

**ESTANDARIZACIÓN DE UN SISTEMA DE BIOENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
DEGRADACIÓN DE FRUTOS DE CAFÉ**

PAULA ANDREA GONZÁLEZ PATIÑO

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2014**

**ESTANDARIZACIÓN DE UN SISTEMA DE BIOENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA
DEGRADACIÓN DE FRUTOS DE CAFÉ**

PAULA ANDREA GONZÁLEZ PATIÑO

Proyecto de Grado para Optar al Título de Especialista en Microbiología Industrial

**CONVENIO UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES - CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES DE CAFÉ “PEDRO URIBE MEJÍA” - CENICAFÉ
DISCIPLINA DE GESTIÓN DE RECURSOS NATURALES Y CONSERVACIÓN**

Director:

**JUAN CARLOS LOPEZ
Microbiólogo Esp.**

Asesor:

**NELSON RODRIGUEZ
Ingeniero Químico Ph D.**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
MANIZALES
2014**

Nota de aceptación

Firma de Director del Trabajo de Grado

Firma del presidente del Comité de Programa

Firma de integrante del Comité de Programa

Manizales, 05 diciembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue posible gracias al apoyo logístico y financiero de la división de Recursos Naturales y Conservación del Centro Nacional de Investigación del Café -CENICAFE - y a la colaboración de los doctores Nelson Rodríguez y Juan Carlos López. Así mismo, esta investigación fue posible gracias a la gestión realizada por la Universidad Católica de Manizales especialmente por la doctora Teresa Cabra.

RESUMEN

En este proyecto “ESTANDARIZACIÓN DE UN SISTEMA DE BIOENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE FRUTOS DE CAFÉ” se busca estandarizar un ensayo bioquímico para conocer y cuantificar el grado de descomposición que puedan generar en los diferentes estados de madurez del fruto de café, algunos productos comerciales químicos y biológicos seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos en una etapa anterior de este proyecto. Esta selección se basó en cuantificaciones en el fruto de parámetros como pH, humedad, temperatura, lignina, celulosa, y especialmente carbono y nitrógeno. Los productos seleccionados para la etapa fueron Viscozyme L, *Trichoderma viridae*, Degradador de compost, los productos se usaron en concentraciones respectivas de 10, 1 y 100 veces la recomendada por el comerciante. En esta etapa, los cuatro productos se evaluaron en frutos de diferente estado de madures, los cuales se clasificaron como grupo 1 (maduros y sobremaduros) y grupo 2 (pintones y verdes).

La investigación se desarrolló dos etapas, en la primera se realizó la estandarización de las unidades experimentales en las cuales se evaluarían los tratamientos, en la segunda se realizó la caracterización fisicoquímica de los frutos para medir el grado de descomposición.

De los resultados obtenidos se puede ver que la estandarización requirió de mucho tiempo por el tipo de suelo el cual era franco arenoso, la capacidades de campo de 26,54% y el punto de marchitez 12,41% del mismo, las cuales son relativamente bajas, por eso este suelo no alcanzó el margen superior de lo establecido en la literatura para suelos Chinchiná de 49,04 % humedad en cafetales tecnificados y 73,61 % en cafetales tradicionales (Salamanca et al, 2005). Pero se logró mantener en el rango de humedad a lo propuesto de 40 – 55 %.

Los resultados también permiten considerar que una vez aplicados los tratamientos, estos inician un proceso rápido de degradación sobre el fruto. Este efecto es diferencial dependiendo del tipo de fruto, siendo notorio principalmente sobre fruto maduro-sobremaduro.

Los productos TV y MM se destacan en estos procesos de degradación de fruto maduro-sobremaduro, el VZ y MM en los procesos con fruto verde, pudiendo ser considerados como candidatos en la evaluación en campo.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVOS	14
4.1. OBJETIVO GENERAL	14
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5. MARCO TEÓRICO.....	15
6. ANTECEDENTES	18
7. DESARROLLO METODOLÓGICO	20
7.1. LOCALIZACIÓN Y LINIAMIENTOS EXPERIMENTALES	20
7.2. MATERIALES Y EQUIPOS PARA ESTANDARIZACIÓN Y ANÁLISIS DE SUELO	21
7.2.1. Materiales.....	21
7.2.2. Equipos.	21
7.3. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE SUELO	21
7.3.1. Humedad.	21
7.3.2. Capacidad de absorción y Punto de marchitez.....	21
7.3.3. Ph, Materia orgánica y elementos pesados.....	22
7.4. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ESTANDARIZACIÓN DE UNIDADES EXPERIMENTALES.	23
7.5. MATERIALES Y EQUIPOS PARA ANÁLISIS DE DEGRADACIÓN DE FRUTO.	24
7.5.1. Productos degradadores de materia orgánica.	24
7.5.2. Sustrato.	24
7.5.3. Materiales.....	24
7.5.4. Equipos.	24
7.6. MONTAJE DE UNIDADES EXPERIMENTALES POR TIPO DE FRUTO.	25
7.6.1. Preparación general.	25
7.6.2. Preparación de Unidades Experimentales.....	25
7.6.3. Preparación de Tratamientos y aplicación.	25

7.6.4. Diseño experimental.	27
7.7. VARIABLES EVALUADAS EN EL FRUTO DE CAFÉ.	29
7.7.1. pH.	29
7.7.2. Temperatura.	29
7.7.3. Humedad.	29
7.7.4. Carbono.	29
7.7.5. Nitrógeno total Kjeldahl.	30
7.7.6. Celulosa.	30
7.8. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CUARTO DE ALMACENAMIENTO DEL MONTAJE.	31
7.9. EQUIPOS.	31
7.9.1. Temperatura y Humedad relativa del aire. Se llevaron registros diarios con un higrotermografo ubicado en un punto central del cuarto de almacenamiento de las UE.	31
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	32
8.1. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.	32
8.2. RESULTADOS ANÁLISIS DE SUELO.	32
8.2.1. Caracterización fisicoquímica de suelo.	32
8.2.2. Ensayos de estandarización de UE y humedad del suelo.	33
8.3. RESULTADOS ANALISIS DE FRUTO DE CAFÉ	35
8.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	36
9. CONCLUSIONES.	40
BIBLIOGRAFIA	42
ANEXOS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de trabajo para montajes en condiciones de laboratorio.....	20
Figura 2. Montaje para obtención de puntos de retención de humedad del suelo.	22
Figura 3. Preparación de Unidades experimentales. 1- Preparaciones de tarrinas con el suelo. 2- Cubrimiento de la tarrina con muselina. 3- Tarrina lista para almacenamiento.....	25
Figura 4. Preparación de productos comerciales degradadores de materia orgánica. 1- Productos usados para la mezcla degradador de compost. 2- <i>Viscozyme L</i> . 3- Peróxido de Hidrógeno 30% p/v. 4- Tratamiento degradador de compost preparado. 2.5 a 2.8- Se muestra los pasos para preparar el tratamiento con el <i>Trichoderma viridae</i>	27
Figura 5. Aplicación del tratamiento a los frutos de café.....	27
Figura 6. Distribución de unidades experimentales en el cuarto de almacenamiento. 1- Unidades experimentales en bandejas metálicas. 2- Estantes de almacenamiento.	29
Figura 7. Control de porcentaje de humedad de suelo.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos y dosis aplicadas en la primera etapa.	18
Tabla 2. Productos y dosis seleccionadas en la primera fase.....	19
Tabla 3. Relación de dosis y su sigla.....	19
Tabla 4. Resumen de ensayos de estandarización de UE y humedad del suelo.....	24
Tabla 5. Productos comerciales usados como tratamiento y dosis seleccionadas.	26
Tabla 6. Mezcla de microorganismos del degradador de compost.	26
Tabla 7. Distribución de unidades experimentales por tratamiento.	28
Tabla 8. Capacidad de campo y punto de marchitez.	32
Tabla 9. Ensayo 1 - con 3 agujeros irregulares, saturación por riego y dos tiempos de secado.	33
Tabla 10. Ensayo 2 - Diferente número de agujeros regulares y saturación por capilaridad.	33
Tabla 11. Ensayo 3 - un agujero regular, saturación por capilaridad y dos tiempos de secado.....	34
Tabla 12. Siglas de productos degradadores de materia orgánica.	35
Tabla 13. Promedios de temperatura, PH, Carbono y relación C/N en fruto maduro-sobremaduro en tiempo inicial (cero) dda de los tratamientos.....	36
Tabla 14. Promedios de temperatura, PH, Carbono y relación C/N en fruto verde en tiempo cero dda de los tratamientos.	37
Tabla 15. Promedios de temperatura, PH, Carbono, relación C/N y pérdida de humedad en fruto maduro-sobremaduro a 40 dda de los tratamientos.....	38
Tabla 16. Promedios de temperatura, PH, Carbono, relación C/N y pérdida de humedad en fruto Verde 40 dda de los tratamientos.	39

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica de <i>Viscozym L</i> hoja 1.....	44
Anexo 2. Ficha técnica <i>de Viscozym L</i> hoja 2.....	45
Anexo 3. Análisis de suelo.....	46
Anexo 4. Posiciones de la broca de acuerdo a la etapas de perforación del fruto. (Arcila, 2011) ..	47

1. INTRODUCCIÓN

La broca de café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) es un insecto que afecta fuertemente la producción de café ya que se alimenta y hospeda en el interior de los granos tanto verdes como maduros. Los primeros registros de esta plaga datan de 1901 (CIBC, 1990), sus orígenes se dan en Etiopía, África y desde allí se generó su dispersión mundial hacia el resto de África, Asia y América. (Benavides, 2005a).

En Colombia se establece desde 1988 encontrándose por primera vez en las regiones del sur de Nariño. Su dispersión ha sido rápida y devastadora debido principalmente a que en los territorios donde ha acometido, el ambiente se muestra favorable para su desarrollo al no tener enemigos naturales que establezcan un equilibrio o control biológico (Bustillo 1991). Desde su aparición se han establecido medidas de control culturales, químicas y biológicas, las cuales en general han mostrado un mediano alcance en el control de la plaga, debido en parte a los mecanismos de defensa que ha manifestado el insecto, como por ejemplo la habilidad de vuelo que presenta la hembra para dispersarse y migrar a otros cafetales.

Uno de los principales focos de reinfestación en las plantaciones se encuentra en los frutos caídos, los cuales, en un cafetal infestado caen debido a que han sido atacados cuando el fruto aún es muy joven, o por desprendimientos al momento de cosechar o efectos climáticos.

Por lo anterior, en el proyecto denominado “Uso de productos químicos y biológicos para la degradación de frutos de café en el suelo y su efecto en el desarrollo de la broca del café”. En una primera etapa se planteó el uso de siete productos biológicos y uno químico para evaluar su capacidad de inducir a diferentes concentraciones la degradación parcial de la materia orgánica del fruto de café en estados de madurez verde-pintón y maduro-sobremaduro. De esta fase se concluyó que 3 productos biológicos (*Viscozyme L*, *Trichoderma viridae*, una mezcla de *Trichoderma sp*, *Bacillus*, *Pseudomona* y el químico peróxido de Hidrógeno 30% p/v mostraron los mejores resultados.

En la presente etapa titulada “Caracterización fisicoquímica de la descomposición de frutos de café, en condiciones de laboratorio y campo” se retomaron estos 4 productos, se usaron las concentraciones que se determinaron como dosis óptima al igual que el tiempo óptimo de reacción en la fase anterior, se implementó el suelo a las unidades experimentales para tener una mayor aproximación a la realidad del fruto en campo, y se realizó una caracterización fisicoquímica más amplia.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales problemas que afronta la caficultura colombiana es el daño que causa el insecto *Hyipotheremus hampei* al perforar los frutos. En diversos estudios se han dilucidado aspectos biológicos y morfológicos del insecto, los ciclo de vida y su relación con la planta del café, estimando y calculando los daños y pérdidas que genera el insecto en el fruto de café.

Estos estudios han demostrado que una de las maneras de infestación del café inicia en los frutos que se han caído del árbol, razón por la cual, es importante buscar mecanismos de acción que bloqueen este ciclo de contagio. Una de las estrategias que se plantean para resolver esta problemática consiste en propiciar la descomposición de estos frutos de café en el suelo, logrando con ello evitar y prevenir tanto el resurgimiento como la dispersión de plaga.

En vista de lo anterior es necesario adelantar estudios controlados en laboratorio que permitan evaluar el proceso de descomposición y efectividad de este método para posteriormente ser aplicado en los suelos de los cafetales Colombianos.

3. JUSTIFICACIÓN

El alojamiento del insecto en frutos de café caídos al suelo se ve diezmada si los frutos no se encuentran en condiciones que generen al insecto un hábitat adecuado, como por ejemplo frutos secos o descompuestos.

En este estudio en particular se busca caracterizar y analizar el grado de descomposición en frutos de café de diferentes estados de madurez, causado por 4 productos comerciales descomponedores de materia orgánica, los cuales en anteriores experimentaciones realizadas en la Disciplina de Recursos Naturales y Conservación de Cenicafé, demostraron tener comportamiento de aceleradores en la descomposición de los frutos de café.

Sin embargo, para trascender lo experimentado es necesario no solo cualificar sino que además cuantificar el grado de descomposición, mediante una caracterización fisicoquímica que permita evaluar la interacción entre el sustrato y el producto, y de acuerdo a ello valorar la capacidad de estos productos para degradar la lignocelulosa del fruto de café.

Además, con estos resultados se continuará con trabajos de investigación que conlleven a implementar en las estrategias de Manejo sanitario del cultivo del café, el producto seleccionado de acuerdo a los mejores resultados como degradador.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el grado de descomposición que pueden generar algunos productos biológicos comerciales descomponedores de materia orgánica sobre frutos de café en diferentes estados de madurez.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar un sistema de ensayo, que permita evaluar la descomposición de frutos de café, bajo condiciones de laboratorio.

Evaluar en el fruto de café parámetros fisicoquímicos que permitan comparar el grado de descomposición causado por los diferentes productos degradadores de materia orgánica.

Seleccionar el producto que muestre las mejores cualidades como degradador para desarrollar posteriores trabajos en el campo.

5. MARCO TEÓRICO

En un estudio que evaluó la población y dispersión de la broca hacia otros cafetales después de realizar el zoqueo del cafeto, se analizó el desarrollo biológico de la broca en frutos caídos y se observó que pasados 100 días aún se encontraban brocas vivas. Después de este tiempo disminuyó la población, sin embargo, el estado de brocas muertas fue bajo, lo que significó que las brocas emergieron del fruto hacia nuevas áreas. En este estudio se calculó que en 187 días de evaluación aproximadamente pueden migrar entre 3.617.000 y 2.575.667 brocas adultas por hectárea (Castaño et al, 2005).

Pero el zoqueo es solo uno de los factores que generan frutos caídos al suelo, pues en tiempos de sequía también se generan precipitaciones de frutos al suelo, y en el caso de que estos frutos estén infestados, la broca encontrará un ambiente óptimo para su reproducción por la baja humedad. En estudios se ha calculado que el 10% de toda la producción no se cosecha, quedando en la planta y el suelo (Bustillo et al. 1998).

Para hacer frente a esta plaga se realizan controles esencialmente por tres medios los cuales son culturales, biológicos y químicos. La mayoría de las veces no basta con usar solo uno de los controles ya que la susceptibilidad del insecto varía de acuerdo a la posición de perforación en la que se encuentre (Anexo 4), por ejemplo el uso de insecticidas solo es útil cuando la broca aún no ha llegado al interior del fruto, por lo que se hace necesario el uso integrado de controles.

Dentro de los controles culturales está el repase que se trata de la recolección de frutos verdes, maduros, sobremaduros, secos y podridos después de la cosecha que se encuentren en la planta y en el suelo, los cuales deben secarse de inmediato.

El control mediante insecticidas químicos o biológicos solo es eficiente cuando el insecto se encuentra penetrando el fruto, pues cuando pasa al endospermo solo es susceptible a parasitoides, además generalmente su uso es muy errático debido a malas dosificaciones, calibración de quipo, operario, la topografía y condiciones ambientales, sin olvidar que los químicos en la mayoría de los casos afectan la fauna nativa y que algunos componentes esenciales son altamente tóxicos (Bustillo, 2006). Además causan contaminación ambiental, residualidad y en general desequilibrio ecológico y se ha visto que con el paso del tiempo la broca ha desarrollado resistencia a los químicos (Ruales, 1997).

Dentro de los controles biológicos usados en los cafetales Colombianos algunos de ellos son parasitoides como *C. stephanoderis*, *P. nasuta*, *P. coffea*, hongos como la *Beauveria bassiana*. Nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*. Sin embargo, desde

hace 15 años no se han presentada avances significativos en la producción masiva de entomonemátodos (Bustillo, 2006).

En vista de lo anterior, en esta investigación se plantea como método alternativo atacar indirectamente la broca dejándola sin frutos hospederos en el suelo, mediante la degradación del material orgánico del fruto. Permitiendo que esta se integre más rápidamente al suelo superficial o horizonte A, ya que de forma natural esta integración es un proceso muy lento aunque continuo el cual puede tardar meses o años dependiendo de las condiciones ambientales, propiciado por bacterias, hongos y actinomicetos (Thompson *et al*, 1988).

Así, de acuerdo a diferentes estudios se conoce que el material lignocelulósico del fruto puede ser degradado por medios físicos, químicos y enzimáticos o con microorganismos. Por acción enzimática la transformación de celulosa a glucosa, está dada por la acción sinérgica de tres enzimas: endo- glucanasas, exoglucanasas y β - glucosidasas, y las enzimas delignificantes son las enzimas oxidativas extracelulares (oxidoreductasas) (Salcedo *et al*, 2011).

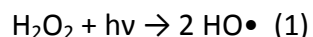
Por microorganismos hay una gran cantidad de especies de uso ya conocido e industrializado. Entre ellas la especie del género *Trichoderma* el cual es un hongo filamentoso, que se encuentra en ambientes terrestres y acuáticos, y que sintetiza enzimas como polisacaridasas, celulasas, xilanasas y quitinasas, por lo que pueden degradar diferentes fuentes de residuos celulósicos y lignocelulósicos (Argumedo *et al*, 2009). En este hongo la luz influye fuertemente en su esporulación, la producción de metabolitos secundarios se activa en presencia de humedad con un óptimo de 60% de capacidad de retención de humedad del suelo y pueden crecer en pH entre 5,5 a 8,5 (Martínez, *et al*, 2013).

Por su parte, bacterias biocontroladoras como *Bacillus* incluyen una gran variedad de especies gram positivas, catalasa positivo, formadores de endosporos, que fermentan la glucosa (Cariello *et al*, 2007), no patógenas, habilidosas para producir una gran variedad de antibióticos y enzimas hidrolíticas extracelulares, crecen a temperaturas desde 15 hasta 55 °C, también son promotoras de crecimiento en plantas y se ha comprobado su acción como degradadoras de estiércol (Deza *et al* 2012). De igual manera la *Pseudomona* posee genes que codifican enzimas, con las que se lleva a cabo la mineralización de contaminantes, su desarrollo óptimo está en humedades del orden del 25 - 75 % de la capacidad de campo, y en suelos saturados de agua entre el 30% a 90%

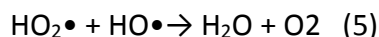
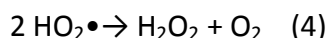
ofrece rendimiento óptimos de degradación. La *Pseudomonas aeruginosa* posee la capacidad de solubilizar los compuestos hidrofóbicos (Gómez *et al* 2008).

Sin embargo es conveniente recordar que la eficiencia de los microorganismos se puede limitar por condiciones físicas y químicas como factores ambientales, pH, temperatura, concentración de minerales, humedad del suelo, respiración y nutrientes disponibles. Por ejemplo una baja humedad disminuye la actividad metabólica bacteriana, la temperatura óptima para acción microbiana en biorremediación de suelos está entre 20°C y 40°C y a mayor temperatura la velocidad de degradación aumentará, pero exceder los 40°C puede causar desnaturalización de enzimas y proteínas de las bacterias conllevando a disminución en la actividad microbiana (Gómez *et al* 2008).

Para tratamientos de degradación química, es ampliamente conocido en las Tecnologías o Procesos Avanzados de Oxidación (TAOs, PAOs) que el peróxido de hidrógeno activado por UV realiza un eficiente proceso fotoquímico mediante el cual se oxida la materia orgánica, y aunque normalmente estas técnicas son usadas en aguas, su eficiencia sugiere su utilidad para ser usado como control degradante de frutos de café en esta investigación. El mecanismo general por el cual se da esta reacción se describe en la ecuación 1



La fotólisis del peróxido en grandes reactores se realiza por luz artificial de lámparas de Hg a 254 nm, sin embargo el máximo de absorción del peróxido es de 220nm, y se sabe que es más eficiente en medios alcalinos, dada la baja sección eficaz de absorción de H₂O₂ a 254 nm, se necesitan altas concentraciones del oxidante, sin embargo, en exceso de peróxido da lugar a reacciones competitivas que pueden inhibir la degradación, ya que HO• pueden recombinarse y reaccionar, por lo que se debe determinar la cantidad óptima de H₂O₂ requerida en cada caso. En las reacciones se muestran a continuación se describe como desde la (2) hasta la (5) tiene el HO• como reactivo (Domènech *et al*, 2001):



6. ANTECEDENTES

En una primera etapa de este proyecto se evaluaron los productos comerciales con capacidad degradadora de materia orgánica que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Productos y dosis aplicadas en la primera etapa.

Producto Comercial	Dosis Recomendada	Cantidades Aplicadas a 450 g de fruto		
		Recomendada	10 veces la recomendada	100 veces la recomendada
Viscozyme L	0,3 ml/kg	0,14 ml	1,35 ml	13,5 ml
Ultrazym AFP-L	0,5 ml/kg	0,23 ml	2,25 ml	22,5 ml
Celluclast 1,5 L	0,82 ml/kg	0,37 ml	3,67 ml	36,7 ml
<i>Trichoderma viridae</i>	10 g /kg	4,5 g	45 g	450 g
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 g /kg	4,5 g	45 g	450 g
Microorganismos Eficaces	0,26 ml/kg	0,1 ml	1,1 ml	11,1 ml
Degradador de compost	0,26 ml/kg	0,1 ml	1,1 ml	11,1 ml
Peróxido de Hidrógeno 30% p/v	0,1 ml/kg	0,05 ml	0,45 ml	4,5 ml

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante análisis fisicoquímicos realizados en los frutos de café con diferente estado de maduración, en esta primera fase se eligieron los productos mostrados en la tabla 2, por presentar mayor grado de degradación en los frutos tratados, y se eligió la concentración óptima para cada producto. Esta dosificación se aclara en la tabla 3.

Tabla 2. Productos y dosis seleccionadas en la primera fase.

Producto Comercial	Dosis recomendadas por casa comercial	Dosis elegida	Cantidades aplicadas a 450 g de frutos / 340 ml H2O
<i>Viscozyme L</i>	0,3 ml/kg	C2	1,35 ml
<i>Trichoderma viridae</i>	10 g /kg	C1	4,5 g
Degradador de compost (<i>Trichoderma sp, Bacillus, Pseudomona</i>)	0,26 ml/kg	C3	11,1 ml
Testigo descomponedor (peróxido de Hidrógeno 30% p/v)	N.A	C3	4,5 ml
Testigo absoluto	N.A	N.A	0 ml
Testigo relativo (agua)	N.A	N.A	4,5 ml

Tabla 3. Relación de dosis y su sigla.

Dosis	Sigla
Recomendada por casa comercial	C1
10 veces la Recomendada	C2
100 veces la Recomendada	C3

7. DESARROLLO METODOLÓGICO

7.1. LOCALIZACIÓN Y LINIAMIENTOS EXPERIMENTALES

Los montajes se llevaron a de acuerdo al siguiente esquema:

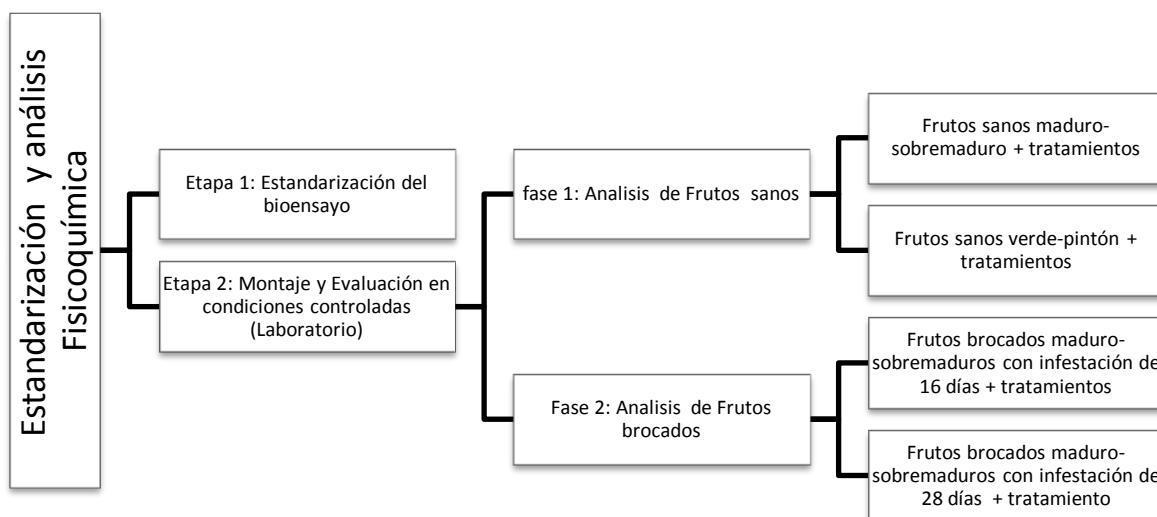


Figura 1. Esquema de trabajo para montajes en condiciones de laboratorio.

Los análisis se llevaron a cabo en los laboratorios de la división de Recursos Naturales y Conservación de Cenicafé.

Para la parte experimental se tuvo en cuenta el tiempo generacional y estados de crecimiento de la broca, este tiempo generacional se tomó en promedio de 40 días, de la literatura consultada para establecer este tiempo solo se tuvo en cuenta la establecida en condiciones de campo, ya que este ciclo depende de las condiciones del medio ambiente. Entre lo consultado un estudio realizado en campo demuestra que en Colombia este tiempo generacional se da en 45 días a 22 °C y en 60 días a 19 °C (Ruiz, 1996), mientras que en otros estudios este tiempo fue inferior.

Para garantizar que el suelo usado en los montajes se mantuviera lo más semejante posible al estado de humedad real del suelo en campo, fue necesario realizar pruebas preliminares que generaran las pautas para establecer en alguna medida el control de esta variable. Y de esta manera ajustar y mantener la humedad dentro del rango establecido para suelos de Chinchiná, Caldas. Las cuales corresponden aproximadamente a 49,04 %

humedad en cafetales tecnificados y 73,61 % en cafetales tradicionales. (Salamanca et al, 2005). Una vez controladas las variables de suelo se procedió a hacer los montajes para evaluación de la degradación de los frutos.

Todos los análisis se realizaron por triplicado para cada producto y se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos estandarizados en los laboratorios de Cenicafé.

7.2. MATERIALES Y EQUIPOS PARA ESTANDARIZACIÓN Y ANÁLISIS DE SUELO

7.2.1. Materiales.

Para realizar el montaje de las unidad experimental se usaron recipientes de plástico transparente de 17 onzas, suelo, muselina y bandas elásticas, bandejas metálicas, agua., punzón de 2 mm de diámetro.

7.2.2. Equipos.

Balanza analítica marca Metter Toledo modelo AG 204, estufa de convección natural marca Memmert modelo U40, dispositivos de presión (cilindro de aire), controles de presión, ollas de presión, placa de cerámica con diafragma de neopropeno, membrana de celulosa, tamiz de 2 mm.

7.3. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE SUELO

Para empezar se realizaron análisis fisicoquímicos del suelo a usar en los montajes, con el objetivo de conocer las cualidades y características del mismo, los análisis realizados fueron los siguientes.

7.3.1. Humedad.

Se realizó por el método gravimétrico. Para ello se pesaron 20 g de suelo y se secaron a 107°C hasta peso constante en una estufa de convección natural. El reporte se generó en base seca de acuerdo a la ecuación (6) (Montenegro, 1990).

$$\% \text{ Humedad base seca} = \frac{\text{Peso}_{\text{inicial}} - \text{Peso}_{\text{final}}}{\text{Peso}_{\text{final}}} * 100 \quad (6)$$

7.3.2. Capacidad de absorción y Punto de marchitez.

Se realizó la evaluación de retención de humedad del suelo por el método de la olla y membrana de presión. Se inició tamizando las muestras de suelo seco al aire con un

tamiz número 10 (2mm), el suelo se sometió a saturación con agua por capilaridad en cilindros sobre una malla plástica en una bandeja, en simultaneo se puso a humedecer durante 24 horas el plato de cerámica y la membrana, pasadas las 24 horas el plato de cerámica y la membrana sin exceso de agua se llevaron a las respectivas olla de presión, el plato de cerámica para la olla en la cual se ejerció 0,33 atm de presión y la membrana en la olla con 15 atm de presión. Las muestras se repartieron en los aros dentro de las ollas y se procedió a ejercer la presión por 48 horas. Pasado este tiempo se pesaron 20 gramos por muestras en capsula previamente pesadas y se secaron en estufa a 107 °C por 24 horas, seguido a esto se procedió a pesar la muestra seca. Los puntos de retención se expresan en porcentaje de humedad y se calculan de acuerdo a la ecuación (6) (Zamudio *et al*, 2006).



Figura 2. Montaje para obtención de puntos de retención de humedad del suelo.

6.1 Tamiz N° 10, 6.2 suelo en proceso de saturación, 6.3 equipo de ollas de presión y dispositivo de presión, 6.4 olla de presión para 0,33 atm, 6.5 y 6.6 aros antes y después de ejercer la presión de 0,33 atm, 6.7 y 6.8 aros antes y después de ejercer la presión de 15 atm, 6.9 las muestras de la parte superior fueron tratadas con 15 atm y las inferiores con 0,33 atm.

7.3.3. Ph, Materia orgánica y elementos pesados.

Se establecieron de acuerdo al reporte de fertilidad del suelo realizado por el laboratorio Multilab Agroanalítica. (Anexo 3)

7.4. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ESTANDARIZACIÓN DE UNIDADES EXPERIMENTALES.

Se realizaron diferentes ensayos para determinar la variación de humedad del suelo de acuerdo a cambios en los montajes de UE. En general los diferentes ensayos consistieron en usar recipientes plásticos de 17 onzas los cuales se perforaron con diferentes números de agujeros, cada recipiente se llenó con 200 gr de suelo estéril y se cubrió con muselina, la cual se fijó al recipiente con una banda elástica, las UE se dispusieron en bandejas metálica que contenía aproximadamente 400 ml de agua destilada, logrando de esta manera que el suelo ganara humedad por capilaridad, así el agua se depositaría de acuerdo a la porosidad del suelo de la misma manera como se encontrarían en campo, aunque en un primer ensayo se usó el riego y no la capilaridad. La variación en los diferentes montajes consistió en el tiempo de exposición al agua, la forma de suministrar el agua, y el número de perforaciones de los recipientes plásticos. En estos ensayos se midió el porcentaje de humedad relativa, la cual se realizó por el método gravimétrico y para todos los casos se pesaron 20 g de suelo y se secaron a 107°C hasta peso constante en una estufa de convección natural, el reporte se generó en base seca de acuerdo a la ecuación (6) (Montenegro, 1990) y también se midió la pérdida de agua por escurrimiento al retirar las UE de las bandejas con agua.

Tres ensayos fueron los más representativos, el primero consistió en usar los recipientes plásticos con tres agujeros, los cuales no eran regulares, el agua se adicionó con una jeringa a manera de riego y se dejó transcurrir un día para medir el % de humedad, las muestras se dejaron secar a 6 y 15 horas. Cada ensayo se realizó con cinco repeticiones.

En el segundo ensayo se tuvo especial cuidado en la perforación de los recipientes, para lo cual se usó el punzón buscando con este que los agujeros fueran de iguales dimensiones, y se usaron 1, 2, 4, y 8 perforaciones, se humedeció el suelo por capilaridad y se ensayó con 9 horas de secado para obtener el % de humedad, con cada número de perforaciones se realizó cinco repeticiones. En total el ensayo tomó siete días, en los cuales se realizaron lecturas a los 3 días de sumergir los recipientes en agua, seguido a esto, se sacaron unos del agua para medirles el agua perdida por escurrimiento y otros de dejaron en agua contante, a los 7 días se hizo lectura de humedad para ambos.

En el tercer ensayo solo se usaron recipientes con un agujero se humedeció el suelo por capilaridad, se realizaron pruebas de humedad a 1 día y se dejó en escurrimiento 4 días y se midió nuevamente la humedad. Se realizaron cinco repeticiones y se secó a 9 y 24 horas.

Tabla 4. Resumen de ensayos de estandarización de UE y humedad del suelo

Ensayo	N° de agujeros	Método de humedecido	Días para humedecerse	Primer % humedad	días de escurrimiento	Segundo % humedad	Tiempo de secado
1	3 irregulares	riego	1	si	0	no	6 y 15
2	1, 2,4,8	capilaridad	3	si	4	si	9
	1, 2,4,8	capilaridad	7	si	0	no	9
3	1	capilaridad	1	si	1	si	9 y 24
	1	capilaridad	1	si	4	si	9 y 24

7.5. MATERIALES Y EQUIPOS PARA ANÁLISIS DE DEGRADACIÓN DE FRUTO.

7.5.1. Productos degradadores de materia orgánica.

Se usaron biodregadantes de marcas comerciales *Viscozyme L*, *Trichoderma viridae* y una mezcla de tres productos Pseudobiol, Subtilin, Trichobiol la cual fue nombrada como degradador de compost. Como testigo descomponedor se usó el químico peróxido de Hidrógeno 30% p/v.

7.5.2. Sustrato.

Se utilizaron frutos de café de Variedad Castillo Naranjal, cosechados en la Estación Experimental Naranjal situada en la vereda de Naranjal Municipio de Chinchiná – Caldas. Se seleccionaron en dos grupos de acuerdo con su grado de madurez; el primer grupo incluyeron frutos verdes y pintones y el segundo grupo maduros y sobre-maduros.

7.5.3. Materiales.

Para realizar el montaje de las unidad experimental se usaron recipientes de plástico transparente de 17 onzas, suelo estéril, muselina y bandas elásticas, punzón de 2 mm de diámetro, bandejas metálicas.

7.5.4. Equipos.

En la realización de los análisis se requirió: Balanza analítica marca Metter Toledo modelo AG 204, pH-metro marca Metter Toledo modelo Seven easy con un electrodo combinado Referencia InLab 413SG, estufa de convección natural marca Memmert modelo U40,

mufla marca Abarephor modelo 1200-220-3, unidad de destilación Buchí B-323, centrifuga, espectrofotómetro, equipo para filtración al vacío, extractor soxhlet.

7.6. MONTAJE DE UNIDADES EXPERIMENTALES POR TIPO DE FRUTO.

7.6.1.Preparación general.

Se esterilizaron aproximadamente 15000 gr de suelo, se perforaron en la parte inferior 72 recipientes plásticos usando un punzón de 2 mm de diámetro, se seleccionaron cuidadosamente 3000 gr de fruto para garantizar que los granos a usar estuvieran en las condiciones adecuadas, esta selección se realizó con un día de anterioridad al montaje para evitar descomposición del fruto.

7.6.2.Preparación de Unidades Experimentales.

Cada recipiente se llenó con 200 gr de suelo estéril, sobre el suelo se depositaron 20 granos de fruto previamente impregnados por los diferentes tratamientos y previamente pesados, cada recipiente se cubrió con muselina la cual se fijó al recipiente con una banda elástica.



Figura 3. Preparación de Unidades experimentales. 1- Preparaciones de tarrinas con el suelo. 2- Cubrimiento de la tarrina con muselina. 3- Tarrina lista para almacenamiento.

7.6.3.Preparación de Tratamientos y aplicación.

Los productos analizados se usaron de acuerdo a las cantidades mostradas en la tabla 5, el peso del *Trichoderma viridae* hace referencia al peso bruto del producto que contiene la espora, este se humedeció en agua para liberar las esporas del hongo (figura 4). La mezcla

del degradador de compost se especifica en la tabla 5. La aplicación de los productos al sustrato se realizó en cajas galleteras acrílicas con dimensiones de 17 cm de largo, 11 cm de ancho, y 6 cm de alto (figura 5).

Tabla 5. Productos comerciales usados como tratamiento y dosis seleccionadas.

Producto	Cantidades aplicadas a 450 g de frutos / 340 ml H₂O
<i>Viscozyme L</i>	1,35 ml
<i>Trichoderma viridae</i>	4,5 g
Degradador de compost	11,1 ml
Testigo descomponedor (peróxido de Hidrógeno 30% p/v)	4,5 ml
Testigo absoluto	0 ml
Testigo relativo (agua)	4,5 ml

Tabla 6. Mezcla de microorganismos del degradador de compost.

Producto	Microorganismo	Cantidad
Pseudobiol	<i>Pseudomona</i>	6 ml
Subtilin	<i>Bacillus</i>	6 ml
Trichobiol	<i>Trichoderma sp</i>	1,8 g



Figura 4. Preparación de productos comerciales degradadores de materia orgánica. 1- Productos usados para la mezcla degradador de compost. 2- *Viscozyme L*. 3- Peróxido de Hidrógeno 30% p/v. 4- Tratamiento degradador de compost preparado. 2.5 a 2.8- Se muestra los pasos para preparar el tratamiento con el *Trichoderma viridae*.



Figura 5. Aplicación del tratamiento a los frutos de café.

7.6.4. Diseño experimental.

El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorio, conformado por seis tratamientos (incluidos los testigos): tres productos evaluados, un testigo absoluto (sin aplicación de agua), un testigo relativo (aplicación de agua), y un testigo (peróxido de hidrógeno) con acción degradadora comprobada (Tabla 7). Cada tratamiento contó con

tres repeticiones y cada repetición por cuatro UE, en total 12 UE por tratamiento para garantizar un peso mínimo de frutos de 240 gr requeridos para los análisis químicos y físicos.

Este mismo diseño se utilizó tanto para los dos grupos de frutos: verdes-pintones y maduro-sobremaduro. Las muestras por tratamiento se tomaron al inicio del experimento (tiempo cero) y pasados 40 días tiempo en el cual se finalizó el experimento (Tiempo 40). Las UE para tiempo 40 se dispusieron aleatoriamente en bandejas que estaban localizadas en estantes metálicos debidamente marcados para indicar la posición de cada UE como se muestra en la figura 6. Los montajes se realizaron de manera individual para cada grupo de frutos. En la tabla 6 se describe la distribución de UE.

Tabla 7. Distribución de unidades experimentales por tratamiento.

Productos	Tiempos (análisis)	Repeticiones x Tratamiento	Unidades Experimentales x Tratamiento	Total UE x tiempo de análisis
<i>Viscozyme L</i>	0 y 40 días	3	12	72
Trichoderma viridae				
Degradador de compost				
Testigo descomponedor (Peróxido de Hidrógeno 30% p/v)				
Testigo absoluto				
Testigo relativo (agua)				

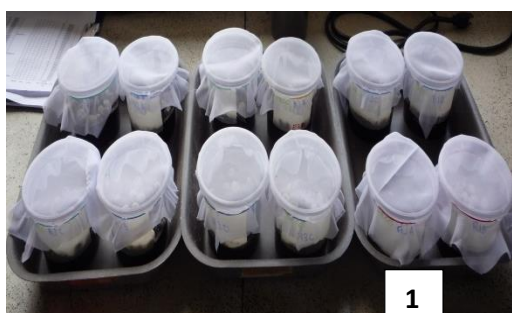


Figura 6. Distribución de unidades experimentales en el cuarto de almacenamiento. 1- Unidades experimentales en bandejas metálicas. 2- Estantes de almacenamiento.

7.7. VARIABLES EVALUADAS EN EL FRUTO DE CAFÉ.

A continuación se describen las variables evaluadas por tratamiento y por grupo de fruto evaluado

7.7.1. pH.

Las mediciones se realizaron por el método potenciométrico. Para el análisis se pesaron 5 gr de fruto los cuales fueron posteriormente triturados con un mortero y diluidos en 20 ml de agua destilada.

7.7.2. Temperatura.

Esta variable se midió por método potenciométrico y se realizó al momento de tomar los datos de pH en el mismo equipo.

7.7.3. Humedad.

Se determinó por el método gravimétrico. Para ello se pesaron 20 g de fruto y se secaron en estufa de convección natural a 107 °C hasta peso constante. El reporte para fruto se generó en base húmeda de acuerdo a la ecuación (7)

$$\% \text{ Humedad base húmeda} = \frac{\text{Masa}_{\text{inicial}} - \text{Masa}_{\text{final}}}{\text{Masa}_{\text{inicial}}} * 100 \quad (7)$$

7.7.4. Carbono.

La determinación de carbono se realizó por el método de calcinación en mufla, para análisis se tomaron 0,5 gramos de fruto seco y molido y se calcinaron a 700 °C por tres horas, posteriormente la muestra fue pesada, la cantidad de cenizas corresponde a la cantidad de materia inorgánica y la fracción volátil se obtiene de la diferencia entre los pesos antes y después de calcinar.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Masa}_{\text{cenizas}}}{\text{Masa}_{\text{inicial}}} * 100 \quad (8)$$

$$\% \text{ Carbono} = (100 - \% \text{ cenizas}) * 0,58 \quad (9)$$

7.7.5. Nitrógeno total Kjeldahl.

Se determinó por el método Kjeldahl. Mediante una digestión se propicia la oxidación de la muestra, para ello se tomaron 0,1 gramos de fruto seco y molido, se le añadieron 10 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄ 95-97 %) y un cuarto de tableta catalizadora Kjeldahl (Merck), la mezcla es sometida a altas temperaturas en una unidad de digestión Buchi 430 durante 1:15 hora para descomponer la materia orgánica orgánicas y transformar el nitrógeno en sulfato ácido de amonio, en este momento la muestra se ha tornado traslucida. En la unidad de destilación Buchi 321 ó B-323 se descompone el sulfato ácido de amonio con Hidróxido de sodio en exceso (NaOH al 32 %) y agua destilada para alcalinizar el medio y así liberar el amoniaco, el amoniaco destilado se captura en una mezcla de 20 ml de ácido bórico al 4% v/v, 20 ml de agua destilada y 3 gotas de indicador mixto (Azul de metileno-Rojo de metilo) formándose borato de amonio, este se titula con ácido clorhídrico (HCl) al 0,1N estandarizado, hasta un cambio de color gris traslucido.

$$\text{Nitrogeno total Kjeldhal (ppm)} = \frac{(V_1 - V_2) * N * F * 14 * 1000}{M} \quad (10)$$

Donde:

V₁= Volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra [ml].

V₂= Volumen de HCl gastado en la titulación del blanco [ml].

N = Normalidad del HCl.

M= Peso de muestra en [g] o volumen de la muestra en [ml].

F= Factor de dilución si la muestra está líquida.

7.7.6. Celulosa.

El método utilizado es por espectrofotometría, de acuerdo a la determinación colorimétrica descrita en el método de Updegraff en 1969. Para ello pesó 0,1 gramos de la muestra de café seca y molido, se agregó 1 ml del reactivo aceto-nítrico a la concentración de referencia y 1 ml de agua destilada, se calentó la muestra hasta punto

de ebullición en baño maría durante 30 minutos, se lavó la muestra con procesos de centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos hasta obtener un sobrenadante completamente claro, se decantó y se adicionó 1 ml de ácido sulfúrico al 67 % v/v y se dejó en reposo durante 1 hora, finalizado el tiempo se adiciona agua destilada aforando a 50 ml para diluir la muestra, se homogeniza la muestra y se toman alícuotas de 0,7 ml, se aforaron a 5 ml con agua destilada, se adicionó 10 ml de reactivo de antrona de forma gradual para evitar una reacción violenta, se sumergió la muestra en un baño de agua a temperatura de ebullición y se dejó por 16 minutos, se enfrió en baño de hielo por 20 minutos, se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos, y se leyó la absorbancia a 620 nm contra un blanco.

$$Lec\ grafica = \frac{abs+0.0129}{0.0187} * 100 \quad (12)$$

$$\% Celulosa = \frac{Lec\ Grafica}{peso\ muestra\ seca * 10^6} * 100 * 7 \quad (13)$$

7.8. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN EL CUARTO DE ALMACENAMIENTO DEL MONTAJE.

La humedad y la temperatura influyen en la degradación de los frutos debido a que tienen efecto sobre los microorganismos y enzimas, así mismo en el desarrollo del ciclo de la broca, por lo tanto es importante conocer estas variables.

7.9. EQUIPOS.

En la realización de los análisis se requirió: Termo-higrografo análogo.

7.9.1. Temperatura y Humedad relativa del aire. Se llevaron registros diarios con un higrotermografo ubicado en un punto central del cuarto de almacenamiento de las UE.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.

Se realizó un análisis descriptivo por cada tratamiento y para cada una de las variables obtenidas en los diferentes tipos de fruto. Para determinar las diferencias estadísticas entre tratamientos, se realizó un análisis de varianza bajo el modelo de análisis del diseño experimental completamente aleatorio al 5% y para determinar estadísticamente diferencias de las mayores respuestas de cada variable por tratamiento, se realizó una prueba de comparación de medias Duncan al 5%. Para el análisis de los datos, se empleó el programa estadístico SAS versión 9,0 (SAS, 2008)

8.2. RESULTADOS ANÁLISIS DE SUELO.

A continuación se muestran los resultados de la caracterización y estandarización de UE y humedad del suelo.

8.2.1. Caracterización fisicoquímica de suelo.

Tabla 8. Capacidad de campo y punto de marchitez.

Identificación de la muestra	Retención de humedad % a 0,33 atm	Retención de humedad % a 15 atm	Humedad aprovechable %
Suelo UE	26,54	12,41	14,13

Estos puntos de % de humedad se encuentran relativamente bajos y con un porcentaje de humedad aprovechable estrecho, sin embargo están dentro de los rangos mínimos esperados para el suelo de Chinchiná de acuerdo al historial de análisis realizados anteriormente en el laboratorio de suelo de Cenicafé.

Los resultados del análisis de suelo realizados por el laboratorio Multilab agroanalítica de pH, elementos pesados (N, P, K, Ca, Mg, Al), material orgánico y textura, se muestran en el anexo 3. De ellos se identifica un suelo en condiciones normales, la textura franco arenosa identificada en estos análisis nos muestra un suelo superficial equilibrado, sin embargo el hecho de que sea arenoso fue posiblemente el causante de que el porcentaje de humedad relativo conseguido en las pruebas de estandarización de humedad, hubiera dada cercano

al límite inferior de lo registrado en la literatura para suelos de Chinchiná (Salamanca et al, 2005).

8.2.2. Ensayos de estandarización de UE y humedad del suelo.

Los resultados de los tres ensayos se muestran a continuación:

Tabla 9. Ensayo 1 - con 3 agujeros irregulares, saturación por riego y dos tiempos de secado.

Ensayo	N° de agujeros	Método de saturación	Días de saturación	Primer % humedad	días de escurrimiento	Segundo % humedad	Tiempo de secado
1	3 irregulares	Riego	1	557,5	0	no	6
1	3 irregulares	Riego	1	572,2	0	no	15

En este primer ensayo se evidencia una alta sobresaturación del suelo, lo que llevo a reevaluar el método de saturación, ya que con riego el agua formo una película en la superficie, además influyó que los agujeros no permitían el drenaje adecuado del agua. Por otra parte, los tiempo de secado 6 y 15 horas mostraron diferencias, aunque aproximadamente entre las 9 y 15 horas el porcentaje no cambio mucho, por lo que se definen las condiciones para el segundo ensayo.

Tabla 10. Ensayo 2 - Diferente número de agujeros regulares y saturación por capilaridad.

Ensayo	N° de agujeros	Método de saturación	Días de saturación	Primer % humedad	días de escurrimiento	Segundo % humedad	Tiempo de secado
2	1	Capilaridad	3	53,1	4	46,1	9
	2	Capilaridad	3	62,2	4	45,4	9
	4	Capilaridad	3	60,8	4	49,3	9
	8	Capilaridad	3	56,5	4	47,5	9
	1	Capilaridad	7	54,6	0	NA	9
	2	Capilaridad	7	63,7	0	NA	9
	4	Capilaridad	7	64,5	0	NA	9
	8	Capilaridad	7	63,4	0	NA	9

En este ensayo se pretendía determinar la saturación del suelo por capilaridad y el escurrimiento de acuerdo al número de agujeros. De los resultados se observa que, como era de esperar el porcentaje aumenta con un mayor número de agujeros, sin embargo la relación de drenaje también aumenta al aumentar los agujeros, lo cual no es conveniente porque las UE perderían agua con mayor facilidad lo que implica mayor esfuerzo para mantener el % de humedad en los límites adecuados. Respecto al número de días de saturación no hay mucha diferencia entre un determinado número de perforaciones y los dos tiempos de saturación, esto se debe a la capacidad máxima de absorción del suelo. Usar la capilaridad disminuyó notablemente los porcentajes obtenidos en el primer ensayo. De acuerdo a estos resultados se procede con el tercer ensayo.

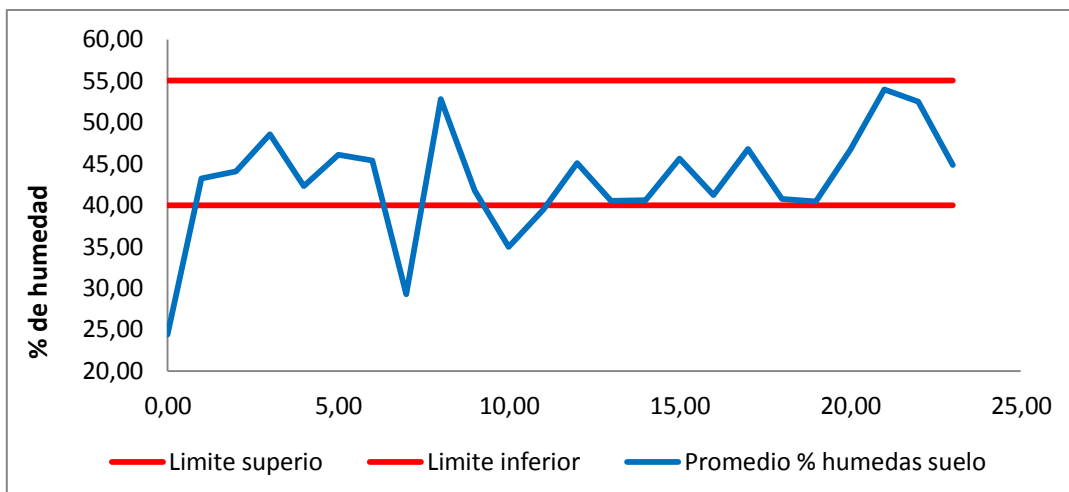
Tabla 11. Ensayo 3 - un agujero regular, saturación por capilaridad y dos tiempos de secado.

Ensayo	N° de agujeros	Método de saturación	Días de saturación	Primer % humedad	días de escurrimiento	Segundo % humedad	Tiempo de secado
3	1	Capilaridad	1	63,81	1	47,00	9
	1	Capilaridad	1	64,23	1	47,46	24

En este ensayo se prosiguió con un solo agujero debido a que mostro una mejor relación entre la saturación y la perdida por escurrimiento, así mismo se continuó saturando por capilaridad y se disminuyó el tiempo de saturación y escurrimiento. De esta manera se determinaron las condiciones para mantener relativamente estable la humedad del suelo, la cual como se ha expresado anteriormente debe encontrarse aproximadamente a 49,04 % en cafetales tecnificados y 73,61 % en cafetales tradicionales. (Salamanca et al, 2005).

A continuación se muestra la aplicación de la información obtenida de estos ensayos, en una grafica que enseña los resultados de los controles de humedades de suelo obtenidos durante el tiempo de duración de la experimentación de degradación de fruto (agosto – noviembre).

Figura 7. Control de porcentaje de humedad de suelo.



Es la gráfica se observa los límites establecidos de acuerdo la capacidad del suelo que se evaluó, el cual era franco arenoso, razón por la que presentaba incapacidad de retener el agua, aunque de acuerdo a lo experimentado el límite máximo de saturación podía subir hasta 64%, se mantuvo en 55 %, para evitar que los tratamientos no se lavaran con el agua sobrenadante, además de cuidar que las brocas no murieran por ahogamiento. Sin embargo se puede observar que la humedad se mantuvo dentro de los límites durante la mayoría de los análisis.

8.3. RESULTADOS ANALISIS DE FRUTO DE CAFÉ

Para simplificar la información se emplean las siglas de los productos descritas en la tabla 8, las cuales fueron usadas de igual forma en la etapa anterior.

Tabla 12. Siglas de productos degradadores de materia orgánica.

Producto	Sigla
Testigo 1 Seco	BS
Testigo 2 Húmedo	BH
Viscozyme	VZ
<i>Trichoderma viridae</i>	TV
Degradador de Compost	MM
Peróxido de Hidrógeno	PO

8.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los análisis se realizaron de acuerdo a las condiciones iniciales y finales del proceso experimental, los cuales corresponden a 0 días y 40 días. Construyendo una comparación entre los productos seleccionados y las diferentes variables evaluadas.

Los valores promedio para las variables evaluadas para fruto maduro-sobremaduro y verdes-pintones en tiempo inicial de 0 días se presentan en las tablas 13 y 14 respectivamente.

Para todas las variables evaluadas una vez aplicados el tratamiento sobre los frutos maduro-sobremaduro el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos.

De acuerdo con la prueba de comparación de medias (Duncan), para la temperatura, se presentan tres grupos estadísticamente diferentes. Grupo 1 conformado por VZ; grupo 2 por los testigos húmedo, seco, peróxido y TV y grupo 3 por MM que muestra el menor valor para esta variable (25.9 ° C). Para PH, los únicos tratamientos diferentes son testigos Húmedo y PO con los mayores pH registrados de 4,3 y 4,4 respectivamente. Para Carbono (g), el menor valor promedio lo presentó el tratamiento PO (18,41 g), siendo estadísticamente diferente a los valores registrados por los testigos Húmedo y Seco. Tendencia similar se presenta para las unidades de la Relación C/N variable, en la que PO (28,51 U) y VZ (26,3 U) presentan los menores valores siendo estadísticamente diferentes al Testigo Seco.

Tabla 13. Promedios de temperatura, PH, Carbono y relación C/N en fruto maduro-sobremaduro en tiempo inicial (cero) dda de los tratamientos.

Tratamiento	Variables			
	Temp (°C) *	PH *	C (g) *	Relación C/N (Unidades) *
BH	26,13 b	4,33 a	19,74 a	31,94 ab
BS	26,30 b	3,95 c	19,48 a	30,06 c
MM	25,87 c	4,14 b	17,44 d	33,14 a
PO	26,10 b	4,37 a	18,41 c	28,51 d
TV	26,13 b	3,93 c	18,94 b	31,21 bc
VZ	26,60 a	4,00 cb	18,68 bc	26,32 e
ANAVA	0,0001	0,0002	< 0,0001	< 0,0001

Anava: Análisis de varianza

dda: días después de aplicación

C: Carbono; N: Nitrógeno; Trat: Tratamiento

* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Duncan 5%)

A diferencia de lo anterior y en términos generales para fruto verde, los resultados muestran diferencias significativas para la variable Relación C/N en favor de MM, tratamiento que presenta los mayores valores (28,92 U). Para el resto de variables y en términos generales, no se presentan diferencias, una vez son aplicados los tratamientos sobre el fruto verde, para el mismo tiempo de evaluación y bajo las condiciones descritas (Tabla 14).

Tabla 14. Promedios de temperatura, PH, Carbono y relación C/N en fruto verde en tiempo cero dda de los tratamientos.

Tratamientos	Variables			
	Temp (°C) *	PH *	C (g) *	Relación C/N (Unidades) *
BH	23,50 c	5,68 a	14,73 a	27,74 b
BS	23,90 b	5,57 a	14,01 a	27,33 b
MM	23,97 b	5,70 a	13,57 a	28,92 a
PO	24,40 a	5,77 a	13,65 a	27,38 b
TV	23,97 b	5,76 a	14,65 a	27,84 b
VZ	24,03 b	5,46 a	14,28 a	27,83 b
ANAVA	0,0003	0,2082	0,4494	0,0128

Anava: Análisis de varianza

dda: días después de aplicación

C: Carbono; N: Nitrógeno; Trat: Tratamiento

* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Duncan 5%)

A los 40 días después de la aplicación de los tratamientos sobre fruto maduro-sobremaduro, el análisis de varianza mostró diferencias significativas para la variable Relación C/N, presentando entre los tratamientos tres diferentes grupos. El primer grupo conformado por el testigo Seco con mostrando el máximo valor en unidades de C/N (26.09 U), seguido por MM, TV y VZ con valores de 24,95; 25,0 y 24,39 Unidades respectivamente y un tercer grupo conformado por PO con valor de 23,23 Unidades para esta variable (Tabla 15).

Tabla 15. Promedios de temperatura, PH, Carbono, relación C/N y pérdida de humedad en fruto maduro-sobremaduro a 40 dda de los tratamientos.

Tratamientos	Variables					
	Pérdida de humedad (%)	Temp (°C) *	PH *	C (g) *	Relación C/N (Unidades) *	Celulosa (%)
BH	46,27 ab	24,23 b	7,48 ab	10,33 a	23,15 c	24,70 b
BS	47,08 a	24,47 ab	7,43 ab	10,05 a	26,09 a	28,19 a
MM	37,18 b	24,87 a	7,39 b	10,65 a	24,95 b	25,85 b
PO	49,00 a	24,57 ab	7,48 ab	9,24 a	23,23 c	22,06 c
TV	43,01 ab	24,27 b	7,50 ab	10,45 a	25,00 b	24,26 b
VZ	42,46 ab	24,47 ab	7,75 a	10,30 a	24,39 b	26,21 ab
ANAVA	0,1336	0,0521	0,2304	0,5043	< 0,0001	0,0662

Anava: Análisis de varianza

dda: días después de aplicación

C: Carbono; N: Nitrógeno; Trat: Tratamiento

* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Duncan 5%)

Para este mismo tiempo, los resultados sobre fruto verde, el análisis de varianza mostró diferencias para las variables Carbono (g) y Relación C/N destacándose respectivamente los tratamientos MM (9,8 g) y PO (23,52 U) (Tabla 16).

Tabla 16. Promedios de temperatura, PH, Carbono, relación C/N y pérdida de humedad en fruto Verde 40 dda de los tratamientos.

Tratamientos	Variables					
	Pérdida de humedad (%)	Temp (°C) *	PH *	C (g) *	Relación C/N (Unidades) *	Celulosa (%)
BH	51,55 ab	25,02 a	7,61 a	11,01 ab	25,30 a	24,99 a
BS	48,60 ab	25,03 a	7,60 a	11,58 a	23,66 c	23,19 ab
MM	57,05 a	25,02 a	7,17 a	9,76 c	24,00 bc	25,58 a
PO	45,22 b	25,05 a	7,41 a	10,30 bc	23,52 c	16,98 b
TV	52,68 ab	25,02 a	7,66 a	10,46 bc	24,31 b	26,52 a
VZ	50,16 ab	25,03 a	7,39 a	11,18 ab	25,08 a	21,35 b
ANAVA	0,2148	0,7573	0,4424	0,0203	< 0,0001	0,0662

Anava: Análisis de varianza

dda: días después de aplicación

C: Carbono; N: Nitrógeno; Trat: Tratamiento

* Promedios seguidos de la misma letra no son estadísticamente diferentes (Duncan 5%)

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En la etapa de estandarización en general no existen diferencias significativas entre los tiempos de secado, pero se sugiere seguir el protocolo el cual establece 24 horas.

De acuerdo a los resultados de la caracterización del suelo este se encontraba en condiciones adecuadas y similares a campo, sin embargo el comportamiento en cuanto al % de humedad y retención de humedad no dependió de esto, sino más bien del tipo de montaje al que se sometió, por lo tanto, siempre se debe hacer ensayos para controlar esas variables.

Por el tipo de suelo franco arenoso, la capacidades de campo de 26,54% y el punto de marchitez 12,41% las cuales son relativamente bajas, este suelo no alcanzó el margen superior de lo establecido en la literatura para suelos Chinchiná de 49,04 % humedad en cafetales tecnificados y 73,61 % en cafetales tradicionales (Salamanca et al, 2005). Sin embargo se logró mantener en el rango de humedad a lo propuesto de 40 – 55%.

No obstante que las pruebas de comparación para algunas de las variables evaluadas no presentaron diferencias entre tratamientos, posiblemente por deberse al número de repeticiones, se puede considerar en términos generales que para el estudio como variables principales de respuesta, deben tenerse en cuenta, la pérdida de humedad (%), Relación C/N y % de Celulosa. Lo anterior hace que se centren esfuerzos en monitorear variables que pueden responder en mayor grado al efecto deseado, y se debe recomendar el aumento en el número de repeticiones.

Los resultados permiten considerar que una vez aplicados los tratamientos, estos inician un proceso rápido de degradación sobre el fruto. Este efecto es diferencial dependiendo del tipo de fruto, siendo notorio principalmente sobre fruto maduro-sobremaduro.

Los productos TV y MM se destacan en estos procesos de degradación de fruto maduro-sobremaduro, el VZ y MM en los procesos con fruto verde, pudiendo ser considerados como candidatos en la evaluación en campo.

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados, mostraron que el PO tienen un relevante efecto descomponedor de los frutos de café, pudiendo ser utilizado de manera individual o en mezcla con otros productos para el objetivo de punto máximo de referencia en pruebas de laboratorio. No obstante, su efecto podría ser potencializado en próximas pruebas teniendo en cuenta una mayor exposición a la luz solar, ya que su activación se da principalmente por radiación UV. También se debe tener en cuenta que

a altas concentraciones pierde efectividad debido a que altas concentraciones de OH⁻ promueven la regeneración de H₂O₂.

Teniendo en cuenta que la reacción de un determinado microorganismo o compuesto puede alterarse drásticamente en función del diseño del reactor (Domènech et al, 2001). Es importante para experimentaciones futuras tener una mayor adecuación en aspectos como la iluminación, geometría, hidrodinámica, entre otros, ya que en esta experimentación solo se tuvo en cuenta la hidrodinámica.

BIBLIOGRAFIA

- Arcila, M. (2011). Período crítico del ataque de la broca del café. Brocarta 043. ISSN - 2145-9053.
- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-cabriales, J. J. (2009). Los géneros fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(4), 257-269.
- Benavides, P. (2005^a). Aspectos genéticos de la broca del café, *Hypothenemus hampei*. En: Memorias XXXII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen). Ibagué, 27-29 de
- Bustillo, A. E. (1991). Perspectivas de manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen), Medellín, Colombia. Miscelánea. No. 18 p. 106-118.
- Bustillo Pardey, A. E. (2006). A review of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 32(2), 101-116.
- Bustillo, A. E; Cárdenas R.; Villalba, D.; BenavideS, P.; Orozco, J.; Posada F. (1998). Manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, Cenicafé, 134 p.
- Cariello, M. E., Castañeda, L., Riobo, I., & González, J. (2007). Inoculante de microorganismos endógenos para acelerar el proceso compostaje de residuos sólidos urbanos. *J. Soil Sc. Plant Nutr*, 7(3).
- Castaño, A., Benavides, P., Baker, P. S. (2005). Dispersión de *Hypothenemus hampei* en cafetales zoqueados. *Revista Cenicafé* 56 (2): 142-150.
- Deza, N. M. S., Medina, S. E. L., & Reyes, C. (2012). Eficacia de la cepa nativa de *bacillus subtilis* como agente supresor del nematodo del nudo *meloidogyne spp.* en cultivo de *capsicum annuum* (ají pimiento piquillo)/Effectiveness of the native strain of bacillus subtilis as a suppressant agent of the nematode *meloidogyne spp* knot in cultures of *capsicum annuum* "piquillo pepper chili". *Revista De Investigación Agraria y Ambiental*, 3(1), 25-40.

- Domènech, X., Jardim, W. F., & Litter, M. I. (2001). Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea*, 1.
- Gomez Romero, S. E., Gutierrez Bustos, D. C., Hernandez Marin, A. M., Hernandez Rodriguez, C. Z., Losada Casallas, M., & Mantilla Vargas, P. C. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos: [revisión]. *NOVA publ. cient*, 6(9), 76-84.
- International institute of biological control – CIBC. Londres, Inglaterra. Control biológico de la broca de la cereza del cafeto. In: *Manual de capacitación en control Bilógico*, Chinchina, Colombia, CENICAFE, 1990. P, 140-153.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
- Montenegro H, Malagón D. (1990). *Propiedades físicas de los suelos*. Bogotá. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1990. p 373.
- Ruales, C. (1997). Aspectos generales sobre la broca del café en Ecuador. *Café y Cacao: Noticias (Ecuador)*, 2(1), 7-11.
- Ruiz, R. (1996). Efecto de la fenología del fruto del café sobre los parámetros de la tabla de vida de la broca del café; *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Tesis: Ingeniero Agrónomo. Manizales, Colombia. 87 p.
- Salcedo, J. G., Flórez, L. M., & López, J. E. (2011). Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Dyna*; Vol. 78, núm. 169 (2011); 182-190 *DYNA*; Vol. 78, núm. 169 (2011); 182-190 2346-2183 0012-7353.
- Salamanca J. A & Sadeghian K. A, S. La densidad aparente y su relación con otras propiedades en suelo de la zona cafetera colombiana. *Cenicafé* 56(4):381-397.2005.
- SAS. SAS/STAT. (2008) *User's Guide 9,0 version*. New York: SAS Institute, 2008
- Thompson, L. M., & Troeh, F. R. (1988). *Los suelos y su fertilidad*. Cuarta edición. Reverté (1988). España. P 99-199.
- Zamudio S, A. Carrascal, C,M. Pulido, R,E. Gallardo, J. Ávila, P,E. Vargas A,M. Vera, RD. *Métodos Analíticos de laboratorio de suelos*, sexta edición. Bogotá. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 2006. p 674.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica de *Viscozym L* hoja 1.



Viscozyme® L

Valid From

2007-09-20

Características del producto:

Enzima Declarada

Beta-glucanasa (endo-1,3(4)-)

Actividad declarada

100 FBG/g

Actividades colaterales

Este producto contiene actividad de
Xilanasa
Celulasa
Hemicelulasa

Color

Marrón

Forma física

Líquido

Densidad aproximada (g/ml)

1,21

Estabilizantes

Cloruro de sodio
Sacarosa

Conservadores

Sorbato de potasio

Organismo de producción

Aspergillus aculeatus

Método de producción

Producido mediante fermentación sumergida de un microorganismo. Se separa la proteína enzimática del organismo de producción y se purifica.

Anexo 2. Ficha técnica de *Viscozym L* hoja 2.

Especificación del producto:

	Limite Mínimo	Limite Máximo	Unidad
Betaglucanase Units FBG	100		/g
Cuenta Total en Placa	-	10000	/g
Bacteria coliforme	-	30	/g
E.coli enteropatógeno	Ninguno detectado		/25 g
Salmonella	Ninguno detectado		/25 g

El producto cumple con las especificaciones de pureza recomendadas para enzimas de grado alimenticio dadas por la Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) y por Food Chemical Codex (FCC).

Envases: Revise la lista de envases estándar para mayor información.

Almacenamiento recomendado:

Utilizar preferentemente antes de Almacenado como es recomendado, el producto debe utilizarse dentro de 6 meses a partir de la fecha de entrega.

Temperatura de almacenamiento 0-10°C (32°F-50°F)

Condiciones de almacenamiento En envase intacto, en lugar seco y protegido de la luz solar. El producto ha sido formulado para mantener una estabilidad óptima. Puede resultar necesario aumentar la dosificación si la enzima ha experimentado un almacenamiento prolongado o condiciones adversas, incluyendo temperatura o humedad alta.

Precauciones de seguridad y manejo

Las enzimas son proteínas. La inhalación de polvo o aerosoles puede provocar sensibilización y causar reacciones alérgicas en personas propensas. Tras un contacto prolongado, algunas enzimas pueden irritar la piel, los ojos y las mucosas. El producto puede crear aerosoles inhalables si se salpica o si se agita fuertemente. El producto derramado puede secarse y generar polvo. Cualquier material derramado debe lavarse con agua abundante. Deben evitarse las salpicaduras. El material sobrante puede secarse y generar polvo. Usense ropa, guantes adecuados y protección para los ojos y la cara según las indicaciones en la etiqueta de advertencia. Lávese toda la ropa manchada o salpicada. Con todos los productos se suministra una ficha de seguridad. Revise el Manual de Seguridad para mayor información sobre el manejo seguro del producto.

2 / 2

Novozymes Latin America Ltda.
Rua professor Francisco Ribeiro 883
CEP 83707-880 - Anuspolis - Paraná
Brasil

Novozymes A/S
Krogshøjvej 38
2880 Bagsvaerd
Denmark

Para más informaciones, o
direcciones de nuestras
oficinas, visite:
www.novozymes.com

La legislación, las reglamentaciones y los derechos de terceros
podrían impedir que los clientes importasen, utilizasen, procesasen o
revendiesen los productos que se describen en el presente documento
en determinadas formas. Sin otro contrato por escrito entre el cliente y
Novozymes para ese efecto, este documento no constituye una
declaración o garantía de ningún tipo y se encuentra sujeto a cambio
sin previo aviso.

Tel: +55 41 541 1000
Fax: +55 41 543 1443

Tel: +45 4448 0000
Fax: +45 4448 9999

© Novozymes A/S

Anexo 3. Análisis de suelo.



MULTILAB AGROANALITICA Reporte suelos Fertilidad



SOLICITANTE : JUAN CARLOS LOPEZ **ORDEN :** 3849
PROPIETARIO : JUAN CARLOS LOPEZ **No. MUESTRAS :** 1
FINCA : EXPERIMENTO **FECHA RECIBO :** 14/07/2014 14:30:59
PROYECTO : EXPERIMENTO FIDUCIA QUIMICOS **FECHA DE REPORTE :** 25/07/2014 13:59:42
MUNICIPIO : CHINCHINA, Caldas
VEREDA :

Nlab	Referencia	pH	N	MO	P	K	Ca	Mg	Al	Textura
			%		mg Kg ⁻¹		cmol(+)kg ⁻¹			
4819	EXPIREMT FIDUK	5,0	0,23	5,1	30	0,26	3,02	0,41	0,1	F.A.

HÉCTOR FERNANDO FRANCO A.
MULTILAB AGROANALÍTICA
 Fernando.Franco@mlabsuelos.com
 Multilab@cafede colombia.com.co

Método de Análisis :
 pH: Potenciométrico-suelo: Agua 1:1; N: Calculado; MO: Walkley-Black - Colorimetría; K, Ca, Mg Na: Acetato de amonio 1N pH7.0-EAA; Al:KCl IM-EAA; Fe, Mn, Zn, Cu: EDTA 0.01M-Acetato de amonio 1N pH7.0- EAA; CIC: Acetato de Amonio 1N pH7.0 colorimetría Nessler; P:Bray II-colorimetría Bray Kurtz; Textura : Bouyoucos con pirofosfato de sodio-clasificación diagrama triangular de USDA- F (franco), Ar (arcilloso), L (limoso), A (arenoso).

Anexo 4. Posiciones de la broca de acuerdo a la etapas de perforación del fruto. (Arcila, 2011)

