difícil conservar la geometría para ejecutar un escalamiento fundado en métodos de análisis dimensional, además, estudios han confirmado la ventaja de escalar sin obedecer a la geometría⁹⁴.

¹⁰⁷ QUINTERO, Rodolfo. Teoría y Aplicaciones. En: Ingeniería Bioquímica. México: Editorial Alambra, S.A., 1990.

Tabla 12. Datos de los biorreactores de 200L y 2000L

Parámetro	Biorreactor de 200L	Biorreactor de 2000L
D (m)	0.6338	13.656
D _i (m)	0.2113	0.4552
H _L (m)	0.6338	13.656
H _i (m)	0.2113	0.4552
L _i (m)	0.0528	0.1138
W _b (m)	0.0634	0.1366
W _i (m)	0.0423	0.0910
N _b	4	4

Fuente: DORAN, Pauline. Fluid flow and Mixing. En: Bioprocess engineering Principles. [partitura]. London. Academia Press Limited. 1999. Datos de biorreactores de 200L y 2000L.

Donde

D: Diámetro interno del reactor

H_L: Altura del reactor

L_i: Ancho del impeler (si lo tiene)

W_i: Alto del impeler (si lo tiene)

D_i: Diámetro del impulsor

W_b: Ancho del bafle

N_b: Número de baffles

Para desarrollar el cambio de escala, se usan criterios establecidos en resultados empíricos⁹⁸, el desarrollo ingenieril representa la capacidad de demostrar la relación entre los instrumentos de laboratorio y los equipos a nivel industrial; antes es necesario establecer una proporción de materia con la cual se podría trabajar en estos nuevos equipos, para este caso la proporción del producto final es de 602kg con el objetivo que las variables primordiales del proceso no se vean alteradas al cambiar de tamaño las unidades donde se procesa la materia prima. A continuación, se mencionan algunos de los criterios de escalamiento de procesos biológicos.

4.1.1 Criterios de escalamiento. Existen diferentes factores que se deben tener en cuenta en la mayoría de los procesos biológicos, como lo son: los requerimientos de los bioprocesos, el diseño del proceso, la geometría de los equipos, entre otras. En un comienzo se debe conocer el tipo de microorganismo con el que se está trabajando, puesto que de eso depende la selección del tipo de agitación y la temperatura en el interior de cada equipo; haciendo referencia al biorreactor se considera la concentración de oxígeno promoviendo el metabolismo celular del

microorganismo. Para la fermentación en medio sólido el modo de operación tiene gran relevancia ya que se escoge según la función que se pretenda darle a la producción, en este caso se desarrolla bajo una operación discontinua porque se ajusta a las etapas iniciales del proceso es decir la inoculación con el hongo entomopatógeno al medio de cultivo.

Por otro lado, en el diseño de un equipo se deben establecer ciertos criterios que garantizan la utilidad de este, entre ellos un mínimo gradiente de concentración, la ausencia de sedimentación y la distribución uniforme de células, pero previo a eso se debe mencionar aspectos que intervienen en dicha optimización como los métodos de: mezcla, agitación, el control de temperatura, pH y oxígeno. En términos de la agitación se puede instalar en el fondo o en la cima del equipo¹⁰⁸.

Otros criterios de escalamiento se establecen con parámetros cuya finalidad es que no se vean alterados al plantear un cambio en los equipos en caso que se desee una producción a mayor volumen, como por ejemplo: similitud geométrica, requerimientos de potencia, régimen de flujo, velocidad de agitación.

4.1.2 Requerimientos de oxígeno y rendimiento en reactores biológicos. Este criterio es importante tenerlo en cuenta al momento de escalar un proceso, puesto que en fermentaciones aeróbicas el abastecimiento de oxígeno es vital para el desarrollo de las células, y por la mínima solubilidad que existe en la fase líquida es necesario un suministro continuo desde la fase gaseosa. Dicha cantidad de oxígeno es producto de la interacción entre la transferencia de oxígeno, tiempos prolongados de circulación y finalmente de la cinética microbiana.

Un ejemplo de ello, es el consumo de oxígeno en procesos de fermentación, en donde la disminución de oxígeno ocurre en tiempos de circulación elevados y el aumento en la concentración de oxígeno ocurre en tiempos de circulación mínimos. Además, existen otros aspectos que afectan el rendimiento en reactores biológicos: la eficiencia del mezclado, el valor del pH, la viscosidad del medio de cultivo y la potencia consumida por el agitador¹⁰⁹. Como se ha mencionado, los requerimientos de oxígeno afectan directamente las fermentaciones más aún cuando se utilizan microorganismos aerobios que requieren de este tipo de suministro lo cual se evidencia en las etapas 2 y 3 del proceso.

¹⁰⁸ OLIVARES BAÑUELOS, Tatiana. Diseño y escalamiento de procesos biotecnológicos. Trabajo de grado Licenciatura de Bioingeniería. México: Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño, 2008. 13-22 p.

¹⁰⁹ QUIRÓS FOURNIER, Jose Pablo. Determinación de modelos para la predicción de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa (K_{la}) oxígeno- medio de cultivo en biorreactores tipo tanque agitado. Trabajo de grado Licenciatura en Ingeniería Química. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica. Facultad de Ingeniería, 2014. 10-30 p.

4.2 ETAPAS DEL PROCESO EN LABORATORIO

Como se menciona en el capítulo 2 las condiciones ambientales de crecimiento (temperatura, humedad relativa, pH y la actividad de agua), en la experimentación, la humedad favorece la germinación y esporulación y permite la fácil penetración de las hifas¹¹⁰ siendo esta mayor al 40%.¹¹¹ Con relación a la temperatura, los hongos entomopatógenos conservan un rango de tolerancia para desarrollarse y esporular el cual se encuentra a temperaturas entre 20 y 30 °C¹¹², en laboratorio la temperatura y humedad a la cual se observó la esporulación fue de 26°C y 82% respectivamente.

4.2.1 Preparación del medio de cultivo. La primera etapa consiste en amplificar la cantidad de micelio del hongo *Beauveria bassiana* con el propósito de obtener la cantidad necesaria de inóculo; este procedimiento se lleva a cabo con instrumentos que comúnmente se encuentran en el laboratorio, por ejemplo, la espátula es utilizada para raspar la superficie del microorganismo y una vez se obtiene la cantidad de micelio se coloca en un recipiente de vidrio ideal para almacenar cualquier tipo de sustancias, posteriormente para amplificar la cantidad de micelio se utiliza jarabe de maíz que está contenido en un erlenmeyer y se le da uso a este instrumento por ser un frasco de vidrio cuya estructura favorece la agitación de las sustancias. Finalizando la primera etapa, se utiliza un agitador de vidrio para mezclar la disolución correspondiente al micelio del hongo y al jarabe de maíz. Entre las condiciones a las cuales se lleva a cabo esta primera etapa dentro de la cámara de flujo laminar se encuentra la presencia de luz ultravioleta a una longitud de onda con un rango de 200 a 390 nm, una temperatura de 20 a 22 °C y una humedad comprendida entre 45 a 55 %. Luego, se procede a preparar el medio de cultivo con cada uno de las materias primas iniciando por pesar cada componente haciendo uso de una balanza analítica y después depositando las cantidades en bolsas de polietileno las cuales permiten una adecuada manipulación de la humedad y aireación del sustrato.

4.2.2 Esterilización, inoculación del medio de cultivo y fermentación. Las bolsas de polietileno con el sustrato son posteriormente llevadas a un proceso de esterilización en autoclave que trabaja con vapor de agua a altas presiones y a una temperatura de aproximadamente 122°C con la finalidad de eliminar cualquier

¹¹⁰ ALATORRE ROSAS, Op.cit.

¹¹¹ HALL, David, et al. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata* [En línea], 2012. [Citado en 16 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/eea.12025>>

¹¹² GODOY, Juan, et al. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Revista de la Facultad de Agronomía* [En línea], 2007. [Citado en 16 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.scielo.org.ve>>

fuente de contaminación que se pueda presentar durante el pesaje o la manipulación de cualquier materia prima¹¹³. Una vez esterilizado el medio se inocula con el micelio de *Beauveria bassiana*, y a continuación se sitúa en la incubadora la cual debe mantener una temperatura controlada de 26°C durante los 25 días de colonización hasta que el hongo esporule y consuma todos los nutrientes para cada medio de cultivo.

El proceso bioquímico de fermentación en el laboratorio se identifica mientras transcurren los días debido a que el hongo va esporulando en cada medio de cultivo, internamente es importante la transferencia de oxígeno puesto que el microorganismo es aerobio, y teniendo en cuenta que las bolsas de polietileno están almacenadas en la incubadora microbiológica se debe regular la condición más significativa de crecimiento como lo es la temperatura.

4.2.3 Formación del pellet. Finalmente, la cuarta etapa consiste en elaborar un pellet manualmente por cada experimento a través de un tamiz de 4.75mm es decir 4750 μm , puesto que se estima que es un tamaño intermedio para la presentación si se tiene en cuenta que generalmente las formulaciones tienen gránulos con rango de tamaño entre 2000 y 6000 μm ¹¹⁴ y el cual se considera no se verá afectado al ambiente al que será expuesto.

4.3 ETAPAS DEL PROCESO A ESCALA PILOTO

En esta sección se identifican las etapas relevantes para el proceso de producción, para cada una hay una breve descripción con el fin contextualizar la información y enfatizar su importancia y condiciones a las que se propone que trabajen.

4.3.1 Preparación del medio de cultivo. La primera etapa hace referencia al mezclado, siendo esta una de las operaciones unitarias más importantes en este tipo de procesos puesto que minimiza los gradientes de concentración de nutrientes y prepara el sustrato para la siguiente etapa. En una escala piloto se requiere de un equipo que mezcle adecuadamente las cantidades correspondientes del medio de cultivo (arroz, maíz, caolín y complejo B), pero para dicha acción se necesita de una correcta agitación integrando de forma homogénea la temperatura, pH y los nutrientes; por ello en el momento de escoger un equipo que proporcione dichas características se debe tener en cuenta la viscosidad del medio, la potencia y el tipo de agitador. Al realizar un énfasis en la temperatura, se debe prevenir la

¹¹³ GARRIDO ABATE, Nicolás. Manual básico del uso de autoclaves [En línea], 2015. [Citado en 15 de junio de 2018]. Disponible en Internet: < <http://sb.uta.cl/libros/Apuntesautoclave.pdf> >

¹¹⁴ URTUBIA, Op.cit., p. 24.

gelatinización de los componentes evitando llegar hasta 73 °C¹¹⁵ y 65°C¹¹⁶ para el arroz y maíz respectivamente.

Los factores que se ven involucrados en el mezclado son el tamaño de partículas considerando que entre menor sea el tamaño mayor será la cohesión entre ellas; la diferencia en la densidad del medio de cultivo ya que puede proporcionar la segregación de los componentes; y el tiempo óptimo de mezclado si se quiere obtener una homogeneidad en la mezcla¹¹⁷.

Otro aspecto es la selección del tipo de mezclador el cual dependerá de las características del medio de cultivo y su clasificación en inmóvil o móvil. Además, en la agitación la cantidad de espuma de los esfuerzos cortantes que se pueden dar en este tipo de procesos depende de la velocidad de giro del elemento rotativo impulsor, si la velocidad del impulsor es alta, éste fenómeno puede generar estrés en las células, aumentar el tamaño de las burbujas de gas y originar un daño mayor a las células ocasionando presión sobre la membrana celular y posteriormente su rompimiento¹¹⁸.

4.3.2 Esterilización, inoculación del medio de cultivo y fermentación. En esta fase de fermentación, el impacto que soporta el microorganismo en el proceso de biotransformación es diverso, ya sea por su complejidad como existencia viviente o por las condiciones resultantes a las que está expuesto dentro del biorreactor¹¹⁹; deben ser optimizados para conseguir la máxima concentración de productos de la fermentación, como lo son la biomasa microbiana y/o metabolitos en un tiempo mínimo (de 15 a 25 días) y a menor costo de producción¹²⁰.

El biorreactor debe funcionar asépticamente durante numerosos días, (como ya se menciona anteriormente de 15 a 25 días los cuales son determinantes para que el hongo esporule), para evitar la aparición de contaminantes, debe proveer oxígeno a una velocidad tal que satisfaga el consumo (de 100 a 1500 rpm, potencia 1 kW)

¹¹⁵ MARTÍNEZ, Jorge, et al. Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón de arroz (*Oryza sativa* L) blanco e integral. Revista de asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos [En línea], 2017. [Citado en 22 de noviembre de 2017]. Disponible en Internet: < <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/446/364>. 2017>

¹¹⁶ PINEDA GÓMEZ, Posidia, et al. Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: estudio por calorimetría diferencial de barrido. Ingeniería y Ciencia [En línea], 2010. [Citado en 17 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v6n11/v6n11a08.pdf>>

¹¹⁷ CHICO PROAÑO, Fabián Mauricio. Premezclado de sólidos inertes para la producción de dinamita, mediante el diseño y construcción de un mezclador cónico vertical piloto. Trabajo de grado Ingeniería Química. Quito, Ecuador: Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, 2011. 33-37 p.

¹¹⁸ RUIZ COLORADO, Ángela Adriana. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante. Doctorado en Ingeniería. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de minas, 2009. 13 p.

¹¹⁹ ASENJO, Juan. Bacterial, Yeast, and Fungal Cultures, Scale-Up. En: Biorreactor System Design. New York: MERCHUK, José, 1995.

¹²⁰ RUIZ LEZA, Héctor, et al. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. bio-reactors desing for solid state fermentation. Revista Mexicana de Ingeniería Química [En línea], 2007. [Citado en 17 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.redalyc.org/pdf/620/62060105.pdf>>

¹²¹; el crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor, del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular.

El equipo biorreactor destinado para esta fase debe poseer una geometría similar a los recipientes de menor tamaño en la planta piloto¹²², el cuerpo del reactor es necesario que tenga una superficie interna libre de rugosidades para prever la acumulación de células o medio de cultivo que puedan ocasionar contaminación, y debe proveer una aireación apropiada de acuerdo con las exigencias metabólicas del hongo entomopatógeno.

El sistema de difusión de oxígeno disuelto debe optimizar al máximo la transferencia de este al medio de cultivo, y se encuentra en un rango de 0-99%. Por lo general poseen sistemas de control de temperatura los cuales mantienen estable y dentro de un rango de 20 a 40°C, óptimo requerido por el cultivo para su máximo crecimiento¹²³, mientras que el sistema de pH del medio de cultivo está formado por un controlador de pH el cual es una sonda electroquímica que mide la acidez y muestra la situación del medio para que no supere un pH de 7.

4.3.3 Formación del pellet. En esta última etapa, se desarrolla como tal la presentación del producto haciendo referencia al pellet, pero antes se deben contemplar los parámetros que se requieren para dicha elaboración, como: la humedad del material siendo un factor fundamental para la calidad del producto ya que actúa como lubricante y aglomerante, además se estima que el valor debe estar comprendido entre un 11 a 12 %; en cuanto a la temperatura del dado se prevé un valor de 35 °C porque a temperaturas mayores a 30 °C se disminuyen los efectos físicos y químicos sobre la estructura del pellet; por otro lado el tamaño de partícula interfiere en la durabilidad y el costo de producción puesto que entre menor sea el tamaño más vale producirlo, en un proceso a mayor escala se debe tener en cuenta que si el granulo es muy pequeño puede generar atascamientos en la maquinaria, por esta razón se recomienda un rango entre 0.5 mm a 0.8 mm; por último se considera la presión del peletizado ya que su función es compactar la biomasa hasta aumentar la densidad de esta, es por ello existe una relación directamente proporcional entre la presión y la densidad¹²⁴.

¹²¹ VÁSQUEZ, Morgan. Diseño del sistema de control para un biorreactor de tanque agitado. [En línea], 2010. [Citado en 16 de junio de 2018]. Disponible en Internet: <<https://es.scribd.com/doc/31787823/Biorreactor-de-tanque-agitado-Morgan-G-Vasquez-2010>>

¹²² LLANO ARANGO, Op.cit.

¹²³ VÁSQUEZ, Op.cit.

¹²⁴ ZAPATA SAAD, Andrés José. Investigación del efecto de los parámetros de elaboración de pellets de cuesco de palma en el proceso de pirolisis. Magister en Ingeniería Mecánica. Bogotá. Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, 2016. 35-40 p.

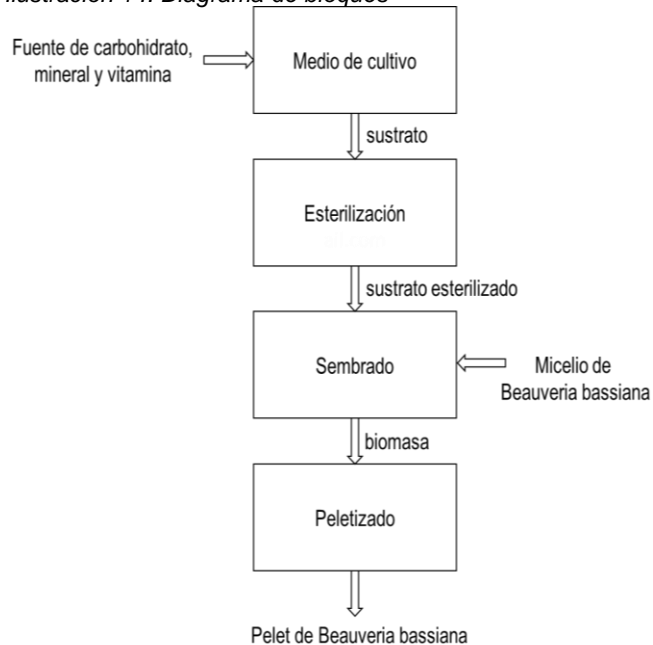
4.4 SELECCIÓN DE LA PROPORCIÓN DE MATERIA PRIMA

Para la selección de proporción de materia prima dicha de un proceso como este, se toma como referencia un proyecto que propone un escalado de fermentación en sustrato sólido a escala piloto, para la producción de un bioinsecticida; Llano Arango, (2007) plantea 508kg de fuente de carbono para el sustrato, junto con 3600L de agua desionizada con fines de humedad para el sustrato sólido. En términos de esta investigación, se decide trabajar con 500kg de arroz base maíz para el escalado del peletizado, y 3600L de agua desionizada teniendo en cuenta que es un valor similar al del proyecto referenciado y se puede proceder con equipos y con las mismas condiciones a las cuales allí se trabaja.

4.5 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO

Se desarrolla este diagrama genérico del proceso, para organizar las etapas anteriormente descritas que fueron de relevancia durante la experimentación en el laboratorio. Siendo este el comienzo de posteriores diagramas.

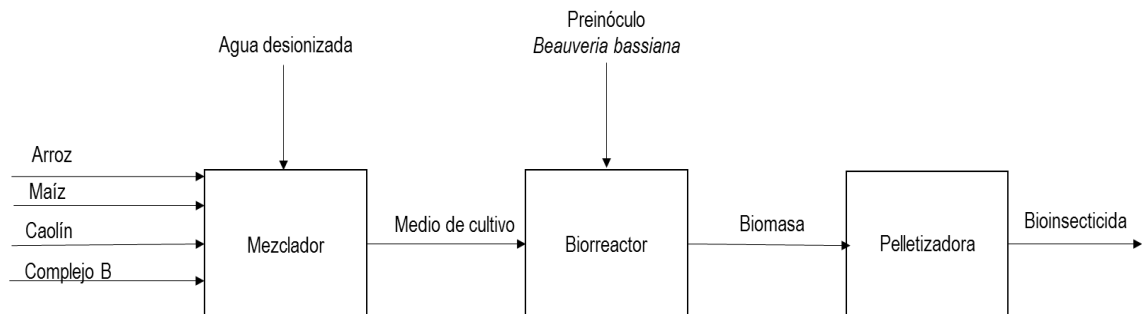
Ilustración 14. Diagrama de bloques



Fuente: elaboración propia

4.5.1 Descripción del proceso. Para la producción a escala piloto de un bioinsecticida en presentación sólida a partir del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* se deben tener en cuenta aspectos generales del proceso entre los cuales se encuentran la preparación del sustrato sólido, cuyo criterio de elección es en consecuencia de los resultados obtenidos en el capítulo dos mediante el desarrollo experimental, y cuyo criterio de proporción es basado en resultados escalados por Llano, Arango (2007). Este sustrato debe ingresar a un tanque de mezcla M-101 con capacidad de 2000L, y por ser materia sólida con ausencia de agua se implementa una corriente de agua desionizada que le proporcione al sustrato la cantidad de agua que el microorganismo necesita para crecer y llevar a cabo sus procesos metabólicos. 312.5 kg de preinóculo de *Beauveria bassiana* ingresan al biorreactor R-101 junto con 2000L de la mezcla del medio de cultivo donde es esterilizado in situ con calor seco y del cual se espera conseguir suficiente agente patógeno; de allí se obtiene el principio activo, el cual se lleva a un equipo pelletizador P-101 para obtener el tamaño de partícula en la presentación que se desea. El proceso descrito anteriormente se muestra en la imagen 15.

Ilustración 15. Diagrama de proceso



Fuente: elaboración propia

4.6 EQUIPOS PARA EL PROCESO A ESCALA PILOTO

Una vez identificados las etapas y variables relevantes en la formulación, se exponen los equipos que consiguen ser reemplazados para la escala piloto y los cuales seguirán cumpliendo las mismas funciones en la producción.

4.6.1 Mezclador. Para la elección del equipo que permita una mezcla homogénea del medio de cultivo y que además permita que se forme un sustrato adecuado que proporcione buenas condiciones se realiza una comparación de distintas maquinarias la cual se observa en el cuadro 1.

Cuadro 1. Ventajas y desventajas para tipos de mezcladores

Equipo	Ventajas	Desventajas
Mezclador impeler de cuchillas planas	Mezcla fluidos de alta viscosidad, tiene una práctica limpieza, geometría simple, además de estar cubierto por material aislante para reducir pérdidas de calor ¹³⁸ .	Capacidad limitada de inserción de ingredientes
Mezclador de flujo o corriente	Los materiales ingresan por medio de una bomba y la mezcla se ocasiona por cruce de sus flujos corrientes.	Posee susceptibilidad a la contaminación, y un alto consumo de energía.
Mezclador de tambor rotatorio	Mezcla productos los cuales tienen una baja densidad aparente, sólo pueden ser procesados productos que no agrupan ni se pegan.	Requiere mayor período de mezclado, contenido limitado de inclusión de sustancias y mayores exigencias de limpieza ¹³⁹ .

Fuente: elaboración propia

Una vez establecida la comparación entre estos 3 tipos de mezcladores y además de tomar como referencia un escalamiento del proceso de producción de un insecticida biológico¹⁴⁰, se selecciona el mezclador impeler de cuchillas planas porque sus características lo hacen apropiado para el proceso en donde se posee una viscosidad relativamente alta teniendo en cuenta las materias primas usadas,

¹³⁸ WALAS, S. Mixing and Agitation. En: Chemical Process Equipment: Selection and Design. USA: Butterworth, Heinemann, 1990.

¹³⁹ CHICO PROAÑO, Op.cit., p 55.

¹⁴⁰ LLANO ARANGO, Op.cit., p. 24.

además que tiene una fácil limpieza teniendo en cuenta que la mezcla tiende a adherirse a las cuchillas del mezclador.

4.6.2 Biorreactor. Es adecuado mencionar que este equipo es un sistema en el cual un organismo es puesto y cultivado con el fin de propagar su población, o para manipular compuestos metabólicos derivados de su ciclo de crecimiento¹⁴¹. Para que un biorreactor cumpla ciertos parámetros de alto rendimiento, productividad y reproductibilidad, es necesario nombrar ciertas funciones las cuales son consideradas por Nielsen (2002), y se exponen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Funciones básicas de un biorreactor

Funciones del biorreactor	Comentario
Contención	Conservar la esterilidad
Introducción de reactivos gaseosos	Comúnmente se introduce oxígeno
Introducción de reactivos líquidos	Comúnmente la fuente de carbono es una disolución de azúcares
Remoción de productos gaseosos	El dióxido de carbono es el principal producto de desecho
Control del ambiente	La temperatura y el pH por lo usual son vigilados
Suspensión	Las células y las partículas conviene mantenerse en suspensión
Dispersión	Mezclado de sistemas de dos fases

Fuente: Nielsen, J.; et al. Bioreaction Engineering Principles 2nd Ed, Plenum Publishers. 2002. [En línea]. Disponible en: <http://www.zuj.edu.jo/download/bioreaction-engineering-principles-2nd-ed-j-nielsen-et-al-kluwer-2003-ww-pdf/>

El biorreactor para fermentación en medio sólido debe ser tal que asegure homogeneidad entre los elementos del sistema y entornos adecuados para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado. Para la elección de este equipo se estudian 3 biorreactores exclusivos para medio sólido, en el cuadro 3 se observan las ventajas y desventajas para cada uno.

¹⁴¹ NIELSEN, Jens, et al. Bioreaction Engineering Principles. 2da Edición. USA: Plenum Publishers, 2002.

Cuadro 3. Ventajas y desventajas para tipos de biorreactores para fermentación en medio sólido

Equipo	Ventajas	Desventajas
Biorreactor Columna-Charola	Posee alta transferencia de oxígeno y aireación, además de mantener mayor transferencia de nutrientes.	No tienen una transferencia homogénea de calor.
Lecho fluidizado	Operan de forma continua, tienen una buena transferencia de oxígeno y humedad además de generar una menor aglomeración del sustrato.	Tiempo de arranque y estabilización prolongados.
Biorreactor Biocon	Este biorreactor está automatizado en el control de variables para el crecimiento microbiano, tiene altos niveles de asepsia y es un equipo compacto.	Tiene dificultad para la toma de muestras.

Fuente: Ruiz Leza, H.A; et al. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *bio-reactors desing for solid state fermentation. Revista mexicana de ingeniería química.* 2007. [En línea]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/620/62060105.pdf>

Para la fermentación en medio sólido se plantea un biorreactor de lecho fluidizado considerando que opera en forma continua lo que aumentaría un rendimiento en la producción del bioinsecticida, este equipo utiliza un sistema ya sea de esponjas, polímeros sintéticos o canastas con perforaciones que permiten una eficiente inmovilización de las células en el soporte con el medio de cultivo¹⁴².

4.6.3 Peletizadora. Para culminar el proceso, se requiere de un equipo que transforme la biomasa a través de diferentes mecanismos físicos hasta obtener el producto que se espera en este caso el bioinsecticida en forma granulada. Es por ello, que se realiza una búsqueda bibliográfica de los tipos de peletizadoras que existen en el mercado y una analogía entre ellas con el propósito de seleccionar la adecuada para este proceso.

¹⁴² OGBONNA, James Chukwuma, et al. Scale up of fuel ethanol production from gar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. *Bioresource Technology* [En línea], 2001. [Citado en 18 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11315804>>

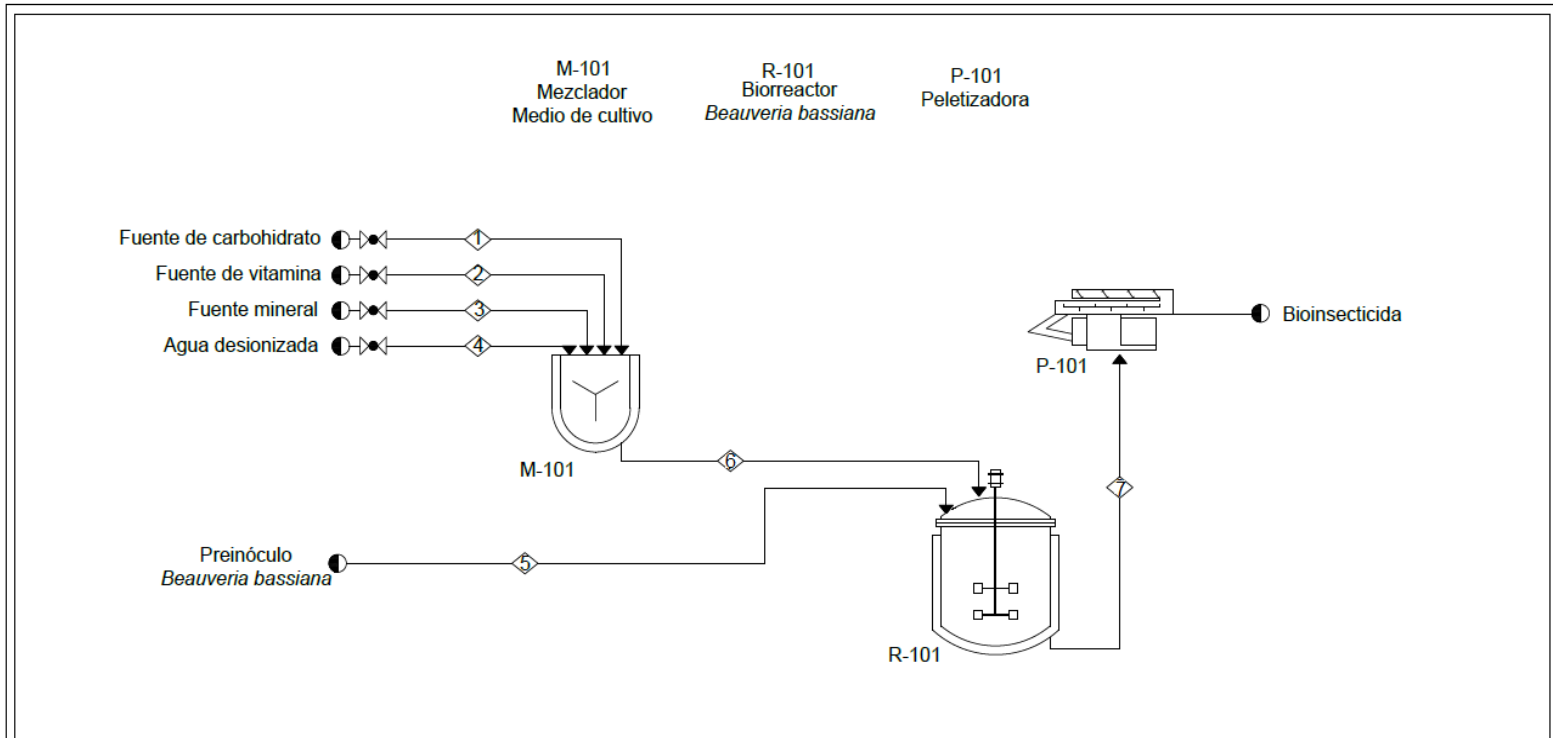
Luego de indagar en la bibliografía se identifica que generalmente en todos los procesos se implementa dos tipos de peletizadoras: tipo dado y tipo rodillo, cada una con un rango amplio de elección que depende de las características que el comprador necesite; ambas son favorables para una producción duradera en pellet, pero en términos de costos, el desgaste de los accesorios de la peletizadora tipo rodillo intervienen en la elección del equipo.


Es por ello que se plantea el uso de la peletizadora tipo dado, por ser un equipo que opera con materias primas similares a las de este proyecto¹⁴³, además de ser una maquinaria fácil de manipular puesto que desde el comienzo se elige el diámetro del orificio y no hay necesidad de cambiar en cada producción los dados, finalmente su mantenimiento, limpieza y lubricación son sencillos.

4.7 DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCESOS (PFD)

A continuación, se observa el diagrama de flujo del proceso para la producción del biopesticida a escala piloto.

¹⁴³ CARREÑO MALLA, Jairo Santiago. Diseño y construcción de una máquina peletizadora de alimentos balanceados para ganado vacuno. Trabajo de grado Ingeniería Electromecánica. Loja, Ecuador: Universidad Nacional de Loja, 2015. 21-26 p.



 Fundación Universidad de América	ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE UN PELETIZADO CON UN HONGO ENTOMOPATÓGENO		REVISIONS			ELABORÓ: Karen Daniela Duque Castiblanco Jenifer Nataly Pachón Castillo
			NO	DATE	DESCRIPTION	
DATE ORIGINAL 10/05/18		SCALE				
LATEST REVISION		JOB NO. 1				
			CHECKED			

4.7.1 Tablas de información del proceso. La información recopilada en las tablas 13 y 14 son como se menciona anteriormente datos obtenidos a partir del escalado de un proceso de elaboración de bioinsecticida por Llano Arango (2007), además de los balances de masa realizados en cada etapa del proceso evidenciados en la sección 4.7.2 y las condiciones óptimas requeridas por los equipos para favorecer cada fase del proceso las cuales se nombran en la sección 4.3.

Tabla 13. Tabla resumen de corrientes PFD

Corriente	1	2	3	4
Descripción	Fuente de carbohidrato	Fuente de vitamina	Fuente mineral	Agua desionizada
Tipo de corriente	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua
Temperatura (°C)	22	22	22	22
Presión (Bar)	0.85	0.85	0.85	0.85
Concentración (kg)	500	0.625	25	
Volumen de operación (l/batch)				3600

Fuente: elaboración propia

Tabla 14. Tabla resumen de corrientes PFD

Corriente	5	6	7	8
Descripción	Preinóculo <i>Beauveria bassiana</i>	Medio de cultivo	Medio de cultivo	Biomasa
Tipo de corriente	Discontinua	Discontinua	Discontinua	Discontinua
Temperatura (°C)	30	30	30	37
Presión (Bar)	0.85	1.35	1.35	0.87
Concentración (kg/l)	312.5	0.146	0.3115	0.3115
Volumen de operación (l/batch)		2000	1940	

Fuente: elaboración propia

4.7.2 Balance de masa. Teniendo en cuenta que en el escalado se establece una proporción de 500kg para el carbohidrato, la relación entre este y la materia prima trabajada en el laboratorio es de 12500, por lo tanto, con este criterio también se realiza la proporción para fuente de minerales, vitaminas y el preinóculo de *Beauveria* en el proceso. Se desarrolla el balance de masa, a través de la ecuación general 5, y de acuerdo a las composiciones de cada una de las corrientes que se encuentran en el PFD.

Ecuación 5. Balance de masa

$$\text{Entra} + (\text{Genera} - \text{Consume}) = \text{Sale} + \text{Acumula}$$

El balance correspondiente al mezclador, se lleva a cabo por medio de las corrientes 1, 2, 3 y 4 que entran a este equipo y se realiza de la siguiente manera (ver ecuación 6).

Ecuación 6. Balance de masa en el mezclador

$$\text{Arroz (250kg)} + \text{Maíz (250kg)} + \text{Caolín (25kg)} + \text{Complejo B (0.625kg)} = 525.625\text{kg}$$

El resultado obtenido en la ecuación 6, se refiere a la cantidad másica que ingresa al mezclador. Luego de conocer este dato, se procede a calcular la concentración de este equipo (ver ecuación 7) y los porcentajes másicos de cada uno de los componentes. Lo anterior se puede evidenciar en la tabla 15.

Ecuación 7. Concentración en el mezclador

$$\text{Concentración mezclador} = \frac{525.625 \text{ kg}}{3600 \text{ L}} = 0.146 \text{ kg/L}$$

Tabla 15. Balance de masa mezclador

Equipo Mezclador	
Concentración (kg/L)	0,146
Porcentajes másicos	
Arroz	47,5
Maíz	47,5
Caolín	4,75
Complejo B	0,25

Fuente: elaboración propia

Se hace el cálculo de los kilogramos de soluto para la corriente 6, la cual entra al biorreactor junto con 2000L provenientes del equipo M101, como se evidencia en la ecuación 8.

Ecuación 8. Kg de soluto en corriente 6

$$\text{kg de soluto corriente 6} = 0,146 \frac{\text{kg}}{\text{l}} * 2000 \text{ l} = 292 \text{ kg}$$

Tabla 16. Composición másica corriente 6

Corriente 6	
Composición (kg)	
Arroz	138,7
Maíz	138,7
Caolín	13,87
Complejo B	0,73

Fuente: elaboración propia

En el biorreactor R-101, se desarrolla el balance de masa con las corrientes 5 y 6 que ingresan a este y 7 que sale. Cabe mencionar que la corriente 5 entra únicamente con 312,5 kg siendo este el preinóculo de *Beauveria*.

Considerando que el biorreactor se encarga de la fermentación sólida se espera que el hongo esporule y se pierda concentración del medio de cultivo asumiendo pérdidas del 3%¹⁴⁵ como se evidencia en la ecuación 9.

Ecuación 9. Ecuación general corriente 7

$$\text{Corriente 7} = (\text{Corriente 6}) * 0.97$$

$$\text{Corriente 7 (arroz)} = (138,7)kg * 0.97 = 134,539 kg$$

$$\text{Corriente 7 (maíz)} = (138,7)kg * 0.97 = 134,539 kg$$

$$\text{Corriente 7 (caolín)} = (13,87)kg * 0.97 = 13,4539 kg$$

$$\text{Corriente 7 (complejo B)} = (0,73)kg * 0.97 = 0,7081 kg$$

¹⁴⁵ PUERTA MARÍN, Op.cit., p. 26.

Tabla 17. Composición equipo R-101

Equipo		
Biorreactor R-101		
Corrientes	6	7
Concentración (kg/L)	0,146	0,3115
Volumen (L)	2000	1940
Composición (kg)		
Micelio		321,26
Arroz	138,7	134,539
Maíz	138,7	134,539
Caolín	13,87	13,4539
Complejo B	0,73	0,7081

Fuente: elaboración propia

Para conocer cuántos kilogramos se pierden por el consumo del hongo entomopatógeno en cada materia prima se realizan los cálculos mostrados en la ecuación 10. Además, para identificar cuanto micelio hay en la corriente 7 se suma el valor correspondiente de la corriente 5 (312.5 kg) con el consumo total como se muestra en la ecuación 12.

Ecuación 10. Consumo en cada materia prima

$$\text{Consumo de sustrato (arroz)} = (138,7) \text{ kg} - 134,539 \text{ kg} = 4.161 \text{ kg}$$

$$\text{Consumo de sustrato (maíz)} = (138,7) \text{ kg} - 134,539 \text{ kg} = 4.161 \text{ kg}$$

$$\text{Consumo de sustrato (caolín)} = (13,87) \text{ kg} - 13,4539 \text{ kg} = 0.4161 \text{ kg}$$

$$\text{Consumo de sustrato (complejo B)} = (0,73) \text{ kg} - 0,7081 \text{ kg} = 0.0219 \text{ kg}$$

Ecuación 11. Consumo total

$$\text{Consumo total} = (4.161 + 4.161 + 0.4161 + 0.0219) \text{ kg} = 8.76 \text{ kg}$$

Ecuación 12. Cantidad de micelio

$$\text{Cantidad de micelio} = (312.5 + 8.76) \text{ kg} = 321.26 \text{ kg}$$

Finalmente, con la peletizadora P-101 se espera que no existan pérdidas significativas por tanto la corriente 7 es igual a la corriente 8. Los resultados se evidencian en la tabla 18.

Tabla 18. Composición másica corriente 8

Corriente 8	
Concentración (kg/L)	0.3115
Volumen(L)	1940
Composición (kg)	
Micelio	321,26
Arroz	134,539
Maíz	134,539
Caolín	13,4539
Complejo B	0,7081

Fuente: elaboración propia

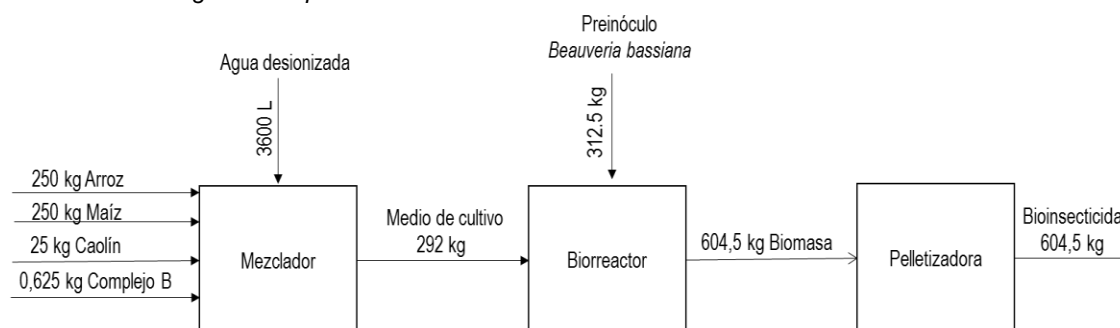
A continuación, se muestra información resumida de las corrientes del proceso correspondientes al balance de masa y el diagrama detallado del proceso.

Tabla 19. Información de las corrientes según balance de masa

Componente (Kg)	Corrientes							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Micelio	-	-	-	-	312,5	-	321,26	321,26
Arroz	250	-	-	-	-	138,7	134,539	134,539
Maíz	-	250	-	-	-	138,7	134,539	134,539
Caolín	-	-	25	-	-	13,87	13,4539	13,4539
Complejo B	-	-	-	0,625	-	0,73	0,7081	0,7081

Fuente: elaboración propia

Ilustración 16. Diagrama del proceso detallado



Fuente: Elaboración propia

4.8 DESCRIPCIÓN DE LOS EQUIPOS SELECCIONADOS

En seguida se muestra una tabla resumen de los equipos propuestos para las etapas relevantes del proceso.

Cuadro 4. Selección de equipos para planta piloto

Equipo	Etapas del proceso	Características	Funcionamiento	Condiciones de operación
Mezclador impeler de cuchillas planas	Preparación del medio de cultivo	*Mezcla fluidos de alta viscosidad *Geometría simple *Fácil limpieza	La mezcla se somete a una deformación de corte para asegurar la distribución uniforme de los ingredientes.	*Tipo de turbina: Cuchilla plana *Potencia (W) : 172,8279 *Orientación: Vertical *MOC: Acero inoxidable 316
Biorreactor de lecho fluidizado	Esterilización, inoculación del medio de cultivo y fermentación	*Opera en modo continuo *Alta concentración de biomasa y área de transferencia de masa, lo que genera una alta conversión.	Provee agitación y aireación por flujo forzado de aire, provee un incremento en la transferencia de oxígeno a la cama del sustrato.	*Temperatura(°C): 25-30 *Acero inoxidable 316
Equipo peletizador	Formación del pellet	* Es un equipo empleado para producción en pellet de harinas. *Alta durabilidad del pellet	La biomasa es sometida a presión para pasar a través de una matriz, para obtener de esta forma el pellet.	*Capacidad: 40-80 (kg/lbs)/hr *Motor: Diésel *Potencia(W): 5965.6

Fuente: elaboración propia

5. EVALUACIÓN DE COSTOS DE PROCESO A ESCALA PILOTO

Para este capítulo se evalúan los costos de los equipos necesarios en el proceso a escala piloto, se realiza una estimación de los costos de producción, y posteriormente el estudio financiero el cual permite establecer si el desarrollo del proceso es económicamente rentable, para esto, se construye el flujo de efectivo y se determinan distintos indicadores de evaluación financiera que permiten concluir sobre la viabilidad económica del proyecto.

En cada una de las secciones que se muestran a continuación se tiene en cuenta un tiempo anual por un periodo de 5 años, además no se considera la inflación correspondiente a cada año.

5.1 INVERSIONES

La inversión del proyecto se identifica en los gastos que se deben llevar a cabo en diferentes áreas del proceso, y se evalúa por su importancia en la obtención de las ganancias a largo plazo.

5.1.1 Cotización de equipos. Para establecer el costo de los equipos se consultan 3 fuentes diferentes (anexo B), las cuales dependiendo las características del equipo proporcionan un precio.

Tabla 20. Costos de mezcladores

Equipo	Costo USD	Costo COP	Potencia (kw)
M-101	\$ 3.990	\$ 11.477.864	6.800
M-101	\$ 4.000	\$ 11.503.316	7.500
M-101	\$ 4.700	\$ 13.518.002	8.000

Fuente: elaboración propia

Tabla 21. Costos de Biorreactores de lecho fluidizado

Equipo	Costo USD	Costo COP	Potencia (kw)
R-102	\$ 15.000	\$ 43.140.002	24.1
R-102	\$ 10.469	\$ 30.114.000	18.2
R-102	\$ 20.000	\$ 57.526.113	25.5

Fuente: elaboración propia

Tabla 22. Costos de peletizadoras

Equipo	Costo USD	Costo COP	Potencia (kw)
P-101	\$ 5.500	\$ 15.592.570	18.5
P-101	\$ 7.055	\$ 20.001.015	20.2
P-101	\$ 8.000	\$ 22.680.102	20.5

Fuente: elaboración propia

Teniendo en cuenta las cotizaciones, y que los equipos cumplen la misma función dentro del proceso, el criterio de selección es de acuerdo al equipo que se considera tiene un menor precio; en la tabla 22 se muestra el costo total de los equipos seleccionados.

Tabla 23. Costos de equipos seleccionados

Costos de equipos	
Mezclador	11.477.864
Biorreactor	30.114.000
Peletizadora	15.592.570
Total	\$57.184.434,00

Fuente: elaboración propia

5.2 COSTOS DE OPERACIÓN

Los datos obtenidos en este apartado se consideran teniendo en cuenta que el proceso es por lotes, por lo tanto, se requieren dos turnos de trabajo de 8 horas cada uno, y además que para cada operación productiva hay un operario con el salario mínimo legal vigente para el año 2018 en Colombia.

5.2.1 Mano de obra directa. Es un factor determinante pues representa el trabajo realizado por parte de los operarios en el proceso. Básicamente, se tiene en consideración el salario mínimo mensual del año 2018 en Colombia, que demanda cada persona por la labor que desempeña dentro de la producción del bioinsecticida. El costo total con relación a la mano de obra de los operarios se evidencia en la tabla 23.

Tabla 24. Datos de mano de obra directa

Mano de obra directa	Numero de personas	Factor prestacional	Salario mínimo (\$/mes)	Costo(\$/mes)
Operario	1	1,5	\$ 781.242	\$ 1.171.863
Total				\$ 1.171.863

Fuente: elaboración propia

5.2.2 Costos indirectos. Para el cálculo de los costos indirectos, es necesario tener en cuenta que el proceso es destinado para planta piloto por ello requiere directamente de 2 operarios y solamente un empleado que representa los servicios varios.

Tabla 25. Datos de costos indirectos

Gastos administrativos				
Salarios	Número empleados	Salario	Factor prestacional	Costo(\$/mes)
Operarios	1	\$ 781.242	1,5	\$ 1.171.863
Servicios varios	1	\$ 781.242	1,5	\$ 1.171.863
Total mensual				\$ 1.025.367
Total anual				\$ 12.304.404

Fuente: elaboración propia

5.2.3 Costos de servicios. Esta sección se incluye para hacer mención de los costos que influyen al realizar todas las operaciones básicas del proceso, en términos del consumo de: acueducto, energía y agua desionizada. Los valores mostrados en la tabla 25 hacen referencia a páginas web del estado, en donde se encuentra la información requerida para el año 2018.

Tabla 26. Datos de costos de servicios

Servicios	Consumo estimado (mes)	Costo	Costo total (\$/mes)
Energía	240,5295 kw-h	479,338 ¹⁴⁶ \$/kWh	115294
Acueducto	226,686 m3	3,373 ¹⁴⁷ \$/m3	764,61
Agua desionizada	102,3 kg	2,837 ¹⁴⁸ \$/kg	290,22
Total mensual			\$ 116.349
Total Anual			\$1.396.197

Fuente: elaboración propia

¹⁴⁶ Tarifas de energía eléctrica (\$/KW/h) reguladas por la Comisión de Regulación de Energía y Gas (CREG) mayo de 2018 [En línea]. [Citado en 18 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<https://www.codensa.com.co/document/Tarifario-mayo-2018.pdf>>

¹⁴⁷ Estructura tarifaria para los suscriptores atendidos en Bogotá D. C. por la empresa de acueducto. [En línea]. [Citado en 18 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <https://www.acueducto.com.co.>>

¹⁴⁸ PUERTA MARÍN, Op.cit.

5.2.3 Costos de materia prima. Con la finalidad de realizar el respectivo análisis financiero, es necesario calcular los costos de cada materia prima que requiere este proceso a escala piloto. Para ello, primero debe estar especificado la cantidad en kg por cada sustrato y la capacidad de producción para realizar una pertinente cotización.

En la siguiente tabla se exponen la estimación de precios en Corabastos, también se encuentra en la segunda columna el precio respectivo a la cantidad de cada insumo utilizado en el laboratorio y en la tercera columna se ubica el costo referente al proceso escalado.

Tabla 27. Datos de costos de materia prima

Materia prima	Costo \$/Kg	Costo \$/Kg anual
Maíz	\$600.000	\$7.200.000
Arroz	\$600.000	\$7.200.000
Caolín	\$425.000	\$5.100.000
Complejo B	\$500.000	\$6.000.000
Costo total anual		\$25.500.000

Fuente: elaboración propia

5.3 DEPRECIACIÓN DE LOS EQUIPOS

En la mayoría de procesos, la depreciación se refiere al uso de equipos y el manejo de diferentes agentes que degeneran a través del tiempo la vida útil de estos. Por otro lado, existen diferentes métodos de depreciación, entre los cuales se encuentra el lineal, la depreciación decreciente y el de unidades de producción; en este proyecto se decide trabajar con el método lineal puesto que su procedimiento es sencillo y se ajusta a lo que se quiere determinar¹⁴⁹. Finalmente, se considera esta sección en este capítulo para tener una referencia de la depreciación mensual y anual de cada equipo, además de contribuir al desarrollo del flujo de efectivo.

Ecuación 13. Depreciación anual y mensual

$$\text{Depreciación Anual} = \frac{\text{Costo del equipo}}{10}$$

¹⁴⁹ NOGUERA TORRES, Natalia. Implementación, valuación de la propiedad, planta y equipo mediante Niff plenas (NIC 16) y sección 17 de Niif para pymes. Trabajo de grado Contaduría. Bogotá D.C.: Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ciencias Económicas, 2014. 14-20 p.

$$\text{Depreciación Mensual} = \frac{\text{Depreciación Anual}}{12}$$

Tabla 28. Datos de la depreciación mensual y anual de los equipos

Equipo	Costo de equipo	Depreciación Mensual	Depreciación Anual
Mezclador	\$11.477.864	\$95.649	\$1.147.786
Biorreactor (medio de cultivo)	\$30.114.000	\$250.950	\$3.011.400
Peletizadora	\$15.592.570	\$129.938	\$1.559.257
TOTAL DEPRECIACIÓN		\$476.537	\$5.718.443

Fuente: elaboración propia

5.4 CAPITAL TRABAJO

Es un factor determinante al momento de elaborar un estudio financiero, si se tiene presente que es un margen de seguridad que financia lo que necesita el proyecto para llevar a cabo sus actividades¹⁵⁰. Para realizar la estimación del capital trabajo se toma como referencia el trabajo de grado elaborado por (Puerta et. al., 2006), en el cual utilizan el método del período de desfase como la cantidad de recursos necesarios para financiar los costos de operación¹⁵¹. El cálculo de este índice se desarrolla por medio de la ecuación 17, cabe mencionar que se tiene en cuenta un tiempo de producción alrededor de 330 días/año.

Ecuación 14. Capital trabajo

$$CT = \frac{Ca}{330} * Nd$$

Donde:

Ca: Costo anual de operación

Nd: Número de días de desfase

¹⁵⁰ RIZZO, María Marcela. El capital trabajo neto y el valor en las empresas. La importancia de la recomposición del capital de trabajo neto en las empresas que atraviesan o han atravesado crisis financieras. Revista EAN [En línea], 2002. [Citado en 26 de junio de 2018]. Disponible en Internet: <<https://journal.universidadean.edu.co>>

¹⁵¹ PUERTA MARÍN, Op.cit.

Tabla 29. Datos de capital trabajo

Nd	40
Ca	\$ 41.000.916
CT	\$4.969.808

Fuente: elaboración propia

5.5 VALOR DE SALVAMENTO

El valor del salvamento es un requerimiento que debe tener cualquier flujo de caja, se denomina como un valor residual de los activos permanentes y se determina con el propósito de demostrar al inversionista que el proyecto tendrá un valor similar a lo que genere en un futuro. Expresado lo anterior, se evalúa en un período de 5 años los activos que no se hayan depreciado en su totalidad, por lo tanto es a aquellos a los que se les calcula el valor de salvamento de la siguiente manera (Ver tabla 29).

Tabla 30. Datos del valor de salvamento

Activo	Valor (\$)	Valor de salvamento
Maquinaria inicial	\$57.184.434	\$54.801.749

Fuente: elaboración propia

5.6 INGRESOS

La producción mensual está estimada en 303 unidades, las cuales se componen de 2kg por bolsa; se establece un precio del producto de \$93.000 con referencia a un insecticida biológico a base de *Beauveria* y *Metarhizium* (anexo C). Con base en las unidades por mes y el precio de venta, se evalúan los ingresos anuales lo cuales serán \$338.148.000 como se muestra a continuación.

Ecuación 15. Ingresos mensuales

$$\frac{303 \text{ unidades}}{\text{mes}} * \$93000 = \frac{\$28.179.000 \text{ unidades}}{\text{mes}}$$

Ecuación 16. Ingresos anuales

$$\frac{\$28.179.000 \text{ unidades}}{\text{mes}} * 12 \text{ meses} = \$338.148.000$$

5.7 TASA DE OPORTUNIDAD PARA EL PROYECTO

El porcentaje equivalente a la tasa de oportunidad del proyecto, consiste en obtener un coste de capital que represente la rentabilidad de los inversionistas en caso que no exista alguna deuda¹⁵⁴, por otra parte, tiene gran relevancia dentro de un estudio financiero puesto que asegura la calidad de decisiones a futuro¹⁵⁵. El criterio que se tiene para elegir este valor es según el reporte de Euroamérica, el cual sugiere que la tasa de oportunidad para proyectos que emprenden innovadoramente en el mercado es del 7.52%.

5.8 ESTIMADO DEL FLUJO EFECTIVO

Para la inversión se tiene en cuenta el valor total de los equipos necesarios para la producción en planta piloto del bioinsecticida y se realiza una simulación del crédito en Bancolombia por un valor de \$57.184.434 como se observa en la imagen 17.

Ilustración 17. Simulación del crédito de Bancolombia Resultado de la Simulación

Los valores resultantes de esta simulación, son informativos, aproximados y podrán variar de acuerdo a las políticas de estudio y aprobación del crédito por parte de Bancolombia.

Tasa mes vencida utilizada en la simulación	1.35%
Cuota mensual	\$2,044,839.49
Seguro de vida asociado a la deuda por cuota	\$69,600.00
Cuota mensual más seguro(s)	\$2,114,439.49

Fuente: BANCOLOMBIA, [En línea]. [Citado en 25 de junio de 2018]. Disponible en Internet: < <https://www.grupobancolombia.com> >

¹⁵⁴ OLAYA, Daniel. La tasa interna de oportunidad-TIO- y la creación de empresas. Revista del instituto internacional de costos [En línea], 2008. [Citado en 26 de junio de 2018]. Disponible en Internet: < <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3362371.pdf> >

¹⁵⁵ GONZÁLEZ DÍAZ, Belén. El coste de oportunidad como herramienta empresarial. Trabajo de grado. Oviedo, España: Universidad de Oviedo, 2000. 3-6 p.

5.8.1 Tabla flujo de efectivo. Para la elaboración del flujo de efectivo los precios son constantes debido a que no se tendrá en cuenta el índice de inflación. La tabla de amortización del crédito se evidencia en el anexo D.

Tabla 31. Flujo de efectivo

	AÑO					
	0	1	2	3	4	5
Ingresos		\$338.148.000	\$338.148.000	\$338.148.000	\$338.148.000	\$338.148.000
Costos de producción		\$41.000.916	\$41.000.916	\$41.000.916	\$41.000.916	\$41.000.916
Gastos administrativos		\$12.304.404	\$12.304.404	\$12.304.404	\$12.304.404	\$12.304.404
Gastos financieros		\$8.219.538	\$5.370.541	\$2.024.148	\$0	\$0
Depreciación activos fijos		\$5.718.443	\$5.718.443	\$5.718.443	\$5.718.443	\$5.718.443
Amortizaciones		\$16.318.530	\$19.167.527	\$22.513.920	\$0	\$0
Utilidad antes de impuestos		\$254.586.168	\$254.586.168	\$254.586.168	\$279.124.236	\$279.124.236
Impuestos (33%)		\$84.013.436	\$84.013.436	\$84.013.436	\$92.110.998	\$92.110.998
Utilidad después de impuestos		\$170.572.733	\$170.572.733	\$170.572.733	\$187.013.238	\$187.013.238
Depreciaciones		\$5.718.443	\$5.718.443	\$5.718.443	\$5.718.443	\$5.718.443
Amortización crédito		\$16.318.530	\$19.167.527	\$22.513.920	\$0	\$0
Inversiones						
Activos fijos	\$57.184.434					
Capital trabajo	\$4.969.808					
Recuperación de capital trabajo						\$4.969.808
Valor de salvamento						\$54.801.749
FLUJO DE EFECTIVO DEL PROYECTO	-\$57.184.434	\$159.972.646	\$157.123.649	\$153.777.256	\$192.731.682	\$252.503.239

Fuente: elaboración propia

5.9 INDICADORES DE RENTABILIDAD

Una vez se ha realizado el correspondiente flujo de caja se procede a elaborar un diagnóstico financiero, el cual se lleva a cabo mediante los resultados obtenidos en dicho balance, que se requieren para calcular los índices de rentabilidad, permitiendo evaluar la factibilidad del proyecto. Entre ellos se encuentra el valor presente neto y la tasa de interna de retorno.

5.9.1 Valor presente neto (VPN) y tasa interna de retorno (TIR). Este indicador de rentabilidad (valor presente neto) se obtiene estableciendo una tasa de oportunidad del 7.52%, por otra parte, la TIR es un criterio de evaluación asociado con la tasa única de rendimiento, adicionalmente se utiliza para indicar la sensibilidad del valor presente neto, puesto que representa la máxima tasa de interés que el inversionista desembolsa sin pérdida alguna de dinero¹⁵⁶.

¹⁵⁶ MARTINEZ STONE, Claudia Monserrat. Evaluación financiera. [En línea]. [Citado en 14 de junio de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.economia.unam.mx/secss/docs/tesisfe/MartinezSCM/indice.pdf>>

Ecuación 17. Valor presente neto

$$VPN = -Inversión + \sum_{n=1}^n \frac{F_n}{(1+i)^n}$$

Donde:

F_n : Flujo de efectivo del proyecto

n : Número de periodos

i : Tasa de interés

Ecuación 18. Tasa interna de retorno

$$VPN = -Inversión + \sum_{n=1}^n \frac{F_N}{(1+TIR)^n} = 0$$

Donde:

F_N : Flujo de efectivo del proyecto

n : Número de periodos

TIR: Tasa de oportunidad para el inversionista

Tabla 32. Indicadores de rentabilidad

VPN	\$85.422.495
TIR	279%

Fuente: elaboración propia

5.9.2 Relación Beneficio/Costo y periodo de recuperación (PR). El periodo de recuperación tiene como fin identificar el momento en años, en el que la inversión realizada en el proyecto ser, basta con aplicar la fórmula 19; por otro lado, la relación beneficio/costo sirve para determinar los beneficios por cada peso invertido en el proyecto.

Ecuación 19. Periodo de recuperación

$$PR = a + \left(\frac{b-c}{d}\right)$$

Donde:

a : Año anterior al que se satisface la inversión

b : Inversión inicial

c : Suma de flujos de efectivo anteriores

d : Flujo neto de efectivo del año en que se satisface la inversión

Tabla 33. Indicadores de rentabilidad

<u>B/C</u>	<u>3.62</u>
<u>PR (años)</u>	<u>2,69</u>
Fuente: elaboración propia	

Según los indicadores de rentabilidad, se concluye que la tasa de rentabilidad (TIR) es alta indicando que la inversión es lucrativa con un periodo de recuperación alrededor de 3 años; la relación beneficio/costo equivale a que los ingresos son mayores a los egresos tal como se observa en el flujo de efectivo; por otra parte, el VPN indica que existe una ganancia a la tasa de interés propuesta en el proyecto. Por lo tanto, después de realizar este análisis, el proyecto es económicamente viable, debido a lo expuesto anteriormente.

6.CONCLUSIONES

- Sobre la búsqueda de un mejor medio de cultivo a partir de un o unos carbohidratos, suplementos minerales y vitamínicos para el crecimiento del hongo *Beauveria bassiana*, se plantearon nuevas materias primas a partir de una investigación bibliográfica acerca de la composición nutricional que le podían brindar al medio de cultivo para la preservación de la viabilidad en el tiempo y obtención de una mayor biomasa.
- Gracias al desarrollo experimental y a las pruebas microbiológicas realizadas, se obtuvo que la formulación para el hongo *Beauveria bassiana*, cuyo medio de cultivo está compuesto de 20g arroz en 20g base maíz, complejo B 0.05 g y caolín 2g, estimuló el crecimiento del hongo por sus características nutricionales a una temperatura de 26°C y 82% de humedad y logró las mejores características en términos de permanencia y viabilidad durante el tiempo dando resultados de $2,38 \times 10^{11}$ esporas/g y 88,28% de germinación. Estos datos fueron comparados con otras investigaciones efectivas y exitosas en arroz usado como sustrato y se logró identificar una similitud en los niveles de concentración y germinación, lo que permitió determinar que podría llevarse a campo y valorar los umbrales de regulación en insectos barrenadores de semillas.
- Para el escalamiento a piloto del proceso, se tuvieron en cuenta únicamente las etapas relevantes del procedimiento en laboratorio y se optó por escalar 526kg del medio de cultivo en *Beauveria bassiana*; para establecer los equipos que podrían ser usados se evaluaron ventajas y desventajas de distintos tipos de maquinaria y se eligieron según las características que deben cumplir en las etapas y las condiciones de operación. Se contempló que, para la etapa inicial del proceso la cual es la preparación del medio de cultivo, el equipo necesario debe ser un mezclador impeler de cuchillas planas, para la fermentación en medio sólido un biorreactor de lecho fluidizado y para la formación del pellet un equipo peletizador tipo dado; el escalado se propuso procurando mantener constante la biomasa puesto que esto permite un máximo crecimiento del hongo y estas relaciones se evidencian a través del diagrama de bloque y de flujo, siendo una herramienta útil en ingeniería de fácil comprensión.
- Al realizar el flujo de efectivo por medio de un análisis financiero del proceso a escala piloto, se tuvieron en cuenta diferentes factores que intervenían en la producción del bioinsecticida. Entre ellos, se determinó que los ingresos son elementales puesto que contrarrestan las pérdidas efectuadas por los costos de producción. Por otra parte, los resultados de los índices financieros arrojaron valores de \$85.422.495, 279%, 3 años y 3.62 correspondientes al VPN, TIR, PR Y B/C indicando que a lo largo del período de tiempo proyectado es viable realizar el proceso a mayor escala.

7.RECOMENDACIONES

- Evaluar la virulencia de las formulaciones realizando una prueba en campo para corroborar la conservación de viabilidad y permanencia del hongo dentro de estas.
- Realizar estudios de formulación utilizando otras materias primas que reemplacen nutricionalmente las obtenidas en esta experimentación, y variando sus concentraciones evaluando el nivel de control.
- Continuar con el proceso de recolección de cepas de microorganismo patógenos por parte de los investigadores del Jardín Botánico de Bogotá.
- Comprobar el escalado propuesto para el proceso de producción del bioinsecticida
- Determinar el consumo de oxígeno de *Beauveria bassiana* dentro de los biorreactores sugeridos para la escala piloto.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR BRENES, Edgar, et al. Manual del cultivo de yuca *Manihot esculenta* Crantz. INTA [En línea], 2017. [Citado en 24 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10918.pdf>>

ADETAN, Dare, et al. Characterization of some properties of cassava root tubers. Journal of Food Engineering [En línea], 2003. [Citado en 24 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: < https://www.researchgate.net/publication/232389343_Characterisation_of_some_properties_of_cassava_root_tubers>

AGUIRRE OTÁLORA, Natalia del Pilar. Determinación del efecto de algunas fuentes de carbono y nitrógeno, del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea riley*. Trabajo de grado Microbiología Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, 2006. 45 p.

ALATORRE ROSAS, Raquel. Hongos Entomopatógenos. Sociedad Mexicana de Control Biológico. [En línea], 2007. [Citado en 2 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: < https://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx.revista/files/pdf/vol9num2/NatyDes_Vol-9-2-Art1.pdf>

ALEAN CARREÑO, Irina. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. Trabajo de grado Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas, 2003. 20-25 p.

ALONSO ZARAZAGA, Miguel Ángel. Orden Coleóptera. IDE@- SEA. [En línea], 2005. [Citado en 22 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: < http://sea-entomologia.org/IDE@/revista_55.pdf>

ALVARADO GAONA, Álvaro y OCHOA, Lyda. Tecnologías locales de producción de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en el municipio de Boyacá, departamento de Boyacá. Scielo [En línea], 2010. [Citado en 24 de julio de 2018]. Disponible en Internet: < http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262010000100014&script=sci_abstract&tlng=pt>

ALVARADO, Hanna. et al. Patogenicidad de cepas de *Metarhizium anisopliae* (L.) y *Beauveria bassiana* sobre *Rhynchophorus palmarum*. CID [En línea], 2013. [Citado en 15 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/10842>>

ÁLVAREZ MARTÍNEZ, Oscar. Aminoácidos, proteínas, enzimas, coenzimas y las vitaminas, La biosíntesis proteica. [En línea], 2016. [Citado en 26 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<http://publicacionesdidacticas.com/hemeroteca/articulo/073014/articulo-pdf>>

ASENJO, Juan. Bacterial, Yeast, and Fungal Cultures, Scale-Up. En: Biorreactor System Design. New York: MERCHUK, José, 1995.

BALLESTEROS TORRES, Juan Manuel. Factores nutricionales que afectan la actividad insecticida de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin contra *Periplaneta americana* L. y la respuesta inmune del insecto. Tesis de maestría Ciencias con Acentuación en Microbiología. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas, 2013. 33-40 p.

BARONA, Edgar. Importancia de la semilla de arroz. FEDEARROZ [En línea], 2010. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.fedearroz.com.co/revistanew/arroz489.pdf>>

BEDMAR, Francisco. ¿Qué son los plaguicidas? Informe especial sobre plaguicidas agrícolas. [En línea], 2011. [Citado en 12 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: <<http://www.cienciahoy.org.ar/ch/ln/hoy122/Plaguicidas%20-%20Bedmar.pdf>>

BUSTILLO, Alex Enrique, et al. Evaluaciones de campo con el hongo *Beauveria Bassiana* para el control de la broca del café *Hypothenemus Hampei* en Colombia. Cenipalma [En línea], 1991. [Citado en 14 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<https://www.researchgate.net>>

CALDERA HINOJOSA, Florentino. Diagnóstico y evaluación del impacto de insectos asociados al género *Quercus* L. en la sierra madre oriental, en Nuevo León, México. Tesis de maestría en Ciencias Forestales. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Forestales, 1997. 25-29 p.

CAÑEDO, Verónica y AMES, Teresa. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. [En línea], 2004. [Citado en 2 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>>

CÁRDENAS RAMIREZ, Ángela, et al. Eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* en el control de la broca del café. CENICAFÉ [En línea], 2007. [Citado en 14 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <[https://www.cenicafe.org/es/publications/arc058\(04\)293-303.pdf](https://www.cenicafe.org/es/publications/arc058(04)293-303.pdf)>

CARREÑO MALLA, Jairo Santiago. Diseño y construcción de una máquina peletizadora de alimentos balanceados para ganado vacuno. Trabajo de grado Ingeniería Electromecánica. Loja, Ecuador: Universidad Nacional de Loja, 2015. 21-26 p.

CASTILLO ZENO, Salvador. Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia spp.* Y *Prosapia spp.*) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala. Trabajo de grado Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 2006. 37 p.

CHACIN ZAMBRANO, Christian, et al. Evaluación del efecto de *Beauveria bassiana* en el control biológico de *Varroa destructor*, parásito de la abeja melífera (*Apis mellifera*) en la finca Felisa en el municipio de los Patios, Norte de Santander. Innovaciencia. Innovaciencia [En línea], 2013. [Citado en 3 de abril de 2018]. Disponible en Internet: <<http://revistas.udes.edu.co/site/index.php/innovaciencia/article/view/211>>

CHEGWIN, Carolina y NIETO, Ivonne. Influencia del medio de cultivo en la producción de metabolitos secundarios del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cultivado por fermentación en estado líquido empleando harinas de cereales como fuente de carbono. Revista mexicana de micología [En línea], 2013. [Citado 4 de enero de 2018]. Disponible en Internet: <<http://revistamexicanademicologia.org/wp-content/uploads/2013/06/RMM-Tr-256-version-paginada-1-9.pdf>>

CHICO PROAÑO, Fabián Mauricio. Premezclado de sólidos inertes para la producción de dinamita, mediante el diseño y construcción de un mezclador cónico vertical piloto. Trabajo de grado Ingeniería Química. Quito, Ecuador: Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, 2011. 33-37 p.

CHONG RODRÍGUEZ, Mabelle Julie. Utilización de cultivos líquidos para la obtención de blastoesporas y conidias de *Beauveria bassiana* (Bals.) *Vuillemin* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) resistentes a condiciones ambientales. Trabajo de grado Microbiología. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas, 2003. 12-34 p.

CRUZ MARTÍNEZ, Lina carolina. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Trabajo de grado Microbiología Industrial. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, 2007. 30-33 p.

DOSAL, Maria Antonia y VILLANUEVA, Marcos. Curvas de calibración en los métodos analíticos. Introducción a la metrología química [En línea], 2008. [Citado en 4 de abril de 2018]. Disponible en Internet: <

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf
>

EL TIEMPO. [En línea]. [Citado en 13 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.eltiempo.com/archivo/documento/MAM-444791>>

Estructura tarifaria para los suscriptores atendidos en Bogotá D. C. por la empresa de acueducto. [En línea]. [Citado el 18 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<https://www.acueducto.com.co.>>

EZZIYYANI, Mohammed, et al. Control biológico por microorganismos antagonistas. Horticultura. [En línea], 2006. [Citado en 6 de agosto de 2017]. Disponible en Internet: < http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rh191/08_15.pdf>

FAO/FIDA (Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola/ Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2000.

FERRER DUFOL, Ana. Intoxicación por plaguicidas. Scielo. [En línea], 2003. [Citado en 14 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200009>

FUNIBER [En línea], 2018. [Citado en 2 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<https://www.composicionnutricional.com/alimentos/HARINA-DE-MAIZ-1>>

GALLEGOS MORALES, Gabriel, et al. Evaluación de formulaciones de *Beauveria bassiana* (Vuill.) en el campo contra el picudo de la yema del manzano *Amphidees spp.* (Coleoptera: Curculionidae) en Arteaga, Coahuila, México. CATIE [En línea], 2005. [Citado en 1 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/6263>>

GARCÍA, Cipriano. et al. Manejo integrado de plagas en granos almacenados. En: Tecnologías de granos y semillas. 1ra Edición. México: MARTINES RUIZ, Rosa, et al., 2009. 211-232 p.

GARCÍA GUTIÉRREZ, Cipriano, et al. Uso de bioinsecticidas para el control de plagas de hortalizas en comunidades rurales. Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable [En línea], 2010. [Citado en 15 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://revistas.unam.mx/index.php/rxm/article/view/17881>>

GARRIDO ABATE, Nicolás. Manual básico del uso de autoclaves. [En línea], 2015. [Citado en 15 de junio de 2018]. Disponible en Internet: < <http://sb.uta.cl/libros/Apuntesdeusodeautoclave.pdf>>

GODOY, Juan, et al. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. Revista de la Facultad de Agronomía [En línea], 2007. [Citado en 16 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.scielo.org.ve/>>

GOETTEL, Mark y ROBERTS, Donald. Mass production, formulation, and field application of entomopathogenic fungi. Biological Control of Locusts and Grasshoppers: State of the Art. [En línea], 1992. [Citado en 17 de noviembre]. Disponible en Internet: < https://digitalcommons.usu.edu/biology_facpub/1343/>

GÓMEZ RAMÍREZ, Hilda, et al. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. SENASA [En línea], 2014. [Citado en 1 marzo de 2018]. Disponible en Internet: < <https://www.senasa.gob.pe> >

GONZÁLEZ DÍAZ, Belén. El coste de oportunidad como herramienta empresarial. Trabajo de grado. Oviedo, España: Universidad de Oviedo, 2000. 3-6 p.

GONZÁLEZ NÚÑEZ, Manuel, et al. Evaluación del caolín como herramienta de control de plagas en cultivos mediterráneos ecológicos. [En línea], 2011. [Citado en 26 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: < https://www.researchgate.net/publication/235435121_Evaluacion_del_caolin_como_herramienta_de_control_de_plagas_en_cultivos_mediterraneos_ecologicos>

GRANDE TOVAR, Carlos David y OROZCO COLONIA, Brigitte Sthepani. Producción y procesamiento del maíz en Colombia. Revista Científica Guillermo de Ockham [En línea], 2013. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.redalyc.org/html/1053/105327548008/>>

HALL, David, et al. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. Entomologia Experimentalis et Applicata [En línea], 2012. [Citado en 16 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/eea.12025>>

HERNÁNDEZ LOZANO, Rafael. Federación Nacional de Arroceros. FEDEARROZ [En línea], 2017. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.fedearroz.com.co>>

HOOVER, Gregory. Gorgojo de los invernaderos. College of agricultural Sciences. [En línea], 2000. [Citado en 22 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: < <https://ento.psu.edu/extension/factsheets/es/es-black-vine-weevil>>

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Referencias bibliográficas. Contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá D.C.: El instituto, 2008. 33p. c.

_____. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grados y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Bogotá D.C.: El instituto, 2008. 36p.

_____. Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. NTC 4490. Bogotá D.C.: El instituto, 1998. 23p.

JARAMILLO GONZÁLEZ, Jorge Luis. Evaluación y validación de mezclas de *Beauveria bassiana* (Balsamo) *Vuillemin* y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin para el control de la broca del café en frutos infestados caídos al suelo. Scielo [En línea], 2012. [Citado en 13 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v41n1/v41n1a15.pdf>>

Jardín Botánico de Bogotá. [En línea]. [Citado en 13 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.jbb.gov.co/herbario/especimen/26094>>.

Jardín Botánico de Bogotá. [En línea]. [Citado en 2 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<http://www.jbb.gov.co/index.php/nuestro-jardin/mision-y-vision>>.

JARONSKI, Stefan y JACKSON, Mark. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. En: Mass production of entomopathogenic Hypocreales. 2da Edición. USA: LAWRENCE, Lacey. 2012. 75-80 p.

JIMÉNEZ, Edgardo. Metodos de control de plagas. Trabajo de grado en Ingeniería en Sistemas de Protección Agrícola y Forestal. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía, 2009. 22-27 p.

JIMÉNEZ, Faviola. Características nutricionales de la arracacha (*arracacia xanthorrhiza*) y sus perspectivas en la alimentación. [En línea], 2005. [Citado en 26 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: <<https://Caracteristicas-nutricionales-de-la-arracacha-arracacia-xanthorrhiza-y-sus-perspectivas-en-la-alimentacion-faviola-jimenez.html>>

JIMENEZ USECHE, Isabel Cristina. Escalamiento para la producción de un biopesticida a partir de *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* en fermentadores de 14 y 250L con base en la transferencia de oxígeno. Trabajo de grado Ingeniero Químico. Bogotá D.C.: Universidad de los Andes, 2003. 22 p.

JUNCO DÍAZ, Raquel de los Ángeles y RODRÍGUEZ PÉREZ, Carlos. Cultivo y crecimiento de los microorganismos. [En línea], 2001. [Citado en 7 marzo de 2018]. Disponible en Internet: <https://www.researchgate.net/publication/288670374_Cultivo_y_crecimiento_de_los_microorganismos>

LEGER, Raymond y ROBERTS, Donald. Engineering improved mycoinsecticides. ScienceDirect [En línea], 1997. [Citado en 7 de marzo de 2018]. Disponible en Internet: < <https://www.sciencedirect.com> >

LLANO ARANGO, Ana Lucia. Escalamiento del proceso de producción de un insecticida biológico a escala piloto para la empresa productos naturales de la sabana S.A., Alquería. Trabajo de grado Ingeniería de procesos. Medellín, Colombia: Universidad EAFIT. Escuela de Ingeniería. Departamento de Ingeniería de Procesos, 2007. 26 p.

MARÍN, Patricia, et al. Evaluación de diferentes medios de cultivo para determinar la germinación del hongo *B. bassiana* producido en formulaciones comerciales. CENICAFÉ [En línea], 1994. [Citado en 15 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/709/1/017.pdf>

MARTÍNEZ CASTRILLÓN, Luis Carlos. Desarrollo de un prototipo de formulación con hongos entomopatógenos para el manejo de *Demostipa neivai* Bondar (Coleoptera: Chrysomelidae). Tesis de Maestría Ciencias Agrarias, Énfasis en Entomología. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía, 2010. 17-58 p.

MARTÍNEZ COVALEDA, Héctor, et al. La cadena del arroz en Colombia. Ministerio de agricultura y desarrollo rural [En línea], 2005. [Citado en 5 de febrero de 2018]. Disponible en internet: < <https://sioc.minagricultura.gov.co>>

MARTÍNEZ, Jorge, et al. Propiedades fisicoquímicas y funcionales del almidón de arroz (*Oryza sativa* L) blanco e integral. Revista de asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos [En línea], 2017. [Citado en 22 de noviembre de 2017]. Disponible en Internet: < <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/446/364>>

MARTINEZ STONE, Claudia Montserrat. Evaluación financiera. [En línea]. [Citado en 14 de junio de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.economia.unam.mx/secss/docs/tesisfe/MartinezSCM/indice.pdf>>

MATA ASTORGA, Miguel. Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como parte de un proceso de escalamiento y producción de bioplaguicidas. Trabajo de grado Ingeniería Biotecnológica. Cartago, Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica, 2008. 45 p.

MEJIA CALDERON, Gilmar, et al. Evaluación de hongos entomopatógenos como biocontroladores de *Bactericera (Paratrioza) cockerelli* (Homóptera: Psyllide: Triozinae) en papa (*Solanum tuberosum*) a nivel laboratorio. Trabajo de grado Ingeniería Agrónoma. San Salvador: Universidad de El Salvador. Facultad de Ciencias Agronómicas, 2008. 44 p.

MONZÓN, Arnulfo. Producción, Uso y Control de Calidad de Hongos Entomopatógenos en Nicaragua. CATIE. [En línea], 2002. [Citado en 13 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: <<http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6723/A2107e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>

MOORE LANDCKER, Elizabeth. Fundamentals of the fungi. En: Fundamentals of the fungi. 4ta Edición. USA: Benjamin Cummin, 1983.

MOTTA DELGADO, Pablo Andrés y MURCIA ORDOÑEZ, Betselene. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. Ambi- Agua. [En línea], 2011. [Citado en 2 de octubre de 2017]. Disponible en Internet: <http://www.ambi-agua.net/seer/index.php/ambi-agua/article/viewFile/465/pdf_455>

MUNGUÍA NAVARRETE, Christopher y PADILLA GARCÍA, Luis Ernesto. Micropropagación de ápices caulinares en Plátano (*Musa spp.* AAB) Cuerno Enano en el Laboratorio de Cultivo de Tejido de la UNAN-León. Trabajo de grado Licenciatura en Biología. Nicaragua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Facultad de Ciencias y Tecnología, 2014. 57 p.

NIELSEN, Jens, et al. Bioreaction Engineering Principles. 2da Edición. USA: Plenum Publishers, 2002.

NOGUERA TORRES, Natalia. Implementación, valuación de la propiedad, planta y equipo mediante Niff plenas (NIC 16) y sección 17 de Niif para pymes. Trabajo de grado Contaduría. Bogotá D.C.: Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ciencias Económicas, 2014. 14-20 p.

NÚÑEZ LÓPEZ, Diana Carolina. Influencia de caolín (partícula inerte) sobre el desarrollo de poblaciones de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) y la interacción fisiológica en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Trabajo de grado Magister en Ciencias Agrarias énfasis Entomología. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias, 2014. 27-35 p.

NYOCHEMBENG, Leopold, et al. Optimizing edible fungal growth and biodegradation of inedible crop residues using various cropping methods. Bioresource Technology. [En línea], 2008. [Citado en 12 de noviembre de 2017]. Disponible en Internet: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407009194>>

OGBONNA, James Chukwuma, et al. Scale up of fuel ethanol production from gar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. Bioresource Technology [En línea], 2001. [Citado en 18 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11315804>>

OJEDA CHI, Melina Maribel, et al. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias [En línea], 2011. [Citado en 14 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.scielo.org.mx>>

OLAYA, Daniel. La tasa interna de oportunidad-TIO- y la creación de empresas. Revista del instituto internacional de costos [En línea], 2008. [Citado en 26 de junio de 2018]. Disponible en Internet: < <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3362371.pdf>>

OLIVARES BAÑUELOS, Tatiana. Diseño y escalamiento de procesos biotecnológicos. Trabajo de grado Licenciatura de Bioingeniería. México: Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño, 2008. 13-22 p.

PADILLA MARTIN, Virginia. Bioinsecticidas. Trabajo de grado Biología. España: Universidad de La Laguna. Facultad de ciencias, 2017. 4-7 p.

PINEDA GÓMEZ, Posidia, et al. Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: estudio por calorimetría diferencial de barrido. Ingeniería y Ciencia [En línea], 2010. [Citado en 17 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v6n11/v6n11a08.pdf>>

PUCHETA DÍAZ, Micaela. et al. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Scielo. [En línea], 2006. [Citado en 10 septiembre de 2017]. Disponible en Internet: < http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006>

PUERTA MARÍN, Jennyfer y ZAPATA CARDONA, Paula Andrea. Diseño conceptual de un proceso para elaboración de un producto funcional a partir de *Ganoderma lucidum*. Trabajo de grado Ingeniería de Procesos. Medellín, Colombia: Universidad EAFIT. Departamento de Ingeniería de procesos, 2006. 15-60 p.

QUINTERO RAMÍREZ, Rodolfo. Teoría y Aplicaciones. En: Ingeniería Bioquímica. México: Editorial Alambra, S.A., 1990.

QUIRÓS FOURNIER, José Pablo. Determinación de modelos para la predicción de los coeficientes volumétricos de transferencia de masa (K_{la}) oxígeno- medio de cultivo en biorreactores tipo tanque agitado. Trabajo de grado Licenciatura en Ingeniería Química. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica. Facultad de Ingeniería, 2014. 10-30 p.

RAIMBAULT, Maurice, et al. International training course on solid state fermentation. En: Orstom. Octubre, 1998. 26 p.

RESTREPO, Jairo. Abonos orgánicos fermentados experiencias de agricultores en Centroamérica y Brasil. CEDECO [En línea], 2002. [Citado en 4 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: < <https://abonos-organicos-fermentados-jairo-restrepo/>>

RIZZO, María Marcela. El capital trabajo neto y el valor en las empresas. La importancia de la recomposición del capital de trabajo neto en las empresas que atraviesan o han atravesado crisis financieras. Revista EAN [En línea], 2002. [Citado en 26 de junio de 2018]. Disponible en Internet: < <https://journal.universidadean.edu.co/> >

RODRIGUEZ, Alejandro, et al. Proyecto demostrativo con implementación de BPA en el cultivo del banano. CORBANA. [En línea], 2010. [Citado en 6 de agosto de 2017]. Disponible en Internet: < <http://cep.unep.org/repcar.png/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-corbana/bpa-en-banano>>

RODRÍGUEZ, Dora Alba. Hongos entomopatógenos registrados en Colombia. Revista Colombiana de Entomología. 1984.

RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, Julián Andrés. Microbiología de las vitaminas. [En línea], 2011. [Citado en 27 de febrero de 2018]. Disponible en Internet: < <https://es.scribd.com/doc/61540960/Microbiologia-de-Las-Vitaminas>>

ROJAS CRUZ, Diana Lizeth. Análisis de la competitividad del sector arracachero y su entorno productivo en el municipio de Boyacá. Trabajo de grado Administración de Empresas. Tunja, Colombia: Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Económicas, Administrativas y Contables, 2014. 19-26 p.

RUIZ CANCINO, Enrique y CORONADA BLANCA, Juanita. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. En: Forest Health Technology Enterprise Team. Control Biológico. México: VAN DRIESCHE, Roy, et al., 2007. 11-36 p.

RUIZ COLORADO, Ángela Adriana. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante. Doctorado en Ingeniería. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Minas, 2009. 13 p.

RUIZ LEZA, Hector, et al. Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. bio-reactors desing for solid state fermentation. Revista Mexicana de Ingeniería Química [En línea], 2007. [Citado en 17 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: < <http://www.redalyc.org/pdf/620/62060105.pdf>>

Secretaria de Agricultura y Ganadería. [En línea], 2000. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: <

http://www.fedearroz.com.co/fna/documentos/Plan_Estrategico_2011-2020_v3.pdf>

SOLIS PERLAZA, Julio Alfonso. Elaboración de carbohidratos nutricional infantil con base de harina de arroz y trigo, sustitución de otras harinas. Trabajo de grado Ingeniería Industrial. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Industrial, 2015. 10-13 p.

TABORSKY, Vladimir. Small-scale Processing of Microbial Pesticides. En: FAO Agricultural Services. Prague, Czechoslovakia: The Chief, 1992. 50-58 p.

Tarifas de energía eléctrica (\$/KW/h) reguladas por la Comisión de Regulación de Energía y Gas (CREG) mayo de 2018 [En línea]. [Citado el 18 de mayo de 2018]. Disponible en Internet: <<https://www.codensa.com.co/document/Tarifario-mayo-2018.pdf>>

TORRES OCTAVO, Jorge. Mercados y producción en agricultura: Café y Maíz en Colombia. [En línea], 2001. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: < <http://bdigital.unal.edu.co/23805/1/20870-70581-1-PB.pdf>>

TRAVIS, Glare. Biotechnological Potential of Entomopathogenic Fungi. En: Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications. vol. 21. New Zealand: ARORA, Dilip, 2003. 79 p.

URTUBIA, Irina y FRANCE, Andrés. Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas agrícolas. INIA TIERRA ADENTRO [En línea], noviembre-diciembre 2007. [Citado en 3 de enero de 2018]. Disponible en internet: < <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR34779.pdf>>

VÁSQUEZ CONDE, Rosalino. Metabolismo de los seres vivos. En: Biología 1. 1ra Edición. México, 2016. 104-121 p.

VÁSQUEZ, Morgan. Diseño del sistema de control para un biorreactor de tanque agitado. [En línea], 2010. [Citado en 16 de junio de 2018]. Disponible en Internet: < <https://es.scribd.com/doc/31787823/Biorreactor-de-tanque-agitado-Morgan-G-Vasquez-2010>>

VÉLEZ, Patricia, et al. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. CENICAFÉ [En línea], 1997. [Citado en 25 de abril de 2018]. Disponible en Internet: <<http://biblioteca.cenicafe.org>>

VILA FLÓREZ, Otto. Diagnóstico de la cadena de la yuca en Colombia. MINAGRICULTURA [En línea], 2015. [Citado en 25 de julio de 2018]. Disponible en Internet: < <https://sioc.minagricultura.gov.co>>

VILLACIDE, José y CORLEY, Juan. Manejo integrado de plagas forestales. INTA. [En línea], 2012. [Citado en 4 de agosto de 2017]. Disponible en Internet: <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-img-tapa_serie_plagas.jpg>

WALAS, Stanley. Mixing and Agitation. En: Chemical Process Equipment: Selection and Design. USA: Butterworth – Heinemann, 1990.

YILDIZ, Sibel, et al. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom, Process Biochemistry. ScienceDirect [En línea], 2002. [Citado en 4 de enero de 2018]. Disponible en: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959202000407>>

ZAPATA SAAD, Andrés José. Investigación del efecto de los parámetros de elaboración de pellets de cuesco de palma en el proceso de pirolisis. Magister en Ingeniería Mecánica. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería, 2016. 35-40 p.

ANEXOS

ANEXO A.

TABLAS DE ABSORBANCIA

Longitud de onda (nm)	Absorbancia acetona 80%	Absorbancia Muestra arracacha	Absorbancia Experimento 1
325	0,866	0,188	2,843
350	0,067	0,095	2,808
400	0,042	0,097	2,76
450	0,033	0,085	2,713
500	0,028	0,092	2,658
550	0,019	0,085	2,452
600	0,015	0,082	2,187
610	0,014	0,08	1,874

Longitud de onda (nm)	Absorbancia acetona 80%	Absorbancia Muestra Harina de yuca	Absorbancia Experimento 2
325	0,866	0,054	2,401
350	0,067	0,032	2,279
400	0,042	0,016	2,22
450	0,033	0,012	2,189
500	0,028	0,011	2,003
550	0,019	0,011	1,756
600	0,015	0,01	1,654
610	0,014	0,01	1,632

Longitud de onda (nm)	Absorbancia acetona 80%	Absorbancia Muestra arroz	Abs Experimento 3
325	0,866	0,802	1,216
350	0,067	0,028	0,55
400	0,042	0,016	0,427
450	0,033	0,013	0,357
500	0,028	0,012	0,314
550	0,019	0,011	0,281
600	0,015	0,010	0,247
610	0,014	0,010	0,242

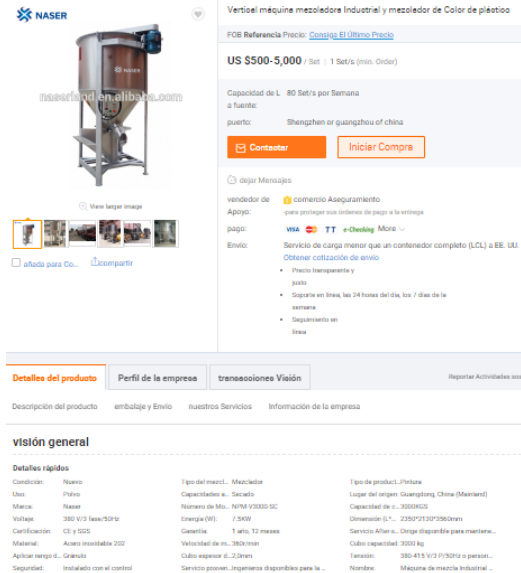
Longitud de onda (nm)	Abs acetona al 80%	Absorbancia Muestra Maíz	Abs Experimento 4
325	0,866	0,755	2,022
350	0,067	0,036	2
400	0,042	0,027	1,589
450	0,033	0,025	1,383
500	0,028	0,023	1,221
550	0,019	0,022	1,083
600	0,015	0,021	0,96
610	0,014	0,020	0,948

Longitud de onda (nm)	Absorbancia acetona 80%	Absorbancia Muestra combinado	Absorbancia Experimento 5
325	0,075	0,244	1,459
350	0,048	0,118	0,833
400	0,022	0,093	0,68
450	0,015	0,081	0,574
500	0,013	0,066	0,496
550	0,012	0,057	0,435
600	0,011	0,048	0,382
610	0,011	0,039	0,371

ANEXO B.

COTIZACIÓN DE EQUIPOS

- Cotización 1 del mezclador: Precio definido por el vendedor: 4000 USD/unit



Vertical máquina mezcladora Industrial y mezclador de Color de plástico

FOB Referencia Precio: [Consultar el Último Precio](#)

US \$500-5,000 / Set 1 Set/s (min. Order)

Capacidad de L. 80 Set/s por Semana a fuente

puerto: Shengzhen or guangzhou of china

[Contatar](#) [Iniciar Compra](#)

Enviar Mensaje

vendedor de comercio Asseguramento

Apoyo para proteger sus ordenes de pago a la entrega

pago: [VISA](#) [TT](#) [e-Check](#) [More](#)

Envío: Servicio de carga menor que un contenedor completo (LCL) a EE. UU. [Obtener cotización de envío](#)

- Precio transparente y justo
- Soporte en línea, las 24 horas del día, los 7 días de la semana
- Seguro en línea

Detalles del producto Perfil de la empresa transacciones Visión Reportar Actividades sospe.

Descripción del producto embalaje y Envío nuestros Servicios Información de la empresa

visión general

Detalles rápidos

Condición:	Nuevo	Tipo del mezcl.:	Mezclador	Tipo de product.:	Plástico
Uso:	Fabrica	Capacidad de m.:	Secado	Lugar del origen:	Guangdong, China (Mainland)
Marca:	Naser	Número de Mo.:	N/M V2000 SC	Capacidad de c.:	3000KGS
Voltaje:	380 V/3 fase/50Hz	Energía (W):	7.5KW	Dimensión (L*W*H):	2200*2100*2060mm
Certificación:	CE y SGS	Garantía:	1 año, 12 meses	Servicio After s.:	Orige disponible para maquina...
Motore:	Motor inoxidable 202	Velocidad de m.:	3600rpm	Calor capacidad:	3000kg
Aplicar rango d.:	Grande	Cubo espesor d.:	2,0mm	Tamaño:	380-415 V/3 F/50Hz o personal...
Seguridad:	Instalado con el control	Servicio posventa:	Impugnancia disponible para la ...	Nombre:	Máquina de mezcla Industrial ...

- Cotización 2 del mezclador: Precio definido por el vendedor: USD 4700/unit.

MEZCLADORA VERTICAL / DINÁMICA / BATCH / DE POLVO



[Contactar directamente con el proveedor](#)

[OBTENER PRESUPUESTO](#)

[ENVIAR UNA PREGUNTA](#)

[RECIBIR DOCUMENTACIÓN](#)

Consultar el mapa con los puntos de venta

[DÓNDE COMPRAR](#)

Características

Tecnología: dinámica	Proceso de producción: batch	Aplicaciones: de polvo
Ámbito de aplicación: para la industria alimentaria, para la industria química, para la industria cosmética, para la industria farmacéutica	Otros características: para productos secos, de sacro inoxidable, vertical, de modo, intensidad de velocidad variable, impulsor y agitador (CIP), de corte, de alta velocidad, ATEX, con homogeneización, pacadora, antideflagrante, de gran capacidad, de alta presión, combinado los sistemas, flexibilidad.	Capacidad: Mín.: 0.1 m³ (3.53 IP) Máx.: 40 m³ (1412.29 IP)

- Cotización 1 Biorreactor de lecho fluidizado: Precio definido por el vendedor: USD 5500/unit.

Mejoramiento químico Acero inoxidable continuo de lecho fluidizado reactor no. 04734

FOB Referencia Precio: [Consiga El Último Precio](#)

US \$2,000-5,000 / Set | 1 Set/s (min. Order)

Capacidad de L: 500 Sets por Mes
a fuente:

puerto: Qingdao port of China

[Contactar](#) [Iniciar Compra](#)

Chatear

vendedor de: comercio Aseguramiento

Apoyo: para proteger sus órdenes de pago a la entrega.

pago:

Envío: Servicio de carga menor que un contenedor completo (LCL) a EE. UU.
[Obtener cotización de envío](#)

- Precios transparentes y justos
- Soporte en línea, las 24 horas del día, los 7 días de la semana
- Seguimiento en línea

Detalles del producto Perfil de la empresa transacciones Visión Reportar Actividades sospe...

visión general

Detalles rápidos

Condición: Nuevo	Grado automático: Automático	Tipo: Caldera de la reaccotan
Lugar del origen: Shandong, China (Mainland)	Marca: Chiyuan	Certificación: ISO
Generales: 1 año	Servicio After s...: Origo disponible para mantene...	

- Cotización 2 Biorreactor lecho fluidizado: Precio definido por el vendedor: USD 15000/unit.

Químico de acero inoxidable lecho fluidizado reactor

FOB Referencia Precio: [Consiga El Último Precio](#)

US \$2,000-50,000 / Set | 1 Set/s (min. Order)

Capacidad de L: 30 Sets por Mes
a fuente:

puerto: QINDAO port, China

[Contactar](#)

Chatear

pago:

Envío: Servicio de carga menor que un contenedor completo (LCL) a EE. UU.
[Obtener cotización de envío](#)

- Precios transparentes y justos
- Soporte en línea, las 24 horas del día, los 7 días de la semana
- Seguimiento en línea

Detalles del producto Perfil de la empresa transacciones Visión Reportar Actividades sospe...

Descripción del producto Tipo del producto Consulta especificación Embalaje y envío Productos relacionados


Información de la empresa Nuestros servicios Póngase en contacto con nosotros

visión general

Detalles rápidos

Condición: Nuevo	Grado automático: Automático	Tipo: Reactor del tanque
Lugar del origen: Shandong, China (Mainland)	Marca: Nantongxia	Número de Mo.: Personalizado
Voltaje: Requiere de los equipos	Energía (W): 0 / 3kw-45kw	Dimensión (L*...): Capacidad de la máquina
Peso: 50-15000 kg	Certificación: CE ISO	Generales: 1 año
Servicio After s...: Origo disponible para mantene...	Número del pro...: Máquina química reactor equipo	Materia: SS
Aplicación: Industria química	Nombre: Máquina química reactor equipo	Capacidad: Customized
Tipo de reactor: Químico reactor discontinuo	Método de calef.: Vapor eléctrico	Tipo de product.: Líquido etc
Volumen: 50-12000L	WhatsApp: 0086 15316397823	

- Cotización 3 Biorreactor lecho fluidizado: Precio definido por el vendedor: USD 20000/unit.



Fixed-Fluidized bed bioreactor

[añada para Co...](#) [compartir](#)

Lecho fluidizado biorreactor para hepatocitos cultivo celular

FOB Referencia Precio: [Consiga El Último Precio](#)

US \$20,000-50,000 / Set | 1 Set/s (mín. Order)

Capacidad de L: 20 Set/s por Semana
a fuente:

puerto: Shanghai

[Contactar](#) [Iniciar Compra](#)

Chattear

vendedor de comercio Aseguramiento

Apoyo: para proteger sus órdenes de pago a la entrega

pago: **VISA** **TT** **e-Checking** **More**

Envío: Servicio de carga menor que un contenedor completo (LCL) a EE. UU.
[Obtener cotización de envío](#)

- Precio transparente y justo
- Soporte en línea, las 24 horas del día, los 7 días de la semana
- Seguros en línea

Detalle del producto

Perfil de la empresa

transacciones Visión

[Reportar Actividades sospe...](#)


Descripción del producto [Nuestros servicios](#) [FAQ](#) [Póngase en contacto con nosotros](#)

visión general

Detalles rápidos

Condición: Nuevo	Grado automatiz...: Automático	Tipo: Biorreactor
Lugar del origen: Shanghai, China (Mainland)	Marcas: Crecomento	Número de Mo...: Crecomento
Voltaje: 220 V/380 V	Energía (W): 0.75kw-45kw	Dimensiones (L*...: Personalizado
Peso: 50-15000 Kgs	Certificación: FDA, EMS, CGMP	Garantía: 1 año
Servicio After-s...: Dirige disponible para mantene...		

- Cotización 1 Peletizadora: Precio definido por el vendedor: USD 5500/unit.



china-changsheng.en.alibaba.com

[añada para Co...](#) [compartir](#)

CS 2015 popular maquinas peletizadoras de biomasa granulación máquinas precio para la venta

FOB Referencia Precio: [Consiga El Último Precio](#)

US \$1,800-28,000 / Set | 1 Set/s El descuento está disponible (mín. Order)

Capacidad de L: 420 Set/s por Trimestre
a fuente:

puerto: Qingdao Port,etc

[Contactar](#)

dejar Mensajes

pago: **VISA** **TT** **e-Checking** **More**

Envío: Servicio de carga menor que un contenedor completo (LCL) a EE. UU.
[Obtener cotización de envío](#)

- Precio transparente y justo
- Soporte en línea, las 24 horas del día, los 7 días de la semana

visión general

Detalles rápidos

Condición: Nuevo	Lugar del origen: Shandong, China (Mainland)	Marcas: CS
Voltaje: 380V-440v	Energía (W): 2.2-220kw	Certificación: CE/
Garantía: 12 meses	Servicio After-s...: Dirige disponible para mantene...	Nombre: Maquinas peletizadoras de bio...
Color: Amarillo/verde/personalizado	Vida útil: Ya	Medio ambiente: Ambiente
Aplicación: Madera, tallo, paja, cáscara de ...	Pellet tamaño d...: 3mm-20mm	Lubricación: Auto
Singularidad: Bajo Costo de alta eficiencia	Pellets acabad...: Superficie fina y alta compacto...	Piezas de desg...: Morte y rodillo

Packaging & Delivery

Paquete: Embalaje estándar de la exportación en condiciones de navegar chapa de hierro

Plazo de entrega: 5-30workdays recibir 30% por adelantado o original L/C llegar

- Cotización 2 Peletizadora: Precio definido por el vendedor: USD 8000/unit.



Granulador De Biomasa

Granulador de biomasa puede convertir residuos como aserrín, paja, cáscara de arroz, corteza de árbol etc. en pellets de combustible de alta densidad a través del procesamiento.



Característica

Materia prima aplicable: fibrosidad, paja, cáscaras de cacahuete, nuez de palma, cascara de coco, semilla de algodón, polvo de bambú, pasto de elefante, caña de azúcar, pulpa, la escoria de oliva, abono orgánico etc.

El sistema de accionamiento principal utiliza engranajes de alta precisión, que mejora la producción de 15% -20%.

La parte de accionamiento de la máquina utiliza rodamientos de alta calidad que son todos importados. Todos ellos hicieron la máquina eficaz, estable y ambiental.

El sistema de lubricación hizo todos los rodamientos funcionan bien.

La máquina adopta un sistema de conversión de alimentación de velocidad ajustable y pulverización de vapor axial, la descarga externa y la protección de sobrecarga.

- Cotización 3 Peletizadora: Precio definido por el vendedor: USD 7055/unit.



Producto
Solución
Caso
Servicio
Faq




Solución de peletización

- Peletizadora de Madera
- Peletizadora de Palma
- Peletizadora de Paja
- Peletizadora de Cáscara de Arroz
- Peletizadora de Bambú
- Peletizadora de Bagazo de Caña de Azúcar
- Peletizadora de Residuos de Hongos
- Peletizadora de Hierba Forrajera
- Peletizadora de Paja de Algodón

Peletizadora de Residuos de Hongos



Proyectos



Producción de 5 toneladas / hora en África

- Nuestra solución para la producción de pellets de residuos de hongos, sobre la base de los siguientes:
 - Tamaño de Partícula: < 5mm.
 - Contenido de Humedad: 15%—20%.
 - Materia Prima Adecuada: Residuos de hongos.
- Flujo de proceso típico - conversión de residuos de hongos en pellets:
 - A) Tamizado → B) Secado → C) Granulación → D) Enfriamiento → E) Ensacado
- El flujo de proceso anterior implica las siguientes máquinas principales:
 - A) Tamizadora: Impureza de la pantalla de residuos de hongos.
 - B) Secadora rotativa: Reducir la humedad de los residuos de hongos.
 - C) Prensa de pellet de anillo de matriz: Hacer 6-8mm pellets.
 - D) Enfriador: Enfriar pellets de madera caliente no superior a la temperatura ambiente 3-5 °C.
 - E) Máquina de ensacado: Empacar los pellets terminados en bolsas.

Contáctenos

Contacto: liyanguasheng
 App : +86 13915875073
 Email : info@hsbiopellet.com
 Dirección : Ciudad de Shezhu, zona

ANEXO C.

PRECIO DE VENTA INSECTICIDA BIOLÓGICO (BIDIPT)



Biodipt

Es un insecticida biológico a base de Beauveria y Metarhizium que ataca a diferentes insectos, causante de la enfermedad en insectos denominada muscardina blanca, también puede erradicar los dípteros en recintos avícolas o porcícolas

Desde: \$25.600

Peso/Volumen 1 Kilo

Precio exento de flete: para cotizarlo favor comunicarse a nuestra línea telefónica +57 (4) 3224937

\$90.250

Cantidad

Categorías: Sanidad animal, Insecticidas biológicos

ANEXO D.

TABLA DE AMORTIZACIÓN DEL CRÉDITO

Periodo	Saldo	Interés	Cuota	Amortización
0	\$58.000.000		\$2.044.839	
1	\$56.738.161	\$783.000	\$2.044.839	\$1.261.839
2	\$55.459.287	\$765.965	\$2.044.839	\$1.278.874
3	\$54.163.149	\$748.700	\$2.044.839	\$1.296.139
4	\$52.849.512	\$731.203	\$2.044.839	\$1.313.636
5	\$51.518.141	\$713.468	\$2.044.839	\$1.331.371
6	\$50.168.797	\$695.495	\$2.044.839	\$1.349.344
7	\$48.801.237	\$677.279	\$2.044.839	\$1.367.560
8	\$47.415.215	\$658.817	\$2.044.839	\$1.386.022
9	\$46.010.481	\$640.105	\$2.044.839	\$1.404.734
10	\$44.586.784	\$621.141	\$2.044.839	\$1.423.698
11	\$43.143.866	\$601.922	\$2.044.839	\$1.442.917
12	\$41.681.470	\$582.442	\$2.044.839	\$1.462.397
13	\$40.199.330	\$562.700	\$2.044.839	\$1.482.139
14	\$38.697.182	\$542.691	\$2.044.839	\$1.502.148
15	\$37.174.755	\$522.412	\$2.044.839	\$1.522.427
16	\$35.631.775	\$501.859	\$2.044.839	\$1.542.980
17	\$34.067.965	\$481.029	\$2.044.839	\$1.563.810
18	\$32.483.044	\$459.918	\$2.044.839	\$1.584.921
19	\$30.876.726	\$438.521	\$2.044.839	\$1.606.318
20	\$29.248.723	\$416.836	\$2.044.839	\$1.628.003
21	\$27.598.742	\$394.858	\$2.044.839	\$1.649.981
22	\$25.926.486	\$372.583	\$2.044.839	\$1.672.256
23	\$24.231.654	\$350.008	\$2.044.839	\$1.694.831
24	\$22.513.943	\$327.127	\$2.044.839	\$1.717.712
25	\$20.773.042	\$303.938	\$2.044.839	\$1.740.901
26	\$19.008.639	\$280.436	\$2.044.839	\$1.764.403
27	\$17.220.416	\$256.617	\$2.044.839	\$1.788.222
28	\$15.408.053	\$232.476	\$2.044.839	\$1.812.363
29	\$13.571.223	\$208.009	\$2.044.839	\$1.836.830
30	\$11.709.595	\$183.212	\$2.044.839	\$1.861.627
31	\$9.822.836	\$158.080	\$2.044.839	\$1.886.759
32	\$7.910.605	\$132.608	\$2.044.839	\$1.912.231
33	\$5.972.559	\$106.793	\$2.044.839	\$1.938.046
34	\$4.008.350	\$80.630	\$2.044.839	\$1.964.209
35	\$2.017.624	\$54.113	\$2.044.839	\$1.990.726
36	\$22	\$27.238	\$2.044.839	\$2.017.601

