



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**ANÁLISIS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PLAGUICIDA
BIOLÓGICO *Metarhizium anisopliae***

Emilia Yesenia Arana Vicente

Asesorado por el Ingeniero Químico Carlos Salvador Wong Davi

Guatemala, abril de 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**ANÁLISIS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PLAGUICIDA
BIOLÓGICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE***

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA

POR

EMILIA YESENIA ARANA VICENTE

ASESORADO POR EL ING. CARLOS SALVADOR WONG DAVI

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, ABRIL DE 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos
VOCAL I	Ing. Alfredo Enrique Beber Aceituno
VOCAL II	Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco
VOCAL III	Ing. Miguel Ángel Dávila Calderón
VOCAL IV	Br. Luis Pedro Ortiz de León
VOCAL V	P.A. José Alfredo Ortiz Henricx
SECRETARIO	Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO

DECANO	Ing. Murphy Olympto Paíz Recinos
EXAMINADOR	Inga. Telma Maricela Cano Morales
EXAMINADOR	Ing. Otto Raúl de León de Paz
EXAMINADOR	Ing. Víctor Manuel Monzón Valdez
SECRETARIA	Inga. Marcia Ivónne Véliz Vargas

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

ANÁLISIS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PLAGUICIDA BIOLÓGICO *Metarhizium anisopliae*

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química con fecha 22 de julio de 2009.

Emilia Yesenia Arana Vicente

Guatemala 23 de febrero de 2011

Ing. Williams G. Álvarez Mejía, M.Sc.
Director Escuela
Ingeniería Química
USAC

Respetable Ingeniero:

Por este medio atentamente me dirijo a usted para hacer de su conocimiento mi aprobación del Informe Final de Trabajo de Graduación que se titula "ANÁLISIS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PLAGUICIDA BIOLÓGICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE*", pues ha cumplido con los requerimientos necesarios para someterse a la respectiva evaluación del mismo.

Sin otro particular y agradeciendo anticipadamente su valiosa colaboración, me suscribo de usted.

Atentamente,



Ma. Carlos Salvador Wong Davi





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

Guatemala, 24 de marzo de 2011
Ref.EIQ.TG.84.2011

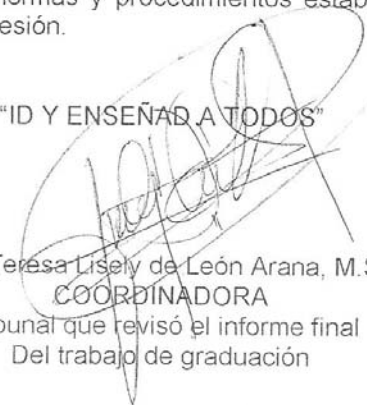
Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Presente.

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el **Acta TG-0902010-B-IF** le informo que reunidos los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del informe final del trabajo de graduación, para optar al título de **INGENIERA QUÍMICA** a la estudiante universitaria, **Emilia Yesenia Arana Vicente**, identificada con carné No.2005-12015, titulado: "**ANÁLISIS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PLAGUICIDA BIOLÓGICO *Metarhizium anisopliae***", el cual ha sido asesorado por el **Ingeniero Químico Carlos Salvador Wong Daví**.

Habiendo encontrado el referido informe final **satisfactorio**, se procede a recomendarle autorice a la estudiante **Arana Vicente**, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.

"ID Y ENSEÑAR A TODOS"


Inga. Teresa Lisely de León Arana, M.Sc.
COORDINADORA
Tribunal que revisó el informe final
Del trabajo de graduación



ESCUELA DE
INGENIERIA QUIMICA

C.c.: archivo

FORMANDO INGENIEROS QUIMICOS EN GUATEMALA

FORMANDO INGENIEROS QUIMICOS EN GUATEMALA
AGENCIADA POR LA AGENCIA CENTROAMERICANA DE
INGENIERIA QUIMICA
Programa de Ingeniería Química
Periodo 2009 - 2012






UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA.

Ref.EIQ.TG.090.2011

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación de la estudiante, **EMILIA YESENIA ARANA VICENTE** titulado: **"ANÁLISIS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PLAGUICIDA BIOLÓGICO *Metarhizium anisopliae*"**.
Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.


Ing. Williams Guillermo Álvarez Mejía; C.Dr.
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, abril de 2011

Cc: Archivo
WGAM/ale

FORMANDO INGENIEROS QUÍMICOS EN GUATEMALA

PROGRAMA DE INGENIERÍA
QUÍMICA ACREDITADO POR
Agencia Centroamericana de Acreditación de
Programas de Arquitectura y de Ingeniería
Período 2009 - 2012



Universidad de San Carlos
de Guatemala



Facultad de Ingeniería
Decanato

Ref. DTG.101 -2011

El Decano de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **ANÁLISIS DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PLAGUICIDA BIOLÓGICO *Metarhizium anisopliae***, presentado por la estudiante universitaria **Emilia Yesenia Arana Vicente**, procede a la autorización para la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.


Ing. Murphy Olimpo Paiz Recinos
DECANO



Guatemala, abril de 2011

/cc

ACTO QUE DEDICO A:

Mis papás

María Luisa Vicente Lobo y Hector Hugo Arana Cermeño. A ustedes están dedicados este y todos mis triunfos, así como yo se que cada lucha en sus vidas ha sido para mis hermanas y para mí.

Mis hermanas

Alida y Marisol, mi formación, mis conocimientos y la mayoría de mis virtudes se las debo a ustedes, recorrer tomada de sus manos este camino ha sido una de las bendiciones más grandes que Dios me concedió.

Mis sobrinas

Mis tres lindos angelitos que vinieron a llenarme de alegrías y a iluminar mi vida con su cariño y sus travesuras, LAS AMO MUCHO.

Mis abuelitos

Su ejemplo de una vida de lucha y perseverancia han sido para mí un punto de partida, gracias por enseñarme a no ponerle mala cara a nada, luchar y continuar hasta alcanzar mis metas.

Mis tías

Por estar siempre allí para mí, sin condiciones y sin peros, quiero compartir este triunfo con

ustedes en honor la excelencia de la mujer
palineca.

Mis primas y primos

Quiero que todas las primas compartamos
juntas este triunfo que es tan suyo como mío.
Gracias por su incondicional apoyo.

Todas las personas que han luchado por hacer del mundo un mejor lugar.

AGRADECIMIENTOS A:

Dios	Te agradezco infinitamente haberme permitido vivir esta vida tan maravillosa.
Mis papás	Gracias por involucrarme en su lucha, ese ejemplo me ha demostrado que solo trabajando arduamente puedo alcanzar mis sueños.
Mis hermanas	Mujeres extraordinarias, gracias por ser mi ejemplo de vida, por iluminar mi camino con su cariño y sus consejos.
Mi familia	Gracias por ser mi respaldo y mi refugio.
Doña Tina	Gracias por estar a mi lado y tenerme paciencia.
Mis amigas y amigos	Gracias por todos los lindos momentos compartidos, por brindarme su cariño y su apoyo en las buenas y en las malas.
Guatemala	Gracias por brindarme la oportunidad del conocimiento, espero regresarte el favor con creces.

*“En los campos de la observación
el azar no favorece sí no a los espíritus preparados”.*

Luis Pasteur

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	V
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XI
GLOSARIO.....	XIII
RESUMEN.....	XVII
OBJETIVOS.....	XXI
HIPÓTESIS.....	XXIII
INTRODUCCIÓN.....	XXV
1. ANTECEDENTES.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Descripción del proceso de producción.....	3
2.1.1. Aislamiento e incremento del hongo.....	3
2.1.2. Producción de conidios.....	8
2.1.3. Control de calidad.....	16
2.1.3.1. Cantidad o concentración de conidios.....	16
2.1.3.1.1. Cámara de <i>Neubauer</i>	17
2.1.3.2. Viabilidad.....	19
2.1.3.3. Parasitismo.....	20
2.2. Ciclo de vida de <i>Metarhizium anisopliae</i> después de su aplicación (combate de la plaga)	21
2.3. Aplicaciones industriales.....	23
2.3.1. Combate de plagas (chinche salivosa).....	23
2.3.2. Catalizador en la producción de biodiesel.....	25
2.3.3. Clasificación comercial del arroz.....	26

2.3.4.	Esquema del proceso de producción.....	28
3.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	29
3.1.	Variables.....	29
3.2.	Delimitación del campo de estudio.....	30
3.3.	Recursos humanos disponibles.....	31
3.4.	Recursos materiales disponibles.....	31
3.5.	Técnica cuantitativa.....	32
3.6.	Recolección y ordenamiento de la información.....	33
3.6.1.	Pre-tratamiento.....	33
3.6.1.1.	Análisis de concentración de conidios.....	33
3.6.1.2.	Generación de muestras para la evaluación del efecto de la humedad en el crecimiento de conidios y determinación del porcentaje de humedad óptimo	35
3.6.1.3.	Análisis de un lote evaluado al porcentaje óptimo utilizando el método de humidificación 1.....	36
3.6.1.4.	Análisis de un lote evaluado al porcentaje óptimo utilizando el método de humidificación 2	38
3.6.2.	Proceso de secado.....	39
3.6.2.1.	Evaluación de concentración de conidios en el proceso de secado.....	39
3.6.2.2.	Evaluación del comportamiento de la viabilidad del hongo durante el proceso de secado.....	40
3.7.	Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información.	41
3.7.1.	Pre-tratamiento.....	41

3.7.2.	Proceso de secado.....	50
3.8.	Análisis estadístico.....	59
3.8.1.	Universo de estudio.....	59
3.8.2.	Unidad de análisis y observación.....	60
3.8.3.	Muestreo aleatorio simple.....	61
3.8.4.	Número de repeticiones.....	62
3.8.4.1.	Descripción del método A.....	63
3.8.4.2.	Lectura de curvas de operación.....	63
3.8.4.3.	Número de repeticiones en la evaluación de humedad óptima.....	66
3.8.4.4.	Descripción del método B.....	69
3.8.4.5.	Determinación del número de repeticiones en la evaluación de un nuevo método de humidificación de arroz.....	70
3.8.4.6.	Determinación del número de repeticiones para el análisis en el proceso de secado...	70
3.8.5.	Diseño experimental.....	71
3.8.5.1.	Evaluación de la humedad óptima.....	71
3.8.5.2.	Evaluación de un nuevo método de humidificación de arroz.....	76
3.8.5.3.	Descripción del comportamiento de la concentración de conidios en el proceso de secado.....	81
3.8.5.4.	Descripción del comportamiento de la viabilidad en el proceso de secado.....	85
4.	RESULTADOS.....	89

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	97
CONCLUSIONES.....	103
RECOMENDACIONES.....	105
BIBLIOGRAFÍA.....	107
APÉNDICE.....	111
ANEXOS.....	155

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

1	Empaque del medio de cultivo.....	9
2	Tratamiento térmico.....	10
3	Preparación de solución inoculadora.....	11
4	Inyección del inóculo.....	12
5	Agitación de bolsas inoculadas.....	13
6	Producto terminado.....	15
7	Cámara de <i>Neubauer</i>	17
8	Diagrama de <i>Neubauer</i> vista desde el microcopio.....	18
9	Prototipo de producción de biodiesel utilizando <i>Metarhizium anisopliae</i> como catalizador.....	26
10	Esquema del proceso de producción.....	28
11	Curva característica para determinar el número óptimo de repeticiones para un modelo de análisis de varianza.....	68
12	Análisis del porcentaje de humedad óptima.....	90
13	Comportamiento de la viabilidad de conidios en el producto final durante el proceso de secado.....	93
14	Comportamiento de la concentración de conidios en el producto final durante el proceso de secado.....	95

TABLAS

I	Definición operacional de variables.....	29
II	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 20% de humedad.....	41
III	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 20% de humedad.....	42
IV	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 21% de humedad.....	42
V	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 21% de humedad.....	43
VI	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 22% de humedad.....	43
VII	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 22% de humedad.....	44
VIII	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 23% de humedad.....	44
IX	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 23% de humedad.....	45
X	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 24% de humedad.....	45
XI	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 24% de humedad.....	46
XII	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 25% de humedad.....	46
XIII	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 25% de humedad.....	47
XIV	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Resumen de resultados.....	47

XV	Evaluación de un método alternativo de humidificación de arroz. Resultados de concentración utilizando el método 1.....	48
XVI	Evaluación de un método alternativo de humidificación de arroz. Resultados de concentración utilizando el método 2.....	49
XVII	Evaluación de un método alternativo de humidificación de arroz. Comparación de resultados.....	50
XVIII	Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 1.....	50
XIX	Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 2.....	51
XX	Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 3.....	51
XXI	Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 4.....	52
XXII	Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 5.....	52
XXIII	Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 6.....	53
XXIV	Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 7.....	53
XXV	Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 8.....	54
XXVI	Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Resumen de resultados de concentración.....	54
XXVII	Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 1.....	55
XXVIII	Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 2.....	55

XXIX	Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 3.....	55
XXX	Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 4.....	56
XXXI	Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 5.	57
XXXII	Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 6.....	57
XXXIII	Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 7.....	58
XXXIV	Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 8.....	58
XXXV	Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Resumen de resultados de concentración.....	59
XXXVI	Diagrama del diseño experimental con postprueba únicamente.....	60
XXXVII	Diagrama del diseño experimental con postprueba únicamente y grupo de control.....	61
XXXVIII	Diagrama del diseño experimental de series cronológicas con repeticiones en el estímulo.....	61
XXXIX	Descripción del tipo de análisis en cada etapa del proceso.....	62
XL	Parámetros de prueba previa. Tamaño muestral.....	66
XLI	Datos de evaluación del tamaño de muestra, utilizando gráficas...	67
XLII	Tabla de datos para la evaluación del porcentaje óptimo.....	72
XLIII	Tabla de parámetros para la evaluación del porcentaje óptimo.....	73
XLIV	La tabla ANOVA (Evaluación del porcentaje de humedad Óptimo).....	74
XLV	Resultados (Evaluación del porcentaje de humedad óptimo).....	75
XLVI	Tabla de datos para la evaluación del porcentaje óptimo.....	77
XLVII	Evaluar un nuevo método de humectación de arroz.....	78

XLVIII	La tabla ANOVA (Evaluación de un nuevo método de humidificación).....	79
XLIX	Resultados (Evaluación de un nuevo método de humectación).....	80
L	Parámetros para evaluar el comportamiento de concentración de conidios con el paso del tiempo en el proceso de secado.....	82
LI	La tabla ANOVA (Concentración en proceso de secado).....	84
LII	Resultados (Concentración en proceso de secado).....	84
LIII	Parámetros para evaluar el comportamiento de viabilidad de conidios con el paso del tiempo en el proceso de secado.....	86
LIV	La tabla ANOVA (Viabilidad en el proceso de secado).....	87
LV	Resultados (Viabilidad en el proceso de secado).....	88
LVI	Análisis de porcentaje de humedad óptima. Resumen de resultados.....	89
LVII	Evaluación de un método diferente para humidificar el arroz. Tabla comparativa.....	92
LVIII	Evaluación de la viabilidad de conidios en el producto final durante el proceso de secado.....	92
LIX	Evaluación de la concentración de conidios en el producto final durante el proceso de secado.....	94

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
N	Cantidad de población total
τ	Efecto de cada tratamiento
d	Error estimado dentro del cual se espera realizar análisis
FV	Fuente de variación
GL	Grados de libertad
μ	Media aritmética
Cg	Número de conidios germinados
Ct	Número de conidios totales
n	Número de repeticiones
a	Número de tratamientos experimentales
ϕ	Parámetro de centralidad, y se presentan curvas para $\alpha=0,05$ y $\alpha=0,01$ (Apéndice, curvas características para análisis de varianza)
G	Porcentaje de germinación
β	Probabilidad de error
p	Proporción de individuos que poseen en la población la característica de estudio. Este dato es generalmente desconocido y se suele suponer que $p=0.5$ que es la opción más segura y hace mayor la cantidad de repeticiones
SC	Suma de Cuadrados
Z	Valor correspondiente a la distribución de Gauss 1
σ^2	Varianza

GLOSARIO

- Asepsia** Ausencia de toda clase de microorganismos patógenos y de materia séptica. Sin infección. La técnica aséptica consiste en la utilización de materiales estériles (libres de microorganismos patógenos, no patógenos y esporas).
- Caja de Petri** Es un recipiente de cristal o de plástico, que consta de una base circular, y las paredes son de una altura baja aproximadamente de 1 cm; y una cubierta de la misma forma pero algo más grande de diámetro para que encaje como una tapa. Los hay de diferentes diámetros, los más utilizados en el laboratorio son los de 10 cm de diámetro. Se utiliza en los laboratorios principalmente para el cultivo de cristales, en los laboratorios de biología se utilizan para el cultivo de bacterias o microorganismo.
- Cepa** En microbiología y genética, una variante genotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.
- Cercópodos** Los cercópodos son una familia de insectos fitófagos hemípteros de amplia distribución en Europa.

Chinche Salivosa	Pertenece a la familia Cercopidae y es un insecto con aparato bucal picador-chupador que utiliza su estilete para laborar túneles de alimentación que finalizan en los elementos del xilema provocando el síntoma conocido como quemazón. Principal problema en el cultivo de caña de azúcar.
Conidio	También llamados conidiosporas, son esporas asexuales no móviles del hongo.
Entomopatógeno	Dentro de los agentes entomopatógenos se incluyen bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoos fundamentalmente. Generalmente se caracterizan por su escasa toxicidad sobre otros organismos del ambiente, por su aptitud para ser tratados industrialmente, es decir, se cultivan, formulan, empacan, almacenan y se comercializan como un insecticida convencional. Estos insecticidas biológicos penetran en el insecto plaga por ingestión, y también por contacto en el caso de los hongos.
Epizoótica	Relativo o perteneciente a Epizootia.
Epizootia	Enfermedad que acomete a una o varias especies de animales, por una causa general y transitoria. Es como la epidemia en el hombre.

Esporular	Dicho de una planta o de una bacteria, Formar esporas.
Espora	Es una estructura reproductiva en la que el hongo se transforma para su dispersión y para sobrevivir durante largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables.
Germinar	Brotar, crecer, desarrollarse.
Hifas	Las hifas son elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos. Están constituidos por una fila de células alargadas envueltas por la pared celular que, reunidas, forman el micelio.
Inoculación	Introducir una cantidad específica de una sustancia que contiene un microorganismo específico.
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Hongo que crece naturalmente en los suelos de todo el mundo y causa la enfermedad en diversos insectos, actuando como un parásito .
Micelio	Micelio es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo. Dependiendo de su crecimiento se clasifican en reproductores (aéreos) o vegetativos.

Patogenicidad	Capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.
Tween 80	Polisorbato 80, comercialmente conocido como Tween 80, es un no iónico tensoactivo y emulsionante. Se utiliza en para permitir la dispersión de esporas del hongo en agua.
Virulencia	La virulencia designa el carácter patogénico, nocivo y violento de un microorganismo, como una bacteria, hongo o virus, o en otras palabras, la capacidad de un microbio de causar enfermedad. Virulencia deriva del latín <i>virulentus</i> que significa «lleno de veneno».

RESUMEN

En la presente investigación se analizó el proceso de producción del bioplaguicida *Metarhizium Anisopliae*, específicamente las etapas de pretratamiento y secado.

En la etapa de pretratamiento se modificó el método tradicional de humectación de arroz, aplicando un estricto control en el porcentaje de humedad. Se determinó la humedad de máxima producción de hongos, realizando corridas con cinco repeticiones a diferentes porcentajes de humedad. Con esto se constató un incremento del 92% en la productividad del hongo.

En la etapa de secado, se estableció el comportamiento del hongo durante los ocho días que dura dicho proceso, aplicando para esto el análisis de concentración de conidios (indicador de productividad) y el análisis de viabilidad (indicador de calidad). Cada indicador se evaluó con cinco repeticiones durante cada uno de los días de análisis.

ABSTRACT

In the current research was analyzed the production process for the *Metarhizium Anisopliae* biopesticide, specifically the pretreatment and dryings steps.

At the pretreatment step the traditional method of humidification of the rice was modified, applying a strict control on the humidity. The humidity level that produced the highest amount of mushroom was established, this by doing different runs with various humidity percentages. With this it was confirm an increase of 92% in the mushroom productivity.

At the drying step was established the mushroom behave during the eight days that the step last, applying for this the conidian concentration analysis (productivity indicator) and the viability analysis (quality indicator). Each indicator was evaluated with five repetitions for each day of analysis.

OBJETIVOS

General

Estandarizar el método de humidificación del arroz y el método de secado final en el proceso de producción del Bioplaguicida *Metarhizium anisopliae*.

Específicos

Humidificación

1. Evaluar la humedad óptima de crecimiento del hongo aplicando un análisis de concentración de conidios a diferentes porcentajes de humedad.
2. Evaluar un método alternativo de humidificación de arroz y estandarizar con éste los tiempos de humidificación para el arroz precocido de segunda categoría.

Secado

3. Determinar el comportamiento de concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado.
4. Determinar el comportamiento de la viabilidad del hongo en el proceso de secado.

HIPÓTESIS

H1: el porcentaje de humedad en el arroz se relaciona de manera directa con el crecimiento del hongo hasta alcanzar un máximo en algún porcentaje y luego disminuye.

Ho₁: el porcentaje de humedad en el arroz no presenta ninguna incidencia significativa sobre el crecimiento del hongo.

H2: el método propuesto para la humidificación del arroz (método 2) genera mejores resultados de producción, mayor crecimiento de conidios.

Ho₂: el método propuesto para la humidificación del arroz (método 2) no genera diferencias significativas en comparación al método 1.

INTRODUCCIÓN

Metarhizium anisopliae es uno de los plaguicidas biológicos de mayor producción y uso en Guatemala, esto debido a su amplia aplicación en los cultivos de caña de azúcar.

Desde el ámbito de Ingeniería Química, es necesario dar a conocer los lineamientos de trabajo de las industrias dedicadas a la producción de bioplaguicidas y, con el presente estudio, se busca además de dar a conocer dicho proceso de producción, analizar dos etapas específicas del proceso: pre-tratamiento y secado.

El punto de partida para el presente análisis fue la metodología tradicional para la generación del hongo, que se ha utilizado desde la década de los sesentas. Se modificó dicha metodología, buscando con esto mejorar las condiciones de homogeneidad y control en la producción. Los indicadores utilizados fueron la concentración de conidios y la viabilidad del hongo, indicadores de productividad y calidad respectivamente.

Se analizó la etapa de pre-tratamiento, que es la primera fase del proceso de producción. En dicha etapa se estableció la existencia de un porcentaje de humedad de arroz en la que se presenta el máximo desarrollo del hongo. Dicho porcentaje representó el punto de partida para incrementar la productividad. Adicional a lo anterior, se propuso un nuevo método de humectación, que a diferencia del método tradicional, no elimina lixiviados, conservando nutrientes propios del arroz que son útiles para mejorar el desarrollo del hongo.

En cuanto al proceso de secado, se estableció el comportamiento del hongo. Se determinó una disminución en la calidad del producto, mientras que el desarrollo de esporas incrementa durante los ocho días que dura el proceso de secado. Con esto se estableció un bosquejo las características del producto final y su desarrollo en función del tiempo que sea sometido a dicha etapa.

1. ANTECEDENTES

El primer uso de *Metarhizium anisopliae* como agente microbiológico para atacar insectos fue en “1879 cuando Elie Metchnicoff realizó experimento con escarabajos del grano de trigo” (Ref. 3, pág. 16). El empleo de hongos entomopatógenos en el campo, comenzó a finales del siglo XIX, sin embargo fue en Brasil a partir de 1964 cuando adquirió importancia su estudio por parte de los investigadores, después de la aparición epizootica de *Metarhizium anisopliae* sobre cercópodos de la caña de azúcar. “Se ha producido y aplicado este entomopatógeno hasta en 100.000 ha/año de caña de azúcar para el control de *Mahanarva posticata* en todo el mundo” (Ref. 1, pág. 8).

A partir de 1996, tras una plaga masiva en los cultivos de caña de azúcar, la producción de hongo *Metarhizium anisopliae* tomó importancia dentro de la industria guatemalteca. Los hongos entomopatógenos, constituyen hoy en día, el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga, principalmente en los chupadores o succionadores ya que estos no pueden ingerir patógenos que infectan a través del tracto digestivo. “*Metarhizium anisopliae* ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diversos órdenes” (Ref. 2, pág. 23).

Durante los años sesenta y setenta, debido a la problemática presentada en el cultivo de algodón, “en Guatemala se establecieron una serie de métodos denominados Manejo Integrado de Plagas (MIP)” (Ref. 4, pág.14), dentro de los que se incluían los primeros métodos biológicos para el control de plagas utilizando parásitos, depredadores y entomopatógenos. Es del MIP de donde

data método tradicional de producción de hongos entomopatógenos aplicado en Guatemala.

Hasta la fecha se han evaluado “diferentes tipos de sustratos naturales para el crecimiento del hongo, como maíz, frijol, soya, arroz y trigo; pero los más utilizados son arroz y trigo” (Ref. 8, pag. 54). Con el paso de los años se ha modificado el proceso de producción, existiendo hasta el momento tres métodos de producción de hongos entomopatógenos: artesanal, semiartesanal e industrial. “En Guatemala y Centro América se utiliza el método semiartesanal” (Ref. 5, pág. 36).

Actualmente acerca del proceso de producción del hongo sólo existe un documento llamado “Producción y manejo del hongo *Metarhizium Anisopliae*”, publicado por CENGICAÑA en julio de 1998. En dicho documento se describen paso a paso los parámetros de producción para el desarrollo del hongo. El método descrito es el método estándar utilizado desde los inicios del MIP en Guatemala. Adicional a esto también explica la aplicación de cepas desarrolladas por CENGICAÑA, y que han presentado mejores resultados en los campos de aplicación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Descripción del proceso de producción

2.1.1. Aislamiento e incremento del hongo

En la fase del aislamiento e incremento del hongo se persigue obtener una cantidad adecuada de inóculo que permita mantener una producción constante de conidios. Las actividades que se desarrollan en esta fase se deben realizar bajo condiciones totalmente asépticas. Para lo anterior toda la cristalería e instrumentalización requerida, así como el agua utilizada deberá ser estéril.

La esterilización se obtiene a través del paso por un autoclave en la cual las “condiciones de temperatura (121°C - 124°C) y presión (15 psi)” (Ref. 4 pág. 19) no permiten la persistencia de microorganismos que puedan ser fuente de contaminación. El material a esterilizar debe “mantenerse en la autoclave por un tiempo que oscila entre 20 y 25 minutos” (Ref. 4 pág. 20). Las actividades en esta fase son:

- a. Revigorización y aislamiento
- b. Prematrices
- c. Matrices

a. Revigorización y aislamiento

La revigorización se desarrolla para mantener la capacidad del hongo de parasitar a la chinche salivosa, obteniendo además una mayor capacidad de

esporulación del hongo en medios artificiales. Para la revigorización el material seleccionado en la evaluación de cepas nativas o la cepa requerida es inoculado preferentemente sobre ninfas de chiche salivosa o en su defecto sobre adultos del mismo insecto. Para ello se prepara una suspensión que contenga como mínimo “ $1.5E7$ conidios/ml en agua estéril y surfactante al 0.01%” (Ref. 3 pág. 22).

Los individuos seleccionados de la cría o capturados en cañaverales que no hayan tenido historial de aplicaciones con *Metarhizium* deberán manipularse lo menos posible para evitarles estrés y que mueran antes de la inoculación. Estos individuos se inoculan con la cepa seleccionada por inmersión en la suspensión de conidios anteriormente preparada; posteriormente se trasladan a un medio en donde puedan sobrevivir. Este medio puede ser una caja de petri con papel absorbente en el fondo.

Todo lo anterior se realiza dentro de una cámara de flujo laminar. La manipulación de los insectos se puede realizar con pinzas esterilizadas. Los insectos inoculados se colocan en el medio de sobrevivencia, humedeciendo ligeramente el papel absorbente con agua estéril. Diariamente se revisa el papel y cuando sea necesario se debe agregar agua esterilizada para evitar la desecación.

Transcurridos cuatro a cinco días después de la inoculación (o al morir) se separan los insectos muertos, los cuales se colocan en cámaras húmedas. La cámara húmeda consiste en una caja de petri con papel absorbente en el fondo y sobre el cual se colocan dos portaobjetos en cruz. Esta cámara húmeda deberá estar esterilizada.

El insecto muerto se coloca sobre los portaobjetos en cruz con la ayuda de una pinza esterilizada. Posteriormente se humedece la cámara con agua aplicada con una pipeta Pasteur esterilizada (sobre el papel absorbente). Es importante evitar que el agua se distribuya sobre los portaobjetos para evitar que los insectos se mojen ya que esto favorece el desarrollo de bacterias.

Las cámaras húmedas se deberán revisar diariamente para evitar que el papel absorbente se seque; además, con ello se logra observar la esporulación sobre los insectos, que ocurre regularmente entre los cuatro a siete días después de colocados en las cámaras húmedas. La esporulación inicialmente deberá provenir de las líneas de unión de las placas del cuerpo, lo que indicará que efectivamente el hongo infectó y penetró al insecto.

Al momento de tener insectos esporulados con el hongo *Metarhizium anisopliae* de la cepa requerida es necesario aislar los conidios sobre un medio artificial para inducir el crecimiento de colonias. El medio artificial utilizado para esta actividad puede ser papa-dextrosa-agar (PDA) o medio de haba (Vicia Fava). El medio de habas es ideal para el crecimiento de colonias de *Metarhizium anisopliae* y se prepara a partir de haba, sacarosa y agar-agar. El aislamiento se realiza con la ayuda de un microscopio estereoscopio, tomando con una aguja de disección estéril los conidios que se han desarrollado sobre el insecto revigorizado y sembrándolos inmediatamente en el medio de cultivo.

Todo lo anterior es indispensable que se desarrolle bajo estrictas normas de asepsia en el interior de una cámara de flujo laminar. Las cajas de Petri se sellan con Parafilm y posteriormente se colocan en un lugar adecuado para la incubación del hongo. Para lo anterior los aislamientos “permanecen dos días en oscuridad total y posteriormente 10 a 12 días bajo iluminación permanente, a una temperatura de 26°C” (Ref. 3, pag. 21). Transcurrido ese período se

pueden observar colonias esporuladas. De un insecto revigorizado se pueden aislar el número de colonias que se requieran.

b. Prematrices

Las prematrices son una fase opcional de incremento del hongo. Una prematriz consiste en un tubo de ensayo con rosca en el cual se ha colocado medio de cultivo (preferiblemente haba). De una colonia se pueden preparar de 20 a 30 prematrices. Para el efecto, bajo condiciones de asepsia y con el equipo e instrumentos estériles, se corta la colonia proveniente del aislamiento con un bisturí y se colocan los trozos de medio de cultivo y conidios en el interior de “un tubo de ensayo que contenga agua estéril y surfactante al 0.01%” (Ref. 3, pág. 18).

A través de agitación manual se suspenden los conidios en el agua y se separan del medio de cultivo con la ayuda de un filtro (puede ser de gasa estéril). La suspensión deberá contener una cantidad superior a $1E8$ conidios por ml. “Se agregan 2 ml. de la suspensión en cada prematriz deseada” (Ref. 4 pág. 26). Se dispersa sobre el medio y se elimina el exceso de la suspensión. El período y las condiciones de incubación son similares a las descritas para el aislamiento de colonias, con la diferencia que no se sella el tubo de ensayo, dejando ligeramente floja la tapa.

La incubación del hongo se realiza con los tubos (prematrices) colocados en forma horizontal. Al final se obtienen medios totalmente colonizados con los conidios del hongo. Las prematrices pueden utilizarse inmediatamente, en caso contrario deben “almacenarse en un ambiente con la temperatura inferior a los 6°C ” (Ref. 3 pág. 26). A las prematrices que se almacenan se les aprieta la tapa y se sellan con papel parafilm.

c. Matrices

Las matrices son recipientes de vidrio con la tapadera plástica perforada para acondicionar un filtro preparado con algodón y gasa. El medio de cultivo utilizado en las matrices es arroz precocido. Para la preparación del medio de cultivo primero se le aplica un tratamiento térmico con arroz.

El tratamiento térmico se realiza con agua en estado de ebullición, en la cual se agrega el arroz, permaneciendo allí durante 6 a 7 minutos (según el grado de dureza del arroz). Cuando el arroz se pueda quebrar fácilmente con la uña, se separa el agua con un tamiz, enfriándolo inmediatamente en forma manual por agitación con una paleta.

Posteriormente “se agregan 300 gramos en cada recipiente de vidrio y se esteriliza” (Ref. 4 pág. 32). Paralelamente se deberá preparar la fuente de inóculo, la cual puede provenir de las prematrices o directamente de las colonias aisladas. Si proviene de las prematrices se pueden preparar 10 matrices por cada prematriz. El hongo esporulado en la prematriz es separado del medio de cultivo a través de lavado por agitación con agua estéril y un surfactante al 0.01%.

Es importante que “la concentración de conidios sea superior al $1E8$ por mililitro” (Ref. 4, pág. 32) de la suspensión preparada, con la ayuda de una jeringa desechable. Para que esta actividad pueda desarrollarse es necesario destapar los recipientes de vidrio y depositar rápidamente la suspensión directamente sobre el arroz, volviendo a colocar la tapa inmediatamente. Posteriormente el inóculo se distribuye por todo el medio de cultivo (arroz) a través de agitación manual. Si el inóculo proviene directamente de colonias, la

suspensión se prepara al igual que la forma descrita para la inoculación de prematrices.

Con una colonia bien esporulada se pueden inocular 10 matrices. Al tener inoculadas las matrices se les proporciona las mismas condiciones y tiempo de incubación que en el caso de los aislamientos, dejándolas incubar en forma horizontal. Al tener matrices esporuladas, se pueden utilizar inmediatamente para la preparación de la suspensión inoculadora en la fase de producción de conidios o “almacenar a 6°C por un tiempo no mayor a cuatro meses” (Ref. 3, pág. 28). En este caso, las matrices no se sellan.

2.1.2. Producción de conidios

La fase de producción de conidios comprende todos los pasos necesarios para obtener comercialmente conidios de la cepa seleccionada. La cantidad de conidios producidos dependerá de la capacidad de las instalaciones, del rendimiento de la cepa producida, del manejo del hongo durante la etapa de incubación y del control de factores como iluminación y temperatura. La fase de producción de conidios comprende:

- a. Preparación del medio de cultivo
- b. Preparación de la suspensión inoculadora
- c. Inoculación y preincubación
- d. Incubación
- e. Secado
- f. Almacenamiento

a. Preparación del medio de cultivo

Para la fase de producción comercial de conidios puede utilizarse como medio de cultivo arroz con tratamiento térmico previo. El tratamiento térmico es similar al descrito para el medio de cultivo utilizado en las matrices. El medio de cultivo se deja enfriar y “se agregan 280 gramos en bolsas de polipropileno” (Ref. 2, pág. 42) resistente a las condiciones de la autoclave. Posteriormente se cierran en su parte superior haciéndole tres dobleces y engrapado (Figura 1).

Esta labor se realiza con el objetivo de facilitar la manipulación de las bolsas y evitando además la posibilidad de ingreso de microorganismos al interior. Es importante que en el interior de la bolsa se conserve una cámara de aire. Las bolsas preparadas de esta forma “se esterilizan en una autoclave por 25 minutos a una temperatura de 121-124 °C y una presión de 15 psi” (Figura 2), (Ref. 3, pág. 17). Después se deja enfriar.

Figura 1. **Empaque del medio de cultivo**



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Figura 2. **Tratamiento térmico**



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

b. Preparación de la suspensión inoculadora

Al mismo tiempo que se está preparando el medio de cultivo se deberá preparar la suspensión inoculadora (Figura 3). La suspensión se prepara a partir de las matrices esporuladas descritas anteriormente. Para el efecto se necesita contar con cristalería estéril; ya que de dicha suspensión dependerá toda la producción comercial.

Las esporas desarrolladas en cada matriz se lavan con una solución de agua estéril y surfactante al 0.01% por agitación y separadas del arroz a través de filtración con un embudo con gasa. Este procedimiento se repite varias veces para cada matriz a manera de dejar totalmente limpio el arroz. El filtrado se vuelve a pasar por un nuevo filtro preparado con un embudo con gasa para evitar que en la suspensión final existan partículas grandes.

Figura 3. **Preparación de solución inoculadora**



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

A la suspensión obtenida del filtrado “se le agregan 60 ppm de nitrógeno disuelto en agua y antibiótico a razón de 250 mg/l de suspensión final” (Ref. 4, pág. 36). El volumen requerido se completa con agua estéril. “La suspensión final deberá contener un mínimo de $1E8$ conidios/ml” (Ref. 4, pág. 36). Es preferible que la suspensión inoculadora se prepare en un matraz 1000 ml por permitir altos volúmenes y para que la suspensión final pueda inocularse con jeringa de llenado automático (Figura 4). Al tener lista la suspensión se deberá tapar cada matraz de erlenmeyer y mantenerlo en un lugar aséptico. La suspensión deberá inocularse lo antes posible.

c. Inoculación y preincubación

Para la inoculación es necesario contar con un área específica que reúna características de alta asepsia. En esta área se han enfriado las bolsas con el medio de cultivo luego de su paso por la autoclave. A cada bolsa se le agregan 16 ml de la suspensión inoculadora en forma de inyección en uno de los extremos de la misma (Figura 4). El inóculo se dispersa en todo el medio de

cultivo contenido en cada bolsa (Figura 5) a través de agitación, teniendo el cuidado de no tocar con las manos los extremos laterales de la misma.

Figura 4. **Inyección del inóculo**



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Las bolsas inoculadas permanecen en preincubación por dos días. Esto consiste en dejar las bolsas en reposo sobre estanterías, “en total oscuridad y a una temperatura de 28°C” (Referencia 3, pág. 22). Con estas condiciones se estimula la germinación de los conidios y la producción del micelio. Al final del período de preincubación, las bolsas se agitan nuevamente (para romper el micelio), lo que estimulará una mayor producción de micelio y conidios.

Durante esta labor el arroz aún no ha cambiado de color. Las bolsas no se deben manipular por sus extremos, ya que se puede contaminar el medio de cultivo con bacterias provenientes de las manos. Es importante que las estanterías estén limpias y deben rociarse con alcohol etílico al 95% antes de colocar las bolsas. Las manos de las personas que realicen todas las labores durante la incubación también deben desinfectarse con alcohol etílico.

Figura 5. **Agitación de bolsas inoculadas**



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

d. Incubación

La incubación del hongo debe realizarse en un espacio con suficiente iluminación, “proporcionándole luz durante 19 horas diarias a una temperatura de 26°C” (Referencia 3, pág. 15). Diez días después de la ruptura de micelio (12 días después de la inoculación) se realiza una nueva agitación manual del arroz”. En este momento el arroz presenta una coloración verde debido a la esporulación del hongo.

El objetivo de esta segunda agitación es estimular una mayor esporulación del hongo. Al realizar la agitación del arroz se debe tener cuidado de no dispersar demasiado los conidios ya que pueden adherirse a las paredes humedecidas de la bolsa de polipropileno.

Transcurridos 16 días después de la inoculación de las bolsas se drenan, acción que consiste en eliminar el exceso de agua a través de un corte en una

esquina inferior. “Dos días después (18 días después de la inoculación), el hongo está listo para su utilización” (Referencia 3, pág. 18). De no utilizar inmediatamente el hongo es necesario secarlo. En este momento, la bolsa se observa completamente verde debido a la esporulación del hongo.

e. Secado

Como se mencionó anteriormente, si el hongo no se va a utilizar inmediatamente es necesario secarlo para que pueda resistir durante mayor tiempo las condiciones de almacenamiento. Para este trabajo se utilizan “bandejas plásticas de 29 pulgadas de largo por 16 de ancho y 9 de alto” (Ref. 3 pág. 20) en las cuales se seca el contenido de 10 bolsas de polipropileno.

Esta actividad deberá realizarse con sumo cuidado para no perder demasiados conidios. La misma se realiza cortando la parte superior de las bolsas con una tijera y vaciando el contenido en las bandejas plásticas. Es importante romper todos los agregados formados para permitir un secado más uniforme. Diariamente es necesario rayar el arroz con una paleta de madera limpia, seca y desinfectada con alcohol a manera de favorecer el secado.

Esta labor se debe realizar en un área con una “temperatura de 24 °C y con iluminación constante” (Ref. 3, pág. 22). Después de 8 a 10 días el hongo estará lo suficientemente seco como para someterlo a las condiciones almacenamiento. Es en este momento cuando se deben determinar los rendimientos; que se define como la cantidad de conidios producidos por cada unidad de arroz utilizado en el proceso. Para determinar el rendimiento es necesario realizar una cuantificación de conidios a través de una cámara de Neubauer (el procedimiento se describe en la parte de control de calidad).

Figura 6. **Producto terminado**



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Al conocer el peso de conidios más arroz que se necesita para completar una dosis-hectárea, “una dosis-hectárea equivale a 5 E12 conidios” (Ref. 3, pag.18). se procede a colocar dicha cantidad en una bolsa plástica debidamente identificada. A este procedimiento se le conoce como cosecha del hongo (Figura 6).

f. Almacenamiento

El hongo más arroz dosificado y empacado en bolsas plásticas está listo para el transporte al campo de aplicación o para ser almacenado. El almacenamiento podrá realizarse en un ambiente con un “rango de temperaturas de 2 a 4 °C, en oscuridad y de preferencia con baja humedad relativa” (Ref. 3, pág. 16). Estas condiciones pueden obtenerse en un cuarto frío especialmente diseñado para el almacenamiento del hongo, o en una refrigeradora (dependiendo de la cantidad de hongo a almacenar). Los conidios se pueden almacenar en cuarto frío por un tiempo máximo de cuatro a cinco meses.

2.1.3. Control de calidad

El control de calidad es una fase muy importante en la producción, en la adquisición de conidios de proveedores y en la aplicación a nivel de campo. En este control, para el caso de la producción y de los conidios adquiridos de proveedores, se cuantifican los conidios por gramo de producto (o por mililitro dependiendo de la presentación final) y la viabilidad de los mismo (% de germinación).

En ambas pruebas es importante obtener una muestra representativa del producto que se quiera evaluar para evitar confusión en la interpretación de los resultados. El control de calidad de los conidios incluye su cuantificación de conidios, viabilidad y parasitismo.

2.1.3.1. Cantidad o concentración de conidios

Los conidios se cuantifican con la cámara de Neubauer. Inicialmente se pesa una cantidad de producto (1 gramo de conidios puros) y se suspende en un volumen conocido de una solución de agua (normalmente 1000 ml) y surfactante al 0.01%. Es importante que al mezclar el producto con la solución se rompan todos los agregado que pudieran existir. Al estar suspendido el producto, se realizan diluciones hasta que se tenga una suspensión con una coloración verde tenue.

Con la suspensión preparada se procede a llenar la cámara de Neubauer, la cual se observa en un microscopio compuesto (de preferencia si es con contraste de fases) y se ubican los campos donde se realizarán las lecturas. Se esperan dos minutos para que los conidios se asienten y se procede a la lectura. En la cámara de Neubauer se realizan las lecturas en los

cuadrantes con dimensiones $1 \times 1 \times 0.1$ mm (factor $1E4$), tratando que la cantidad de conidios por campo oscile entre 100 y 200 (manejable con diluciones).

El resultado se expresa en número de conidios por gramo de producto. Cuando la presentación del producto es en líquido, se mide una alícuota (puede ser 1ml) y se realizan diluciones necesarias. La manera de contar los conidios y el resultado se expresa en número de conidios por centímetro cúbico de producto.

2.1.3.1.1. Cámara de *Neubauer*

Cuando se trata con bacterias que forman hongos se desea determinar el número de esporas por mililitro de suspensión preparada. Una de las formas más comunes de obtener esta estimativa es a través del uso de la Cámara de Neubauer (Figura 7), también conocida como hemacitómetro.

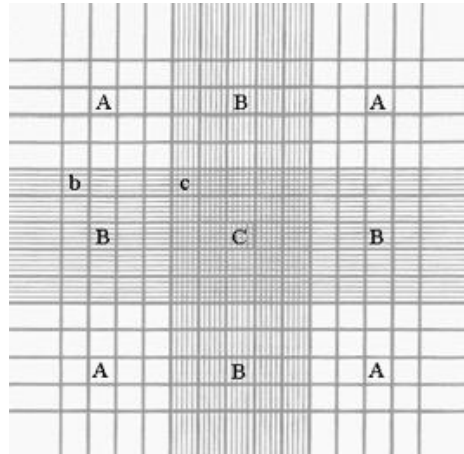
Figura 7. Cámara de *Neubauer*



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

La cámara de Neubauer consiste en una lámina microscópica, poco más grande que un portaobjetos tradicional, con marcas en cuadrantes de medidas conocidas. Observándose con ayuda de un microscopio es posible percibir en la misma la existencia de tres tipos de cuadrantes denominados A, B, C que juntos forman un cuadrado mayor (Figura 8).

Figura 8. **Diagrama de Neubauer vista desde el microscopio**



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Cabe señalar que estos cuadrantes tienen diferentes sub-divisiones, lo que hace que el criterio para elegir el cuadrante en el que se contará esporas sea el tamaño de las esporas a cuantificarse. Por lo general muy pequeñas esporas se cuentan en el cuadrante C, el tamaño intermedio en el cuadrante B, mientras que las esporas grandes se cuentan en el cuadrante A.

La superficie total integrada por nueve cuadrantes es de 9 mm^2 y cada cuadrante (A, B y C) son cuadrados de $1 \times 1 \text{ mm}$. Se utilizan cubreobjetos (especialmente para su uso en una cámara Neubauer), dando como resultado una profundidad de $0,1 \text{ mm}$, que permite obtener un volumen de $0,1 \text{ mm}^3$ en cada cuadrante.

La suspensión de esporas debe ser preparada con “una gota de Tween 80 (Distribuidor) por cada 100 ml ” (Ref. 2, pág. 42), lo que impide la agregación de esporas en grupos, lo que complica y compromete la fiabilidad de contar.

Recuento en el cuadrante A

Se cuenta el número de esporas observadas en los cuatro cuadrantes A.

Cálculos: el cuadrante es de 0,1 mm³ en volumen, las esporas fueron contadas en cuatro cuadrantes, tenemos el número de esporas en un volumen de suspensión igual a:

$$0,1 \text{ mm}^3 \times 4 = 0,4 \text{ mm}^3 (= 0,0004 \text{ cm}^3 = 0.0004 \text{ ml})$$

Para obtener una estimación del número de esporas por ml hace el siguiente cálculo:

$$\text{Concentración (Esporas/ml)} = \frac{\text{Total Esporas}}{4 \times 0.0001 \text{ ml}} \quad \text{Ecuación 1}$$

2.1.3.2. Viabilidad

Viabilidad de un producto es la medida de la cantidad de conidios que tengan la capacidad de germinar, expresada en porcentaje. Para esta evaluación se prepara una suspensión del producto en una solución de agua y surfactante al 0.01% en un tubo de ensayo. La suspensión se homogeniza y se siembra aplicando una gota con una pipeta Pasteur en una caja de petri en la que previamente se han colocado 15 ml. de medio de cultivo y se deja en “incubación durante 20 horas en oscuridad a una temperatura aproximada de 26°C” (Ref. 3, pág. 28). Luego se realizan las lecturas de germinación.

En cada caja de petri se efectúan tres lecturas con ayuda de un microscopio de contraste de fases, utilizando un aumento de 400X, se enfocan los tres campos contando la cantidad de conidios germinados y totales en cada uno.

Con lo anterior se calcula el porcentaje de germinación de cada campo con la siguiente fórmula: viabilidad o porcentaje de germinación. (Ref. 4, Pág.

$$G = \frac{C_g}{C_t} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

G = Porcentaje de germinación

C_g = Número de conidios germinados

C_t = Número de conidios totales

Las tres lecturas (correspondientes a tres campos) se promedian, teniendo con ello el porcentaje de germinación de cada muestra. Si la formulación del producto es líquida se toma una alícuota de la misma y se diluye en una solución de agua y surfactante al 0.01%, procediendo de la misma manera que para los productos en estado sólido. Con los datos de viabilidad y cuantificación de conidios se procede a dosificar con base en la aplicación de 5E12 conidios viables por hectárea.

2.1.3.3. Parasitismo

La evaluación del parasitismo sirve para verificar la eficiencia del control del hongo sobre el insecto plaga. Para el efecto se recolectan del campo 100 adultos vivos después de cada aplicación, los cuales se colocan en cajas petri estériles y húmedas similares a las descritas en la revigorización del hongo hasta que los insectos mueran.

Con los insectos muertos, se procede a realizar cámaras húmedas (tal como se describió para la revigorización), desinfectando los insectos previamente en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante un minuto y

tres lavados posteriores en agua estéril. Los insectos se secan con un papel previamente esterilizado y con la ayuda de pinzas estériles se colocan en los portaobjetos de la cámara húmeda.

Las observaciones y el control de la humedad en el interior de la cámara se realizan diariamente. Finalmente se efectúa un recuento del total de insectos parasitados (que presenten estructuras típicas provenientes de las uniones de las placas del cuerpo) y se relaciona con la cantidad total de insectos observados, pudiendo así calcular el porcentaje de parasitismo. La recolección de los adultos se realiza un día después de la aplicación cuando está se haya dirigido a los adultos y cuatro días después de la aplicación si fue a ninfas.

2.2. Ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae* después de su aplicación (combate de la plaga)

En general los hongos entomopatógenos desarrollan las siguientes fases sobre su hospedante: “Germinación, Formación de Apresorios, Formación de Estructuras de Penetración, Colonización y Reproducción” (Ref. 9, pág. 83).

El proceso se inicia cuando la espora o conidio se adhiere a la cutícula del insecto, luego desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y “la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas post-inoculación” (Ref. 8, pág. 54).

En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula.

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación.

Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de la relación patógeno-hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado destruxinas, demetildextruxina y protodextruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos.

Las destruxinas afectan varios organelos tales como mitocondria, retículo endoplásmico y membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino, túbulos de Malpighi, hemocitos y tejido muscular. La esporulación ocurre en 2 a 3 días, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente.

La infección por el entomopatógeno puede ser afectada principalmente por la baja humedad relativa y por la falta de habilidad para utilizar los nutrientes disponibles sobre la superficie de la cutícula o por la falta de factores necesarios para el reconocimiento de un hospedero susceptible o sitio de infección penetrable. El reconocimiento de un hospedero susceptible involucra signos químicos y topográficos. También puede fracasar la invasión del hongo

por la presencia de compuestos inhibitorios tales como fenoles, quinonas y lípidos en la superficie de la cutícula.

Los síntomas que causan los entomopatógenos son variables: las ninfas disminuyen sus movimientos, disminuyen la producción de espuma y pueden abandonar los lugares de ataque. Los adultos infectados presentan movimientos lentos, no se alimentan, reducen su radio de vuelo y las hembras no ovipositan. Pueden morir en lugares distantes de donde fueron contaminados. “El ciclo total de la enfermedad es de 8 a 10 días” (Ref. 1, pág. 37).

Después de la muerte, los individuos presentan un crecimiento micelial blanco seguido por la típica esporulación verde. En algunas ocasiones no se presenta la esporulación sobre el tegumento, solamente se ve la presencia de micelio y se debe a condiciones inadecuadas de humedad durante el proceso de esporulación.

2.3. Aplicaciones industriales

2.3.1. Combate de plagas (chinche salivosa)

El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, debe aplicarse al detectar “niveles poblacionales iguales o superiores a 0.15 ninfas/tallo o 0.1 adultos/tallo o 47 adultos/trampa/semana” (Ref. 8, pág. 40). Es necesario realizar el estricto control de los niveles poblacionales del insecto, de los aislamientos del hongo utilizado, de la calidad del hongo adquirido, su manejo pre-aplicación, de la concentración de esporas aplicadas y del método de aplicación.

CENGICAÑA cuenta con tres cepas que pueden utilizarse dependiendo del estrato altitudinal en que se encuentre el problema de infestación o del estado de desarrollo del insecto. La cepa CG 93-3 se adapta bien al estrato medio y es eficiente en el control de ninfas y adultos, la cepa CG 94-4 al estrato bajo y la cepa PL-43 (de origen brasileño) a algunas zonas del estrato bajo (Ref. 1, pág. 32).

Para establecer la calidad del hongo adquirido en casas comerciales, CENGICAÑA ha establecido el servicio de análisis de calidad del producto, en el cual se cuantifica la viabilidad de las esporas y su concentración. Para que esta calidad no sea afectada durante el tiempo entre la adquisición del hongo y su aplicación en el campo, se aconseja mantener el producto bajo condiciones de aire acondicionado (20°C) y con oscuridad, si el tiempo es menor a 10 días. Si el tiempo es mayor a 10 días, debe mantenerse en refrigeración (4 °C). (Ref. 4).

La concentración de conidios (esporas) aplicadas al campo es de 5×10^{12} por hectárea. Es aconsejable dirigir el producto a las ninfas con equipo de aplicación terrestre, preferentemente con bombas mochila y cuando es dirigida a adultos, con aplicaciones aéreas.

El ciclo de *Metarhizium anisopliae* se completa entre 7 y 10 días. Esto incluye 3-4 días germinación de las esporas y penetración de las hifas al hemocele a través de la cutícula. Esto indica que el insecto infectado debería morir entre 7 y 10 días después de entrar en contacto con el hongo (Ref. 1, pág. 53).

2.3.2. Catalizador en la producción de biodiesel

Los científicos han encontrado una manera mucho mejor para hacer biodiesel. Su nuevo método podría reducir el costo y aumentar la eficiencia energética de la producción de combustible.

En lugar de mezclar los ingredientes y aplicar calefacción durante horas, los ingenieros químicos hacen pasar el aceite de girasol y metanol a través de un lecho de pellets a partir de esporas de hongos. Una enzima producida por el hongo realiza el trabajo de hacer biodiesel con una eficiencia impresionante (Ref. 2, pág. 18).

Por lo general, el biodiesel se hace mediante la mezcla de metanol con lejía y aceite vegetal, luego de calentar durante varias horas la reacción produce moléculas energéticas llamadas ésteres. Desafortunadamente calentando la mezcla es un desperdicio enorme de energía y un punto de venta importante de los combustibles alternativos es la eficiencia. Una enzima llamada lipasa puede vincular la molécula orgánica al metanol sin ningún tipo de calefacción adicional, pero la enzima pura es cara.

Potumarthi tiene una solución simple. Para no molestarse en la purificación de la lipasa sería más fácil simplemente encontrar un organismo que produce gran cantidad de la enzima y aplastarla en pelotillas. En este caso, el hongo *Metarhizium anisopliae* hace el truco.

Recientemente, varios grandes centros de investigación han surgido para desarrollar mejores formas de fabricar biocombustibles. Teniendo en cuenta que con un puñado de ingenieros químicos se puede lograr mucho en lo que

parece ser un presupuesto muy reducido, el futuro de los combustibles alternativos se ve muy bien.

Ravichandra Potumarthi mostró su trabajo durante una sesión de póster en la (Figura 9).

Figura 9. **Prototipo de producción de biodiesel utilizando *Metarhizium anisopliae* como catalizador**



Fuente: Ravichandra Potumarthi, **Instituto indio de tecnología química.**

2.3.3. Clasificación comercial del arroz

Arroz con cáscara: arroz que ha mantenido su cáscara después de la trilla.

Arroz descascarado: (arroz pardo o arroz de embarque) es el arroz con cáscara del que sólo se ha eliminado la cáscara. El proceso de descascarado y manipulación puede ocasionar una pérdida parcial del salvado.

Arroz elaborado: (arroz blanco) es el arroz descascarado del que se han eliminado total o parcialmente, por elaboración, el salvado y el germen. Éste a su vez se clasifica en:

- Arroz blanco de primera categoría: arroz con menos del 10% de granos no enteros
- Arroz blanco de segunda categoría: arroz con granos no enteros

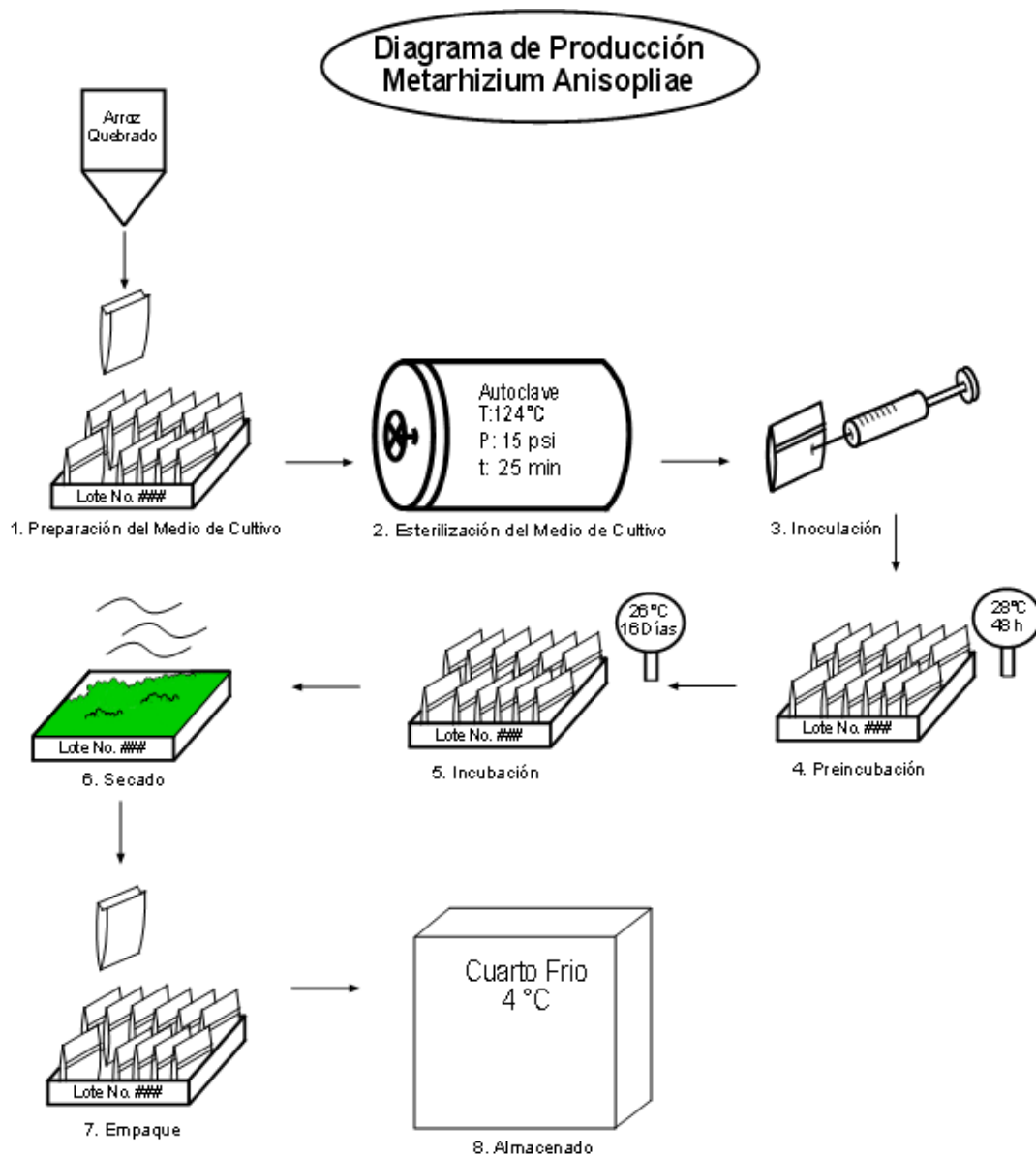
Arroz precocido: puede ser arroz descascarado o elaborado que se obtiene remojando en agua el arroz con cáscara o descascarado y sometiéndolo a un tratamiento térmico, de forma que se gelatinice completamente el almidón, seguido de un proceso de secado (Ref. 5, pag. 38). Este a su vez se clasifica en:

- Arroz precocido de primera categoría: arroz con menos del 10% de granos no enteros
- Arroz precocido de segunda categoría: arroz con granos no enteros

Arroz glutinoso o arroz ceroso: granos de variedades especiales de arroz que presentan un aspecto blanco y opaco. El almidón del arroz glutinoso se compone casi totalmente de amilopectina. Después de cocido tiende a pegarse.

2.3.4. Esquema del proceso de producción

Figura 10. Esquema del proceso de producción



Fuente: Emilia Yesenia Arana Vicente. **Agroindustrias Successo.**

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Variables

Tabla 1. Definición operacional de variables

No.	Variables		Definición
	Independientes	Dependientes	
1		Concentración de conidios	Indica la cantidad de conidios por litro en solución. Se utiliza para verificar el crecimiento de conidios en una muestra determinada.
2		Porcentaje de humedad del arroz	Indica el porcentaje de agua que absorbe el arroz tras ser sometido a un exceso de humedad en sus paredes. Se toma como base cero la humedad que contiene inicialmente. (Aproximadamente 15 %)
3	Tiempo de humectación		Tiempo que se pone en contacto el arroz con agua para su respectiva absorción.
4		Viabilidad de conidios	Se refiere a la cantidad de conidios que germinan adecuadamente para su uso como control biológico.
5	Tiempo de secado		El tiempo de secado se refiere a la cantidad de días que pasa el producto final en el proceso de secado.

Fuente: Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, CENGICAÑA. **Producción y Manejo del Hongo *Metarhizium anisopliae***. Pág. 24

3.2. Delimitación del campo de estudio

El estudio de la presente investigación se enfocó en dos áreas del proceso de producción, en la preparación del medio de cultivo y en la etapa de secado. En la primera se estableció las condiciones óptimas de operación y se generó un método estándar de humectación de arroz, buscando una mayor productividad. En el segundo caso se analizó el comportamiento de desarrollo del hongo en el proceso de secado para tener una referencia en futuras investigaciones.

El análisis inició en la preparación del medio de cultivo, estudiando la humectación del arroz. Se analizó el porcentaje de humedad presente en el arroz antes de entrar a la autoclave y sus efectos en el crecimiento del hongo *Metarhizium anisopliae*. En esta área también se evaluó un método alternativo de humectación del arroz y se comparó los resultados de crecimiento de hongo con el proceso utilizado normalmente.

En el segundo proceso analizado, el proceso de secado del producto final, se evaluó el comportamiento del hongo desde el inicio de dicho proceso (día 1) hasta su respectivo almacenamiento (día 8). Los indicadores de productividad utilizados fueron la concentración de conidios y la viabilidad de conidios, dos técnicas de análisis microbiológico que generan datos de la calidad y cantidad de producción respectivamente, verificando así la efectividad en las condiciones de dicha etapa.

3.3. Recursos humanos disponibles

Para el respectivo estudio, las muestras pasaron por todo el proceso de producción. Se contó con el apoyo de todos los operarios encargados en las diferentes áreas del proceso de producción, para alcanzar los objetivos con éxito mediante el manejo adecuado de las muestras.

3.4. Recursos materiales disponibles

Reactivos:

- *Metarhizium anisopliae*
- Agua potable
- Butanol como desinfectante
- Tween 80 como surfactante
- Arroz precocido de segunda categoría (3 quintales aproximadamente)

Equipo e instrumentos:

- Autoclave
- Cajas de Petri
- Vasos de precipitados de 100 ml
- Arroz quebrado
- (3 quintales aproximadamente)
- Agua desmineralizada
- Bolsas de polipropileno para cada muestra (100 unidades)
- Grapas
- Engrapadora

- Balanza analítica
- 2 Recipientes plásticos
- Probeta de 100 ml
- Matraz de 1000 ml
- Pipetas pasteur
- Gotero
- Espátula
- Papel parafilm
- Cámara de Neubauer
- Magnetizador
- Balanza analítica con agitador
- Microscopio
- Tijera
- Contador

3.5. Técnica cuantitativa

Se utilizó un estudio experimental para analizar las respectivas áreas del proceso. En el primer caso para analizar el proceso de humectación (Pretratamiento del medio de cultivo) se estableció el porcentaje de humedad óptimo de crecimiento de hongo. Este resultado se obtuvo mediante una correlación entre el porcentaje de humedad inicial y el crecimiento de conidios. Para evaluar el crecimiento del hongo se utilizó una técnica de conteo de células llamada Análisis de Concentración de Conidios.

Seguidamente, también en el pretratamiento se evaluó un método alternativo para la humectación de arroz, comparándolo con el original y determinando cual generaba mejores resultados de crecimiento de conidios.

Por último en el proceso de secado se analizó el comportamiento de desarrollo del hongo durante los ocho días de estadía en el cuarto de secado, utilizando como método de recolección de datos la concentración de conidios y la viabilidad del hongo. Se realizaron lecturas diariamente durante todo el período. Por último se generaron suficientes datos para correlacionar el comportamiento del hongo durante los días del proceso.

Como base alimenticia para el crecimiento del hongo se utilizó arroz precocido de segunda categoría y se verificó que en cada paso de la producción se aplicará de forma homogénea los tratamientos a cada una de las muestras o y/o lotes de estudio.

3.6. Recolección y ordenamiento de la información

3.6.1. Pre-tratamiento

3.6.1.1. Análisis de concentración de conidios

Instrumentos:

- a. 1 Matraz de 1000 ml
- b. 1 Probeta de 1000 ml
- c. 1 Pipeta pasteur
- d. 1 Gotero
- e. 1 Espátula
- f. Papel parafilm
- g. Cámara de Neubauer
- h. 1 Magnetizador
- i. 1 Balanza analítica con agitador
- j. 1 Microscopio

Reactivos:

- a. Agua desmineralizada
- b. Twin 80 como surfactante
- c. 16.8 kg de *Metarhizium anisopliae*

Procedimiento:

- a. Lavar con jabón desinfectante, abundante agua y secar la cámara de neubauer;
- b. Lavar un matraz de 1000 ml. con su respectivo tapón con suficiente agua y jabón desinfectante; y secarlos;
- c. Lavar con abundante agua y jabón desinfectante una probeta de 1000 ml, luego secarla;
- d. Lavar una pipeta pasteur con abundante agua, luego secarla;
- e. Lavar un gotero con abundante agua y secarlo adecuadamente;
- f. Lavar una espátula con abundante agua y secarla;
- g. Con la probeta medir 1000 ml. de agua desmineralizada y agregarlos al matraz;
- h. Agregar al matraz dos gotas de tween 80;
- i. Agregar al matraz un magnetizador;
- j. En un trozo de papel pesar 1 gramo de producto a analizar;
- k. Agregar el producto del inciso “j” en el matraz de 1000 ml;
- l. Tapar el matraz de 1000 ml. y colocarlo en el agitador durante 1 minuto;

- m. Tomar una alícuota de la mezcla con una pipeta pasteur y colocarla en la cámara de Neubauer;
- n. Analizar con la ayuda de un microscopio la cantidad de conidios en cada uno de los cuadrantes A de la cámara de Neubauer;
- o. Repetir el anterior análisis con una muestra de cada cultivo estudiado.

3.6.1.2. Generación de muestras para la evaluación del efecto de la humedad en el crecimiento de conidios y determinación del porcentaje de humedad óptimo

Instrumentos:

- a. 280 g. de arroz precocido de segunda categoría para cada muestra
- b. 1 bolsa de polipropileno para cada muestra
- c. Agua potable
- d. 3 grapas
- e. 1 engrapadora
- f. 1 balanza analítica
- g. 1 recipiente plástico
- h. 1 probeta de 100 ml

Procedimiento:

- a. Pesar la cantidad de arroz quebrado indicada en cada una de las tablas 2, 4, 6, 8, 10, 12;

- b. Depositar el arroz pesado en un recipiente plástico;
- c. A cada muestra agregarle la cantidad de agua potable necesaria para llegar al peso final indicado en las tablas 2, 4, 6, 8, 10, 12;
- d. Colocar una tapadera sobre el recipiente;
- e. Esperar a que el arroz absorba la humedad;
- f. Pesar nuevamente y empacar en bolsas de polipropileno;
- g. Identificar la bolsa con su porcentaje y número de repetición (Ver tablas 2, 4, 6, 8, 10, 12).

3.6.1.3. Análisis de un lote evaluado al porcentaje óptimo utilizando el método de humidificación 1

Instrumentos:

- a. Recipiente plástico
- b. Ventilador
- c. Escurridor
- d. Báscula
- e. Bolsas polipropileno
- f. Grapas
- g. Engrapadora
- h. Cronómetro

Reactivos:

- a. 45.359 kg de Arroz precocido de segunda categoría
- b. Agua

Procedimiento:

- a. Introducir un quintal de arroz en un recipiente plástico con capacidad suficiente;
- b. Agregar la cantidad de agua suficiente para cubrir 4 centímetros sobre la superficie del arroz;
- c. Esperar 10 minutos y depositar el arroz en un equipo para escurrir el agua en exceso;
- d. Pesar el arroz en su totalidad para verificar la humedad absorbida;
- e. Utilizar un ventilador para evaporar el exceso de humedad en las paredes del arroz, durante 10 minutos;
- f. Pesar nuevamente para verificar la humedad absorbida;
- g. Repetir los pasos e y f hasta obtener el porcentaje requerido, verificando tiempos;
- h. Empacar en bolsas de polipropileno, aplicando 280 gramos a cada bolsa, e introducir a la autoclave todas las muestras procedentes de dicho lote para seguir el proceso;
- i. Verificar cada etapa del proceso para que sea estándar en todas las bolsas;
- j. Analizar la concentración de conidios (procedimiento 3.6.1.1) en 12 bolsas representativas del total.

3.6.1.4. Análisis de un lote evaluado al porcentaje óptimo utilizando el método de humidificación 2

Instrumentos:

- a. Recipiente plástico
- b. Escurridor
- c. Báscula
- d. Bolsas polipropileno
- e. Grapas
- f. Engrapadora
- g. Cronómetro
- h. Masking tape

Reactivos:

- a. 45.359 kg de arroz precocido de segunda categoría
- b. Agua

Procedimiento:

- a. Introducir un quintal de arroz quebrado en un recipiente plástico con capacidad suficiente;
- b. Agregar la cantidad de agua suficiente para llegar al porcentaje óptimo (El porcentaje óptimo lo proporciona el análisis del procedimiento 3.6.1.2);
- c. Movilizar con una paleta para homogenizar la humedad;

- d. Esperar 20 minutos y movilizar nuevamente para mantener la homogeneidad. Repetir dicho movimiento en rangos de 20 minutos hasta que absorba el total de humedad libre;
- e. Registrar el tiempo necesario para que absorba toda la humedad en exceso;
- f. Pesar para verificar que la humedad absorbida corresponda al porcentaje esperado;
- g. Verificar el tiempo;
- h. Empacar en bolsas de polipropileno con 280 gramos de arroz húmedo e introducir a la autoclave todas las muestras procedentes de dicho lote para seguir el proceso;
- i. Verificar cada etapa del proceso para que sea estándar en todas las bolsas;
- j. Analizar la concentración de 12 bolsas representativas del total (utilizando el procedimiento 3.6.1.1).

3.6.2. Proceso de secado

3.6.2.1. Evaluación de concentración de conidios en el proceso de secado

Para el análisis en el proceso de secado se utilizó las muestras resultantes del método 2 (ver procedimiento 3.6.1.4). Utilizando el método de análisis de concentración de conidios descrito en el inciso 3.6.1.1 se determinó el crecimiento de conidios durante cada uno de los días que las muestras del grupo permanecieron en el proceso de secado.

3.6.2.2. Evaluación del comportamiento de la viabilidad del hongo durante el proceso de secado

Un bosquejo de la calidad del producto se determina mediante un análisis de viabilidad. Con el objetivo de analizar a detalle el comportamiento del bioplaguicida en el proceso de secado se analizará la viabilidad de las muestras durante cada uno de los días del tiempo estipulado.

El análisis de viabilidad se realizará bajo el siguiente procedimiento:

- a. En un tubo de ensayo desinfectado agregar una gota de surfactante (tween 80);
- b. Agregar 0.1 gramo de producto pulverizado;
- c. Agregar 10 ml. de agua;
- d. Con un a pipeta pasteur agregar una gota de la anterior solución en una caja de petri en la que previamente se han colocado medio de cultivo (agar);
- e. Dispersar la gota sobre el medio de cultivo (con ayuda de una varilla);
- f. Dejar en incubación durante 20 horas en oscuridad a 26 °C;
- g. Con ayuda de un microscopio realizar el conteo de conidios germinados;
- h. Todo el procedimiento se realiza con equipo esterilizado dentro de una cámara de de flujo laminar.

3.7. Tabulación, ordenamiento y procesamiento de la información

3.7.1. Pre-tratamiento

Tabla 2. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 20% de humedad**

Muestras 20%					
No.	Masa inicial (g)		Masa final (g)		% Humedad
	Con tara	Sin tara	Con tara	Sin tara	
1	213.7	210	265.7	262	20%
2	213.7	210	265	261.3	20%
3	213.7	210	266.4	262.7	20%
4	213.7	210	265.3	261.6	20%
5	213.7	210	266.6	262.9	20%

Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuación 3, Pág. 144.

Tabla 3. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 20% de humedad**

CRECIMIENTO DE CONIDIOS 20%						
Lectura de cuadrantes Neubauer (Conidios)				Promedio	Concentración (Conidios/ml)	Concentración (Conidios/L)
1	2	3	4			
46	32	34	41	38.25	3.83E+08	3.63E+08
33	46	34	35	37	3.70E+08	
46	31	38	32	36.75	3.68E+08	
37	35	31	30	33.25	3.33E+08	
35	33	40	37	36.25	3.63E+08	

Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4, Págs. 143 y 144.

Tabla 4. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 21% de humedad**

Muestras 21%					
No.	Masa inicial (g)		Masa final (g)		% Humedad
	Con tara	Sin tara	Con tara	Sin tara	
1	213.7	210	268.3	264.6	21%
2	213.7	210	269.1	265.4	21%
3	213.7	210	267.9	264.2	21%
4	213.7	210	268.2	264.5	21%
5	213.7	210	268.9	265.2	21%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuación 3, Pág. 144.

Tabla 5. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 21% de humedad**

CRECIMIENTO DE CONIDIOS 21%						
Lectura de cuadrantes Neubauer (Conidios)				Promedio	Concentración (Conidios/ml)	Concentración (Conidios/L)
1	2	3	4			
39	39	39	39	39	3.90E+08	4.46E+08
43	40	46	45	43.5	4.35E+08	
36	28	44	23	32.75	3.28E+08	
57	45	41	60	50.75	5.08E+08	
61	53	56	57	56.75	5.68E+08	

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4, Págs. 143 y 144.

Tabla 6. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 22% de humedad**

Muestras 22%					
No.	Masa inicial (g)		Masa final (g)		% Humedad
	Con tara	Sin tara	Con tara	Sin tara	
1	213.7	210	274.5	270.8	22%
2	213.7	210	272.5	268.8	22%
3	213.7	210	271.4	267.7	22%
4	213.7	210	272.9	269.2	22%
5	213.7	210	273.5	269.8	22%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuación 3, Pág. 144.

Tabla 7. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 22% de humedad**

CRECIMIENTO DE CONIDIOS 23%						
Lectura de cuadrantes Neubauer (Conidios)				Promedio	Concentración (Conidios/ml)	Concentración (Conidios/L)
1	2	3	4			
55	71	69	68	65.75	6.58E+08	6.04E+08
47	56	64	53	55	5.50E+08	
52	61	48	65	56.5	5.65E+08	
69	68	61	56	63.5	6.35E+08	
72	59	53	61	61.25	6.13E+08	

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 8. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 23% de humedad**

Muestras 23%					
No.	Masa inicial (g)		Masa final (g)		% Humedad
	Con tara	Sin tara	Con tara	Sin tara	
1	213.7	210	274.8	271.1	23%
2	213.7	210	277.3	273.6	23%
3	213.7	210	274.7	271	23%
4	213.7	210	275.9	272.2	23%
5	213.7	210	276.4	272.7	23%

Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuación 3.

Tabla 9. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 23% de humedad**

CRECIMIENTO DE CONIDIOS 23%						
Lectura de cuadrantes Neubauer (Conidios)				Promedio	Concentración (Conidios/ml)	Concentración (Conidios/L)
1	2	3	4			
73	76	83	68	75	7.50E+08	7.45E+08
86	80	78	72	79	7.90E+08	
65	84	69	78	74	7.40E+08	
75	73	75	73	74	7.40E+08	
76	64	78	63	70.25	7.03E+08	

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 10. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 24% de humedad**

Muestras 24%					
No.	Masa inicial (g)		Masa final (g)		% Humedad
	Con tara	Sin tara	Con tara	Sin tara	
1	213.7	210	280.4	276.7	24%
2	213.7	210	279.6	275.9	24%
3	213.7	210	278.4	274.7	24%
4	213.7	210	279.8	276.1	24%
5	213.7	210	278.9	275.2	24%

Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuación 3.

Tabla 11. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 24% de humedad**

CRECIMIENTO DE CONIDIOS 24%						
Lectura de cuadrantes Neubauer (Conidios)				Promedio	Concentración (Conidios/ml)	Concentración (Conidios/L)
1	2	3	4			
71	74	84	65	73.5	7.35E+08	7.44E+08
78	65	79	82	76	7.60E+08	
76	78	63	72	72.25	7.23E+08	
67	85	73	76	75.25	7.53E+08	
75	71	76	78	75	7.50E+08	

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 12. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Pesos de muestras al 25% de humedad**

Muestras 25%					
No.	Masa inicial (g)		Masa final (g)		% Humedad
	Con tara	Sin tara	Con tara	Sin tara	
1	213.7	210	284.3	280.6	25%
2	213.7	210	281.9	278.2	25%
3	213.7	210	282.6	278.9	25%
4	213.7	210	283.4	279.7	25%
5	213.7	210	282.1	278.4	25%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuación 3.

Tabla 13. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Concentración de conidios de muestras al 25% de humedad**

CRECIMIENTO DE CONIDIOS 25%						
Lectura de cuadrantes Neubauer (Conidios)				Promedio	Concentración (Conidios/ml)	Concentración (Conidios/L)
1	2	3	4			
63	47	64	50	56	5.60E+08	5.62E+08
50	65	55	60	57.5	5.75E+08	
54	67	48	56	56.25	5.63E+08	
69	52	56	59	59	5.90E+08	
57	44	55	53	52.25	5.23E+08	

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 14. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Resumen de Resultados**

Resumen % humedad óptima	
% Humedad	Concentración de conidios (C/L)
20	3.63E+08
21	4.46E+08
22	6.04E+08
23	7.45E+08
24	7.44E+08
25	5.62E+08

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 3.

Tabla 15. **Evaluación de un método alternativo de humidificación de arroz.**
Resultados de concentración utilizando el Método 1

MÉTODO 1						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	39	56	40	56	47.75	4.78E+08
2	62	72	59	61	63.5	6.35E+08
3	67	76	85	88	79	7.90E+08
4	62	73	91	73	74.75	7.48E+08
5	104	99	108	95	101.5	1.02E+09
6	69	79	87	80	78.75	7.88E+08
7	90	82	96	89	89.25	8.93E+08
8	62	45	66	45	54.5	5.45E+08
9	84	97	85	93	89.75	8.98E+08
10	54	44	51	55	51	5.10E+08
11	58	54	62	65	59.75	5.98E+08
12	98	72	96	45	77.75	7.78E+08
Promedio					72.270833	7.23E+08

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 16. **Evaluación de un método alternativo de humidificación de arroz. Resultados de concentración utilizando el Método 2**

MÉTODO 2						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	197	155	167	147	166.5	1.67E+09
2	146	164	158	161	157.25	1.57E+09
3	237	226	193	230	221.5	2.22E+09
4	84	94	132	112	105.5	1.06E+09
5	169	154	176	149	162	1.62E+09
6	95	108	84	145	108	1.08E+09
7	142	133	117	135	131.75	1.32E+09
8	115	105	137	117	118.5	1.19E+09
9	175	153	164	148	160	1.60E+09
10	163	174	184	184	176.25	1.76E+09
11	95	88	103	86	93	9.30E+08
12	62	57	76	62	64.25	6.43E+08
Promedio					138.70833	1.39E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 17. **Evaluación de un método alternativo de humidificación de arroz.**
Comparación de resultados

Comparación			
MÉTODO	Concentración (C/L)	Diferencia	% Diferencia
1	7.23E+08	6.64E+08	92%
2	1.39E+09		

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuación 5.

3.7.2. Proceso de secado

Tabla 18. **Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 1**

Día 1						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	96	121	132	141	122.5	1.23E+09
2	112	120	118	121	117.75	1.18E+09
3	147	139	135	149	142.5	1.43E+09
4	117	136	125	131	127.25	1.27E+09
5	140	137	128	189	148.5	1.49E+09
6	122	134	137	136	132.25	1.32E+09
Promedio					131.79	1.32E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 19. **Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 2**

Día 2						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	130	131	144	147	138	1.38E+09
2	149	147	181	145	155.5	1.56E+09
3	168	173	148	167	164	1.64E+09
4	212	191	188	179	192.5	1.93E+09
5	178	168	175	157	169.5	1.70E+09
6	169	154	143	180	161.5	1.62E+09
Promedio					163.5	1.64E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 20. **Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 3**

Día 3						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	174	183	171	199	181.75	1.82E+09
2	160	186	178	146	167.5	1.68E+09
3	205	226	275	195	225.25	2.25E+09
4	154	153	164	181	163	1.63E+09
5	185	155	163	171	168.5	1.69E+09
6	184	173	178	179	178.5	1.79E+09
Promedio					180.75	1.81E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 21. **Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 4**

Día 4						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	181	182	174	184	180.25	1.80E+09
2	192	205	182	179	189.5	1.90E+09
3	185	182	181	184	183	1.83E+09
4	193	187	195	182	189.25	1.89E+09
5	195	188	180	179	185.5	1.86E+09
6	184	196	206	175	190.25	1.90E+09
Promedio					186.29	1.86E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 22. **Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 5**

Día 5						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	189	183	201	188	190.25	1.90E+09
2	185	186	189	197	189.25	1.89E+09
3	198	194	208	211	202.75	2.03E+09
4	195	198	197	195	196.25	1.96E+09
5	190	193	183	199	191.25	1.91E+09
6	210	196	217	190	203.25	2.03E+09
Promedio					195.5	1.96E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 23. **Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 6**

Día 6						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	204	212	216	228	215	2.15E+09
2	212	209	185	212	204.5	2.05E+09
3	196	176	193	185	187.5	1.88E+09
4	225	214	225	258	230.5	2.31E+09
5	239	254	213	228	233.5	2.34E+09
6	215	237	219	235	226.5	2.27E+09
Promedio					216.25	2.16E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 24. **Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 7**

Día 7						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	293	236	248	267	261	2.61E+09
2	241	210	228	239	229.5	2.30E+09
3	210	208	211	230	214.75	2.15E+09
4	214	198	211	204	206.75	2.07E+09
5	217	225	229	224	223.75	2.24E+09
6	232	214	221	230	224.25	2.24E+09
Promedio					226.66667	2.27E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 25. **Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado final del producto terminado. Día 8**

Día 8						
No	a	b	c	d	Promedio	Concentración (Conidios/L)
1	255	227	231	231	236	2.36E+09
2	219	231	242	214	226.5	2.27E+09
3	236	225	218	238	229.25	2.29E+09
4	206	217	219	228	217.5	2.18E+09
5	231	218	226	240	228.75	2.29E+09
6	235	224	218	228	226.25	2.26E+09
Promedio					227.375	2.27E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 4.

Tabla 26. **Concentración de conidios del bioplaguicida en el proceso de secado del producto terminado. Resumen de resultados de concentración**

Resultados de concentración	
Día	Concentración (Conidios/L)
1	1.32E+09
2	1.64E+09
3	1.81E+09
4	1.86E+09
5	1.96E+09
6	2.16E+09
7	2.27E+09
8	2.27E+09

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuación 1.

Tabla 27. **Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 1**

Día 1									
No.	a		b		c		Promedio		Viabilidad
	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	
1	203	0	307	5	286	4	265.333	3	99%
2	226	2	226	1	216	1	222.667	1.3333333	99%
3	238	2	374	7	247	5	286.333	4.6666667	98%
4	304	2	250	1	364	1	306	1.3333333	100%
5	238	2	235	2	235	0	236	1.3333333	99%
6	219	1	246	2	231	2	232	1.6666667	99%
Viabilidad promedio									99.16%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 2, 6 y 7.

Tabla 28. **Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 2**

Día 2									
No.	a		b		c		Promedio		Viabilidad
	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	
1	312	4	358	4	292	3	320.667	3.6666667	99%
2	348	2	403	4	342	5	364.333	3.6666667	99%
3	270	0	250	0	228	1	249.333	0.3333333	100%
4	290	2	263	3	279	4	277.333	3	99%
5	310	5	357	2	216	5	294.333	4	99%
6	265	3	211	2	276	2	250.667	2.3333333	99%
Viabilidad promedio									99.07%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 2, 6 y 7.

Tabla 29. **Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 3**

Día 3									
No.	a		b		c		Promedio		Viabilidad
	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	
1	340	1	236	5	235	4	270.33	3.33	99%
2	280	4	290	2	297	0	289.00	2.00	99%
3	237	2	350	2	273	4	286.67	2.67	99%
4	304	2	197	1	278	3	259.67	2.00	99%
5	173	3	229	0	130	4	177.33	2.33	99%
6	208	3	298	2	187	2	231.00	2.33	99%
Viabilidad promedio									99.02%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 2, 6 y 7.

Tabla 30. **Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 4**

Día 4									
No.	a		b		c		Promedio		Viabilidad
	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	
1	242	2	272	2	300	7	271.33	3.67	99%
2	286	4	256	1	275	1	272.33	2.00	99%
3	219	1	263	1	254	4	245.33	2.00	99%
4	258	1	274	6	402	5	245.00	4.00	98%
5	226	5	263	0	216	2	235.00	2.33	99%
6	274	3	234	3	269	2	259.00	2.67	99%
Viabilidad promedio									98.92%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 2, 6 y 7

Tabla 31. **Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 5**

Día 5									
No.	a		b		c		Promedio		Viabilidad
	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	
1	225	0	225	1	200	4	216.67	1.67	99%
2	195	5	224	3	199	5	206.00	4.33	98%
3	275	3	312	6	300	2	295.67	3.67	99%
4	215	4	337	3	199	1	250.33	2.67	99%
5	259	2	296	5	269	3	274.67	3.33	99%
6	218	2	284	4	244	3	248.67	3.00	99%
Viabilidad promedio									98.75%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 2, 6 y 7.

Tabla 32. **Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 6**

Día 6									
No.	a		b		c		Promedio		Viabilidad
	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	
1	272	5	394	4	247	2	304.33	3.67	99%
2	175	2	228	1	213	3	205.33	2.00	99%
3	308	8	290	3	200	4	266.00	5.00	98%
4	233	4	233	3	287	6	251.00	4.33	98%
5	275	6	217	6	197	1	229.67	4.33	98%
6	295	5	259	4	201	3	251.67	4.00	98%
Viabilidad promedio									98.48%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 2, 6 y 7.

Tabla 33. Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 7

Día 7									
No.	a		b		c		Promedio		Viabilidad
	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	
1	212	4	200	3	247	5	219.67	4.00	98%
2	271	5	250	4	213	3	244.67	4.00	98%
3	256	3	322	8	189	2	255.67	4.33	98%
4	387	7	226	6	376	7	329.67	6.67	98%
5	235	4	328	9	235	4	266.00	5.67	98%
6	189	2	215	4	232	4	212.00	3.33	98%
Viabilidad promedio									98.22%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 2, 6 y 7.

Tabla 34. Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Día 8

Día 8									
No.	a		b		c		Promedio		Viabilidad
	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	
1	266	7	347	11	242	7	285	8.33	97%
2	231	4	233	7	238	3	234	4.67	98%
3	182	3	203	2	234	3	206.33	2.67	99%
4	286	4	174	3	341	9	267	5.33	98%
5	192	2	177	4	174	3	181	3	98%
6	200	2	189	3	255	5	214.67	3.3333333	98%
Viabilidad promedio									98.13%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuaciones 2, 6 y 7.

Tabla 35. **Viabilidad del hongo en el proceso de secado final del producto terminado. Resumen de resultados de concentración**

Día	Viabilidad
1	99.16%
2	99.07%
3	99.02%
4	98.92%
5	98.75%
6	98.48%
7	98.22%
8	98.13%

Fuente: apéndice 3, muestra de cálculo, ecuación 2.

3.8. Análisis estadístico

3.8.1. Universo de estudio

Por tratarse del análisis de dos áreas del proceso de producción se tomará el universo de estudio de la siguiente manera:

Proceso de humidificación

Se tomará como universo de estudio todas las bolsas de 280 gramos pertenecientes a cada lote de análisis.

Proceso de secado

Se tomará como universo de estudio las muestras pertenecientes al grupo resultante del método 2, que serán sometidas al proceso completo y con especial análisis en el proceso de secado.

3.8.2. Unidad de análisis y observación

Etapa de pretratamiento

La unidad de análisis fue cada una de las bolsas de 280 gramos analizadas. En esta etapa se realizaron dos análisis cada uno de con un diseño experimental diferente. Para analizar el porcentaje de humedad para el óptimo crecimiento de conidios se aplicó un diseño experimental con post-prueba únicamente (Tabla 36). Para comparar un nuevo método de humectación de arroz se aplicó un diseño con post-prueba únicamente y grupo de control² (Tabla 37).

Tabla 36. Diagrama del diseño experimental con postprueba únicamente

Gi	Xi	Oi
RG1	20%	3.63E+08
RG2	21%	4.46E+08
RG3	22%	6.04E+08
RG4	23%	7.45E+08
RG5	24%	7.44E+08
RG6	25%	5.62E+08

Fuente: Hernández Sampieri. **Metodología de la investigación**. Pg. 124

Tabla 37. **Diagrama del diseño experimental con postprueba únicamente y grupo de control**

Gi	Xi	Oi
RG1	Método 1	7.23E+08
RG2	Método 2	7.23E+09

Fuente: Hernández Sampieri. **Metodología de la investigación**. Pg. 124

Etapa de secado

La unidad de análisis fue cada una de las muestras sometidas al análisis del proceso de secado. En dicho proceso se analizó concentración de conidios y viabilidad, esto mediante el uso de un diseño experimental de series cronológicas con repetición en el estímulo (Tabla 38).

Tabla 38. **Diagrama del diseño experimental de series cronológicas con repetición en el estímulo**

Gi	X1	O1	X2	O2	X3	Oi3	X4	O4	X5	O5	X6	O6	X7	O7	X8	O8
RG1	1	1.32E9	2	1.64E9	3	1.81E9	4	1.86E9	5	1.96E9	6	2.16E9	7	2.27E9	8	2.27E9
RG2	1	99.16%	2	99.07%	3	99.02%	4	98.92%	5	98.75%	6	98.48%	7	98.22%	8	98.13%

Fuente: Hernández Sampieri. **Metodología de la investigación**. Pg. 128.

3.8.3. Muestreo aleatorio simple

Tomando en cuenta que cada lote a analizar se encuentra constituido por arroz quebrado precocido proveniente del mismo proveedor, que se clasifica en aproximadamente 176 subgrupos homogéneos (bolsas de aproximadamente

280 gramos), se utilizará un muestreo aleatorio simple pues cada uno de los 176 subgrupos tiene la misma posibilidad de ser electo para análisis.

Es decir, en los 176 subgrupos no existen característica alguna para subseleccionarlos y por consiguiente todos poseen la misma posibilidad de ser electos para su respectivo análisis.

3.8.4. Número de repeticiones

Para determinar el número de repeticiones se aplicaron dos métodos. El método A (3.8.4.1) se utilizó para determinar el número de repeticiones necesarias en el análisis del porcentaje de humedad óptima, para la etapa de pre-tratamiento.

El método B para la determinación del número de replicas a analizar fue aplicado en los análisis de: viabilidad en el secado, de concentración de conidios y de comparación entre el método tradicional de humectación y el método nuevo de humectación.

Tabla 39. Descripción del tipo de análisis en cada etapa del proceso

Etapa del proceso	Análisis	Diseño experimental	Método para determinar el número de réplicas	Número de replicas
PRETRATAMIENTO	% Óptimo	Diseño con postprueba únicamente	Método A	5
	Comparación de métodos	Diseño con postprueba únicamente y grupo de control	Método B	12
SECADO	Concentración de conidios	Diseño de series cronológicas con repetición del estímulo	Método B	6
	Viabilidad	Diseño de series cronológicas con repetición del estímulo	Método B	6

Fuente: Hernández Sampieri. **Metodología de la investigación**. Pg. 128.

3.8.4.1. Descripción del método A

La elección del número de repeticiones se basa en los siguientes planteamientos:

- a. Alfa es la probabilidad de rechazar la hipótesis nula cuando esta sea verdadera (Erro tipo I), $\alpha = P \{\text{Rechazar } H_0 | H_0 \text{ es cierta}\}$;
- b. Beta es la probabilidad de aceptar la hipótesis nula siendo esta falsa (Error tipo II). Este dato es el que generan las gráficas;
 $\beta = P \{\text{No Rechazar } H_0 | H_0 \text{ es falsa}\}$
- c. Un valor alto de $1 - \beta$ indicaría una probabilidad de interpretar correctamente la hipótesis, es decir $1 - \beta = P \{\text{Rechazar } H_0 | H_0 \text{ es falsa}\}$.

En los dos primeros casos se estaría cometiendo un error en la elección de la hipótesis. El siguiente análisis para elegir la cantidad de replicas por tratamiento se basa en el tipo de error número II (planteamiento 2); utilizando gráficas que generen resultados con el mínimo error posible. Es decir generar gráficamente un valor β mínimo para alcanzar un $1 - \beta$ máximo y así maximizar la certeza de la hipótesis comprobada, como se indica en el planteamiento 3.

3.8.4.2. Lectura de curvas de operación

- a. Determinar si se realiza una ANOVA de efectos fijos o efectos aleatorios para el uso de las gráficas según sea el caso (Apéndice, Curvas características para análisis de varianza).

b. Determinación de parámetro Φ :

$$\Phi^2 = \frac{n \sum_{i=1}^a \tau_i^2}{a\sigma^2} = \frac{\sum_{i=1}^a n_i \tau_i^2}{a\sigma^2}$$

Donde:

n = número de repeticiones.

a = número de tratamientos experimentales

σ^2 = Varianza

τ = efecto de cada tratamiento.

La cantidad Φ^2 está relacionada con el parámetro de centralidad, y se presentan curvas para $\alpha = 0,05$ y $\alpha = 0,01$ (Apéndice, Curvas características para análisis de varianza).

El parámetro anterior, depende de:

- Los valores τ_1, \dots, τ_a o bien μ_1, \dots, μ_a para los que se consideran medias distintas, ya que obviamente dichos valores no son conocidos previamente;
- El valor de σ^2 , que al ser también desconocido, se suele usar el valor que se obtiene mediante una muestra piloto;
- El número de réplicas por tratamiento.

Así, fijados los valores de τ_i y el valor de σ^2 se debe determinar n para que la potencia sea $(1 - \beta)$. Una manera de hacerlo es buscando en las tablas de curvas características de operación.

- c. Se elige la curva de operación. Para ello se calculan los grados de libertad

$$V_1 = a - 1$$

Donde a = número de tratamientos experimentales
 V = Grados de libertad = Curva a elegir (Apéndice)

- d. Se fija el haz de curvas correspondiente al valor de α elegido

$$\alpha = P \{ \text{Rechazar } H_0 | H_0 \text{ es cierta} \}$$

$$\alpha = 0.01$$

- e. Se elige la curva correspondiente a V_2

$$V_2 = a \cdot (n-1)$$

Donde a = número de tratamientos experimentales
 n = número de repeticiones

- f. En el eje X se busca el valor del parámetro Φ y se fija la ordenada para ese valor de Φ que muestra la curva de operación elegida en (iii)
- g. El valor de la probabilidad de error de tipo II está en la ordenada

3.8.4.3. Número de repeticiones en la evaluación de humedad óptima

a. Se calcula el parámetro Φ (Asumiendo $n = 5$)

Para determinar este parámetro es necesario establecer datos de una prueba piloto realizada antes de realizar las pruebas reales solo con el fin de establecer parámetros de inicio. Para ello se realizó un ensayo previo al real del cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 40. **Parámetros de prueba previa. Tamaño muestral**

Media	Concentración (C/ml)
μ_1	90500000
μ_2	445500000
μ_3	218750000
μ_4	350000000

Fuente: **Agroindustrias Successo**. Prueba piloto.

$$\mu = \frac{90500000 + 445500000 + 218750000 + 350000000}{4}$$

$$\mu = 276187500$$

σ^2	2.39646E+16
------------	-------------

Tabla 41. **Datos de evaluación del tamaño de muestra, utilizando gráficas**

Media	Concentración (C/ml)	τ	τ^2
μ_1	90500000	185687500	3.44798E+16
μ_2	445500000	-169312500	2.86667E+16
μ_3	218750000	57437500	3.29907E+15
μ_4	350000000	-73812500	5.44829E+15
suma			7.18939E+16

Fuente: punto 3.8.4.1.1. (Página 61)

$$\Phi^2 = \frac{n (\tau_1^2 + \tau_2^2 + \tau_3^2 + \tau_4^2)}{\alpha * \sigma^2}$$

$$\Phi^2 = \frac{4 * (7.18939E + 16)}{5 * 2.39646E + 16}$$

$$\Phi^2 = 2.4$$

- b. Se elige la curva de operación V_1 . Para ello se calculan los grados de libertad

$$V_1 = 5 - 1$$

$$V_1 = 4$$

- c. Se fija el haz de curvas correspondiente al valor de α elegido

$$\alpha = 0.01$$

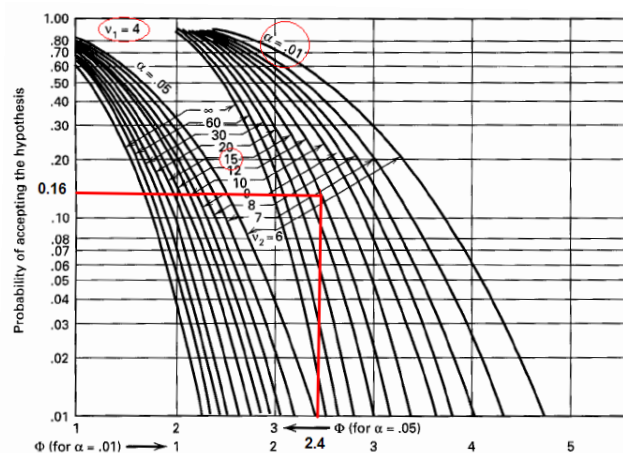
d. Se elige la curva correspondiente a V_2

$$V_2 = 5(4 - 1)$$
$$V_2 = 15$$

e. En el eje X se busca el valor del parámetro $\Phi=2.4$ y se fija la ordenada para ese valor de $\Phi=2.4$ que muestra la curva de operación elegida en (c.)

f. El valor de la probabilidad de error de tipo II está en la ordenada

Figura 11. **Curva característica para determinar el número de repeticiones óptima para un modelo de análisis de varianza**



Fuente: Manuel Vivanco. **Muestreo Estadístico, Diseño y Aplicaciones** Pág. 64.

En este caso el valor de probabilidad obtenido en la ordenada es de 0.16 lo que indica una potencia de:

Esto indica que el análisis ANOVA realizando cuatro réplicas por tratamiento se obtiene un porcentaje de confiabilidad de 84%. Otra forma de interpretar este parámetro sería indicar que cuatro réplicas es el mínimo a realizar si se quiere obtener un porcentaje alto de confiabilidad. Con base a esto se tomó 5 réplicas para el análisis de humedad óptima.

3.8.4.4. Descripción del método B

El número de repeticiones a analizar se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$n = \frac{N * Z^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) * Z^2 * p * q} *$$

Donde:

n = Número total de repeticiones, cantidad de muestras a analizar como tamaño representativo para concluir a partir de ellas adecuadamente

N = Cantidad de población total

Z = Valor correspondiente a la distribución de Gauss 1,96 para $\alpha = 0,05$ y 2,58

p = Es la proporción de individuos que poseen en la población la característica de estudio. Este dato es generalmente desconocido y se suele suponer que $p = 0.5$ que es la opción más segura y hace mayor el tamaño muestral

q = 1-p

d = Error estimado dentro del cual se espera realizar análisis

*Ecuación utilizada en estadística para describir el tamaño muestral de poblaciones finitas. Referencia 15.

3.8.4.5. Determinación del número de repeticiones en la evaluación de un nuevo método de humidificación de arroz

$$n = \frac{174 * 1.65^2 * 0.05 * 0.95}{0.1^2 * (174 - 1) * 1.65^2 * 0.05 * 0.95}$$

$$n = 12.102 \cong 12$$

3.8.4.6. Determinación del número de repeticiones para el análisis en el proceso de secado

$$n = \frac{12 * 1.65^2 * 0.05 * 0.95}{0.1^2 * (12 - 1) * 1.65^2 * 0.05 * 0.95}$$

$$n = 6.38 \cong 6$$

3.8.5. Diseño experimental

3.8.5.1. Evaluación de la humedad óptima

✓ **Nombre del modelo**

Modelo ANOVA Unifactorial Completamente Aleatorizado de Efectos Fijos.

✓ **Descripción del modelo**

En este procedimiento se evaluó un único factor, el porcentaje de humedad inicial en el arroz, generando las condiciones para evaluar porcentajes específicos que es la principal característica de los modelos de efecto fijo, y el hecho de que sea completamente aleatorizado implica que no se contemplara ningún tipo de consideración preferencial en el análisis de las réplicas, sino que se analizarán completamente al azar.

En este análisis se evaluó cómo el porcentaje de humedad inicial en el arroz afecta el desarrollo de conidios de hongo *Metarhizium anisopliae*. Con este fin se analizaron muestras a rangos de porcentajes de humedad próximos a 20%, 21%, 22%, 23%, 24% y 25%.

La selección de número de repeticiones de la muestra se realizó utilizando un método descrito en la sección 3.8.4.1.3 el cual está basado en Lectura de las Curvas de Operación obteniéndose una cantidad mínima de 4 réplicas por tratamiento con un porcentaje de probabilidad de certeza de 84%. Por lo que se aplicaron $n = 5$ réplicas por tratamiento.

Los rangos estudiados son rangos de porcentaje de humedad dentro de los que se espera obtener un máximo rendimiento de producción de conidios, esto con base a observaciones anteriores al presente estudio.

✓ **Aplicación del modelo**

Tabla 42. **Tabla de datos para la evaluación del porcentaje óptimo**

Nivel (a=5)	Observaciones (n=5, N=25)					Promedios
	1	2	3	4	5	
a						
20%	3.83E+08	3.70E+08	3.68E+08	3.33E+08	3.63E+08	363000000
21%	3.90E+08	4.35E+08	3.28E+08	5.08E+08	5.68E+08	445500000
22%	6.58E+08	5.50E+08	5.65E+08	6.35E+08	6.13E+08	604000000
23%	7.50E+08	7.90E+08	7.40E+08	7.40E+08	7.03E+08	744500000
24%	7.35E+08	7.60E+08	7.23E+08	7.53E+08	7.50E+08	744000000
25%	5.60E+08	5.75E+08	5.63E+08	5.90E+08	522500000	562000000
						577166667

Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuación 4.

a. Consideraciones previas

- Normalidad: y_{ij} sigue una distribución normal
- $E(y_{ij}) = \mu_i$
- $V ar(y_{ij}) = \sigma^2$
- Independencia: y_{ij} son independientes entre sí

b. Estimación de los parámetros

Tabla 43. **Tabla de parámetros para la evaluación del porcentaje óptimo**

Parámetro	Descripción	Fórmula o valor
a	Cantidad de tratamientos	5
N	Número de muestras a analizar	25
n	Número de réplicas por tratamiento	5
μ_i	Media aritmética aplicada a cada tratamiento	$\mu_i = \frac{Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4 + Y_5}{n}$
α	Nivel de significación. Porcentaje de error tipo I	0.01
β	Porcentaje mínimo de error tipo II	0.16

Fuente: referencia número 6. P.53.

c. Análisis de la varianza

El contraste de hipótesis que se abordó fue el siguiente:

H1: El porcentaje de humedad en el arroz se relaciona de manera directa con el crecimiento del hongo hasta alcanzar un máximo en algún porcentaje y luego disminuye.

H₀₁: El porcentaje de humedad en el arroz no presenta ninguna incidencia significativa sobre el crecimiento del hongo.

La tabla ANOVA se presenta como:

FV	SC	GL	F
Tratamiento	$SCTra = \sum n_i \bar{y}_i^2 - n\bar{y}^2$	$a - 1$	$F_0 = \frac{SCTra/(a-1)}{SCE/(N-a)}$
Error	$SCE = SCT - SCTra$	$N - a$	
Total	$SCT = \sum \sum y_{ij}^2 - n\bar{y}^2$	$N - 1$	

Fuente: referencia número 6. P.58.

Donde:

FV = Fuente de variación

SC = Suma de Cuadrados

GL = Grados de libertad

Se rechaza H_0 a nivel α cuando $F_0 > F_{\alpha, a-1, N-a}$.

Siendo $F_{\alpha, a-1, N-a}$ la distribución de una F de Snedecor (apéndice)

Tabla 44. **La tabla ANOVA**
(Evaluación del porcentaje de humedad óptimo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Fo
Tratamiento	2.26554E+18	4	214.1952796
Error	5.2885E+16	20	
Total	2.32E+18	24	

Fuente: referencia número 6. P.58.

Tabla 45. **Resultados (Evaluación del porcentaje de humedad óptimo)**

Fo > F : Rechazamos Ho ₁	
F(0.01,4,20)	4.431
Fo	214.1952796

Fuente: **Agroindustrias Successo**. Prueba piloto.

d. Conclusión

Al rechazar la hipótesis nula se acepta la hipótesis uno (H1), estableciendo así que el porcentaje de humedad en el arroz se relaciona de manera directa con el crecimiento del hongo hasta alcanzar un máximo en algún porcentaje y luego disminuye.

3.8.5.2. Evaluación de un nuevo método de humidificación de arroz

✓ **Nombre del modelo**

Modelo ANOVA Unifactorial Completamente Aleatorizado de Efectos Fijos.

✓ **Descripción del modelo**

Se evaluó un único factor, el método de humedad inicial en el arroz. Al ser completamente aleatorizado se establece que no se contempló ningún tipo de consideración preferencial en el análisis de las réplicas, se analizaron completamente al azar.

En este análisis se evaluaron dos métodos diferentes en la humectación inicial del arroz, proponiendo un método que genere mejor desarrollo de conidios de hongo *Metarhizium anisopliae*. Cada método se aplicó a un lote de producción.

La selección del número de replicas a analizar se estableció utilizando un método descrito en la sección 3.8.4.2.1. Utilizándose así una cantidad mínima de 12 réplicas por tratamiento con un porcentaje de probabilidad de certeza de 90%.

✓ **Aplicación del modelo**

Tabla 46. **Tabla de datos para la evaluación del porcentaje óptimo**

Nivel (a=2)	Observaciones (n=12, N=24)												Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
MÉTODO 1 Concentración (Conidios/L)	4.78 E+08	6.35 E+08	7.90 E+08	7.48 E+08	1.02 E+09	7.88 E+08	8.93 E+08	5.45 E+08	8.98 E+08	5.10 E+08	5.98 E+08	7.78 E+08	7.23E+08
MÉTODO 2 Concentración (Conidios/L)	1.67 E+09	1.57 E+09	2.22 E+09	1.06 E+09	1.62 E+09	1.08 E+09	1.32 E+09	1.19 E+09	1.60 E+09	1.76 E+09	9.30 E+08	6.43 E+08	1.39E+09
Promedio												1.05E+09	

Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuación 4.

a. Consideraciones previas

- Normalidad: y_{ij} sigue una distribución normal
- $E(y_{ij}) = \mu_i$
- $V ar(y_{ij}) = \sigma^2$
- Independencia: y_{ij} son independientes entre sí

b. Estimación de los parámetros

Tabla 47. **Evaluar un nuevo método de humectación de arroz**

Parámetro	Descripción	Fórmula o Valor
a	Cantidad de tratamientos	2
N	Número de muestras a analizar	24
n	Número de réplicas por tratamiento	12
μ_i	Media aritmética aplicada a cada tratamiento	$\mu_i = \frac{Y_1 + Y_2 + \dots + Y_{12}}{n}$
α	Nivel de significación. Porcentaje de error tipo I	0.01
β	Porcentaje mínimo de error tipo II	0.16

Fuente: referencia número 6. P.53.

c. Análisis de la varianza

El contraste de hipótesis que se abordó fue el siguiente:

H2: El método 2 propuesto para la humectación del arroz genera mejores resultados en cuanto a crecimiento o concentración de conidios en comparación al método 1.

Ho₂: El método 2 propuesto para la humectación del arroz no genera diferencias significativas en comparación al método 1.

La tabla ANOVA se presenta como:

FV	SC	GL	F
Tratamiento	$SCTra = \sum n_i \bar{y}_i^2 - n \bar{y}^2$	$a - 1$	$F_0 = \frac{SCTra/(a-1)}{SCE/(N-a)}$
Error	$SCE = SCT - SCTra$	$N - a$	
Total	$SCT = \sum \sum y_{ij}^2 - n \bar{y}^2$	$N - 1$	

Fuente: referencia número 6. P.58.

Donde:

FV = Fuente de variación

SC = Suma de cuadrados

GL = Grados de libertad

Se rechaza H_0 a nivel α cuando $F_0 > F_{\alpha, a-1, N-a}$.

Siendo $F_{\alpha, a-1, N-a}$ la distribución de una F de Snedecor (apéndice)

Tabla 48. **La tabla ANOVA**
(Evaluación de un nuevo método de humidificación)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Fo
Tratamiento	2.65E+18	1	24.598
Error	2.4E+18	22	
Total	5.02E+18	23	

Fuente: referencia número 6. P.58.

Tabla 49. **Resultados (Evaluación de un nuevo método de humectación)**

Fo>F: Rechazamos Ho ₂	
F(0.01,1,22)	7.946
Fo	24.5979511

Fuente: **Agroindustrias Successo**. Prueba piloto.

d. Conclusión

Al rechazar la hipótesis nula se acepta la hipótesis dos (H₂), estableciendo así que el método 2 propuesto para la humectación de arroz genera mejores resultados en cuanto a crecimiento o concentración de conidios en comparación al método 1.

3.8.5.3. Descripción del comportamiento de la concentración de conidios en el proceso de secado

✓ **Nombre del modelo**

Modelo ANOVA Unifactorial Completamente Aleatorizado de Efectos Fijos.

✓ **Descripción del modelo**

En este caso el factor de estudio fue el tiempo de secado y su efecto en el crecimiento de conidios. Que sea completamente aleatorizado implica que no se contemplo ningún tipo de consideración preferencial en el análisis de las réplicas, sino que se analizaron completamente al azar.

Este análisis consistió en evaluar el desarrollo de conidios por medio de la lectura de concentración de conidios durante los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 del proceso de secado y verificando de esta forma el comportamiento de dicho parámetro. La selección del tamaño de la muestra se realizó utilizando un método descrito en la sección 3.8.4.2.2 , obteniéndose una cantidad mínima de 6 réplicas por tratamiento con un porcentaje de probabilidad de certeza de 90%. Por lo que se aplicarán n igual a 6 réplicas por tratamiento.

✓ **Aplicación del modelo**

a. Consideraciones previas

- Normalidad: y_{ij} sigue una distribución normal
- $E(y_{ij}) = \mu_i$
- $V ar(y_{ij}) = \sigma^2$
- Independencia: y_{ij} son independientes entre sí

b. Estimación de los parámetros

Tabla No. 50. **Parámetros para evaluar el comportamiento de concentración de conidios con el paso del tiempo en el proceso de secado**

Parámetro	Descripción	Fórmula o Valor
a	Cantidad de tratamientos	8
N	Número de muestras a analizar	48
n	Número de réplicas por tratamiento	6
μ_i	Media aritmética	$\mu_i = \frac{Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4 + Y_5}{n}$
α	Nivel de significación (error tipo I)	0.01
β	Porcentaje mínimo de error tipo II	0.16

Fuente: referencia número 6. P.53.

c. Análisis de la varianza

El contraste de hipótesis que se abordó fue el siguiente:

H3: El factor tiempo influye en los resultados de concentración durante el proceso de secado.

H0₃: El factor tiempo no influye sobre los resultados de concentración en el proceso de secado.

La tabla ANOVA se presenta como:

FV	SC	GL	F
Tratamiento	$SCTra = \sum n_i \bar{y}_i^2 - n\bar{y}^2$	$a - 1$	$F_0 = \frac{SCTra/(a-1)}{SCE/(N-a)}$
Error	$SCE = SCT - SCTra$	$N - a$	
Total	$SCT = \sum \sum y_{ij}^2 - n\bar{y}^2$	$N - 1$	

Fuente: referencia número 6. P.58.

Donde:

FV = Fuente de variación

SC = Suma de cuadrados

GL = Grados de libertad

Se rechaza H0 a nivel α cuando $F_0 > F_{\alpha, a-1, N-a}$

Siendo $F_{\alpha, a-1, N-a}$ la distribución de una F de Snedecor

Tabla 51. **La tabla ANOVA (Concentración en proceso de secado)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Fo
Tratamiento	4.5853E+18	7	30.1436696
Error	8.69228E+17	40	
Total	5.45453E+18	47	

Fuente: referencia número 6. P.58.

Tabla 52. **Resultados (Concentración en proceso de secado)**

Fo > F: Rechazamos Ho ₃	
F(0.01,7,40)	3.124
Fo	30.14366965

Fuente: **Agroindustrias Successo**. Prueba piloto.

d. **Conclusión**

Rechazando la hipótesis nula se acepta la hipótesis tres (H3), estableciendo así que el factor tiempo influye en los resultados de concentración durante el proceso de secado.

3.8.5.4. Descripción del comportamiento de la viabilidad en el proceso de secado

✓ **Nombre del modelo**

Modelo ANOVA Unifactorial Completamente Aleatorizado de Efectos Fijos.

✓ **Descripción del modelo**

En este caso el factor de estudio fue el tiempo de secado y su efecto en la viabilidad en el proceso de secado. Que sea completamente aleatorizado implica que no se contempla ningún tipo de consideración preferencial en el análisis de las réplicas, sino que se analizaron completamente al azar.

Este análisis consistió en evaluar la viabilidad de conidios durante los días 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 del proceso de secado y verificando de esta forma el comportamiento de dicho parámetro. La selección del tamaño de la muestra se realizó utilizando un método descrito en la sección 3.8.4.2.2, obteniéndose una cantidad mínima de 6 réplicas por tratamiento con un porcentaje de probabilidad de certeza de 90%. Por lo que se aplicaron $n = 6$ réplicas por tratamiento.

✓ **Aplicación del modelo**

a. Consideraciones previas

- Normalidad: y_{ij} sigue una distribución normal
- $E(y_{ij}) = \mu_i$
- $V ar(y_{ij}) = \sigma^2$
- Independencia: y_{ij} son independientes entre sí

b. Estimación de los parámetros

Tabla No. 53. **Parámetros para evaluar el comportamiento de viabilidad de conidios con el paso del tiempo en el proceso de secado**

Parámetro	Descripción	Fórmula o Valor
a	Cantidad de tratamientos	8
N	Número de muestras a analizar	48
n	Número de réplicas por tratamiento	6
μ_i	Media aritmética aplicada a cada tratamiento	$\mu_i = \frac{Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4 + Y_5}{n}$
α	Nivel de significación. Porcentaje de error tipo I	0.01
β	Porcentaje mínimo de error tipo II	0.16

Fuente: referencia número 6. P.53.

c. Análisis de la varianza

El contraste de hipótesis que se abordó fue el siguiente:

H1: El factor tiempo influye en los resultados de viabilidad durante el proceso de secado.

Ho: El factor tiempo no influye sobre los resultados de viabilidad en el proceso de secado.

La tabla ANOVA se presenta como:

FV	SC	GL	F
Tratamiento	$SCTra = \sum n_i \bar{y}_i^2 - n \bar{y}^2$	$a - 1$	$F_0 = \frac{SCTra/(a-1)}{SCE/(N-a)}$
Error	$SCE = SCT - SCTra$	$N - a$	
Total	$SCT = \sum \sum y_{ij}^2 - n \bar{y}^2$	$N - 1$	

Fuente: referencia número 6. P.58.

Donde:

FV = Fuente de variación

SC = Suma de Cuadrados

GL = Grados de libertad

Se rechaza H_0 a nivel α cuando $F_0 > F_{\alpha, a-1, N-a}$.

Siendo $F_{\alpha, a-1, N-a}$ la distribución de una F de Snedecor

Tabla 54. **La tabla ANOVA (Viabilidad en el proceso de secado)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Fo
Tratamiento	0.00065751	7	6.25079257
Error	0.000601076	40	
Total	0.001258586	47	

Fuente: referencia número 6. P.58.

Tabla 55. **Resultados (Viabilidad en el proceso de secado)**

Fo>F: Rechazamos Ho	
F(0.01,7,40)	3.124
Fo	6.251

Fuente: **Agroindustrias Successo**. Prueba piloto.

d. Conclusión

Rechazando la hipótesis nula se acepta la hipótesis cuatro (H4), estableciendo así que el factor tiempo influye en los resultados de viabilidad durante el proceso de secado.

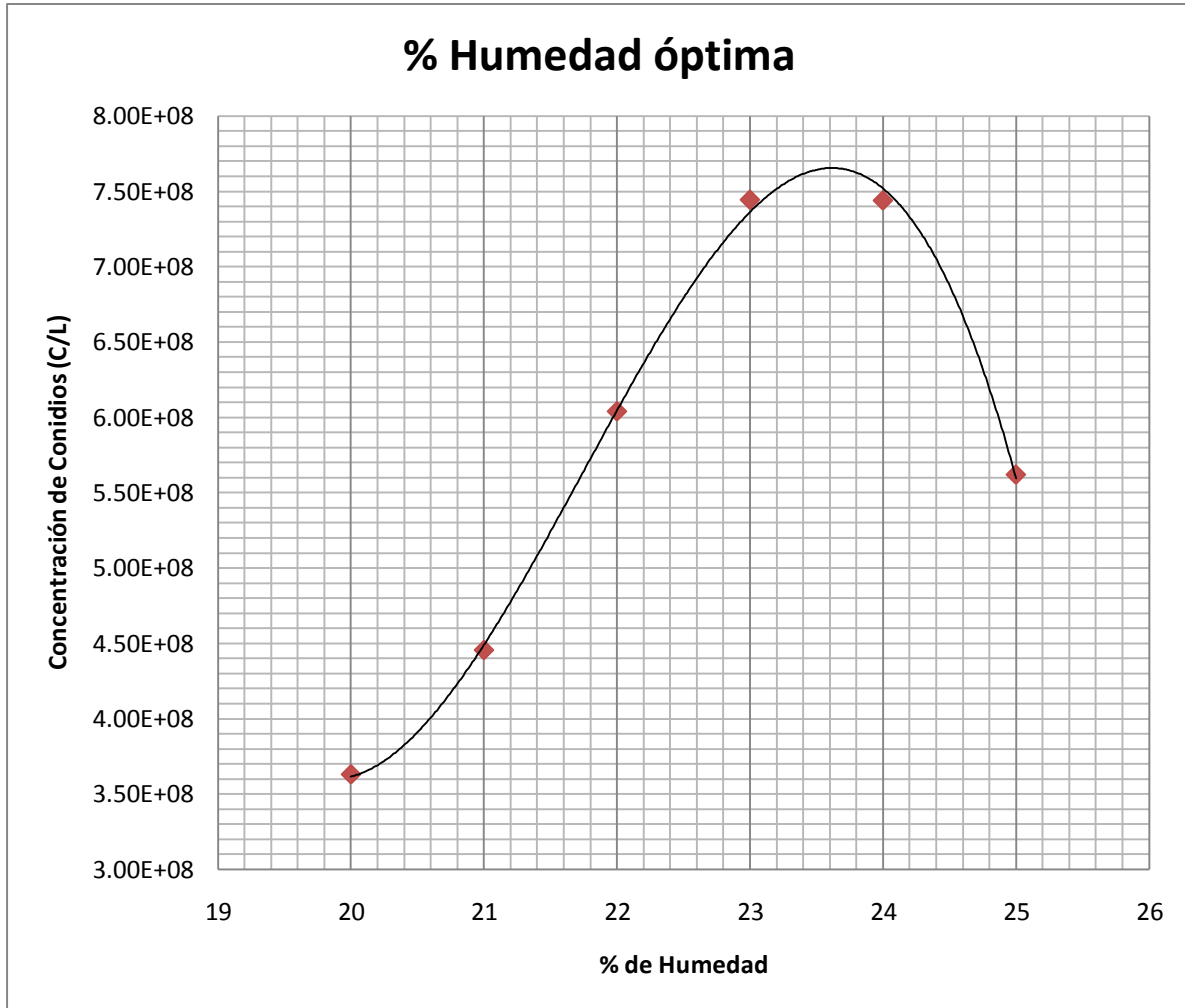
4. RESULTADOS

Tabla 56. **Análisis de porcentaje de humedad óptima. Resumen de resultados**

Resumen % humedad óptima	
% Humedad	Concentración de Conidios (C/L)
20	3.63E+08
21	4.46E+08
22	6.04E+08
23	7.45E+08
24	7.44E+08
25	5.62E+08

Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 3.

Figura 12. Análisis del % de humedad óptima



Fuente: tabla No. 52.

MÉTODO DE HUMECTACIÓN 2

(Nuevo método)

Instrumentos

- a. Recipiente plástico
- b. Báscula
- c. Bolsas polipropileno
- d. Grapas
- e. Engrapadora
- f. Cronómetro

Reactivos

- a. 45.963 kg de arroz precocido de segunda categoría
- b. 14.515 kg agua (14.5 litros)

Procedimiento

- a. Introducir un quintal de arroz en un recipiente plástico con capacidad suficiente;
- b. Agregar la cantidad de agua próxima a 14.5 litros o 14.515 kg;
- c. Movilizar con una paleta para homogenizar la humedad;
- d. Movilizar en lapsos de veinte minutos durante una hora con cuarenta minutos;
- e. Empacar e introducir a la autoclave todas las muestras procedentes de dicho lote para seguir el proceso.

Tabla 57. **Evaluación de un método diferente para humidificar el arroz.**

Tabla comparativa

Comparación			
Método	Concentración (C/L)	Diferencia	% Diferencia
1	7.23E+08	6.64E+08	92%
2	1.39E+09		

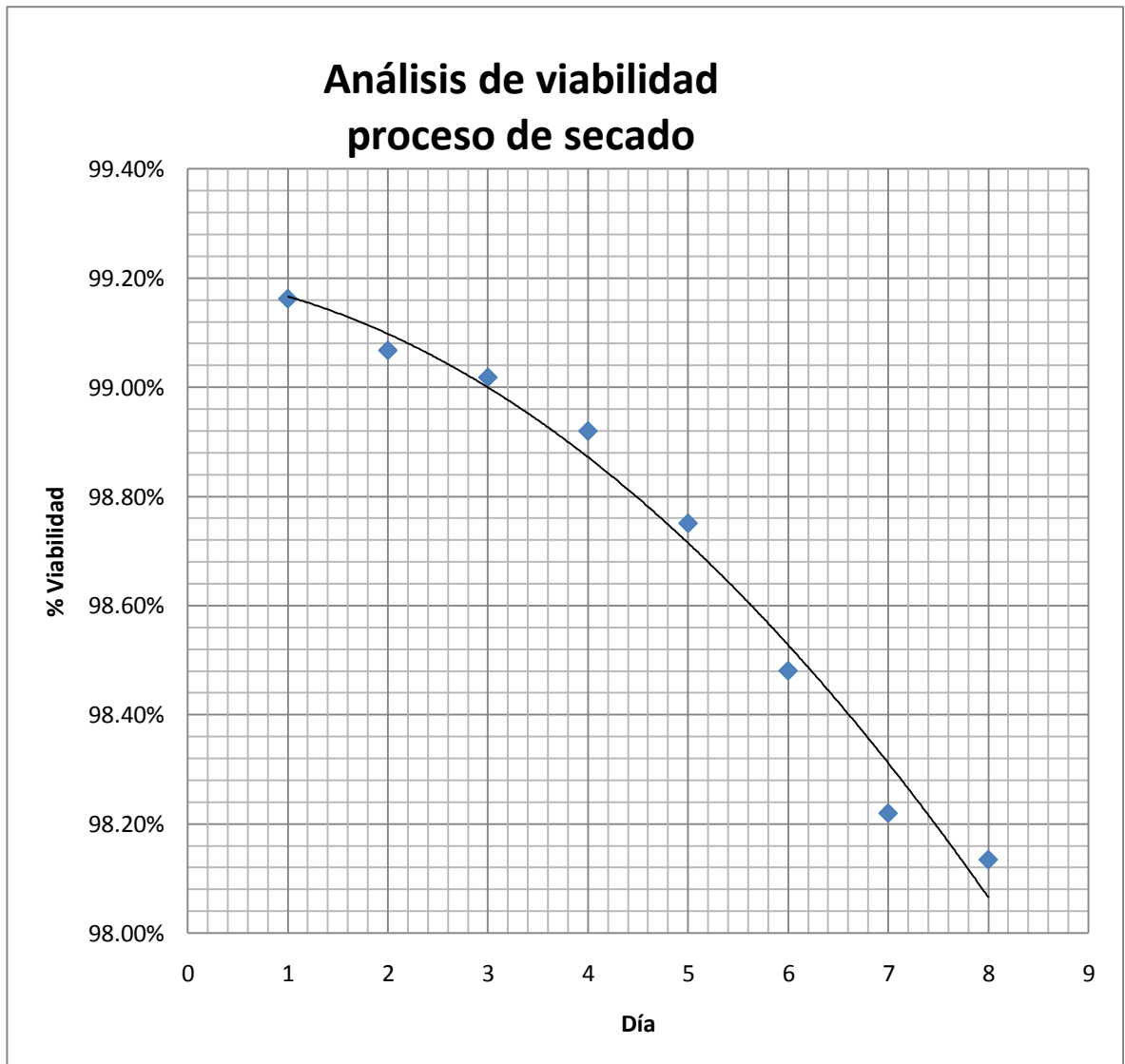
Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuaciones 1 y 5.

Tabla 58. **Evaluación de la viabilidad de conidios en el producto final durante el proceso de secado**

Día	Viabilidad
1	99.16%
2	99.07%
3	99.02%
4	98.92%
5	98.75%
6	98.48%
7	98.22%
8	98.13%

Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuación 2.

Figura 13. **Comportamiento de la viabilidad de conidios en el producto final durante el proceso de secado**



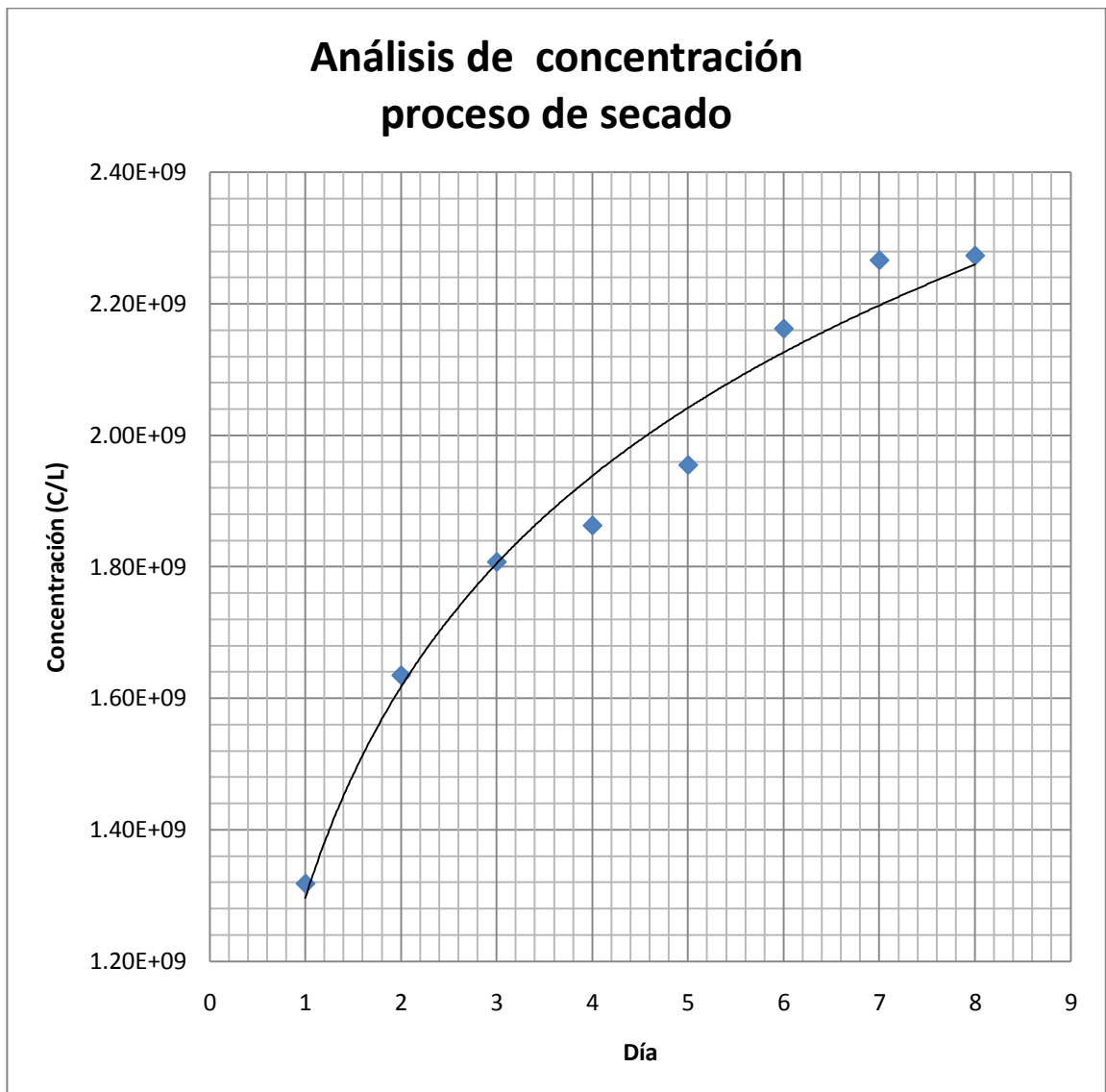
Fuente: tabla 54.

Tabla 59. **Evaluación de la concentración de conidios en el producto final durante el proceso de secado**

Día	Concentración (Conidios/L)
1	1.32E+09
2	1.64E+09
3	1.81E+09
4	1.86E+09
5	1.96E+09
6	2.16E+09
7	2.27E+09
8	2.27E+09

Fuente: apéndice, muestra de cálculo, ecuación 1.

Figura 14. Comportamiento de la viabilidad de conidios en el producto final durante el proceso de secado



Fuente: tabla 55.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El proceso de producción del plaguicida biológico *Metarhizium anisopliae* engloba el control del cultivo, desarrollo y crecimiento de los hongos entomopatógenos. La base alimenticia por excelencia para el crecimiento de estos microorganismos es el arroz precocido, el cual además de funcionar como sustrato alimenticio funciona también como la base física sobre la que se desarrollan las colonias del mismo.

El producto final que se comercializa como plaguicida biológico son las esporas del hongo que, al no ser usadas inmediatamente después de su producción, pasan por un proceso de secado y se almacenan por un tiempo no mayor de tres meses.

El análisis en esta investigación se enfocó específicamente en dos áreas del proceso, el área de pretratamiento en la cual se humedece y empaca el arroz precocido y el área de secado en la que se elimina el exceso de humedad del producto final. En estas dos áreas la investigación se desarrolló enfocando el análisis hacia el estudio y el control del proceso, buscando puntos claves para el incremento de la productividad.

En el caso del pretratamiento se investigó la forma correcta de introducir al proceso un sustrato alimenticio diferente al usual. El arroz precocido utilizado anteriormente se sustituyó por arroz precocido de segunda categoría. Evidentemente era necesaria la investigación del manejo de este nuevo sustrato pues varía no sólo en el área superficial del sólido, sino también en cuanto a la estructura nutricional del mismo.

Se inició por investigar la humedad del arroz que presenta el óptimo crecimiento de conidios, es decir la humedad a la que se genera la mayor producción de hongo. Para alcanzar el resultado deseado se desarrolló un modelo estadístico experimental denominado ANOVA Unifactorial Completamente Aleatorizado de Efectos Fijos, a través del cual se estableció un método de investigación con muestras próximas a 20%, 21%, 22%, 23%, 24% y 25% de humedad, con cinco repeticiones cada una.

Mediante este análisis se obtuvo una correlación que describe el comportamiento de la concentración de conidios a diferentes porcentajes de humedad (Figura 12), observándose un máximo en 23.6 % de humedad. De esta forma se comprobó que existe una humedad en la que se genera el máximo crecimiento de conidios, es decir que la máxima productividad se presenta al utilizar arroz precocido de segunda categoría con 23.6% de humedad.

Es importante tomar en cuenta que el estado de humedad inicial del arroz proveniente del proveedor es el que se toma como base cero (aproximadamente 15 % de humedad).

Se evaluó un nuevo método de humectación de arroz, para compararlo con el tradicional y verificar la efectividad del mismo. Este nuevo método consiste en agregar la cantidad específica de agua para alcanzar la humedad necesaria (24%). A diferencia del método tradicional en el que se eliminan los lixiviados con almidón y demás nutrientes, en este nuevo método, mediante un mayor control, se busca la absorción total de humedad sin desperdicio de lixiviados y una homogeneidad más estricta en cada lote.

Al aplicar ambos métodos, el tradicional y el nuevo propuesto, a 24% de humedad se obtuvieron resultados con diferencias muy marcadas. Con el primer método se obtuvo una concentración promedio de conidios de $7.23E+08$ conidios por litro y con el segundo método se obtuvo una concentración promedio de conidios de $1.39E+09$ conidios por litro.

La diferencia entre el primer método y el segundo fue de 92%, esto indica que como se había previsto al eliminar los lixiviados se pierden nutrientes que facilitan el crecimiento del hongo, agregando a esto un control más estricto en el método 2 (nuevo método propuesto), se genera homogeneidad en la humedad del arroz que es un factor importante para incrementar las probabilidades de crecimiento.

El diseño estadístico experimental para la comparación entre métodos se realizó mediante un modelo ANOVA Unifactorial Completamente Aleatorizado de Efectos Fijos. La aplicación de este modelo consistió en analizar dos lotes aplicando los métodos correspondientes, en cada uno de los cuales se analizó 12 muestras tomadas al azar para la lectura de resultados.

En el proceso de secado de producto final, se analizó el comportamiento del desarrollo del hongo durante los ocho días que éste permanece en dicha etapa. Los parámetros evaluados fueron concentración de conidios, que en este caso se utilizó para verificar la productividad, y la viabilidad, que es un indicador de la calidad del producto final.

Las esporas del hongo en el campo de aplicación se utilizan en solución, es decir que se diluyen en agua y se dispersan mediante válvulas especiales sobre el área infestada. Al entrar en contacto con las paredes del insecto objetivo, la spora encuentra condiciones para germinar, introduciéndose dentro

del mismo y alimentándose de éste. Así en cuestión de días el hongo es capaz de eliminar la plaga.

Este bosquejo del uso del hongo en el campo de aplicación muestra la importancia de evaluar los indicadores de concentración de conidios y viabilidad en el producto final. Una baja viabilidad indica que una gran parte del total de hongos no se encuentra en condiciones de germinar ni de atacar al insecto. Por otro lado la concentración de conidios indica la cantidad de esporas producida, mientras mayor sea ésta mayor será la productividad.

La viabilidad disminuye con el transcurso del tiempo (Figura 13), es decir que a medida que el producto final se somete al proceso de secado, éste disminuye su calidad en cuanto a la capacidad de conidios para germinar. Cuanto mayor tiempo permanezcan los hongos a condiciones de secado, mayor es cantidad de hongos que no podrán realizar su trabajo en el campo de aplicación.

En contraste a lo anterior, para el análisis de la concentración de conidios, a medida que pasa el tiempo incrementa la cantidad de esporas desarrolladas del hongo (Figura 14), es decir que durante el proceso de secado se generan las condiciones para estimular el desarrollo del hongo e incrementar la productividad.

Para el análisis del proceso de secado, se utilizó un diseño estadístico experimental con un modelo ANOVA Unifactorial Completamente Aleatorizado de Efectos Fijos. Se generaron muestras para dicho análisis a condiciones controladas y se evaluó viabilidad y concentración de conidios, con 6 repeticiones para cada análisis. Esto durante cada uno de los días que las

muestras permanecieron en el proceso de secado. Por medio del modelo estadístico se comprobó la confiabilidad de los resultados obtenidos.

En cuanto a las hipótesis establecidas, se comprobó que el porcentaje de humedad en el arroz se relaciona de manera directa con el crecimiento del hongo hasta alcanzar un máximo en el porcentaje de 23.6% y luego disminuye. De igual forma se estableció un nuevo método de humidificación de arroz precocido de segunda categoría (método 2), comprobando que éste genera mejores resultados que el método tradicional.

Ambas hipótesis se comprobaron con apoyo de los modelos estadísticos, utilizando la distribución de F de Snedecor, descartando así las hipótesis nulas y aceptando las alternas correspondientes.

CONCLUSIONES

1. El máximo crecimiento de conidios se presenta a un porcentaje de humedad inicial de 23.6%, utilizando como base alimenticia arroz precocido de segunda categoría.
2. Utilizando un método alternativo para la humectación de arroz se incrementó en un 92% el crecimiento de conidios. El método alternativo consiste en un proceso controlado que se tarda una hora con cuarenta minutos, utilizando 45.963 kg de arroz quebrado y 14.515 kg agua (método descrito en la página 77), sin eliminar lixiviados.
3. Durante el proceso de secado del producto final la concentración de conidios incrementa con el transcurso del tiempo.
4. Durante el proceso de secado del producto final la viabilidad disminuye con el transcurso del tiempo.

RECOMENDACIONES

1. Instalar un equipo para la humidificación de arroz que permita realizar el proceso en forma continua y homogénea, lo cual representaría un incremento notable en la productividad.
2. Profundizar una investigación en el proceso de secado, planteando un punto de equilibrio en cuanto a concentración de conidios, viabilidad y humedad, y establecer, a partir de esta información, el tiempo idóneo para el almacenamiento del producto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carnet Photographique Emmanuel Buchot. “La economía de Guatemala y su agricultura” [en línea]. Enciclopedia en carta, 12 de enero de 2008 [Ref. de 25 de noviembre de 2009]. Disponible en web: <http://www.voyagesphotosmanu.com/economia_guatemala.html>.
2. 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”. Turrialba, Costa Rica, 2006. 183 p.
3. CADENA PRODUCTIVA DEL ARROZ (GST). *Convenio de Comercialización de la cadena productiva del Arroz*. Guatemala: 2006.
4. HERNÁNDEZ SAMPIERI, Roberto C. *Metodología de la Investigación*. 4ª. Edición. México: McGraw Hill, 1997. 298 p.
5. *Informe Anual 2008-2009*. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, CENGICAÑA. Guatemala: enero 2010. 56 p.
6. *Información Técnica Sobre el Agente de Control Biológico Metarhizum anisopliae*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. 1984 n° 1. México: enero 1984. 497 p.

7. LARREA VEGA, Orietta Fernández “Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de la calidad”. 12 de noviembre de 2008 [Ref. de 05 de octubre de 2010]. Disponible en web: <<http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/HONG-ENT.htm>>.
8. LEMUS, Yuli A., Ginna M. Rodríguez, Raul A. Cuervo, Jorge Antonio Durán Vanegas, Claudia Liliana Zuluaga, Gloria Rodríguez. *Determinación de la Factibilidad del Hongo Metarhizium Anizopliae para ser Usado como Control Biológico de la Hormiga Arriera*. [Revista Científica Guillermo de Ockham] Vol. n° 1. Enero-Junio 2008. 43 p.
9. *Manejo Integrado de la Chinche Salivosa en la Caña de Azúcar*. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, CENGICAÑA. 1998, n° 1. Guatemala: abril 1998. 33 p.
10. MORENO GIL, Jaime Serret. *Procedimientos Estadísticos*. Primera edición. Madrid: Esic. 1998. 539 p.
11. *Producción y Manejo del Hongo Metarhizium anisopliae*. Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar, CENGICAÑA. 1998, n°1. Guatemala: julio 1998. 45 p.
12. *Reglamento de Calidad e Inocuidad Alimentaria para Granos de Arroz*. Diario Oficial. 09 de abril de 2008 [Ref. de 08 de junio de 2010]. Disponible en web: <http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/per12_t.pdf>.

13. Universidad Autónoma de Madrid. “Folleto de Muestreo”. 06 de mayo de 2008 [Ref. de 21 de enero de 2010]. Disponible en web: <http://www.uam.es/personal_pdi/psicologia/carmenx/Tema1.pdf>.
14. Universidad de Oviedo. “Cálculo del tamaño muestral”. 16 de agosto de 2009 [Ref. de 14 de enero de 2010]. Disponible en web: <www.psico.uniovi.es/Dpto_Psicologia/metodos/tutor.7/p3.html>.
15. VIVANCO, Manuel. *Muestreo Estadístico, Diseño y Aplicaciones*. 1ª. Edición. Santiago de Chile: Editorial Universitaria, 2005. 265 p.
16. Wikipedia the free encyclopedia. “*Metarhizium anisopliae*”. 27 de febrero de 2009 [Ref. de 22 de mayo de 2009]. Disponible en web: <http://en.wikipedia.org/wiki/Metarhizium_anisopliae>.

APÉNDICE

MUESTRA DE CÁLCULO

1. Cálculo de la concentración de conidios

$$\text{Concentración (Esporas/ml)} = \frac{\text{Total Esporas}}{4 * 0.0001 \text{ ml}} \quad \text{Ecuación 1}$$

2. Cálculo del porcentaje de conidios germinados. Análisis de Viabilidad

$$G = \frac{C_g}{C_t} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

G = Porcentaje de Germinación

C_g = Número de conidios germinados

C_t = Número de conidios totales

3. **Cálculo del porcentaje de humedad inicial en el arroz precocido de segunda categoría**

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{Masa Inicial} - \text{Masa Final})}{\text{Masa Inicial}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

4. **Cálculo del promedio de conidios contados en la cámara neubauer**

$$\text{Promedio Conidios} = \frac{C1 + C2 + C3 + C4}{4} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

C1 = Conteo en el primer cuadrante.

C2 = Conteo en el segundo cuadrante.

C3 = Conteo en el tercer cuadrante.

C4 = Conteo en el segundo cuadrante.

5. **Cálculo de la diferencia de resultados de producción entre el método 1 y el método 2**

$$\% \text{ Diferencia} = \frac{\text{Concentración 2} - \text{Concentración 1}}{\text{Concentración 2}} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

6. Cálculo del promedio de conidios germinados, en el análisis de viabilidad

$$\text{Promedio Viable} = \frac{Va + Vd + Vc}{3} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

Va = Conidios germinados en el primer cultivo.

Vb = Conidios germinados en el segundo cultivo.

Vc = Conidios germinados en el tercer cultivo.

7. Cálculo del promedio de conidios no germinados, en el análisis de viabilidad

$$\text{Promedio No Viable} = \frac{NVa + NVd + NVc}{3} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

NVa = Conidios germinados en el primer cultivo.

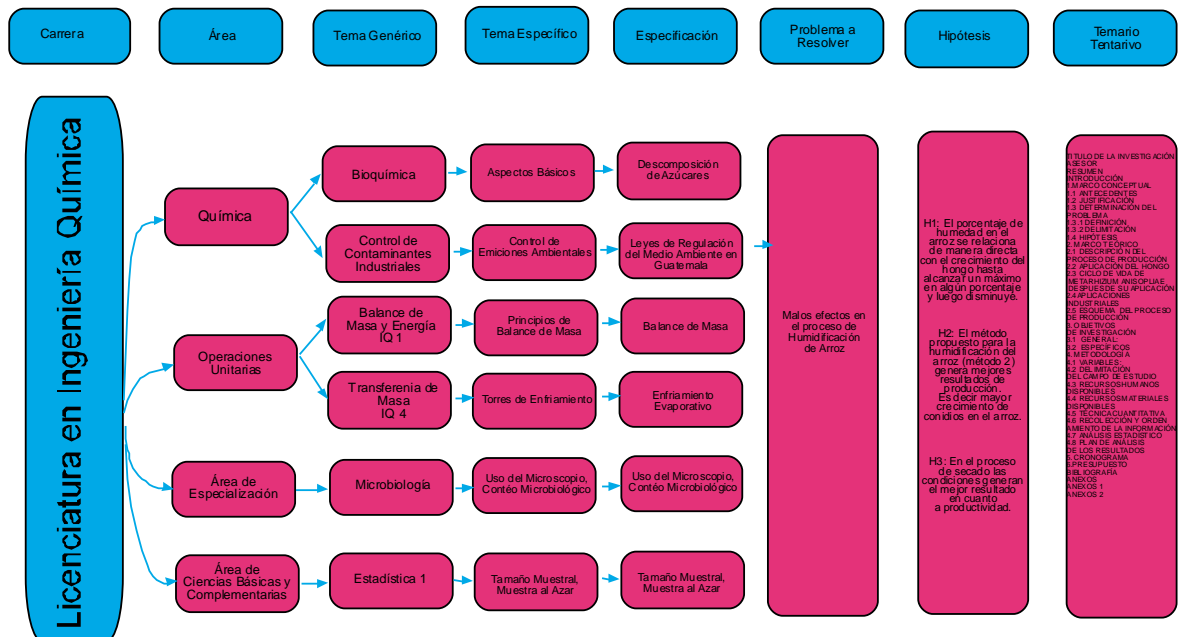
NVd = Conidios germinados en el segundo cultivo.

NVc = Conidios germinados en el tercer cultivo.

ANEXOS

ANEXO 1

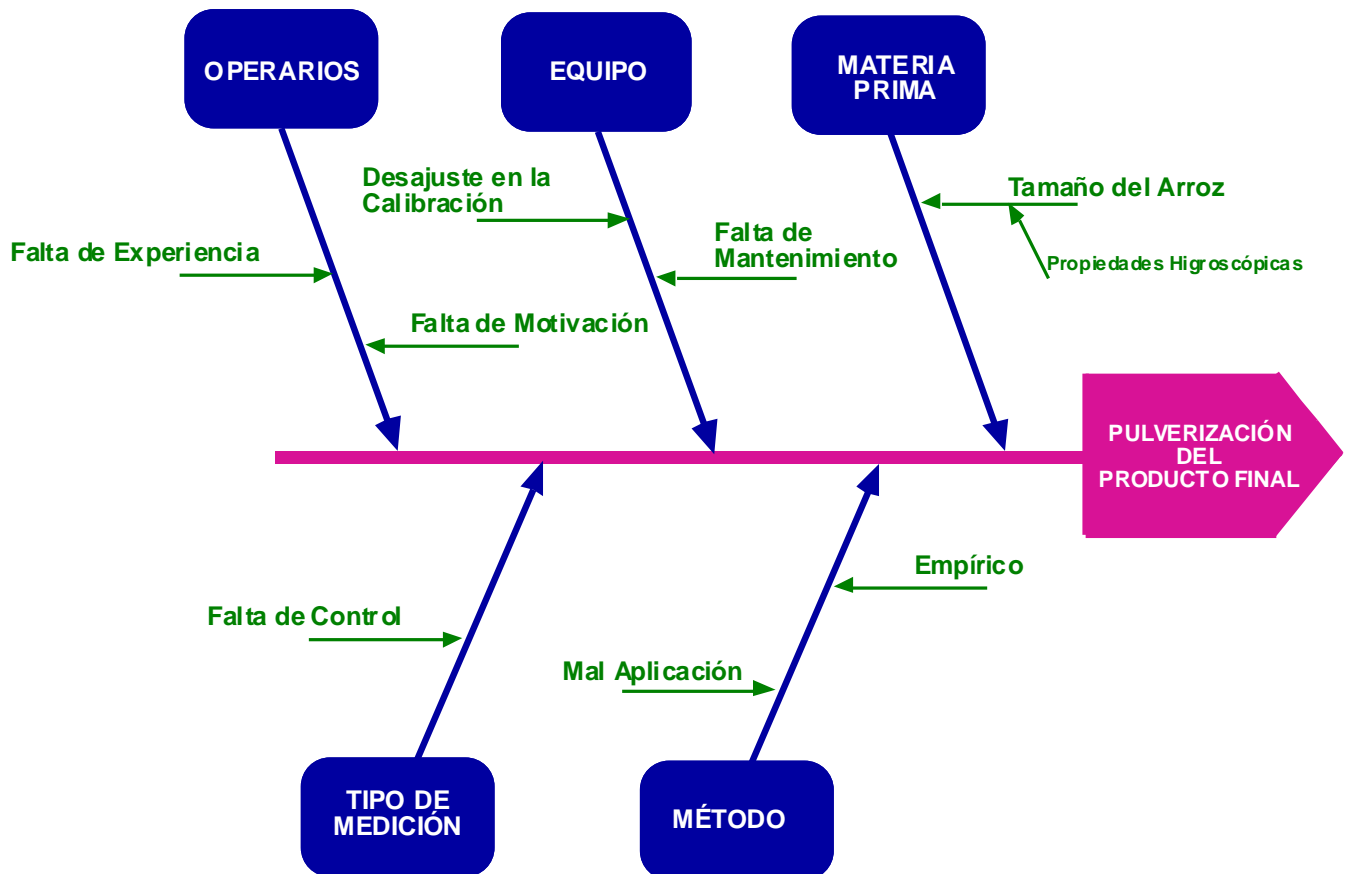
Tabla de requisitos académicos



Fuente: Emilia Arana, Universidad de San Carlos de Guatemala.

ANEXO 2

Diagrama ishikawa



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

ANEXO 3

Descripción de la empresa

Agroindustrias Successo S.A. es una empresa líder en la producción de Bioplaguicidas, desde hace más de 10 años manufactura y distribuye hongos entomopatógenos en todo el país y también al extranjero. Actualmente el consumo de *Metarhizium anisopliae* prevalece frente a otros bioplaguicidas por su uso en la industria azucarera, por lo mismo la producción de éste entomopatógeno es el principal objetivo de producción dentro de la empresa.

Para el cultivo y generación de sus productos (Hongos Entomopatógenos) Agroindustrias Successo S.A. cuenta con equipo y áreas de almacenamiento dentro de las que se pueden mencionar: autoclave, área de inoculación, área de reproducción, área de esporulación, laboratorio de control de calidad, área de secado, bodega fría para almacenar el producto final.

La actual gerente de Agroindustrias Successo S. A. Inga. Ludy Miliceth Recinos Iguardia se encuentra interesada en la investigación del proceso, en especial en dos áreas del mismo, el Pretratamiento y el Proceso de Secado.

Agroindustrias Successo se encuentra ubicada en 3 av. 3-69 z.8 Mixco residenciales Los Balcones Mixco, Guatemala.

ANEXO 4

Pretratamiento, humectación y remojo de arroz precocido



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Pretratamiento, humectación



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Lixiviados



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Empaque de arroz



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Autoclave, esterilización de arroz



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Autoclave, esterilización de arroz



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Área de inoculación



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Preparación de inóculo



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Inoculación



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Agitación posterior a la inoculación



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Instalaciones asépticas adaptadas para el desarrollo del hongo



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Muestra del producto terminado



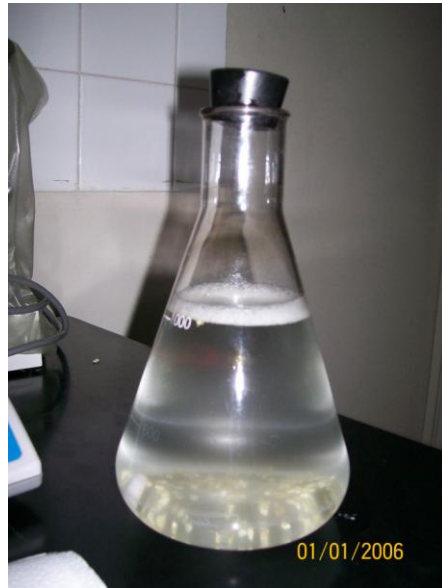
Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Muestra para el análisis de concentración de conidios



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Análisis de concentración de conidios



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Análisis de concentración de conidios



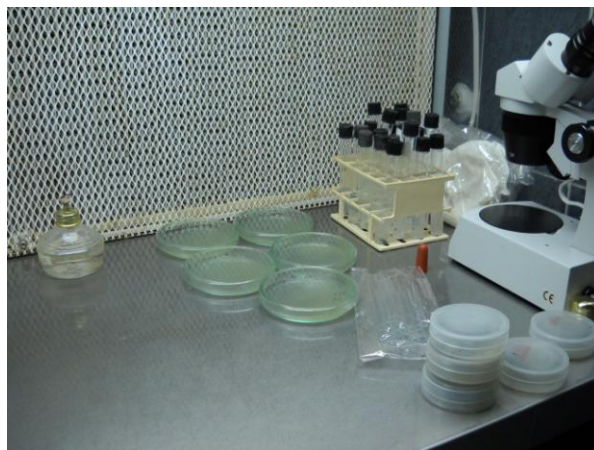
Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Análisis de concentración de conidios



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Análisis de viabilidad



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Análisis de viabilidad



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.

Análisis de viabilidad



Fuente: Emilia Arana, **Agroindustrias Successo**.