

# REBIOLEST

REVISTA CIENTÍFICA DE ESTUDIANTES



Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional de Trujillo

Volumen 1 , Número 1

Enero - Junio, 2013





**EDITOR**

**César Jara Campos**

La Revista REBIOLEST es un órgano oficial de difusión científica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo (Trujillo, Perú), que publica, en español, investigaciones realizadas por alumnos en su etapa formativa o de fin de Carrera (Tesis) de las diferentes disciplinas de la rama de las Ciencias Biológicas. Es una publicación de periodicidad semestral y sus artículos son revisados por el Consejo Editorial.

Los artículos que aparecen en el presente volumen no expresan necesariamente la opinión de la Revista, siendo los autores los responsables de los criterios que se emiten.

Todos los derechos quedan reservados por la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Cualquier publicación, difusión o distribución de la información presentada queda autorizada, siempre y cuando se cite la fuente de origen.

**Dirección:** Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Campus universitario, Av. Juan Pablo II s/n. Trujillo. Perú. Apartado 315

**E-mail:** [facbio@unitru.edu.pe](mailto:facbio@unitru.edu.pe)

**Página Web:** [www.unitru.edu.pe](http://www.unitru.edu.pe)

**Telefax:** 044-474835

**Foto de la portada:** "Cortarramas peruano" *Phytotoma raimondii*, Taczanowski, 1883 (Passeriformes: Cotingidae). Especie Endémica de Perú. Estado de conservación En Peligro (EN). Se distribuye desde Tumbes, Piura, Lambayque, La Libertad y Ancash, desde 0 a 550 m. Su hábitat predominante es el bosque seco ecuatorial, se alimenta de brotes tiernos de "palo negro" *Grabowskia boerhaviifolia*. Foto gentilmente proporcionada por el **Dr. Luis Pollack Velásquez** de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo



## Editorial

### **LAS PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y EL MODELO DE ACREDITACIÓN DE LAS CARRERAS UIVERSITARIA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

En el 2006, mediante Ley, se crea el SINEACE (Sistema Nacional de Evaluación y Certificación de la Calidad Educativa); en el 2007 se instala el CONEAU (Consejo de Evaluación, Acreditación y Certificación de la Calidad Educativa Superior) y en el 2009 se publica en el diario El Peruano el Modelo de Calidad para la Acreditación de las Carreras Profesionales Universitarias, con tres dimensiones, nueve factores, 16 criterios, 84 indicadores, 253 fuentes de verificación referenciales y 125 indicadores de gestión.

Adaptado a este modelo, en el 2010, se publican los estándares para las Carreras Universitarias de Ciencias Biológicas, con el propósito de que alcancen la acreditación, es decir, ser consideradas como instituciones de calidad, entendida ésta como la condición en que se encuentra para responder a las exigencias que demanda nuestra sociedad.

La Dimensión N° 2, denominada Formación Profesional del mencionado modelo, posee tres Factores el segundo de los cuales corresponde al el Factor de Investigación, que tiene como criterio la generación y evaluación de proyectos de investigación y como meta la producción intelectual de estudiantes, quienes deberán ejecutar los proyectos en dos momentos: durante la formación profesional (investigación formativa) y como trabajo final de carrera (Tesis).

Para lograr este cometido, el mismo documento propone como estándar inicial (46) que la Carrera Profesional debe tener un sistema implementado de evaluación de la investigación formativa y de trabajo final de carrera, Consciente de ello, el Comité Central de Autoevaluación y Acreditación de la Facultad de Ciencias Biológicas, presidido por el Señor Decano de Facultad, ha propuesto un Mapa de Procesos que ha sido aprobado por la alta Dirección de la Universidad en el cual se incluye como parte del proceso a la investigación,

En el mencionado Mapa de procesos ya no se concibe a la investigación solamente como la realización de la misma, sino que plantea que el proceso termina y se considera logrado siempre que los resultados sean dados a conocer a la comunidad por diversos medios, entre ellos las revistas científicas. Entonces, era necesario proponer un nuevo reglamento de investigación, el cual ya ha sido terminado y será sometido para su pronta aprobación oficial. Este Reglamento, igualmente, considera a las publicaciones científicas como una actividad importante e inherente al quehacer científico. También era necesario crear el medio de difusión de la producción científica específicamente de los alumnos y tesis y por ello, el Decanato ha creado esta revista denominada REBIOLEST, en su formato virtual, para darle la característica de que se refiere a la revista oficial científica de estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

Se ha creído conveniente publicar en este primer número solamente ocho trabajos como para iniciar las ediciones en un tiempo breve, sin embargo, en el futuro se publicarán mayor número de artículos en sus tres modalidades: trabajo originales, revisiones o Notas Científicas, los cuales previamente serán sometidos a revisión por especialistas. De nosotros depende hacer crecer nuestra nueva revista científica REBIOLEST.

El Comité Editorial



## Contenido/Contents

### ARTÍCULOS ORIGINALES/ORIGINAL PAPERS

- **Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 y degradación de tres concentraciones de Dodecylbenceno Sulfonato de Sodio/*Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 growth and degradation of three concentrations of Sodium Dodecylbenzene Sulfonate.** ERIKA ALAYO AGUIRRE, KATHERINE CHACÓN RODRÍGUEZ, NOLIA FERREL CABALLERO, OBED LUJAN MEZA, SANTIAGO CAMPOS HERRERA, WILMERIPARRAGUIRRE TANDAYPAN, JUAN GUEVARA GONZÁLEZ. Pág. 4
- **Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Capsicum annum* var. *longum*/Effect of inoculation of *Rhizobium etli*, and *Trichoderma viride* on root and aerial growth of *Capsicum annum* var. *longum*.** SANDRA NEYRA VAZALLO, LUZ TERRONES RAMÍREZ, LIZETH TORO CARRANZA, BERNARDO ZÁRATE GARCÍA, BERTHA SORIANO BERNILLA. Pág. 11
- **Efecto de tres concentraciones de conidios de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas III de *Plutella xylostella* en condiciones de laboratorio/Effect of three concentrations of *Metarhizium anisopliae* conidia on *Plutella xylostella* larvae-III under laboratory conditions.** KAREN AVALOS VELA, FLOR SORIANO LÓPEZ, CARLOS REYNA VIGO, YUSEFF ROJAS FIESTAS, JORGE PIMINCHUMO ROJAS, LUIS VÁSQUEZ SANJINÉZ, JUAN WILSON KRUGG. Pág. 22.
- **Detección de antígenos sanguíneos humanos del grupo ABO en larvas de *Necator americanus* incubadas en presencia de eritrocitos tipificados/Detection of human blood group antigens ABO in *Necator americanus* larvae incubated in the presence of typified erythrocytes.** DANTE APONTE HERNÁNDEZ, EDGAR MÉNDEZ OLULO, MIGUEL FABIÁN FRANCISCO, ROSA POLO TACANGA, WILLIAN DOMÍNGUEZ PAREDES, HERMES ESCALANTE AÑORGA. Pág. 30
- **Efecto del extracto hidroalcohólico de *Coriandrum sativum* (Apiaceae) sobre la infectividad de huevos embrionados de *Toxocara canis* en *Mus musculus* BALB/c/Effect of hydroalcoholic extract of *Coriandrum sativum* (Apiaceae) on the infectivity of *Toxocara canis* embryonated eggs in *Mus musculus* BALB/c.** VANESSA ARROYO ULLOA, KAREN SICCHA AGUILAR, VÍCTOR TERÁN RAMÍREZ, LUÍS ZAFRA HARO, LAURA ZEÑA SILVA, CÉSAR A. JARA. Pág. 37
- **Efecto biofungicida de *Trichoderma harzianum* y de extractos de *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis* y *Ricinus communis* sobre *Rhizoctonia solani*/Biofungicide-effect of *Trichoderma harzianum* and extracts of *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis*, and *Ricinus communis* on *Rhizoctonia solani*.** KATTY GONZA CARNERO, ELOY LÓPEZ MEDINA, CARMEN ZAVALETA SALVATIERRA, JORDAN DE LA CRUZ CASTILLO, WILLIAM MENDOZA MIRANDA. Pág.43
- **Efecto de la estratificación en la germinación de semillas del ciruelo europeo, *Prunus domestica*/Effect of the stratification, on the germination of seeds of European plum, *Prunus domestica*.** JORDAN DE LA CRUZ CASTILLO, ELOY LÓPEZ MEDINA, CARMEN ZAVALETA SALVATIERRA, WILLIAM MENDOZA MIRANDA, ARACELY GONZA CARNERO. Pág. 49
- **Valoración económica de bienes y servicios ambientales de la Laguna Conache, Laredo (La Libertad, Perú)/Economic valuation of environmental wealths and services Conache lagoon, Laredo (La Libertad, Peru).** ALEXIS J. VERONA EZCURRA, ANDRÉS RODRÍGUEZ CASTILLO. Pág. 54



# Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 y degradación de tres concentraciones de Dodecilbenceno Sulfonato de Sodio

## *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 growth and degradation of three concentrations of Sodium Dodecylbenzene Sulfonate

Erika Alayo Aguirre<sup>1</sup>, Katherine Chacón Rodríguez<sup>1</sup>, Nolia Ferrel  
Caballero<sup>1</sup>, Obed Lujan Meza<sup>1</sup>, Santiago Campos Herrera<sup>1</sup>, Wilmer  
Iparraguirre Tandaypan<sup>1</sup> y Juan Guevara González<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela AP de Microbiología y Parasitología. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología.  
Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

### RESUMEN

La finalidad del presente trabajo es determinar el efecto de las concentraciones de 10, 50 y 100 ppm de Dodecilbenceno sulfonato de sodio (DBS) en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 y en la degradación del compuesto a los 15 días. Se utilizó un cultivo puro de *P. aeruginosa* MBL-03, reactivado en Caldo nutritivo a 37 °C por 18 horas. Se preparó medio mínimo de sales que contenía: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2%, KCl 0.5%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, asparragina 0.25% y agua destilada; y una solución patrón de DBS a 10000 ppm. Se inoculó 1.69x10<sup>8</sup> UFC/mL a tres biorreactores (que contenían 10, 50, 100 ppm de DBS); y a un biorreactor control sin DBS. La evaluación del crecimiento se realizó mediante el método de recuento en placa y la degradación del DBS por el Método de Azul de Metileno. Los resultados a los 15 días, con 5% de significancia, indican que no existe diferencia significativa en el crecimiento bacteriano; sin embargo, en la degradación de DBS existe diferencia significativa entre las tres concentraciones evaluadas.

Las concentraciones de 10, 50 y 100 ppm de DBS, no presentan efecto inhibitorio en el crecimiento de *P. aeruginosa* MBL-03; sin embargo, estas concentraciones sí influyen en la degradación del DBS.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, degradación, Dodecilbenceno Sulfonato de Sodio

### ABSTRACT

Effect of concentrations of 10, 50 and 100 ppm of sodium dodecylbenzene sulfonate (DBS) in the growth of *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 and compound degradation at 15 days was determined. It was used a pure culture of *P. aeruginosa* MBL-03, reactivated in nutrient broth at 37 °C for 18 hours. It was prepared a minimal salts medium contained: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1% 2% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5% KCl, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25% asparagine and distilled water, and a standard solution of DBS to 10000 ppm. Inoculated 1.69x10<sup>8</sup> CFU/mL to three bioreactors (containing 10, 50, 100 ppm DBS) and even bioreactor control without DBS. The growth assessment was performed by plate count method and degradation of DBS by Methylene Blue Method. The results at 15 days, with 5% significance, indicate no significant difference in bacterial growth, however, in the degradation of DBS significant difference between the three concentrations tested. Concentrations of 10, 50 and 100 ppm of DBS, have no inhibitory effect on the growth of *P. aeruginosa* MBL-03, yet whether these concentrations influence DBS degradation.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, degradation, sodium dodecylbenzene sulfonate



## INTRODUCCIÓN

Los detergentes son derivados químicos producidos en grandes cantidades en todo el mundo y su consumo va en aumento cada año debido a la creciente población<sup>1,2</sup>. Algunos de estos detergentes presentaban como compuesto principal al alquilbenceno sulfonato de cadena ramificada que son considerados como no biodegradables y capaces de causar problemas ambientales. A fin de evitar los problemas causados por estas moléculas recalcitrantes, se estableció el uso de los alquilbenceno sulfonato de sodio de cadena lineal puesto que, son más fácilmente biodegradables<sup>3,4,5</sup>.

El aumento demográfico, la industrialización, urbanización y el turismo en las zonas de la costa, causan un deterioro progresivo del ambiente marino. Son las aguas residuales los que constituyen la principal fuente de contaminación del medio marino y costero<sup>6</sup>.

Sibila realizó la evaluación de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de tensioactivos en el medio acuático marino, este consistió en la biodegradación de tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos; y la toxicidad sobre los organismos acuáticos<sup>6</sup>. Asimismo, Ivankovic et al<sup>2</sup> realizaron la recolección de información de los tensioactivos aniónicos que se encuentran en: efluentes de aguas residuales, aguas superficiales y sedimento, así como también la importancia de la toxicidad generada sobre bacterias, algas, invertebrados y vertebrados. Oya et al<sup>7</sup> muestran que la toxicidad acuática es relativamente alta en agua dulce o agua de mar a causa de LAS.

Los tensioactivos aniónicos se pueden encontrar en las aguas residuales en concentraciones importantes, la mayoría de ellas son conocidos como degradables en condiciones aeróbicas. Sin embargo, los tensioactivos aniónicos también son biodegradables en condiciones anaeróbicas, realizado por bacterias que se encuentran en sedimentos y bajo la superficie del suelo<sup>8</sup>.

En el medio ambiente la degradación de las mezclas de alquilbenceno sulfonato de sodio de cadena lineal (LAS) es en un 50 %, siendo mejor en condiciones de aerobiosis, que en ambientes anóxicos o con bajo contenido de oxígeno disuelto que produce una degradación parcial y selectiva de éstas. [4] Entre otros factores que se tuvieron en cuenta para la degradación de LAS fueron los surfactantes catiónicos, sales o contaminantes orgánicos y pH<sup>9</sup>.

Se realizaron estudios de la degradación de la parte del grupo sulfonato presente en la molécula de LAS, donde fue sometido a ataque microbiano por cultivos puros y mixtos que tuvieron como fuente disponible al tensioactivo y a la glucosa, resultando un mayor metabolismo del sulfonato teniendo como única fuente de carbono al principio activo<sup>10</sup>.

Sigoillot y Nguyen<sup>3</sup> realizaron un trabajo donde aislaron bacterias del agua de mar costera de Francia contaminados con residuos urbanos. Algunos de estas bacterias no necesitaban sodio para su crecimiento, estos pertenecían a los géneros *Alcaligenes* y *Pseudomonas*. En este trabajo se realizó la completa biodegradación de un surfactante en donde tuvieron en cuenta los siguientes pasos: la oxidación terminal de la cadena alquilo, desulfuración y la escisión del anillo aromático. Sólo pocas cepas son capaces de llevar a cabo los dos primeros pasos. [1][3] Según Ojo y Oso, se produce la biodegradación primaria con la oxidación del grupo metilo externo ( $\beta$ -oxidación), seguido por el acortamiento de la cadena alquil por la vía oxidativa escindiendo las unidades de carbono 2 ( $\omega$ -oxidación).

Los estudios realizados por Fortunato et al<sup>12</sup> demuestran la capacidad degradativa de poblaciones microbianas mixtas que fueron aisladas de ambientes contaminados por compuestos tensioactivos aniónicos y observándose una mayor eficiencia en el proceso de degradación. Estas poblaciones mixtas del Río de la Plata, responsables de la degradación de tensioactivos son *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida* y microorganismos provenientes de lodos que también incluyen a *Pseudomonas* sp. y *Aeromonas*.

Según Peressutti et al<sup>13</sup> un consorcio constituido por cuatro bacterias como *Aeromonas caviae* (dos variedades), *Pseudomonas alcaliphila* y *Vibrio* sp. producen una mayor biomasa a partir de LAS y CO<sub>2</sub> liberado (mineralización) que en cultivos individuales. Por otro lado se realizó una completa degradación de LAS a 10 mgL<sup>-1</sup> y los niveles de LAS de 50 y 100 mgL<sup>-1</sup> conducen a una pronunciada disminución en el grado de biodegradación e inhibición del crecimiento del cultivo.

De nueve bacterias aisladas por Ogbulie et al<sup>14</sup> del río Otamiri en Nigeria, solamente *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus* fueron las que pudieron sobrevivir en el agua del río con detergente. La evaluación específica de utilización de detergentes reveló que pueden



utilizar los detergentes de forma sola o combinada; *Pseudomonas* presenta mayor capacidad que *Staphylococcus* para utilizar estos detergentes. Por ello, la importancia del género *Pseudomonas* en la participación dentro de un consorcio para la degradación de LAS.

La mayoría de las relaciones entre comunidades bacterianas, favorecen la resistencia a diversas condiciones ambientales y son más eficientes en la transformación de LAS que cualquier población bacteriana. [15] En los consorcios, algunos de los miembros atacan la cadena lateral, mientras que otros degradan la fracción aromática. *P. aeruginosa* es capaz de crecer mediante el uso de dodecilbenceno sulfonato de cadena ramificada o alcohol citronfenol terpénico o LAS como única fuente de carbono<sup>16,17</sup>.

La degradación biológica tiene un gran potencial en el presente, teniendo en cuenta que las bacterias capaces de transformar estos compuestos deben ser elegidas con cuidado<sup>18</sup>. Las bacterias degradadoras de detergentes caracterizadas e identificadas incluyen a *P. aeruginosa*<sup>3</sup>. En los estudios realizados por Horvath y Koft<sup>19</sup>, *Pseudomonas* sp. muestra una relación directa entre la concentración de LAS suministrados y los rendimientos de la célula; la utilización de LAS se ha mejorado en gran medida por la presencia de fenol. Esta mejora sugiere co-metabolismo y que las concentraciones limitadas de productos fenólicos derivados de LAS deben ser acumulados para obtener el metabolismo activo de su molécula. Asimismo, una cepa bacteriana aislada de lodos activados, utiliza el LAS como única fuente de carbono [17] y además en algunas especies el surfactante inhibe la degradación, sin inhibir el crecimiento<sup>20</sup>.

En la revisión bibliográfica, no se ha encontrado trabajos publicados sobre bacterias que degraden detergentes u otros surfactantes, implicados en un tratamiento de efluentes o de aguas superficiales en el Perú. Por ello, es importante realizar estudios que permitan conocer las concentraciones apropiadas de detergentes que las bacterias puedan degradar y de esta manera contribuir a la biorremediación de aguas en las que los mayores contaminantes son dichas sustancias químicas, provenientes de fuentes industriales, domésticas o por arrastre de ellas, que se encuentran en el suelo, por las lluvias hacia los ríos y mares.

Por tal razón, el presente trabajo tiene por finalidad determinar el efecto de tres concentraciones de Dodecilbenceno sulfonato de sodio, en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 y en la degradación del componente a los 15 días.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

- Dodecilbenceno sulfonato de sodio presente en los detergentes.
- Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo.
- 11.2 mL de solución patrón de Dodecilbenceno sulfonato de sodio a 10000 ppm.

### Diseño y armado de Biorreactores

Se fabricó 4 biorreactores con frascos de vidrio de 1L de capacidad provistos de 2 deflectores de 1 cm x 9 cm, con motores de 9 V que fueron regulados a 1.5 V para su funcionamiento y una hélice para la agitación. Los biorreactores fueron conectados a un sistema de aireación previamente purificado.

Todos los biorreactores fueron sometidos a desinfección química con hipoclorito de sodio al 5%, y luego esterilizados en cámara UV durante una hora.

### Preparación del Medio Mínimo de Sales

El medio mínimo de sales tuvo los siguientes componentes: 6.3 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2.1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1%, 0.525 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2%, 0.525 g de  $\text{KCl}$  0.5%, 0.0042 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.42 g de Asparragina 0.25%. Disuelto en 2.1 litros de agua destilada. Y a pH  $7 \pm 1$ .

### Preparación de la solución patrón de DBS

Un litro de "Deterfas" contiene 21.92 % de DBS que es equivalente a 219200 ppm. A partir de este equivalente se extrajo una alícuota de 10 mL y se agregó en un volumen de 209,2 mL de agua destilada estéril correspondiendo a una concentración de 10000 ppm.

### Reactivación del cultivo y evaluación de su pureza.



Las bacterias de un cultivo se sembraron en 5 mL de caldo nutritivo, e incubados a 37 °C por 18 horas. El cultivo reactivado fue sembrado por superficie en agar nutritivo e incubado a 37°C por 24 horas. Se observaron las características macromorfológicas de las colonias y las características micromorfológicas mediante coloración Gram. Luego se sembró en agar glutamato y en 10 mL caldo glutamato para observar la producción de pioverdina y piocianina respectivamente.

#### **Preparación del inóculo**

Se preparó una suspensión en 4 mL de agua destilada estéril con el cultivo reactivado y se comparó con el tubo número tres del Nefelómetro de Mac Farland ( $9 \times 10^8$  UFC/mL). Se corroboró mediante recuento en placa por siembra en superficie, en agar nutritivo.

#### **Inoculación en los sistemas**

Tres biorreactores contenían volúmenes de 0.7 mL, 3.5 mL y 7 mL de la solución patrón y fueron aforados hasta 700 mL con medio mínimo de sales, obteniendo concentraciones de 10, 50 y 100 ppm de DBS, respectivamente. El biorreactor control contenía 699 mL de medio mínimo de sales. Se inoculó 1 mL de la suspensión bacteriana a cada biorreactor; y se adicionó 2 mL de antiespumante a cada uno de ellos.

Los cuatro biorreactores fueron incubados a 30° C $\pm$  1 a pH 7 en condiciones de agitación y aireación durante 15 días.

#### **Evaluación del crecimiento**

Se realizó diluciones al décimo de cada contenido de los biorreactores y luego se sembró por superficie para el recuento en placa, por duplicado; utilizando para ello las dos últimas diluciones.

#### **Evaluación de la degradación**

Se realizó mediante el Método de Azul de Metileno de acuerdo a lo establecido por Standard Methods for the Examination of water and wastewater, cuyo límite de detección es de 10 ug calculado como alquilbenceno sulfonato lineal. [21] Evaluado a los 15 días.

#### **Análisis Estadístico**

Los datos encontrados se analizaron por la prueba estadística ANAVA, con el propósito de determinar si existe diferencia significativa entre los valores de los parámetros estudiados.

## **RESULTADOS**

El efecto de las concentraciones de 10, 50 y 100 ppm de dodecibenceno sulfonato de sodio en el crecimiento de *P. aeruginosa* MBL-03 se muestra en la Fig. 1. Los sistemas de ensayo fueron incubados a 30°C $\pm$  1, pH 7.0; durante 15 días. La Fig. 2 muestra las concentraciones residuales de DBS en los tres sistemas evaluados.

## **DISCUSIÓN**

En el presente estudio se utilizó un cultivo puro de *P. aeruginosa* MBL-03 previamente aislado de la bocatomía del Río Moche sección La Huaca-La Libertad, el cual se cultivó en Medio Mínimo de Sales, DBS como fuente de carbono y antiespumante; e incubados a temperatura de 30 $\pm$ 1°C, pH 7 $\pm$ 0.5; para evaluar la degradación del DBS y el crecimiento de la bacteria. Esta temperatura y el pH utilizados se eligieron en base a los trabajos realizados por Ambily y Jisha<sup>[24]</sup> y Bateman<sup>[23]</sup>, ya que ellos demostraron que estos parámetros son óptimos para el crecimiento y degradación de *P. aeruginosa*.

El resultado del crecimiento de *P. aeruginosa* MBL-03 en las 3 concentraciones de DBS a los 15 días, demuestra que la bacteria utiliza a este compuesto como fuente de carbono, confirmando así lo mencionado por Horvath<sup>19</sup>, Jiménez et al<sup>22</sup> y Ambily y Jisha<sup>24</sup>. Este crecimiento bacteriano a la concentración de 50 ppm de DBS es ligeramente superior, en comparación de 10 y 100 ppm evaluado a los 15 días; pero aplicando el análisis de varianza con un 5% de significancia, indica que esta diferencia en el crecimiento no es significativa, esto indica que hasta 100 ppm puede crecer sin dificultad. Según Peressutti<sup>13</sup> y Goodnow<sup>20</sup>, la concentración de 10 ppm es menos tóxica y por lo tanto más asimilable por la bacteria, mientras que a las concentraciones de 50 y 100 ppm son tóxicas e impiden el crecimiento bacteriano. Sin embargo en el presente trabajo se encontró que las concentraciones utilizadas no tiene efecto negativo en el crecimiento, concordando con el trabajo

realizado por Ambily y Jisha [24] que demostraron el crecimiento de *P. aeruginosa* en un rango de concentraciones de 1500-10000 ppm de DBS.

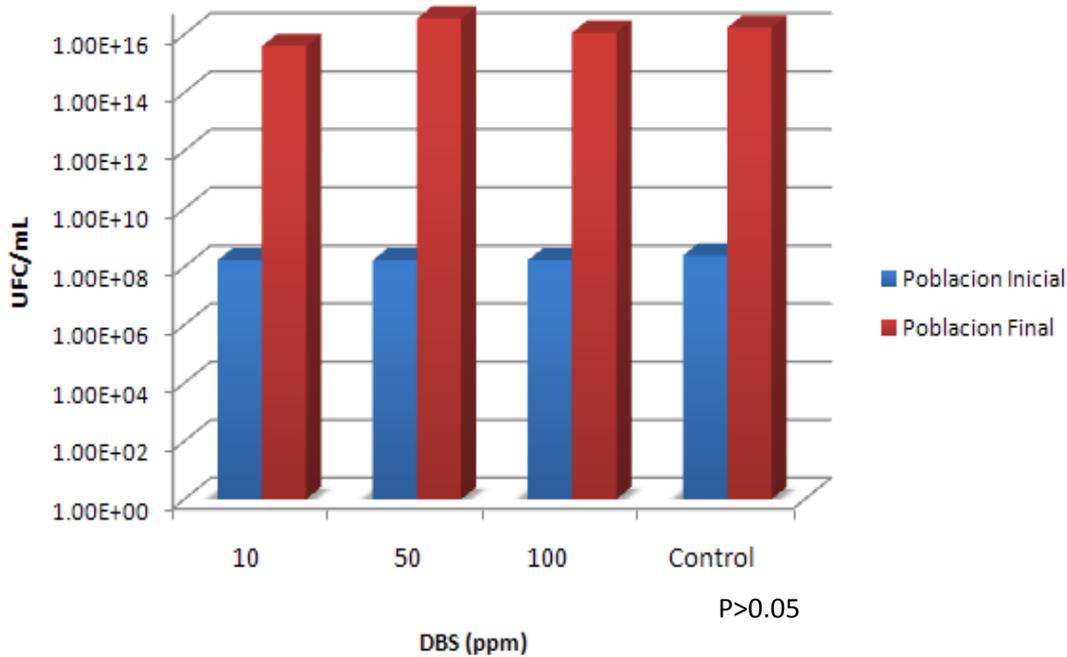


Fig. 1. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 en tres concentraciones de dodecibenceno sulfonato de sodio durante 15 días.

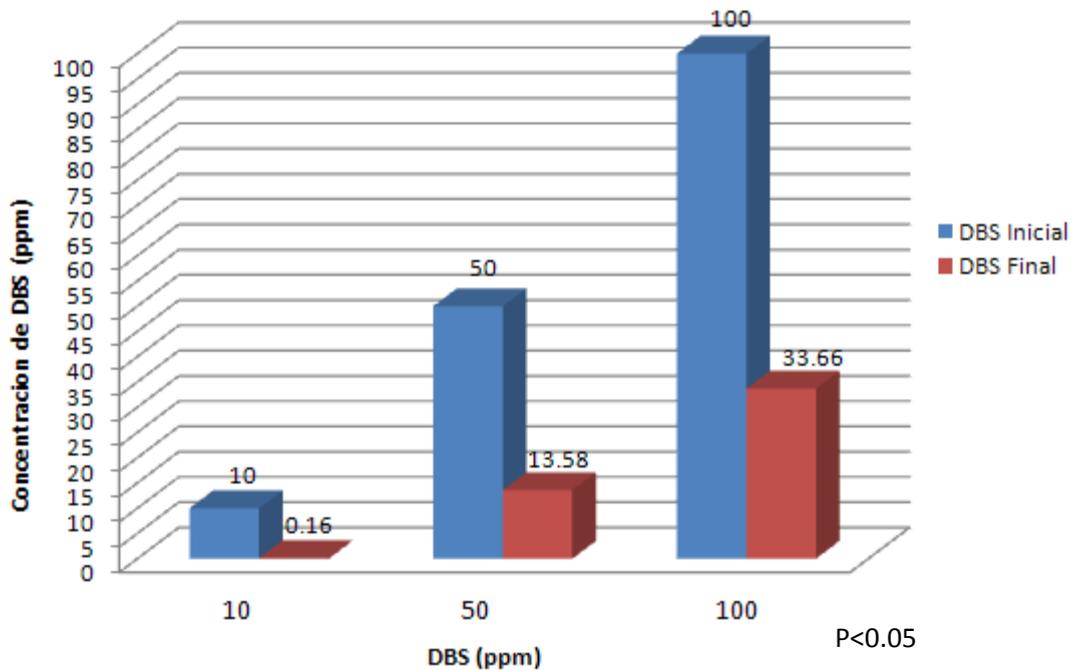


Fig. 2 Degradación de tres concentraciones de dodecibenceno sulfonato de sodio por *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03 durante 15 días.

El metabolismo de este compuesto lo utiliza para el crecimiento y acumulación de biomasa confirmando lo dicho por Merrettig-Bruns<sup>8</sup> y Oso y Ojo<sup>3</sup>. Este crecimiento también está influenciado



por los alcoholes grasos presentes en el antiespumante, estos son la única fuente de carbono disponible; y la urea presente en el “Deterfas” que es una fuente de nitrógeno adicional, esto se comprueba por el crecimiento bacteriano en el biorreactor control.

Para la evaluación de la degradación del DBS, se utilizó el Método de Azul de Metileno, este método según Oso y Ojo<sup>3</sup>, y American Public Health Association Estándar Methods for the Examination of Water and Wastewater<sup>21</sup>, es relativamente simple y preciso, comprende tres extracciones sucesivas en cloroformo para obtener DBS residual y se realiza la medición de la intensidad del color azul del compuesto en un espectrofotómetro a 652nm de longitud de onda y se cuantifica a través de una curva de calibración detectando la degradabilidad primaria de este compuesto.

En la evaluación de la degradación, a la concentración de 10 ppm de DBS ocurre la mayor degradación, éstos resultados coinciden con los obtenidos por Peressutti<sup>[13]</sup>. Sin embargo, en las concentraciones de 50 ppm y 100 ppm existe una disminución de la degradación de DBS, no concordando con Peressutti<sup>[13]</sup> y Goodnow<sup>[20]</sup>, ya que mencionan que a estas concentraciones no existe degradación, porque este compuesto altera la estructura de la membrana celular e induce toxicidad en parámetros fisiológicos como: la actividad metabólica y la tasa de crecimiento específico; no obstante, esto no ocurre con el cultivo de *P. aeruginosa* MBL-03, porque tendría genes de resistencia que le confieren la capacidad de soportar estas concentraciones.

El análisis de varianza con un 5% de significancia, indica que hay diferencia significativa en la degradación de DBS, esto demuestra que las concentraciones si influyen en la degradación.

Según Ogbulie<sup>14</sup>, la capacidad degradativa que presenta *P. aeruginosa* se debe a la presencia de plásmidos que naturalmente no están presentes en todos los microorganismos. Por lo tanto la capacidad de utilizar xenobióticos depende de la posesión de las enzimas necesarias para tal degradación.

Bateman<sup>23</sup> explica que la degradación primaria y secundaria es iniciada por enzimas alquilulfatasas, seguida de la oxidación con liberación de alcoholes primarios y secundarios realizada por una enzima alcohol deshidrogenasa. Merrettig-Bruns<sup>8</sup>, Sigoillot<sup>11</sup>, Peressutti<sup>13</sup>, Jiménez et al<sup>22</sup>, mencionan que la vía oxidativa comienza con la  $\omega$  oxidación de la cadena alquilo (oxidación terminal de la cadena), y es seguida por sucesivas  $\beta$  oxidaciones. Esto conduce a la pérdida de sus propiedades surfactantes.

Para aumentar la capacidad degradativa de *P. aeruginosa* MTCC 10311, Ambily y Jisha<sup>[24]</sup> utilizaron caseína y triptona como fuente de nitrógeno adicional obteniendo una mejora en la degradación de DBS. En el trabajo realizado la fuente nitrogenada y carbonada es la urea del “Deterfas” y el ácido graso del antiespumante, respectivamente. Además Ambily y Jisha<sup>24</sup> indican que si se incrementa las fuentes de carbono y nitrógeno, disminuye el tiempo de incubación necesaria para la degradación del compuesto.

*P. aeruginosa* realiza una degradación primaria del DBS, escindiendo a partir del carbono terminal; por lo tanto para una completa mineralización del DBS, Oso y Ojo<sup>3</sup>, Visoottiviseth, Ekachote y Upatham<sup>1</sup>, Fortunato et al<sup>12</sup>, utilizan poblaciones microbianas mixtas, en especial aquellas aisladas de ambientes contaminados con este compuesto incluyendo géneros como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Vibrio*, *Aspergillus*, *Verticillium*, entre otros para lograr una completa mineralización del DBS.

## CONCLUSIONES

- Las concentraciones de 10, 50 y 100 ppm de DBS, no presentan efecto inhibitorio en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBL-03, sin embargo estas concentraciones si influyen en la degradación del DBS.
- No se encontró diferencia significativa en el crecimiento de *P. aeruginosa* a las tres concentraciones del DBS; sin embargo, si presentaron diferencia significativa entre los valores de degradación del DBS.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Visoottiviseth P, Ekachote S, Upatham ES. Microbial Degradation of Anionic Detergent In Natural Water. J. Sci. Soc. 1988; 14: 209-217.
2. Ivanković T, Hrenović J. Surfactants in the Environment. Arh Hig Rada Toksikol. 2010; 61:95-110.
3. Ojo OA, Oso BA. Biodegradation of synthetic detergents in wastewater. AJB. 2009; 8 (6): 1090-1109.
4. Visitación Figueroa L. Degradación Fotocatalítica de detergentes en efluentes domésticos. [Tesis Para Obtener Grado De Magister]. Lima: Pontificia Universidad Católica Del Perú; 2004.
5. Sweeney WA, Anderson RG. Biodegradability of Alkylbenzene Sulfonates. JAOCS. 1989; 66 (12): 1844-1848.
6. Sibila Lores MA. Evaluación de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de tensioactivos en el medio acuático y marino. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de Cádiz; 2008.
7. Oya M, Takemoto Y, Ishikawa Y. Large Decrease in Acute Aquatic Toxicity of Linear Alkylbenzene Sulfonate in Hard Water and Seawater by Adding Adsorbent. J. Oleo Sci. 2008; 57 (1): 15-21.
8. Merrettig-Bruns U, Jelen E. Anaerobic Biodegradation of Detergent Surfactants. Applied Microbiology. 2009; 2: 181-206; doi: 10.3390/ma 2010181.
9. Sánchez Peinado M. Efectos biológicos de los sulfonatos de alquilbenzeno lineales (LAS) en suelo agrícola: Biotransformación y estudios de biodiversidad. [Tesis Para Obtener Grado de Doctor]. Granada: Universidad de Granada; 2007.
10. Benarde MA, Koft BW, Horvath R, Shaulis A. Microbial Degradation of the Sulfonate of Dodecyl Benzene Sulfonate. Appl. Microbiol. 1965; 13:103-105.
11. Sigoillot JC, Nguyen MH. Complete Oxidation of Linear Alkylbenzene Sulfonate by Bacterial Communities Selected from Coastal Seawater. Appl Environ Microbiol. 1992; 58(4): 1308-1312.
12. Fortunato MS, Rossi S, Korol S, Aquino MD. Eficiencia de la degradación Microbiana de Tensioactivos: Algunos Factores Condicionales. Acta Farm. Bonaerense. 1998; 17 (2): 105-111
13. Peressutti SR, Olivera NL, Babay PA, Costagliola M, Álvarez HM. Degradation of linear alkylbenzenesulfonate by a bacterial consortium isolated from the aquatic environment of Argentina. Journal of Applied Microbiology. 2008; 105: 476-484.
14. Ogbulie TE, Ogbulie JN, Umezuruike I. Biodegradation Of Detergents by Aquatic Bacterial Flora from Otamiri River. Nigeria Afr J Biotechnol. 2008; 7(6): 824-830.
15. Hrsak D, Begonja A. Possible Interactions within a Methanotrophic-Heterotrophic Groundwater Community Able To Transform Linear Alkylbenzene sulfonates. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66(10): 4433-4439.
16. Campos Garcia J, Esteve A, Vazquez Duhalt R, Ramos JL, A, Soberon Chavez G. The Dodecylbenzene Sulfonate Degradation Pathway Of *Pseudomonas aeruginosa* W51d Involves A Novel Route For Degradation Of The Surfactant Lateral Alkyl Chain. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60 (7): 3730-3734.
17. Farzaneh H, Fereidon M, Noor A, Naser G. Biodegradation of dodecylbenzene sulfonate sodium by *Stenotrophomonas maltophilia* Biofilm. Afr J Biotechnol. 2010; 9(1): 055-062.
18. Angelidaki I, Mogensen AS, Ahring BK. Degradation of organic contaminants found in organic waste. Biodegradation. 2000; 11: 377-383.
19. Horvath RS, Koft BW. Degradation of Alkyl Benzene Sulfonate By *Pseudomonas* Species. Appl. Microbiol. 1972; 23 (2): 407-414.
20. Goodnow RA, Harrison AP. Bacterial Degradation of Detergent Compounds. Appl. Microbiol. 1972; 24(4): 555-560.
21. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition, 1999. 5540 C. Anionic Surfactants as MBAS, pp 456 - 462.
22. Jimenez L, Breen A, Thomas N, Ferderle TW, Saylor GS. Mineralization of linear Alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium. Appl. Environ. Microbiol. 1991; 57 (5): 1566-1569.
23. Bateman T, Dodgson KS, White GF. Primary Alkylsulfatase activities of the detergent-degrading bacterium *Pseudomonas* C12B. Biochem. J. 1986; 236: 401-408.
24. Ambily S, Jisha MS. Biodegradation of anionic surfactant, sodium dodecyl sulphate by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 10311. J. Environ. Biol. 2012; 33: 717-720.



# Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de *Capsicum annum* var. *longum*.

Effect of inoculation of *Rhizobium etli*, and *Trichoderma viride* on root and aerial growth of *Capsicum annum* var. *longum*.

Sandra Neyra Vazallo<sup>1</sup>, Luz Terrones Ramírez<sup>1</sup>, Lizeth Toro Carranza<sup>1</sup>,  
Bernardo Zárate García<sup>1</sup> y Bertha Soriano Bernilla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela AP de Microbiología y Parasitología. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

## RESUMEN

Con el fin de determinar la efectividad de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* para ayudar a mantener la estabilidad en las producciones hortícolas así como mejorar la protección del medio ambiente y salud humana, se estudió el efecto de estos microorganismos sobre plántulas de *Capsicum annum* var. *longum* sembradas en un semillero sobre tierra estéril con el fin de disminuir carga microbiana. Se realizó tres ensayos, considerando un grupo control inoculado con 5ml de agua destilada estéril, un grupo experimental inoculado con 5 ml de la suspensión *R. etli* a una concentración aproximada de  $10^8$  UFC/ml y otro grupo experimental inoculado con 5 ml de una suspensión de  $10^8$  esporas/ml de *T. viride*. Las variables agronómicas; longitud, peso húmedo y peso seco de tallo y raíz se tomaron como indicativo de crecimiento y desarrollo vegetal. Se encontró un efecto positivo en la estimulación del crecimiento de las plántulas de *C. annum* var. *longum* por los microorganismos empleados, por lo cual podría recomendarse como potenciales PGPR (Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal) y PGP (Promotor de crecimiento vegetal) en este cultivo, como alternativa para reducir el uso de fertilizantes químicos.

**Palabras clave:** *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride*, *Capsicum annum*, promotor de crecimiento

## ABSTRACT

In order to determine the effectiveness of *Rhizobium etli* and *Trichoderma viride* to help maintain stability in horticultural products and to improve environmental protection and human health, effect of these microorganisms on seedlings planted *Capsicum annum* var. *longum* hotbed of sterile soil in order to reduce microbial load was determined. Three trials were conducted, assuming a control group inoculated with 5ml sterile distilled water inoculated with experimental group 5 ml *R. etli* suspension to a concentration of approximately 108 CFU / ml and one experimental group inoculated with 5 ml of a suspension of 108 spores / ml of *T. viride*. The agronomic variables, length, wet weight and dry weight of shoot and root were taken as indicative of plant growth and development. We found a positive effect in stimulating the growth of seedlings of *C. annum* var. *longum* by the microorganisms employed, thus could be recommended as potential PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) and PGP (plant growth promoter) in this crop, as an alternative to reduce the use of chemical fertilizers.

**Keywords:** *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride*, *Capsicum annum*, growth promoter



## INTRODUCCIÓN

Las hortalizas constituyen un grupo de cultivos fundamentales dentro de la producción agrícola, representando un renglón importante desde los puntos de vista tanto económico como social para muchos países, al jugar un papel importante en la alimentación humana por su riqueza en vitaminas, ácidos orgánicos fácilmente asimilables, sales minerales y aceites esenciales, lo que ha motivado el incremento continuo de su producción a escala mundial.<sup>(1)</sup>

Los fertilizantes minerales usados indiscriminadamente llegan a generar serios desequilibrios en los agroecosistemas por contaminación del suelo, el agua, el aire y los alimentos, pudiendo provocar la degradación de los suelos y la resistencia a plagas, la destrucción de los controles naturales y hasta poner en peligro la salud humana. Por tal motivo es de gran interés restaurar la microflora del suelo mediante estrategias que permitan mejorarlo en relación a la productividad agrícola y de una manera no contaminante.<sup>(1)</sup>

A finales de la década de los 70 Kloepper y Schroth utilizaron el término PGPR (rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal) para referirse a aquellas bacterias que se encuentran libres en el suelo, capaces de adaptarse, colonizar y permanecer en la rizósfera de la planta.<sup>(3)</sup> Recientemente, la denominación se ha extendido a microorganismos PGP para incluir hongos y cualquier organismo a fin.<sup>(4, 12)</sup>

Un considerable número de especies bacterianas asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de ejercer un efecto benéfico en el crecimiento de plantas. Este grupo de bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) incluye el género *Rhizobium*. Estas bacterias se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. La estimulación directa puede incluir la producción de hormonas, disolución y mineralización de fosfatos, fijación asimbiótica de nitrógeno atmosférico y producción de sideróforos y antibióticos.<sup>(6, 7)</sup> El ingreso del nitrógeno permite la estimulación de los procesos microbianos en la transformación de la materia orgánica y reciclaje de nutrientes necesarios en los sistemas agrícolas productivos, así como en aquellos considerados como agroecosistema sostenibles.<sup>(2)</sup> La capacidad PGPR de *Rhizobium* ha sido estudiada porque la agricultura sustentable demanda mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno a través del uso de bacterias competitivas capaces de extender la ventaja de la simbiosis a otros cultivos no leguminosos.<sup>(6)</sup>

Para microorganismos PGP (Promotores de crecimiento vegetal) como *Trichoderma* ayudan al control del crecimiento de algunos patógenos que podrían estar presentes en la rizósfera, actuando como bioestimulador y su potencial fijación biológica del fósforo, logra disminuir la incidencia de enfermedades en el cultivo en más del 60% y estimula el desarrollo vegetativo del cultivo observándose mayor vigor, tallos normales con abundante follaje y mejor crecimiento radical.<sup>(4, 8, 9, 10)</sup> Los bioestimulantes son compuestos orgánicos que difieren los nutrientes, los cuales en pequeñas cantidades fomentan, inhiben o modifican los procesos fisiológicos de las plantas.<sup>(8)</sup> Un efecto remarcable se observa sobre el sistema radicular, en donde se incrementa el desarrollo de raíces adventicias y pelos absorbentes, estos últimos muy importantes para la absorción del fósforo, importantes en el empleo de la agricultura.<sup>(4, 11)</sup>

El uso de biofertilizantes y bioestimulantes ha mejorado la comprensión de la relación planta microorganismo en su contribución a minimizar los riesgos de degradación de suelos y a maximizar el regreso de energía a los sistemas de producción. Estas consideraciones han tomado importancia en las últimas tres décadas para establecer las fronteras a la agricultura, no solo desde el punto de vista de lograr una máxima producción sostenida, sino buscando la estabilización de los sistemas de producción a largo plazo. El incremento en la productividad a base de grandes cantidades de energía (como es el caso de la aplicación de fertilizantes químicos sintéticos) no puede ser mantenido indefinidamente, existe un límite en la capacidad de producción que va a estar regulada por los costos externos de la energía que se introduce en los sistemas de producción.<sup>(12)</sup>

Una de las posibles alternativas propuestas contra tal situación, es la biofertilización con microorganismos del suelo.<sup>(1)</sup> Hoy en día los biofertilizantes son considerados como un componente del manejo integrado de la nutrición vegetal y han sido definidos como sustancias que contienen microorganismos vivos que al aplicarse a las semillas, superficies de las plantas o al suelo, colonizan



la rizósfera o el interior de la planta y promueven su crecimiento aumentando la disponibilidad de los nutrientes y la sanidad vegetal en la planta hospedera.<sup>(5)</sup>

Esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aéreo y radicular de las plántulas de *Capsicum annum* L. var. *Longum*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material de estudio:

- Semillas de *Capsicum annum* L. var. *longum* “páprika” comercializado por HORTUS S.A. De la provincia de Trujillo, departamento La Libertad; mayo – 2012
- *Rhizobium etli* proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo.
- *Trichoderma viride* proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo.

### Microorganismos

Se utilizó una cepa de *R. etli* (Rf 188-03) proporcionado por el Laboratorio de Microbiología Ambiental y un cultivo de *T. viride* proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo.<sup>(6)</sup>

### Caracterización morfológica y fisiológica

Las bacterias se caracterizaron físicamente mediante la observación al microscopio con la prueba de Gram. Se utilizó como prueba fisiológica para *Rhizobium* el medio de ELMARC.<sup>(5)</sup>

### Preparación del Inóculo bacteriano y fúngico

A partir de la cepa de *R. etli* (Rf 188-03), se realizó la preparación del inóculo. En condiciones de esterilidad se hicieron suspensiones en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de agua destilada estéril hasta obtener una concentración final de acuerdo al tubo N° 3 del nefelómetro de Mac Farland (9 x 10<sup>8</sup> UFC/ml).<sup>(5)</sup>

De un cultivo puro de *T. viride* se preparó el inóculo, realizando una cosecha de esporas con agua destilada estéril, se hizo un recuento de cámara de Neubauer y finalmente se estandarizó a una concentración de 10<sup>8</sup> esporas/ml.<sup>(15)</sup>

### Desinfección y germinación de las semillas

Las semillas se lavaron con agua corriente eliminando los productos químicos de la certificación de la semilla y 10 veces con agua destilada estéril. Luego se desinfectó por inmersión en etanol al 70% durante tres minutos y se lavó cinco veces consecutivas con agua destilada estéril. Seguidamente se les agregó hipoclorito de sodio al 2.25% por un minuto y se lavó 10 veces consecutivas con agua destilada estéril. Dichas semillas fueron colocadas en placas Petri con algodón humedecido para su posterior germinación en siete días.<sup>(5,19)</sup>

### Crecimiento de las plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum*

Se utilizó suelo procedente del CEP CAM (Centro experimental de producción de cultivos y animales menores) de la Universidad Nacional de Trujillo, este fue tamizado, esterilizado en autoclave y secado en el horno. El suelo fue colocado en un semillero que contiene pocillos de 200 g de capacidad, en los cuales se introdujeron tres semillas germinadas en cada uno de manera equidistante. Posteriormente se inoculó el suelo para cada sistema experimental con 5ml de suspensión de *Rhizobium etli* y 5ml de suspensión de *Trichoderma viride*; y para el sistema control, 5ml de agua destilada estéril.<sup>(6, 15,18)</sup>

Se determinó el efecto sobre el crecimiento de las plántulas evaluando las siguientes variables agronómicas: longitud, peso húmedo y peso seco del tallo y raíz así como el índice de efectividad de la inoculación (IEI) de las plántulas evaluadas en 10, 20 y 40 días, calculado mediante la siguiente expresión,

$$IEI = \left[ \frac{\text{Trat Inoculación} - \text{Control Sin Inoculación}}{\text{Control Sin Inoculación}} \right] \times 100$$

### Análisis estadístico

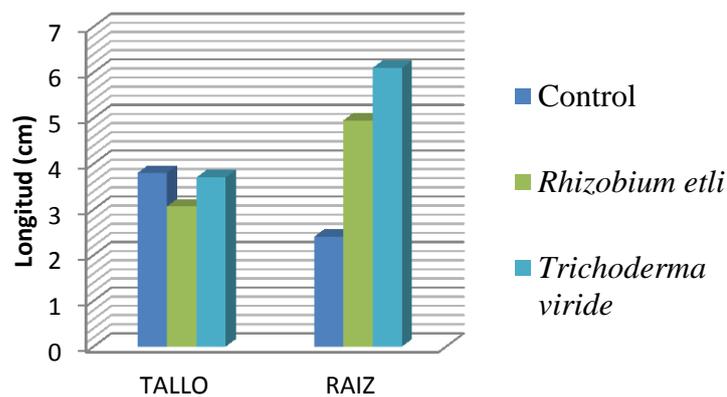
Se realizó el análisis de varianza y la prueba de Rangos Múltiples de Duncan ( $P=0.05$ ) para determinar las diferencias entre tratamientos. Los promedios para las tres variables agronómicas (longitud, peso húmedo y peso seco del tallo y raíz) se ordenaron de mayor a menor y el promedio de estos órdenes se utilizó para establecer el valor de orden global (ranking) de los tratamientos estudiados. <sup>(6, 13, 14, 16, 17)</sup>

## RESULTADOS

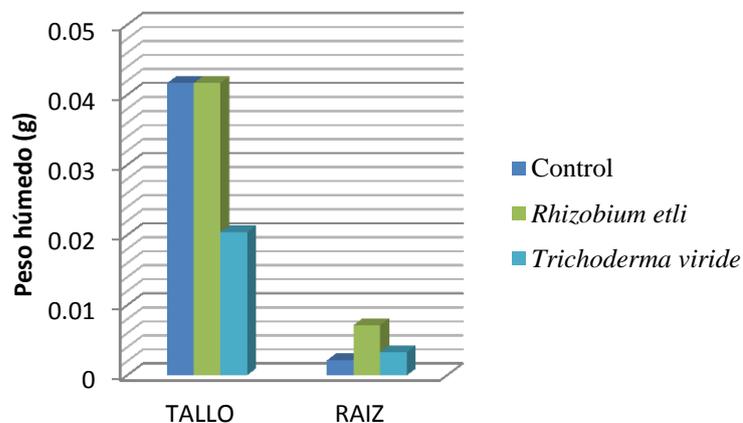
Se encontró que las raíces de *C. annum* tratadas tanto con *R. etli* como con *T. viride* alcanzaron mayores longitudes promedio que el control (Fig. 1), sin embargo, cuando se examinó el peso húmedo no sucedió lo mismo, porque fue mayor en los tallos (Fig. 2).

Cuando se examinó el peso seco total, se encontró que no hubo diferencia en el tallo y más bien algo de diferencia en las raíces (Fig. 3), así mismo, y por el contrario a los 20 días, la longitud promedio fue mayor en los controles (Fig. 4).

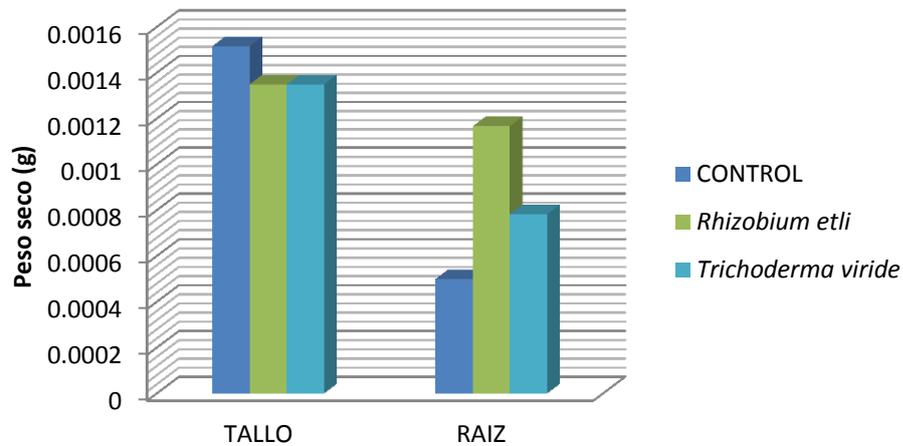
Igualmente, a los 20 días de cultivo, el peso húmedo siguió siendo mayor en los controles y el peso seco permaneció, casi, sin diferencia (Figs. 5 y 6); sin embargo, a los 40 días el promedio de longitud de raíz y tallo fue mayor, mas no hubo mucha diferencia en cuanto al peso (Figs. 7 y 8)



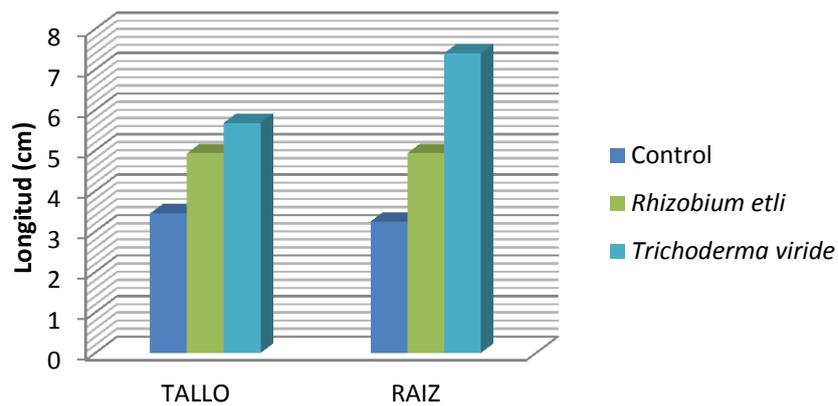
**Fig. 1:** Longitud promedio de tallo y raíz de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* a los 10 días después de los ensayos realizados con *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control *in vitro*.



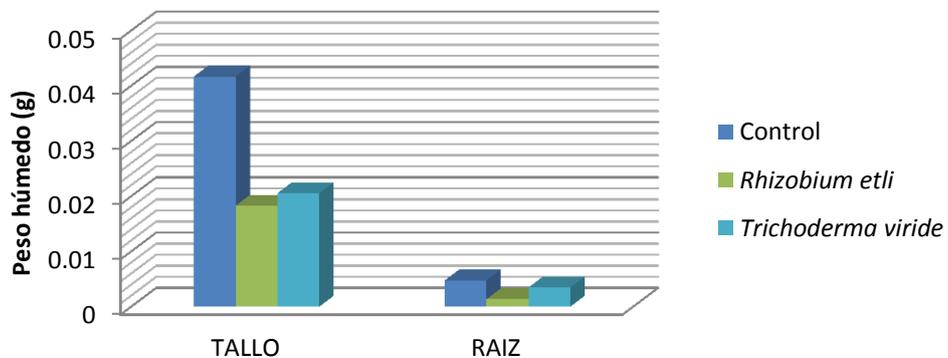
**Fig. 2.** Promedio de peso húmedo total de tallo y raíz de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* a los 10 días después de los ensayos realizados con *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control *in vitro*.



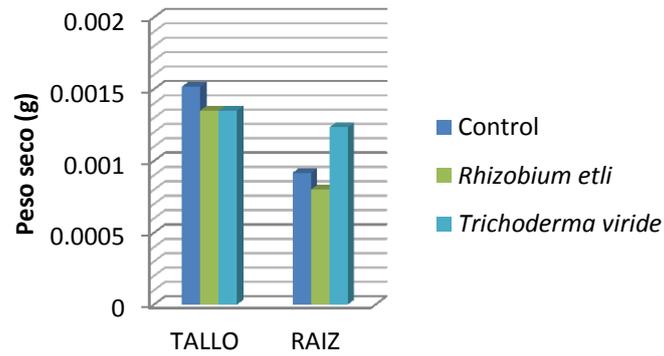
**Fig. 3:** Promedio de peso seco total de tallo y raíz de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* a los 10 días después de los ensayos realizados con *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control *in vitro*.



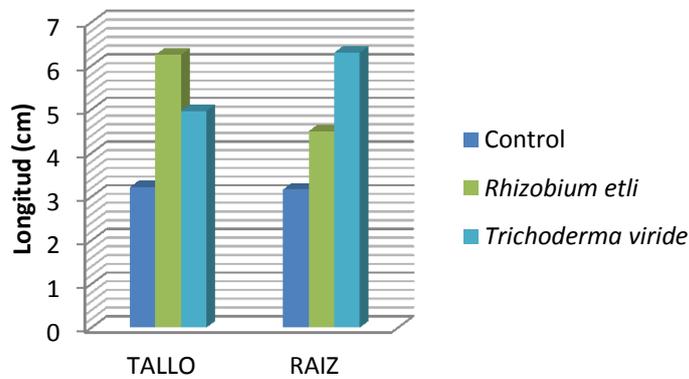
**Fig. 4:** Longitud promedio de tallo y raíz de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* a los 20 días después de los ensayos realizados con *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control *in vitro*.



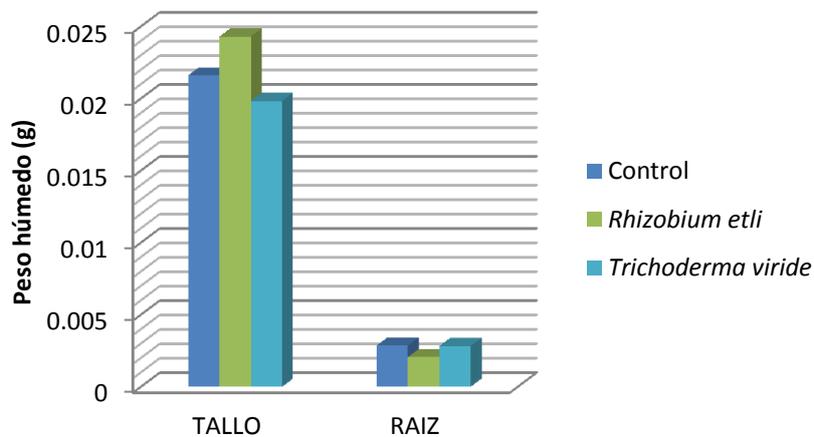
**Fig. 5:** Promedio de peso húmedo total de tallo y raíz de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* a los 20 días después de los ensayos realizados con *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control *in vitro*.



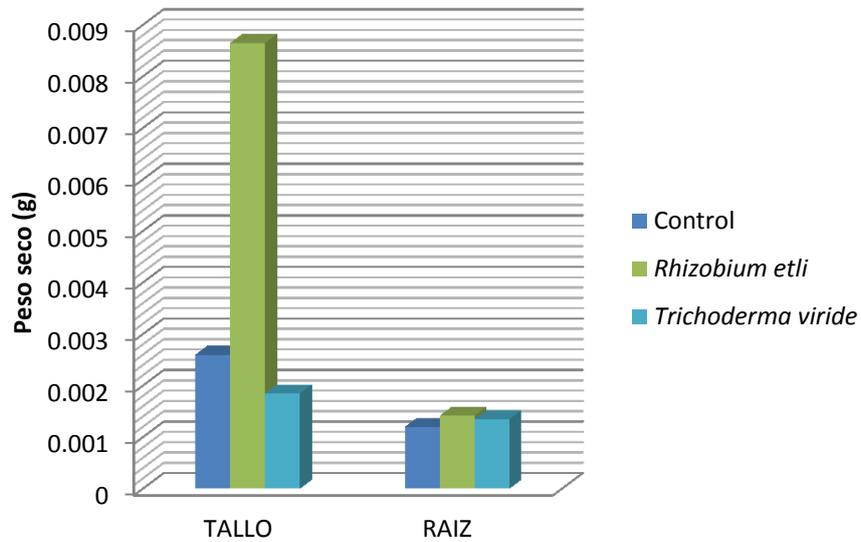
**Fig. 6:** Promedio de peso seco total de tallo y raíz de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* a los 20 días después de los ensayos realizados con *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control *in vitro*.



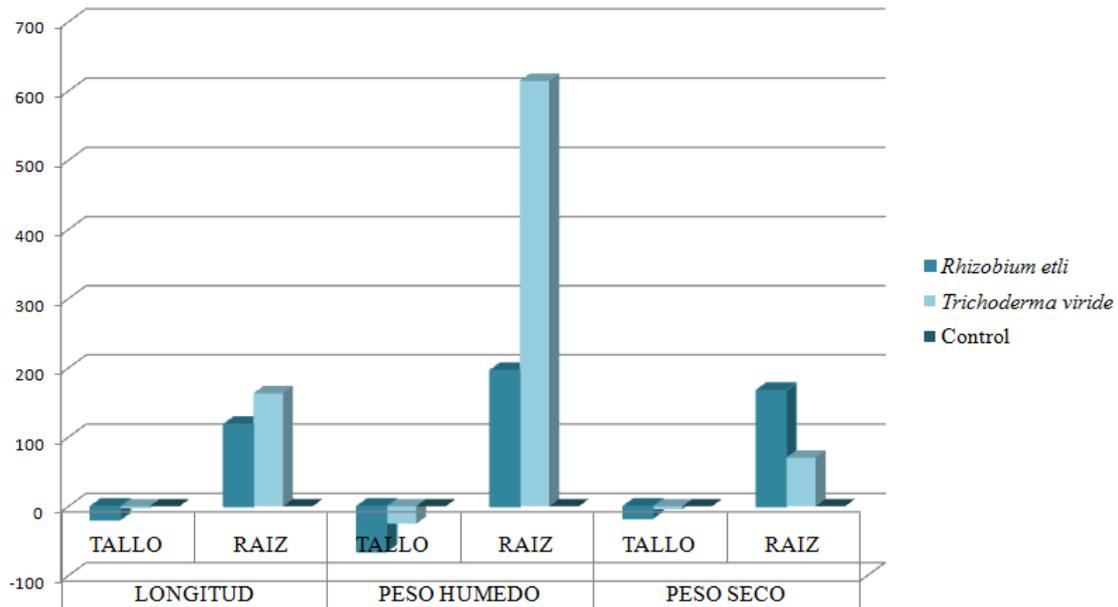
**Fig. 7:** Longitud promedio de tallo y raíz de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* a los 40 días después de los ensayos realizados con *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control *in vitro*



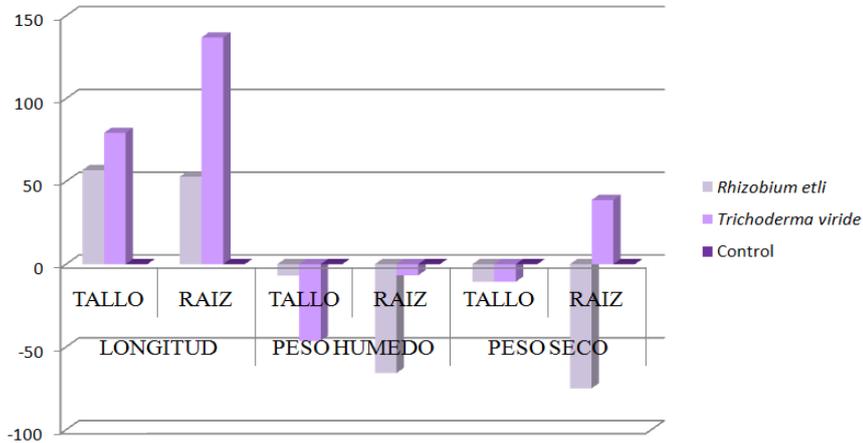
**Fig. 8:** Promedio de peso húmedo total de tallo y raíz de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* a los 40 días después de los ensayos realizados con *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control *in vitro*.



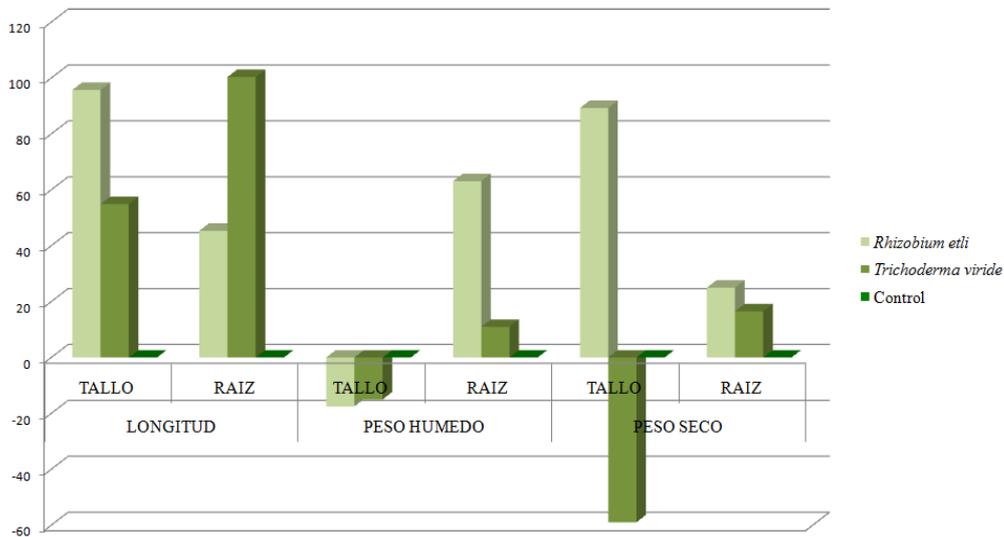
**Fig. 9:** Promedio de peso seco total de tallo y raíz de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* a los 40 días después de los ensayos realizados con *Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control *in vitro*.



**Fig. 10:** Índice de efectividad de la inoculación (IEI) en 10 días, expresado en porcentaje de seis variables agronómicas (longitud, peso húmedo y peso seco del tallo y raíz) en los tres ensayos realizados (*Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control) *in vitro*.



**Fig. 11:** Índice de efectividad de la inoculación (IEI) en 20 días, expresado en porcentaje de seis variables agronómicas (longitud, peso húmedo y peso seco del tallo y raíz) en los tres ensayos realizados (*Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control) *in vitro*.



**Fig. 12:** Índice de efectividad de la inoculación (IEI) en 40 días, expresado en porcentaje de seis variables agronómicas (longitud, peso húmedo y peso seco del tallo y raíz) en los tres ensayos realizados (*Rhizobium etli*, *Trichoderma viride* y Control) *in vitro*.



## DISCUSIÓN

En la actualidad, la agricultura sustentable, plantea mejorar la eficiencia en la fijación del nitrógeno mediante el uso de plantas leguminosas y no leguminosas, rizobios y algunos hongos competitivos, capaces de ser usados en la biorremediación y fitorremediación, de esta manera extender las ventajas de la simbiosis a otros cultivos; en tal sentido, las investigaciones se han orientado al estudio de rizobios y hongos como promotores de crecimiento de plantas leguminosas y no leguminosas.<sup>(6)</sup>

Al analizar los índices de efectividad, para cada variable agronómica evaluada, se observa una mayor efectividad de *T. viride* respecto a la longitud de tallo y raíz, *R. etli* muestra su efectividad en el peso húmedo y ambos microorganismos muestran una diferencia significativa en el peso seco, por los valores negativos que muestra la inoculación con *T. viride*, que pueden deberse a la mala calibración de la balanza analítica, a la poca muestra y al tiempo insuficiente de secado.

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran en general diferencias significativas para la longitud de tallo y raíz de la plántula de *C. annum* var. *longum* en la inoculación de *R. etli* y *T. viride* y esto se corrobora con otros investigadores quienes dicen que el efecto favorable que se puede alcanzar en los cultivos de importancia económica con la aplicación de organismos PGPR y PGP, es promoviendo el crecimiento y desarrollo de posturas, aun cuando en ocasiones, estas no alcanzaron las dimensiones requeridas para considerarlas adecuadas.<sup>(1,21)</sup> Algunos autores atribuyen el efecto de estas rizobacterias a lo que ellos denominan “hipótesis aditiva” en la que más de un mecanismo está involucrado en la asociación planta – rizobacteria, los cuales operan simultáneamente o en asociación.<sup>(17)</sup>

Esto debido a que *R. etli*, es capaz de penetrar la corteza de la raíz y segregar un grupo de sustancias fisiológicamente activas a la rizósfera, tales como giberelinas, auxinas, citocinas y ácido abscísico, que contribuyen al desarrollo de plantas al influir sobre su metabolismo, ya sea inhibiendo o promoviendo su crecimiento o desarrollo, además provocan el aumento en la absorción de agua y nutrientes por las raicillas de las plantas provocando un efecto beneficioso en el rendimiento de los cultivos. Esto ocurre por un aumento de la división celular al alargar la raíz y promover la formación de pelos radicales, y en consecuencia, la resistencia al estrés osmótico por aumento de clorofila, K, Ca, azúcares solubles y contenido de proteínas.<sup>(1, 3, 5, 28)</sup>

Por tal motivo, *Rhizobium* es un microorganismo capaz de fijar el nitrógeno asimbioticamente favoreciendo la nutrición de la plántula y también tiene la capacidad de disolver fosfatos, cualidad que lo convierte en un microorganismo con capacidad de PGPR.<sup>(6, 27)</sup> En cuanto al mecanismo de acción mediante el cual se promueve el crecimiento vegetal se plantea que posiblemente más de un mecanismo de acción esté involucrado y la asociación y que estos operan simultáneamente o en sucesión, la suma de los diferentes mecanismos refleja los cambios observados en el crecimiento de las plantas, cuando son inducidos bajo condiciones ambientales propicias.<sup>(17)</sup> Se observó también incrementos en el peso seco de la raíz y el tallo, por sus moléculas promotoras de crecimiento presente en la rizósfera o en los tejidos de las plantas estimulando un mayor desarrollo de raíz y tallo por la absorción de nutrientes.<sup>(6, 26)</sup> Además el proceso por el cual las bacterias se mueven hacia la raíz y la colonizan, no es muy claro. No obstante, se han propuesto algunos factores que favorecen el aumento en peso húmedo como las condiciones favorables de humedad, tiempo de generación, quimiotaxis y la capacidad de movimiento.<sup>(21,22)</sup>

Las rizobacterias ofrecen una alternativa ecológica para controlar el ataque de patógenos y/o mejorar el rendimiento de cultivos, por lo que actualmente se utilizan técnicas de avanzada para entender sus mecanismos de acción. Pueden promover el crecimiento por vías directas e indirectas, cuyos elementos específicos no han sido debidamente caracterizados. Los efectos directos pueden evidenciarse en ausencia de otros microorganismos, es decir, la planta solo interactúa con el microorganismo en estudio, mientras que los mecanismos indirectos se pueden observar en la interacción del microorganismo de interés con un fitopatógeno, mediante la cual se reducen los efectos dañinos en el vegetal.<sup>(29)</sup>

Por su parte, los resultados obtenidos en *T. viride* se deben a la participación en la biotransformación de la celulosa, aceleración de la reproducción celular, mineralización del nitrógeno y de algunas proteínas presentes en el suelo, permitiendo que estos procesos biológicos de degradación favorezcan el crecimiento de la planta.<sup>(8)</sup>

El efecto bioestimulador de este hongo se demuestra en la longitud de raíz cuando se comparó con el control, a pesar que no fué la que mostró los mejores resultados in vitro fué la que evidenció un mejor efecto sobre la elongación de la raíz de la plántula de *Capsicum annum* L. var. *longum*



reportando incrementos en el crecimiento que se atribuyen a la obtención de un mayor desarrollo radical, estimulado por el complejo enzimático que se origina en la rizósfera de las plantas; solubilización del fósforo inorgánico, elemento fundamental en la fotosíntesis y en la respiración celular, y necesario para el desarrollo de estructuras reproductivas. La disponibilidad de este elemento para ser asimilado por la planta, mejora la calidad del cultivo.<sup>(8,10, 22, 26)</sup> Este incremento de las plántulas parece que varían según las comunidades microbianas asociadas a la rizósfera, la especie de la plántula, tipo de sustrato y prácticas culturales.<sup>(23)</sup>

Por lo antes dicho se debe considerar que *Trichoderma* es un hongo invasor oportunista, que se caracteriza por su rápido crecimiento, por la capacidad de asimilar una amplia gama de sustratos y por la producción de una variedad de compuestos microbianos. Igualmente, debido a la existencia de transposones en sus moléculas se considera estimulador de crecimiento vegetal e inductor de resistencia sistémica, debido a que modula o estimula algunas respuestas de las plantas.<sup>(24)</sup>

No solo los microorganismos ejercen su efecto sobre la planta, sino que ésta también actúa, a través de sus exudados, determinando la composición de la comunidad rizosférica, incluso en las diferentes zonas de las raíces varían las estructuras y las especies de la comunidad rizosférica.<sup>(25)</sup>

Es difícil entender por completo el funcionamiento de un sistema biológico. La complejidad de las interacciones planta – suelo – microorganismo - ambiente son variadas; una comprensión completa de todas las relaciones en cuestión es poco probable; sin embargo, los efectos benéficos de las interacciones biológicas que estimulan los rendimientos de los cultivos y mejoran la sanidad de las plantas pueden ser evaluados y quedar en evidencia algunas estrategias generales de la interacción.<sup>(24)</sup>

La sustentabilidad de los sistemas agrícolas a largo plazo debe fomentar el uso y manejo efectivo de los recursos internos de los agroecosistemas. En este sentido, los biofertilizantes e inoculantes microbianos, así como los bioestimulantes son un componente vital de los sistemas sustentables, ya que constituyen un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable de reducir los insumos externos y de mejorar la calidad y cantidad de los recursos internos.<sup>(30)</sup> La continuidad de esta línea de investigación, contribuirá al conocimiento más certero de esta práctica agronómica.

## CONCLUSIÓN

- La inoculación de 5ml de la suspensión de *Trichoderma viride* a una concentración aproximada de  $10^8$  esporas/ml y de *Rhizobium etli* a  $10^8$  UFC/ml estimula el desarrollo de plántulas de *Capsicum annum* L. var. *longum* “paprika” en condiciones de laboratorio. Encontrándose diferencias significativas en las variables agronómicas longitud de tallo, longitud de raíz, peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pulido L. E, Medina N, Cabrera A. Biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) y cebolla (*Allium cepa* l.). i. crecimiento vegetativo. Redalyc 2003; 24(1): 15-24.
2. Ferrera Cerrato R, Alarcón A. La Microbiología del Suelo en la agricultura sostenible. Ciencia Ergo Sum 2001; 8(2): 175 – 183.
3. Rives N, Acebo Y, Hernández A. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* l.). perspectivas de su uso en cuba. Redalyc 2007; 28(2): 29 – 38.
4. Curá JA, Ribaudó CM, Gaetano AM, Ghiglione HO. Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo de arroz durante las primeras etapas de desarrollo. 2005.
5. Reyes I, Alvarez L, El Ayoubi H, Valery A. Selección y Evaluación de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Pimentón y Maíz. Bioagro 2008; 20(1): 37-48.
6. Santillana N, Arellano C, Zuñiga D. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* miller). Redalyc 2005; 4(1-2): 47-51.
7. Torriente D. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en cuba. Scielo 2010; 31(1): 1-10.
8. Cupull Santana R, Andreu Rodríguez CM, Pérez Navarro C, Delgado Pérez Y, Cupull Santana MC. Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. Centro Agrícola 2003; 30(1): 21-25.



9. Cupull Santana R, Delgado Pérez Y, Cupull Santana MC, Andréu Rodríguez CM. Efecto de dos biopreparados y micorriza en la estimulación de la germinación, el control de *Rhizoctonia solani* y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. Centro Agrícola 2003; 30(2): 9-13.
10. Cupull Santana R, Ortiz Arbolaez A, Sánchez Esmori C. Efecto de *Trichoderma viride* Rifai en el desarrollo de los injertos hipocotiledonares de café. Centro Agrícola 2010; 37(4):37-40.
11. Pérez Torres E, Milanés Virelles P, Rodríguez González N, García Rivero G, Torres Ávila O, Martínez Estrada H, Viamontes Viamontes R, Tamayo Escobar Y, Pérez Cerezález E y Prada Fernández J. Acción de *Trichoderma harzianum* Rifai en el incremento de biomasa en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Rev. prod. anim. 2009; 21(2): 127-130.
12. Aguirre Medina JF, Irizar Garza MB, Durán Prado A, Grajeda Cabrera OA, Peña del Río MA, Loredó Ostil C y Gutierrez Baeza A. Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Inifap 2009; 5: 1-86.
13. Vilorio de Z. A, Arteaga de R. L, Pire R. Desarrollo radical del pimentón (*Capsicum annuum* L.) bajo tres distancias de siembra y su relación con el peso de los frutos. Bioagro 1998; 10(3): 80-83.
14. Terry Alfonso E, Leyva Galán A. Evaluación Agrobiológica de la coinoculación Micorrizas-Rizobacterias en tomate. Agronomía Costarricense 2006; 30(1): 65-73.
15. Jiménez C, Sanabria de Albarracín N, Altuna G, Alcano M. Efecto de *Trichoderma harzianum* (Rifai) sobre el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.). Fac. Agron. (LUZ) 2011; 28: 1-10.
16. Galeano M, Mendez F, Urbaneja A. Efecto de *Trichoderma harzianum* rifai (cepa T-22) sobre cultivos hortícolas. Koppert Biological Systems; 286 (65): 1-11.
17. Terry Alfonso E, Leyva A, Hernández A. Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). Rev. Colomb. Biotecnol 2005; 7(2): 47-54.
18. Bécquer CJ, Ramos Y, Nápoles JA, Arioza MD. Efecto de la interacción Trichoderma-rizobio en *Vigna luteola* SC-123. Pastos y Forrajes 2004; 27(2): 139-145.
19. Cubillos Hinojosa J, Valero N, Mejía L. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). Scielo 2009; 27(1): 1-11.
20. Nuñez Sosa DB, Liriano Gonzáles R, López Ceballos C. Evaluación de biofertilizantes (*Azospirillum* y Micorrizas) y diferentes niveles de materia orgánica en bolsa y organóponico, en el cultivo de la zanahoria (*Daucus carota* L.). Centro agrícola 2005; 32(2): 5-10.
21. Loredó Osti C, López Reyes L, Espinosa Victoria D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. Redalyc 2004; 22(2): 225 – 239.
22. Camelo R. M, Vera M. SP, Bonilla B. RR. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Corpoica 2011; 12(2), 159-166.
23. Sánchez López DB. Efecto de la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el cultivo de tomate (*Solanum Lycopersicum* var. *Sofía*) bajo invernadero [Tesis Maestría]. Bogotá D.C, 2011.
24. Alejandro Cano M. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. U.D.C.A 2011; 14(2): 15 – 31.
25. Ezziyani M, Pérez Sánchez C, Sid Ahmed A, Requena MA, Candela MA. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de Biología 2004; 26: 35-45.
26. Martínez B, Reyes Y, Infante D, Gonzáles E, Baños H, Cruz A. Selección de Aislamientos de *Trichoderma* spp. Candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. En arroz. Protección Veg. 2008; 23(2): 118-125.
27. Díaz Medina A, Suárez Pérez C, Pujol Marco Y, Sánchez Esmoris C, Orrantía Cardenas I, Castro Alvarez P. Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* (BFN) sobre el desarrollo de posturas de café (*Coffea arabica* L.). Centro Agrícola 1999; 26 (1).
28. Barreto D, Valero N, Muñoz A, Peralta A. Efecto de Microorganismos Rizosféricos sobre Germinación y Crecimiento Temprano de *Anacardium Excelsum*. Zonas áridas 2007; 11(1): 240-250.
29. Huape Gonzales LM. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) una opción en agricultura sustentable. [Tesis Título profesional]. México, 2009.
30. Rodríguez Hernández A, Heydrich Pérez M, Velázquez del Valle MG, Hernández Lauzardo AN. Perspectivas del empleo de Rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. Redalyc 2006; 24(1): 42-49.



# Efecto de tres concentraciones de conidios de *Metarhizium anisopliae* sobre larvas III de *Plutella xylostella* en condiciones de laboratorio

Effect of three concentrations of *Metarhizium anisopliae* conidia on *Plutella xylostella* larvae-III under laboratory conditions

Karen Avalos Vela<sup>1</sup>, Flor Soriano López<sup>1</sup>, Carlos Reyna Vigo<sup>1</sup>, Yuseff Rojas Fiestas<sup>1</sup>, Jorge Piminchumo Rojas<sup>1</sup>, Luis Vásquez Sanjinéz<sup>1</sup> y Juan Wilson Krugg<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela AP de Microbiología y Parasitología. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

## RESUMEN

Se determinó el efecto de las concentraciones de 105, 106 y 107 conidios de *Metarhizium anisopliae* /mL sobre las larvas III de *Plutella xylostella* en condiciones de laboratorio. Para esto se recolectaron 240 especímenes adultos de *P. xylostella*, los que fueron transportados al laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Trujillo, para su determinación y crianza hasta la obtención de larvas III. La evaluación se realizó colocando 20 larvas III en cada una de cuatro placas, una para cada concentración y la cuarta para el control. Se inoculó por aspersión concentraciones de 105, 106 y 107 conidios/mL, a cada uno de los grupos problema respectivamente, mientras que al control solo se le inoculó Tween 80 al 0.1%, incubándose luego a temperatura ambiente. Se evaluó diariamente hasta los cinco días después de la inoculación anotándose los síntomas y/o signos observados y posteriormente las larvas muertas fueron colocadas en cámara húmeda, analizándose los datos de supervivencia obtenidos mediante el paquete estadístico SPSS v.15. Se encontró que las larvas III de *P. xylostella* inoculadas con el hongo presentaron pérdida de apetito, disminución de la movilidad, melanización y muerte, observándose además que a las concentraciones de 105, 106 y 107 las larvas presentaron un porcentaje de supervivencia del 5, 0 y 0% respectivamente, no encontrándose diferencia significativa entre los porcentajes de supervivencia a las tres concentraciones evaluadas. Se concluye que *M. anisopliae* a las concentraciones de 105, 106 y 107 disminuye significativamente la supervivencia de las larvas III de *P. xylostella*, no existiendo diferencia significativa entre las tres concentraciones empleadas.

**Palabras clave:** *Metarhizium anisopliae*, *Plutella xylostella*, larvas III, conidios

## ABSTRACT

The concentrations effect of 105, 106 and 107 of *Metarhizium anisopliae* conidia / mL on larvae III of *Plutella xylostella* was determined in laboratory conditions. For this were collected 240 adult specimens of *P. xylostella*, which were transported to the laboratory of Plant Pathology, of National University of Trujillo, for his determination and breeding until obtain larvae III. The evaluation was performed with 20 larvae III in each of four Petri dishes, one for each concentration and the fourth for control. Was inoculated by spraying concentrations of 105, 106 and 107 *M. anisopliae* conidia / mL, each one of the groups respectively problem, while only control was inoculated with Tween 80 0.1%, then incubated at environmental temperature. Was assessed daily until five days after inoculation scoring symptoms and / or signs observed and subsequently dead larvae were placed in a humid



camera, analyzing survival data obtained using SPSS v.15. It was found that larvae III *P. xylostella* inoculated with *M. anisopliae* showed symptoms as loss of appetite, decreased mobility, melanization and death, also observed that at concentrations of 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> and 10<sup>7</sup> of *M. anisopliae* on larvae showed a survival rate of 5%, 0% and 0%, respectively, was found no significant difference between survival rates at three concentrations tested. We conclude that *M. anisopliae* to concentrations of 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> 10<sup>7</sup> significantly decreases the survival of larvae III of *P. xylostella*, with no significant difference between the three concentrations employed.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*, *Plutella xylostella*, larvas III, conidias

## INTRODUCCIÓN

*Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), conocida como polilla dorso diamante, es una de las plagas más destructivas de los cultivos de crucíferas; se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo y puede atacar a una diversa gama de plantas de la familia Brassicaceae, especies silvestres o cultivadas<sup>1</sup>. En estado larvario perfora las hojas reduciendo el área fotosintética y el vigor del vegetal, siendo un factor limitante en el cultivo<sup>2,3</sup>.

El control de *P. xylostella* se ha realizado haciendo uso excesivo de insecticidas de amplio espectro; conllevando a que fácilmente desarrolle resistencia a estos, por lo que ha sido clasificada entre los 20 primeros insectos resistentes a nivel mundial. Por ello, el manejo integrado es una alternativa de control, donde la aplicación de químicos sea la última opción<sup>1,4</sup> y la primera el control biológico, que implica la protección del control natural existente del campo y la creación de condiciones ambientales más favorables para los enemigos naturales<sup>5,6</sup>.

Las especies de hongos que han sido reportado como controladores biológicos son: (i) *Paecilomyces lilacinus* sobre *Bactrocera* spp.<sup>7</sup>, *Bemisia tabaci*<sup>8</sup>, *Taenia saginata*<sup>9</sup>, *Meloidogyne incognita* y *Heterodera*<sup>10</sup>; (ii) *Beauveria bassiana* que tiene actividad entomopatógena sobre *Hypothenemus hampei*<sup>11</sup>; (iii) *Verticillium lecanii* con efecto sobre *Trialeurodes vaporariorum*<sup>12</sup>; *Cordyceps scarabaeicola* y *Nomuraea rileyi* para el control de *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*<sup>13</sup>; (iv) *Metarhizium anisopliae* como controlador de *Phlebotomus duboscqi*<sup>14</sup>, *Heteronychia licas*<sup>15</sup>, *Otiorynchus sulcatus*<sup>16</sup>, *Boophilus microplus*<sup>17</sup>, *Aeneolamia* spp<sup>18</sup>, *Spodoptera frugiperda*<sup>19</sup>, *Spodoptera litura*<sup>20</sup>, *Anopheles gambiae*<sup>21</sup> y *Plutella xylostella*<sup>22</sup>.

*M. anisopliae* inicia su acción entomopatógena cuando su conidia se adhiere y germina en la superficie del tegumento del insecto, luego la hifa joven comienza a excretar enzimas y penetra por presión mecánica iniciado por el apresorio. Una vez dentro del insecto, el hongo desarrolla cuerpo hifales que van diseminándose a través del hemocele ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días de iniciada la infección, luego el hongo inicia un crecimiento micelial e invade todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas atraviesan la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de conidias<sup>23</sup>.

Loc y Bich Chi (2007)<sup>22</sup> evaluaron el potencial biocontrolador de *M. anisopliae* y *B. bassiana* contra *P. xylostella* y observaron una mortalidad entre el 79.1% al 87.3% para *M. anisopliae* y de 71.4% a 82.7% para *B. bassiana*. Mnyone et al.<sup>24</sup> y Sterling et al.<sup>25</sup> reportan que la actividad entomopatógena de los hongos está influenciado por la concentración de las conidias, en este sentido, Mnyone et al.<sup>24</sup> evaluaron los efectos de las concentraciones de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre *Anopheles gambiae* y Sterling et al. Hicieron lo propio con *M. anisopliae* sobre *Heterotermes tenuis*, demostrando que la concentración de conidias es un factor que influye en la infectividad del hongo.

Si bien es cierto que *M. anisopliae* tiene efecto sobre *P. xylostella*<sup>22</sup> no se ha reportado el efecto de las concentraciones, ya que es posible que si ese efecto se mantiene a concentraciones más bajas se estaría ahorrando recursos económicos que se traduciría en un beneficio al agricultor por la reducción de costos y del consumidor que puede adquirir el producto a menor precio. Considerando que este método no contamina el medio ambiente ni genera resistencia en el insecto a diferencia de los pesticidas, y además teniendo en cuenta la voracidad de la larva III; este trabajo tiene como objetivo conocer, el efecto de las concentraciones de 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> conidias de *Metarhizium anisopliae*/mL sobre las larvas III de *Plutella xylostella* "polilla dorso diamante" en condiciones de laboratorio.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Muestra y muestreo:

- Todas las conidias de *Metarhizium anisopliae* presentes en una bolsa de 800 g de arroz procedente de SENASA.
- 240 Larvas III de *Plutella xylostella*.

El muestreo se hizo al azar.

### Recolección, crianza de adultos y obtención de larvas de *Plutella xylostella*:

De los cultivos de brócoli ubicados en la campiña de Moche, Provincia Trujillo, Región La Libertad, se recolectó 240 ejemplares de *Plutella xylostella*, estadio adulto, los que fueron llevados al laboratorio para su crianza e identificación de acuerdo a sus características taxonómicas.

Para la crianza de adultos de *P. xylostella* se construyeron cámaras, con las siguientes dimensiones 25cm x 30cm x 50cm, cubiertas con tul fino, siendo la base y la parte posterior de triplay y forradas en su interior con papel toalla, se les está alimentando diariamente a base de una solución de miel y hojas frescas de col.

Para la obtención de larvas se colocaron dentro de las cámaras retazos de cartulina en forma zig-zag que los adultos utilizan para la postura de sus huevos, y así se obtendrán una mayor población de larvas, necesarias para el análisis experimental; luego las posturas se extraen recortándolas de la cartulina, después las colocamos sobre hojas de col frescas, que le sirven de alimento cuando eclosionan, y la introducimos en placas Petri (14 cm de diámetro).

### Reactivación de *Metarhizium anisopliae*:

El cultivo de dicho hongo fue proporcionado por el laboratorio de hongos entomopatógenos de SENASA, Lima- Perú. Se realizó una reactivación entomopatógena de *M. anisopliae*, el cual consistió en realizar una suspensión de este mismo hongo que se obtuvo de la bolsa enviada por SENASA y éste se aplicará sobre un insecto susceptible que en este caso fue *Spodoptera frugiperda*. A los 5 días luego de la inoculación de la suspensión se procedió a aislar el micelio que se encontraba encima del insecto, y posteriormente se sembró sobre tubos de ensayo conteniendo Agar Sabouraud.

### Propagación y Estandarización del inóculo

Para la propagación del *M. anisopliae* fue necesario utilizar solución estéril de Tween 80 al 0.1%, la cual se le agregó a los tubos de ensayos donde fue sembrado el hongo; luego del paso anterior se realizó una suspensión homogénea del hongo. Se preparó Agar Sabouraud de manera inclinada en frascos planos a los cuales se les agregó 0.1 ml de la suspensión del hongo, que se incubó a  $25 \pm 0.1$  °C hasta la obtención de micelio y con lo que se obtuvo mayor cantidad de esporas.

Se obtendrán las esporas con solución acuosa estéril de Tween 80 al 0.1% y fueron colocadas en un matraz estéril. La suspensión se estandarizó en cámara de Neubauer a las concentraciones de  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  conidias/ml las cuales nos sirvieron como inóculo.

### Inoculación

La muestra estuvo constituida por 160 larvas de III estadio de *P. xylostella*, de las cuales 3 grupos de 20 larvas cada uno fueron ejemplares problema y otro de grupo de 20 larvas fueron ejemplares testigos, hicimos de este ensayo una suma de 2 repeticiones por concentración. A los ejemplares problema se les inoculó por aspersión la solución acuosa de Tween 80 al 0,1% conteniendo una de las concentraciones de  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  esporas/ml de *M. anisopliae*, dependiendo del tratamiento que utilizamos mientras que los ejemplares testigo se les inoculó por aspersión una solución acuosa de Tween 80 al 0,1%, todo esto fue puesto a incubación y se controló la temperatura y el porcentaje de humedad.

### Evaluación de la actividad entomopatógena de *Metarhizium anisopliae*:

Después de la inoculación se evaluó cada 24 horas la aparición de síntomas y/o signos de infección micótica que presentaron las larvas problema en comparación a los testigos. La observación de cada una de las larvas y el progreso de la infección micótica se realizó diariamente anotando la aparición de síntomas como pérdida de apetito, parálisis, pigmentaciones, u otros, que se produjeron durante el ensayo.

### Aislamiento del hongo a partir de larvas III de *P. xylostella* infectada experimentalmente

Se aplicaron los postulados de Koch en las especímenes muertos durante el bioensayo, para lo cual se procedió de la siguiente forma: se colocaron los insectos muertos en una placa de Petri estéril

incubarlos en cámara húmeda estéril por espacio de 3 a 7 días a temperatura ambiente con la finalidad de que el hongo colonice el interior del insecto, se desarrolle y cubra la superficie cuticular con micelio, y posteriormente a partir del micelio se realizó el microcultivo, incubándose a temperatura ambiente durante 3 a 5 días; finalmente se procedió a la observación microscópica e identificación del hongo sembrado, según las claves taxonómicas de Gilmany Barnett.

#### Análisis de datos:

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el Análisis de Varianza (ANAVA) utilizando el Programa Estadístico SPSS versión 5.0 para comparar si existía diferencia significativa entre las medias de supervivencia de las larvas de III estadio de *Plutella xylostella* obtenidas en las tres concentraciones de conidias/mL de *M. anisopliae*.

### RESULTADOS

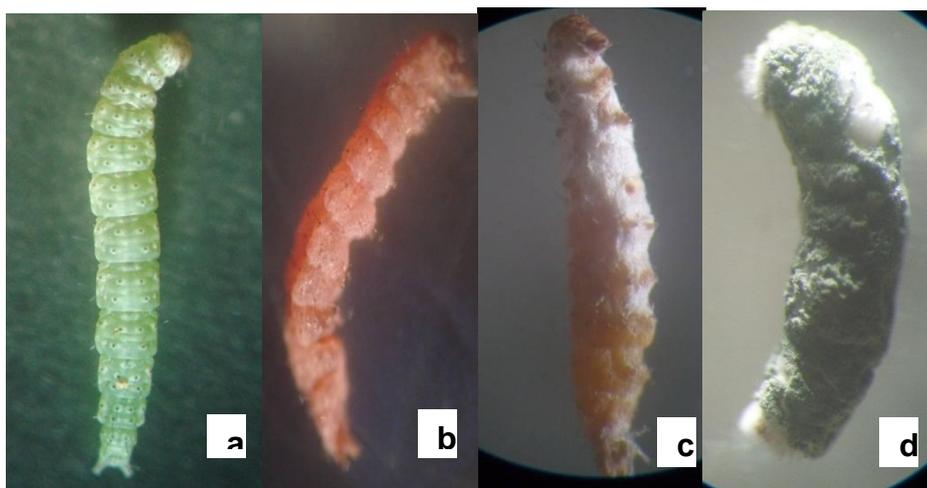
Se encontró que las larvas de *P. xylostella* que fueron inoculadas con *M. anisopliae*, presentaron signos y síntomas compatibles con la falta de buen estado de salud, siendo el síntoma más resaltante la escasa movilidad y el signo más sobresaliente el oscurecimiento (Tabla 1, Fig. 1).

Se encontró, asimismo, la inoculación a la concentración de  $10^7$  conidias/mL redujo la supervivencia de las larvas a un 0%. (Fig. 2)

**Tabla 1.** Síntomas y/o signos observados en larvas de III de *Plutella xylostella* inoculadas en las diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae*

Síntomas y/o signos observados	Conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> mL			
	0*	$10^5$	$10^6$	$10^7$
Pérdida del apetito	-	+	+	++
Escasa movilidad	-	+	++	++
Oscurecimiento (melanización)	-	++	++	++
Muerte	-	+	+	+
Aparición de micelio	-	+	+	++
Momificación	-	+	++	++

\*Representa al control.



**Fig.1.** Larvas III de *Plutella xylostella*: (a) control. (b) muerta por *Metharizium anisopliae*, coloración oscura. (c) aparición parcial de micelio blanco. (d) completamente cubierta de micelio blanco.

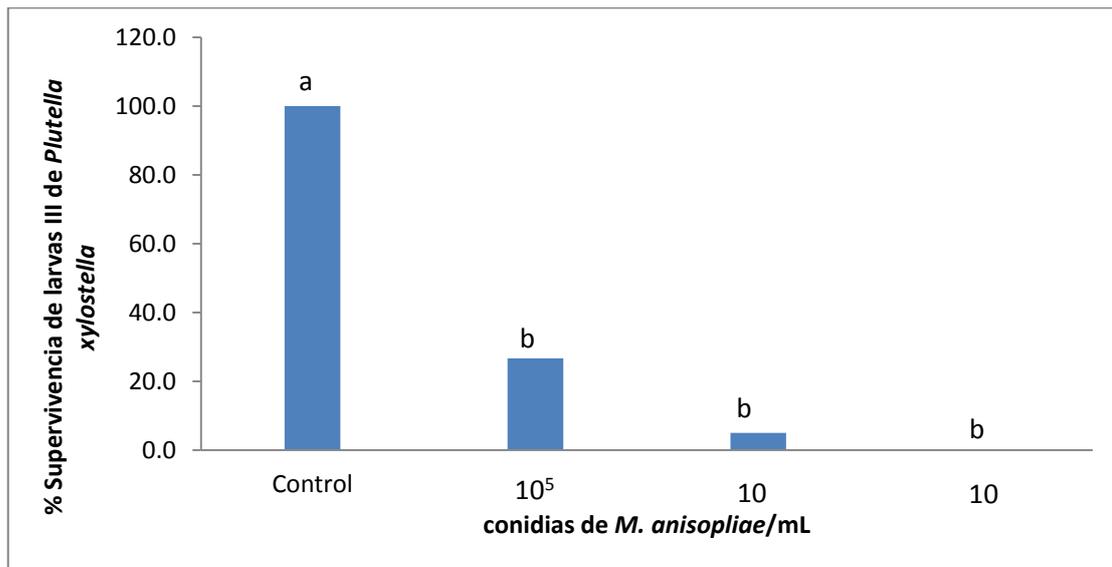


Fig 2. Porcentaje de supervivencias de *Plutella xylostella* utilizando tres diferentes concentraciones de conidios de *Metarhizium anisopliae* al cuarto día de inoculación. (a:si hay diferencia significativa; b:no hay diferencia significativa)

## DISCUSIÓN

En la tabla 1 podemos apreciar los síntomas producidos en las larvas inoculadas con *M. anisopliae* debido a que los hongos entomopatógenos, a diferencia de otros agentes, no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo, pudiendo ocurrir la infección por contacto y adhesión de las esporas a las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos<sup>23</sup>. La adhesión de los conidios de los hongos entomopatógenos a la cutícula del huésped es la etapa inicial del proceso patológico e incluye eventos tanto pasivos como activos<sup>26</sup>. Lo cual ha sugerido que iones divalentes como el  $Ca^{+2}$  y el  $Mg^{+2}$  reducen las fuerzas de repulsión de la electrostática de la superficie del insecto, por lo que pueden afectar su hidrofobicidad y promover la adhesión del complejo pared celular fúngica – cutícula, creando condiciones favorables para el establecimiento de la espora y la subsecuente invasión del hospedero<sup>23</sup>. También se relaciona la adhesión de las esporas de *M. anisopliae* a las proteínas adhesinas MAD1 y MAD2, las cuales se sitúan en la superficie celular<sup>28</sup>. Luego de la adhesión *M. anisopliae* logra penetrar la cutícula del insecto *P. xylostella* debido a que produce enzimas tales como proteasas y quitinasas, y utiliza una combinación de estas para penetrar en la cutícula y acceder al hemocele del hospedero que es rico en nutrientes<sup>26</sup>, lo que produce disturbios en el organismo del insecto.

La germinación de la espora se inicia con el hinchamiento de la misma, que es favorecido por una humedad alta; luego estimulada por mensajeros que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares del insecto. La hidratación de la espora es favorecida por la acción anti-deseccante de su cubierta mucilaginosa, que además funciona como protector ante la presencia de polifenoles tóxicos y enzimas, secretadas por el sistema inmune del insecto. *Metarhizium anisopliae* presenta un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobinas, las cuales favorecen la acción de enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto<sup>23</sup>. Después de la penetración de las hifas, éstas se diseminan vía hemolinfa, producen blastosporas y cuerpos filamentosos de hifas que invaden el sistema inmune del hospedero multiplicándose rápidamente en los tejidos. Una vez que *M. anisopliae* ingresa al hemocele de las larvas de *P. xylostella* desencadena síntomas y signos (tabla 1) como, la escasa movilidad de las larvas debido a que *M. anisopliae* sintetiza unas sustancias llamadas destruxinas (dtx), las cuales inducen parálisis flácida y la contracción muscular visceral en los insectos; estos efectos citotóxicos en las células epiteliales probablemente sea porque envuelven los canales  $Ca^{2+}$ -ATPasa tipo vacuolar; por ello a las destruxinas se les reconoce como determinantes de la virulencia importantes en *Metarhizium spp*<sup>29,30</sup>.



La pérdida de apetito (tabla1) en las larvas de *P. xylostella* se produce por la pérdida de la integridad estructural de las membranas celulares y la consecuente deshidratación de las células por pérdidas de fluidos, todo esto ocurre por la acción mecánica de las hifas y la acción química de las toxinas de *M. anisopliae* llevándolas a la muerte<sup>23, 31</sup>. El oscurecimiento (tabla1, fig1 a-b) en relación a las larvas control se produce porque se activa el sistema inmune a través de los procesos de melanización, fagocitosis, nodulación y encapsamiento; la melanina sustancia responsable del oscurecimiento del tejido, como es el caso de Rodríguez *et al.* (2005)<sup>15</sup> quienes obtuvieron como resultado que los huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* inoculados presentaron inicialmente tonalidad oscura y deshidratación visible a los cuatro días de post-inoculación; esto pudo deberse a la degradación enzimática del corion que está compuesto principalmente por proteínas, lípidos y polisacáridos y a la acción de toxinas como las beauvericinas producidas por *M. anisopliae*, las que causan además perturbación en la metamorfosis y en los mecanismos de defensa.

Durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrientes pero otros pueden inhibir su crecimiento, sin embargo, los hongos desarrollan una serie de actividades que les permiten evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomodulatorias o toxinas fúngicas<sup>23,32</sup>. Luego de que los mecanismos de defensa del insecto son sobrepasados, el hongo entomopatógeno entra en la fase de colonización y al agotar los nutrientes y el agua presentes en el interior de la larva, emerge desarrollando sus hifas en la superficie de ésta (fig 1-c). Finalmente el hongo deja de crecer y comienza a esporular, lo que se observa como una pigmentación color verde oliváceo (fig 1-d)<sup>23,33</sup>.

En la fig. 2 se observó que al incrementarse la concentración de conidias de *M. anisopliae*/mL en rango de  $10^5$  a  $10^7$ , el porcentaje de supervivencia disminuyó hasta un 0%, pero en el análisis estadístico no existe diferencia significativa entre las tres concentraciones de conidias de *M. anisopliae*/mL, sólo se encontró diferencia significativa con el control; lo que significa que las concentraciones de  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  conidias de *M. anisopliae*/mL tienen el mismo efecto sobre las larvas III de *P. xylostella*. Como es el caso de Petlamul and Prasertsan (2012)<sup>20</sup> en donde encuentran que *M. anisopliae* a la concentración de  $10^8$  conidias/mL alcanza el 100% de mortalidad de *S. litura*.

Estos resultados no concuerdan con las investigaciones de Mnyone *et al.*<sup>24</sup> quienes aplicaron *M. anisopliae* en *Anopheles gambiae* encontrando que la supervivencia disminuía hasta un 0% pero a una concentración de  $10^9$  conidias /mL, una concentración más alta que la empleada en esta investigación; y Sterling *et al.* quienes aplicaron *M. anisopliae* en *H. tenuis* concluyeron que al aumentar las concentraciones de conidias, de  $1 \times 10^3$  a  $3 \times 10^8$  conidias/mL, hubo mayor mortalidad y menor tiempo de supervivencia, probablemente por los diferentes grados de susceptibilidad que presenta cada especie de insecto.

Fernández-Ruvalcaba *et al.*<sup>17</sup> quienes obtuvieron como resultados de mortalidad que *M. anisopliae* es altamente efectivo para ambas cepas de *Boophilus microplus* susceptible y resistente a los organofosforados en condiciones de laboratorio y además la mortalidad de garrapatas observada en las dos cepas estuvo positivamente correlacionada a la concentración de esporas. Caston<sup>15</sup> encuentra que *M. anisopliae* afecta a *H. licas* causándole la muerte a la concentración de  $10^9$  conidias/mL. Sharififard *et al.*<sup>34</sup> encuentran que *M. anisopliae* fue efectiva y causa el 44 % y el 72% de mortalidad en población adulta de *Musca domestica* a las concentraciones de  $10^5$  y  $10^7$  esporas/g de cebo.

## CONCLUSIÓN

- *Metarrhizum. anisopliae* a las concentraciones de  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  disminuye significativamente la supervivencia de las larvas III de *Plutella xylostella*, no existiendo diferencia significativa entre las tres concentraciones empleadas.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mahmoudvand M, Abbasipour H, Sheikhi-Garjan A, Bandani A. Decrease in pupation and adult emergence of *Plutella xylostella* (L.) treated with hexaflumuron. Chilean JAR. 2012; 72(2): 206- 211.
2. Chagas NR, Boica AL and Alonso TF. Biología de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) em cultivares de couve-flor. Neotrop entomol. 2010; 39 (2): 253-259.
3. Ochoa R, Carballo M, Quezada JR. Algunos aspectos de la biología y comportamiento de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) y de su parasitoide *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Manejo integrado de Plagas. 1989; 11:21- 30.
4. Bertolaccini I, Sánchez DE, Arreguil MC, Favaro JC, Theiler N. Mortality of *Plutella xylostella* (Lepidoptera, Plutellidae) by parasitoids in the Province of Santa Fe, Argentina. Rev Bras Entomol. 2011;55(3): 454-456.
5. Guaharay F, Chaput P. Control Biológico Ayer Hoy y Siempre. En: Carballo M, Guaharay F. Editores. Control Biológico de plagas agrícolas. 1ed. Catie, 2004. p.1-13.
6. Butt TM, Jackson C, Magan N. Introduction- Fungal Biological Control Agentes: Progress, Problems and Potential. In: Butt TM, Jackson C, Magan N. Fungal as Biocontrol Agentes: Progress, Problems and Potential. Cabi, 2001.
7. Chiang-Mai J. Evaluation of effective entomopathogenic fungi to fruit fly pupa, *Bractocaea spp.* and their antimicrobial activity. Sci. 2012; 39(3): 464- 477.
8. Carr A, Elósegui O, Bel N. Aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Broum & Smith. Fitosanidad. 2003; 7 (3): 27-32.
9. Braga FR, De Araújo JV, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. Rev soc bras med trop. 2008; 41(6): 686 -688.
10. Cayrol JC, Djian C, Pijarowski L. Study of the nematocidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. Revue Nématol. 1989; 12(4): 331- 336.
11. Bastidas A, Velásquez E, Marín P, Benavides P, Bustillo A, Javier F. Evaluación de preformulados de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, para el control de la broca del café. Agrom. 2009; 17(1): 44-45.
12. Bouhous M, Laurous L. Efficiency of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in the biological control of *Trialeurodes vaporariorum*, (Homoptera: Aleyrodidae), a greenhouse culture pest. Afr J Microbiol Res. 2012; 6(10):2435-2442.
13. Vu VH, Hong S, Kim K. Selection of entomopathogenic fungi for Aphid control. J Biosci and Bioeng. 2007; 104(6): 498-505.
14. Ngumbi PM, Irungu LW, Ndegma PN, Maniania NK. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill to adult *Phlebotomus duboscqi* (Neveau- Lemaire) in the laboratory. J Vector Borne Dis. 2011; 48: 37-40.
15. Caston M. The efficacy of two isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metchin) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the adults of the black maize beetle *Heteronychus licas* Klug (Coleoptera: Scarabidae) under laboratory conditions. Afr J Agric Res. 2008; 3(4): 259-265.
16. Bruck DJ, Donahue KM. Persistence of *Metarhizium anisopliae* incorporated into soilless potting media for control of the black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus* in container-grown ornamentals. J invert Pathol. 2007; 95: 146-150.
17. Fernández M, Zhioua E, García Z. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. Téc Pecu Méx. 2005; 43(3):433-440.
18. Bautista-Gálves A, Gónzales-Cortes N. Tres dosis de *Metarhizium anisopliae* sobre la mosca pinta (*Aeneolamia spp.*) en caña de azúcar en la región de Los Rios, estado de Tabasco. Universidad y Ciencia. 2005. 21(41): 37-40.
19. Vásquez J, Martos A. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin (Hypocreales: Clavicitaceae), en Lima, Perú. Rev per Ent. 2003;43:101-106.
20. Petlamul W, Prasertsan P. Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. Mycobiology. 2012; 40(2): 111- 116.
21. Bukhari T, Takken W, Koenraadt CJM. Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. Parasit Vectors. 2011; 4:23.
22. Loc NT, Bich-Chi VT. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against diamondback moth, *Plutella xylostella*. Omonrice. 2007; 15: 86-93.



23. Pucheta M, Flores A, Rodríguez S, de la Torre M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 2006; 31(12):856- 860.
24. Mnyone L, Kirby M, Lwetoijera D, Mpingwa M, Knols B, Takken W *et al*. Infection of de Malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, with two species of entomopathogenic fungi: effect of concentration, co-formulation, exposure time and persistence. *Malaria Journal*. 2009; 8:309-320.
25. Sterling A, Gómez C, Campo A. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae*(Deuteromycota: Hypomycetes) sobre *Heterotermes tenuis*(Isoptera: Rhinotermitidae) en *Hevea brasiliensis*.*Rev Colomb Entomol*. 2011; 37(1):36-42.
26. Ment D, Gindin G, Rot A, Soroker V, Glazer I, Barel Sh *et al*.Novel technique for quantifying adhesion of *Metarhizium anisopliae* conidia to the tick cuticle. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 76(11):3521-3528.
27. Shaukat A, Huang Z, QeZang W, Ren ShX. Production and regulation of Extracellular proteases from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the presence of Diamondback Moth Cuticle. *Pakistan J Zool*.2011; 43(6): 1203-1213.
28. Wang Ch, St Leger R. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enable attachment to plants. *Eucaryot Cell*. 2007; 6(5): 808-816.
29. Wang B, Kang Q, Lu Y, Bai L, and Wang Ch. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(4): 1287-1292.
30. Roberts DW, Leger. R. Toxins. In: Roberts & Leger (eds.). *Metarhizium* spp., Cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects.*Adv Appl Microbiol*. 2004, 54: 13- 17.
31. Carballo M, Hidalgo E, Rodríguez A. Control Biológico de Insectos mediante hongos entomopatógenos. En: Carballo M, Guaharay F. Editores. *Control Biológico de plagas agrícolas*. Ied. Catie, 2004. p.34-58.
32. Wang Ch, St Leger R, Acollagenus protective coat enable *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *PNAS*. 2006; 103(17): 6647-6652.
33. Ojeda-Chi M, Rodríguez-Vivas R, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Cruz-Vázquez C. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). 2011; 2(2): 177-192.
34. Sharififard M, Mossadegh, Vazirianzadeh B, Zarel- Mahmoudabadi A. Interactios between entomopathogenic fungus, *M. anisopliae* and Sublethal Doses of Spinosad for control of house fly, *Musca domestica*. *Iran J Arthropod- Borne Dis*. 2011; 5(1): 28-36.



# Detección de antígenos sanguíneos humanos del grupo ABO en larvas de *Necator americanus* incubadas en presencia de eritrocitos tipificados

## Detection of human blood group antigens ABO in *Necator americanus* larvae incubated in the presence of typified erythrocytes

Dante Aponte Hernández<sup>1</sup>, Edgar Méndez Olulo<sup>1</sup>, Miguel Fabián Francisco<sup>1</sup>, Rosa Polo Tacanga<sup>1</sup>, Willian Domínguez Paredes<sup>1</sup> y Hermes Escalante Añorga<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Alumnos de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. E-mail: maph\_1989@hotmail.com

### RESUMEN

El mimetismo molecular se ha asociado con la cronicidad de las infecciones parasitarias, este mecanismo puede deberse a la absorción de moléculas del hospedador o a la síntesis de moléculas similares. Los objetivos de este trabajo son estudiar la adsorción de determinantes antigénicos ABO por cultivo *in vitro* de larvas filariformes de *Necator americanus*. Se trabajó con larvas filariformes obtenidas de la eclosión de huevos de este helminto mediante el método de Harada-Mori, y fueron recolectadas por el método de Baermann-Moraes en cuatro tubos con medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos. En los tubos 1, 2 y 3 se adicionó eritrocitos de tipo A, B y O, respectivamente. El tubo 4 se usó como control negativo. Luego de 10 días de incubación de los 4 tubos se aplicó la técnica de Inhibición de la Aglutinación usando anticuerpos monoclonales comerciales. Los resultados mostraron que las larvas presentan antígenos A y B de los eritrocitos agregados al medio de cultivo. Se concluyó que estas larvas captan estos determinantes antigénicos presentes en los eritrocitos del huésped, ya que su ciclo de vida incluye una migración por el torrente sanguíneo.

**Palabras clave:** *Necator americanus*, Grupo ABO, eritrocitos tipificados

### ABSTRACT

Molecular mimicry has been associated with a chronic parasitic infection; this mechanism may be due to the absorption of molecules of the host or the synthesis of similar molecules. The objectives of this work are to study the adsorption of ABO antigenic determinants in vitro culture of filariform larvae of *Necator americanus*. We worked with filariform larvae hatch obtained from this helminth eggs by Harada-Mori method, and were collected by the Baermann-Moraes method in four tubes with RPMI 1640 supplemented with antibiotics. In tubes 1, 2 and 3 were added erythrocyte A, B and O, respectively. The tube 4 is used as negative control. After 10 days of incubation of the 4 tubes technique applied Agglutination Inhibition using commercial monoclonal antibodies. The results showed that the larvae present antigens A and B of erythrocytes added to the culture medium. Concluded that these larvae capture these antigenic determinants present in the host erythrocytes, as their life cycle includes a migration into the bloodstream.

**Keywords:** *Necator americanus*, ABO system, typified erythrocytes



## INTRODUCCIÓN

Los nematodos son organismos extracelulares que tienen complicados ciclos vitales. Estos infectan a humanos alrededor de todo el mundo sin embargo son particularmente más comunes en las regiones tropicales, aunque en su mayoría, además del factor climático, se asocian a factores como la edad, calidad de vida y el oficio<sup>1</sup>. Dependiendo de la especie, estos parásitos tienen preferencias en cuanto al lugar en el que se localizan dentro del huésped pudiendo habitar en el intestino, en vasos sanguíneos, órganos linfáticos u otras localizaciones. Con frecuencia migran a través de tejidos hasta alcanzar el órgano definitivo en el que se asientan<sup>2</sup>. Generalmente las infecciones humanas causadas por nematodos son de larga duración, es decir, son crónicas y las personas que viven en áreas endémicas pueden infectarse desde su infancia y llevar estos parásitos por el resto de sus vidas<sup>3</sup>. Entre los parásitos que significan un mayor problema en salud, están los geohelminthos especialmente en los trópicos<sup>4</sup>, donde hay prevalencias altas de *Ascaris lumbricoides*, Uncinarias (*Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*), *Trichuris trichura* y también se presentan especies de filarias no muy comunes en las comunidades rurales<sup>5</sup>. En nuestro país las investigaciones en diferentes localidades de la selva han obtenido reportes de una elevada incidencia de uncinarias, de estas, más del 50% pertenecían a la especie *N. americanus*<sup>6,7,8</sup>. Sin embargo no solo las zonas tropicales presentan estos parásitos, sino también se han reportado casos en ciudades de la costa<sup>9,10</sup>.

Estos parásitos pueden sobrevivir durante años en el hospedador infectado, al que no tienen como objetivo destruir, debido a que han desarrollado estrategias de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador las que fueron resultado de la evolución paralela con sus huéspedes. Esta cronicidad esta asociada a la expresión de antígenos del huésped en la superficie del parásito, pues de esta forma no se induce a la activación de los linfocitos T y/o B o se hace en forma poco eficiente<sup>11,12</sup>.

Los antígenos de grupo sanguíneo son componentes químicos simples localizados en la superficie de los eritrocitos e inclusive tienen una amplia distribución en el organismo, ubicándose en células y líquidos corporales, como los antígenos del sistema ABO<sup>13</sup>. En los últimos 20 años se ha demostrado que los antígenos de grupo sanguíneo además de actuar como receptores de parásitos, bacterias y virus, se pueden encontrar en la superficie de muchas especies parasitarias<sup>14</sup>. Los antígenos de superficie representan para el parásito, mecanismos importantes de evasión, especialmente cuando se comparten estructuras moleculares con el hospedador<sup>15,16</sup>.

Dentro de las primeras investigaciones realizadas para identificar antígenos provenientes del huésped expresados en la superficie del parásito, destacan las realizadas por Clegg y sus colaboradores, en *Schistosoma mansoni*<sup>17</sup>. Ellos determinaron la presencia de antígenos A, B y H, infectando monos Rhesus inmunizados contra un tipo específico de antígenos humanos y observando la muerte del parásito en estos; se determinó que la presencia de una especificidad particular de antígeno sobre la superficie de los parásitos era dependiente de la especificidad presente en la sangre utilizada para los cultivos. Posteriormente, en investigaciones realizadas en *A. lumbricoides*, se identificó sobre la superficie del parásito, antígenos del Sistema ABO<sup>14,15</sup> y del Sistema P<sup>18</sup> y se observó que los parásitos podían expresar las mismas determinantes antigénicas ABO que sus respectivos hospederos.

En las investigaciones anteriormente descritas se propuso que la adquisición de estos antígenos del grupo sanguíneo ABO se realizaba en el torrente sanguíneo durante la etapa inmadura del parásito, característica compartida por los ciclos evolutivos de estos parásitos con *N. americanus*, y pueden permanecer en su superficie hasta su forma adulta. La identificación de estos antígenos en la cutícula del parásito adulto sugiere dos explicaciones posibles. La primera considera que los estadios finales de los parásitos conservarían los antígenos absorbidos en la migración y los mantendría durante el proceso madurativo a estado adulto. La segunda sostiene que tanto los estadios finales como el ejemplar adulto podrían adquirir las determinantes antigénicas a partir de las secreciones intestinales<sup>16</sup>.

Un requisito común a todas las infecciones parasitarias que progresan consiste en que los parásitos puedan evadir los efectos totales de las respuestas inmunes del hospedador y sobrevivir en éste durante largos períodos. Un nemátodo que desarrolla este tipo de infecciones que afectan al hombre, se encuentra *N. americanus* del que se sabe que vive entre 15-17 años tras la inoculación de larvas infectivas<sup>3</sup>. Existe, por tanto, la necesidad de conocer los mecanismos de supervivencia del parásito, particularmente, el mimetismo molecular como una estrategia evasiva a la respuesta inmune del



hospedador. Para lo cual esta investigación plantea identificar antígenos sanguíneos humanos del grupo ABO en larvas de *N. americanus* que estuvieron en contacto con antígenos eritrocitarios humanos en condiciones experimentales con el fin de proporcionar un nuevo conocimiento que sirva como base para próximas investigaciones relacionadas a *N. americanus*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

- 14400 larvas filariformes de *Ancylostoma duodenale* en SSF
- Tres personas (una con tipo sanguíneo A, una con tipo B y una con O)

### Obtención de muestras fecales positivas para ancilostomideos

Se trabajó con estadios larvarios obtenidos a partir de heces con huevos de este helminto obtenido de una paciente con uncinariasis, presentado en el Hospital de Apoyo Santa Rosa de Puerto Maldonado. Se obtuvo 4 muestras líquidas en diferentes recipientes las cuales se centrifugaron para obtener un concentrado mucoso, que previamente se le realizó un recuento de la cantidad de huevos viables por mililitro de muestra, obteniéndose un recuento de 110-115 huevos por campo microscópico de concentrado. Además se obtuvieron estados adultos de la paciente, mediante evacuaciones a partir de los cuales se hizo la identificación taxonómica.

### Obtención de larvas filariformes

Al concentrado obtenido luego de la centrifugación, se le realizó la técnica de Harada- Mori para la extracción de larvas filariformes, utilizándose para este método 30 tubos experimentales. Para la obtención de los estados larvales 3 la eclosión demoró 15 días a 27°C, siendo normal el periodo de eclosión un rango de 10 -15 días a una temperatura ambiental de 25-30 °C. (10) Estas fueron recolectadas en solución salina fisiológica. Para asegurar una obtención total de las larvas, se realizó el método de Baermann-Moraes modificado en copa para los restos de muestra que aun quedaron en el papel filtro<sup>7</sup>. Las larvas filariformes obtenidas se lavaron 3 veces con solución salina fisiológica, se centrifugaron y se determinó el número de larvas existentes en la suspensión.

### Tipificación de eritrocitos

Se obtuvieron muestras de sangre, en tubos heparinizados, de donantes que conocían sus grupos sanguíneos (una persona con tipo de sangre A, la otra con tipo B y la tercera con el tipo O). Luego fueron tipificados por Aglutinación Directa enfrentándolos a anticuerpos monoclonales anti A, anti B respectivamente. Posteriormente se lavaron tres veces en solución salina fisiológica, para poder obtener un sedimento eritrocitario.

### Cultivo de estadios larvales de *Necator americanus*

Se tomaron alícuotas de 1 mL del concentrado de larvas y se sembraron en 4 tubos que contenían 10 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 1% de la mezcla de antibióticos (vancomicina 300 µg/mL; gentamicina 500 µg/mL; nistatina 1250 U/mL; trimetoprima 500 µg/mL; sulfametoxazol 800 µg/mL). En los tubos 1, 2 y 3 se agregaron 100 µL de sedimento de eritrocitos tipificados A, B y O respectivamente. El tubo 4 fue usado como un control negativo. Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 10 días.

### Recuperación de los estadios larvales

Una vez finalizado el tiempo de cultivo, se procedió a la separación por migración de las larvas filariformes, de los tubos 1, 2, 3 y 4, utilizando el método de Baermann-Moraes modificado en copa y recolectándolas en solución salina fisiológica estéril. Las larvas recolectadas fueron lavadas 3 veces en solución salina fisiológica, y concentrada por centrifugación a 1500 rpm. Se hizo el recuento de las larvas y se equilibró las concentraciones en los 4 tubos.

### Inhibición de la aglutinación semicuantitativa

Luego del tiempo de incubación se procedió a realizar la identificación de los antígenos en la cutícula de las larvas, para lo cual fue necesario la obtención de un nuevo sedimento eritrocitario obtenido del mismo modo realizado con anterioridad. Se prepararon 2 series de diluciones geométricas seriadas de cada anticuerpo monoclonal que previamente había reconocido los antígenos expresados por los eritrocitos incubados. Se agregaron 25 µL de concentrado de larvas a cada pocillo de cada serie. Se hizo la lectura agregando 25 µL de una suspensión al 1 % de eritrocitos frescos de los tipos A a la



primera serie, y del tipo B a la segunda serie. Se realizó el mismo procedimiento para los 4 tubos. Se determinó el título de los eritrocitos sin enfrentarlos a algún concentrado larvario.

## RESULTADOS

Para poder realizar los experimentos, se necesitó obtener larvas filariformes a partir de huevos presentes en las heces. Estos huevos fueron recolectados y se contó con 7 ml de una suspensión de huevos cuya concentración fue de 1000-1100 huevos/mL. De esta suspensión se obtuvo un volumen de 2 mL de suspensión de larvas las cuales presentaron una concentración de 1100 larvas/mL.

Los resultados de la inhibición de la aglutinación de las larvas del tubo 1 (en contacto con eritrocitos A) mostraron que el concentrado de larvas inhibía de manera significativa la aglutinación con anticuerpo anti- A, demostrando la presencia de antígenos dirigidos contra ese anticuerpo en las larvas, sin embargo al enfrentarlos con los anticuerpos anti-B se demostró la ausencia de antígenos B en estas larvas filariformes.

Las larvas del tubo 2 (en contacto con eritrocitos B), al ser enfrentadas a los anticuerpos B, inhibieron de manera significativa la aglutinación con este anticuerpo. También se investigo la presencia de antígenos A en este concentrado larvario, enfrentándolos a anticuerpo anti-A; se demostró que estas larvas no presentaron estos antígenos

En las larvas de tubo 3 (en contacto con eritrocitos O) y las del tubo 4 (sin contacto de eritrocitos) se investigó la presencia de antígenos A y B enfrentándolos a los anticuerpos anti-A y anti-B; los resultados indicaron la ausencia de estos antígenos en las larvas.

Los experimentos demostraron que las larvas filariformes pueden absorber las determinantes antigénicas de los eritrocitos presentes en el medio de cultivo. La tabla I presenta los resultados de las pruebas de inhibición de la aglutinación

**Tabla 1.** Títulos obtenidos por la Técnica de la Inhibición de la Aglutinación para la identificación de antígenos ABO en las larvas de *Necator americanus* en condiciones experimentales.

ANTICUERPOS MONOCLONALES	Grupos experimentales			Grupos controles	
	LEA	LEB	LEO	Larvas del tubo sin eritrocitos	Reacción de la aglutinación sin larvas
<b>Título para Anti A</b>	4	128	128	128	128
<b>Título para Anti B</b>	128	16	128	128	128

LEA=larvas del tubo con eritrocitos A, LEB=larvas del tubo con eritrocitos B, O=larvas del tubo con eritrocitos O

## DISCUSIÓN

Las técnicas de Harada-Mori, para la obtención de las larvas filariformes, precisan de un cuidado especial de la temperatura, ya que de lo contrario los huevos tardan mucho tiempo en eclosionar o incluso pierden su viabilidad debido a la contaminación. Por otro lado la técnica de Baerman-Moraes es muy eficiente para la recuperación y concentración de larvas vivas<sup>4</sup>.

Los experimentos realizados provee una clara evidencia de la presencia de antígenos sanguíneos A y B en la superficie de larvas filariformes de *Necator americanus* cultivados con eritrocitos humanos tipificados. La adquisición de antígenos de grupo sanguíneo a partir de eritrocitos agregados a los medios de cultivo fue inicialmente comunicada por Goldring<sup>17</sup> para *S. mansoni*, en este trabajo se encontró que los antígenos sanguíneos ABO son adquiridos por el parásito, probablemente en forma de glucolípidos o megaloglicolípidos, en el fluido sanguíneo del hombre, además otros autores determinaron la expresión de antígenos provenientes del huésped, en la superficie de larvas de este



parasito<sup>19,20</sup>; esto le sirve para enmascarar los antígenos de la superficie de los parásitos y para evadir la respuesta inmune.

Smith identificó determinantes antigénicos pertenecientes a eritrocitos humanos de grupos sanguíneos A y B, en sustancias de excreción/secreción de larvas de segundo estadio de *Toxocara canis*, los cuales fueron detectados por fluorescencia indirecta<sup>21</sup>.

Resultados similares a los obtenidos fueron los que obtuvo Ponce de León<sup>14</sup>, trabajando con *A. lumbricoides*. Los valores de los títulos obtenidos mostraron una inhibición significativa de la aglutinación, que a su vez indicó la presencia de estos antígenos en la superficie de las larvas<sup>14</sup>. Además demostró en otras investigaciones la capacidad que tienen las larvas de *A. lumbricoides* de adherir no solo a estas determinantes antigénicas, sino también antígenos de otros grupos sanguíneos como H<sup>15,16</sup> y P<sup>13,18</sup>, e incluso otras moléculas como el ácido siálico<sup>21</sup>.

La similitud de resultados con otras investigaciones en diferentes parásitos se debe al parecido morfológico y fisiológico que tiene la cubierta de los nematodos, ya que en esta se encuentran diversas moléculas como proteínas, lípidos y carbohidratos, además de otras, las cuales interactúan con el medio que los rodea, y se piensa que esas moléculas son las que intervienen en la evasión de la respuesta inmune del huésped<sup>23</sup>.

Las pruebas de inhibición de la aglutinación realizadas demostraron que las larvas del tubo 1 (agregados de eritrocitos A) solo expresaron antígenos A, y las larvas del tubo con agregado de eritrocitos B expresaron solo antígenos B. La coincidencia entre los títulos de los anticuerpos monoclonales de la primera serie y de los tubos con eritrocitos O y el control negativo, permitió observar que las larvas no presentan antígenos A ni B cuando no están en contacto con los antígenos ni con los eritrocitos.

Entre las estrategias de evasión parasitaria, se ha comunicado el mimetismo como una forma de evasión del reconocimiento específico. Los antígenos de superficie representan mecanismos importantes de evasión de la respuesta inmune en parásitos extracelulares. La respuesta inmunológica puede evitarse cuando el parásito comparte estructuras moleculares con las del hospedador, pues de esta forma no se induce la activación de los linfocitos T y/o B, o se hace en forma poco eficiente<sup>24,25</sup>.

El ciclo de vida de *N. americanus* incluye una migración de larvas por el torrente sanguíneo. El pasaje de un estadio a otro va acompañado por la segregación de una nueva cubierta. La antigua se desprende entera o en fragmentos, pero puede ser absorbida parcialmente por la nueva<sup>1</sup>. En el ejemplar adulto no hay mudas, pero la cutícula continua expandiéndose mientras el parásito crece. Esta experiencia in vitro sugiere que el parásito en su ciclo de vida, durante la migración por el torrente circulatorio, puede absorber antígenos A y/o B de su hospedador con la finalidad de utilizarlo para la evasión de la respuesta inmune por mimetismo molecular<sup>26</sup>.

Si bien aún no se puede descartar la hipótesis de que la última muda larval conserve total o parcialmente los antígenos absorbidos durante su migración, es lógico considerar que las determinantes antigénicas ABO identificadas en el adulto provienen principalmente de antígenos solubles, ya que si las únicas posibilidades de adquisición de antígenos para el parásito ocurriesen durante la migración, la diferencia de tamaño existente entre L4 y adulto diluirían tanto los antígenos ABO en la cutícula de este último, que posiblemente no pudiesen ser identificados<sup>16</sup>.

Aún se desconoce cual es el mecanismo por el cual las larvas presentan estos antígenos en su superficie, algunos autores indican que este mimetismo molecular se da por una expresión de moléculas similares producidas por el mismo parásito, así como se da en el caso de organismos diferentes como protozoarios<sup>27,28</sup> y bacterias<sup>29</sup>, sin embargo esta expresión antigénica puede deberse a una absorción directa de los mismos antígenos del huésped. El mecanismo más probable por el cual *N. americanus* presenta estos antígenos en su superficie es la absorción directa, ya que no se presentó reacción en las larvas incubadas sin eritrocitos ni en las larvas que presentaban eritrocitos, pero sin determinantes antigénicos, es decir, eritrocitos tipo O.

En esta experiencia se demostró solo la presencia de antígenos A y B cuando las larvas fueron incubadas en presencia de estos. En otras investigaciones con *Fasciola gigantica* se hallaron productos de excreción / secreción que presentaron reacción cruzada con anticuerpos, aunque estas no fueron incubadas en presencia del antígeno respectivo, lo que indica la diversidad de mecanismos por el cual la larva evade la respuesta inmune del huésped<sup>30</sup>.



## CONCLUSIÓN

- Las larvas filariformes de *Necator americanus* son capaces de adherir los antígenos del grupo sanguíneo ABO bajo condiciones experimentales. Como también se demostró la especificidad particular que tiene el necator americanus para expresar solamente los antígenos eritrocitarios del tipo de sangre utilizado en los cultivos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brooker S, Bethony J, Hotez P. Human Hookworm Infection in the 21st Century. *Adv Parasitol.* 2004; 58: 197–288.
2. Loukas A, Prociv P. Immune responses in hookworm infections. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4):689–703.
3. Maizels RM, Gomez-Escobar N, Gregory WF, Murray J, Zang X. Immune evasion genes from filarial nematodes. *Int J Parasitol.* 2001; 31(9): 889-98.
4. Albonico M, Stoltzfus RJ, Savioli L, Tielsch JM, Chwaya HM, Ercolef E, Cancrini G. Epidemiological evidence for a differential effect of hookworm species, *Ancylostoma duodenale* or *Necator americanus*, on iron status of children 1998; 27: 530-537.
5. Gazzinelli MF, Lobato L, Matoso L, Avila R, Marques RC, Brown AS, Correa-Oliveira R, Bethony JM, Diemert DJ. Health Education through Analogies: Preparation of a Community for Clinical Trials of a Vaccine against Hookworm in an Endemic Area of Brazil. *Neglected Tropical Diseases* 2010; 4(7): 1-12
6. Córdova E, Vásquez L, Ruelas N, Valdivia L, Liu M, Neyra M et. al. Determinación de *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* en una localidad del Departamento de Madre de Dios 1998. *Rev perú Parasitol* 2002;16(1):7-9.
7. Machicado J D, Marcos L A, Tello R, Canales M, Terashima A, Gotuzzo E. Diagnosis of soil-transmitted helminthiasis in an Amazonic community of Peru using multiple diagnostic techniques. 2012; 106: 333-339.
8. Pascual G, Iannacone J, Hernandez A, Salazar N. Parásitos intestinales en pobladores de dos localidades de Yurimaguas, alto Amazonas, Loreto, Peru. *Neotrop Helminthol* 2010; 4(2):127-136.
9. Vasquez E, Camero F, Aguirre E. Enteroparasitosis en el Asentamiento Humano «Enrique Milla Ochoa»- Los Olivos. *Rev perú Parasitol* 1995;11(1):55-56
10. Iannacone J, Benites MJ, Chirinos L. Prevalencia de infección por parásitos intestinales en escolares de primaria de Santiago de Surco, Lima, Perú. *Parasitol Latinoam* 2006; 61: 54 – 62.
11. Dondji B, Sun T, Bungiro RD, Vermeire JJ, Harrison LM, Bifulco C, Cappello M. CD4+ T cells mediate mucosal and systemic immune responses to experimental hookworm infection. *Parasite Immunol* 2010; 32:406-413.
12. McSorley HJ, Loukas A. The immunology of human hookworm infections. *Parasite Immunology* 2010; 32:549-559.
13. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: Capacidad inhibitoria relacionada al antígeno P1. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 2007; 41(2): 225-228.
14. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. Identificación de epitopes Tipo Grupo Sanguíneo ABO en larvas de *Ascaris lumbricoides* mantenidas in vitro. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 2009; 43(1): 21-26.
15. Ponce-León P, Foresto P y Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: heterogeneidad en la expresión de epitopes ABO. *Invest Clin* 2006; 47(4): 385-393.
16. Ponce de León P, Di Vita S, Biondi C, Valverde J. Absorción de antígenos solubles ABH por larvas de *Ascaris lumbricoides* in vitro. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2011; 45(1): 125-131.
17. Goldring OL, Clegg JA, Smithers SR, Terry RJ. Acquisition of human blood group antigens by *Schistosoma mansoni*. *Clin Exp Immunol.* 1976; 26:181–187.
18. Ponce de León P, Foresto P, Valverde J. *Ascaris lumbricoides*: Mimetismo molecular por absorción de epítipo P1. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2010; 44(2): 253-257.
19. Dean DA, Sell KW. Surface antigens on *Schistosoma mansoni*. *Clin. exp. Immunol* 1972; 12: 525-540.
20. Smith HV, Kusel JR. The acquisition of antigens in the intercellular substance of mouse skin by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Clin. exp. Immunol* 1979;36: 430-435
21. Smith HV, Kusel JR, Girdwood RWA. The production of human A and B blood group like substance by *in vitro* maintained second stage *Toxocara canis* larvae: their presence on the outer, larval surfaces and in their excretions/secretions. *Clin. Exp. Immunol* 1983; 54:695-633.
22. Ponce de Leon P, Di Vita S, Biondi C, Valverde J. Captación de ácido siálico por larvas de *Ascaris lumbricoides* durante incubación in vivo. *Acta Bioquim Clín Latinoam* 2011; 45(3):451-461.



23. Soulsby EJ. The evasion of the immune and immunological un-reponsiveness: parasitic helminth infections. *Immunol Lett.* 1987; 16(3-4): 315-20.
24. Pleass RJ, Woof JM. Fc receptors and immunity to parasites. *TRENDS in Parasitology* 2001; 17(11): 545-551.
25. Ham DA, McDonald J, Atochina O, Da'dara AA. Modulation of host immune responses by helminth glycans. *Immunol Rev* 2009; 230: 247-257.
26. Schmid-Hempel P. Parasite immune evasion: a momentous war. *Trends Ecol Evol.* 2008; 23(6):318-26.
27. Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Oritz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology* 2002, 18(6): 272-278.
28. Bogdan C, Rölinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 1998; 28:121-134.
29. Kraiczy P, Skerka C, Kirshfinl M, Zipler PF, Brade V. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: Insufficient killing of the pathogens by complement and antibody. *Int. J. Med. Microbiol.* 291(33): 141-146
30. Abu-Shakra M, Buskila D, Shoenfeld Y. Molecular mimicry between host and pathogen: examples from parasites and implication. *Immunol Lett.* 1999; 67(2):147-52.



# Efecto del extracto hidroalcohólico de *Coriandrum sativum* (Apiaceae) sobre la infectividad de huevos embrionados de *Toxocara canis* en *Mus musculus* BALB/c

## Effect of hydroalcoholic extract of *Coriandrum sativum* (Apiaceae) on the infectivity of *Toxocara canis* embryonated eggs in *Mus musculus* BALB/c

Vanessa Arroyo Ulloa<sup>1</sup>, Karen Siccha Aguilar<sup>1</sup>, Víctor Terán Ramírez<sup>1</sup>, Luís Zafra Haro<sup>1</sup>, Laura Zeña Silva<sup>1</sup> y César A. Jara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Alumnos de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

### RESUMEN

Con el propósito de verificar el efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de culantro, *Coriandrum sativum*, sobre la infectividad de huevos larvados con L2 de *Toxocara canis* inoculados experimentalmente en *Mus musculus* BALB/c. Para ello, se obtuvieron huevos no embrionados a partir de hembras grávidas del parásito los cuales fueron colocados en placas de Petri con SSFE durante 15 días para lograr su embrionación. Cuando estuvieron totalmente embrionados (huevo con L2) grupos de aproximadamente mil huevos fueron colocados en el extracto diluido a concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/mL y luego inoculados por vía oral a ratones; al mismo tiempo, huevos embrionados no tratados con el extracto fueron inoculados a otro grupo de ratones (grupo control). A los 12 días postinfección, todos los animales de experimentación fueron necropsiados con el propósito de verificar la presencia de larvas de *T. canis* a nivel de pulmones, hígado y/o ojos (infección positiva). No se encontró larvas en ningunos de los órganos de los animales experimentales, a diferencia de lo que ocurrió en el grupo control en cuyos pulmones y ojos se verificó la presencia de las L3. Se concluye que el extracto hidralcohólico de *C. sativum*, a las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/mL, inhibe la infectividad de los huevos totalmente embrionados (con L2) en una infección experimental en ratones BALB/c.

**Palabras clave:** Extracto hidroalcoholico, *Coriandrum sativum*, *Toxocara canis*, *Mus musculus*

### ABSTRACT

With the purpose of verified the effect of alcoholic extract of coriander seed, *Coriandrum sativum*, on the infectivity of larval eggs of *Toxocara canis* with L2 in *Mus musculus* experimentally inoculated BALB / c. For this, not embryonated eggs were obtained from pregnant females parasite which were placed in petri dishes for 15 days SSFE to achieve its embryonation. When they were entirely embryonated (egg L2) groups of about thousand eggs were placed in the diluted extract at concentrations of 0.5 and 1.0 mg / mL and then orally inoculated mice, while embryonated eggs not treated with the extract were inoculated to another group of mice (control group). At 12 days PI, all experimental animals were necropsied in order to verify the presence of larvae of *T. canis* level of lung, liver and / or eyes (positive infection). No larvae were found in any of the organs of experimental animals, unlike what happened in the control group whose lungs and eyes checked for the L3. It is concluded that the extract of *C. hidralcohólico sativum*, at concentrations of 0.5 and 1.0



mg / mL, inhibits infectivity completely embryonated eggs (with L2) in an experimental infection in BALB /c.

**Keywords:** Alcoholic extract, *Coriandrum sativum*, *Toxocara canis*, *Mus musculus*

## INTRODUCCIÓN

La toxocarosis es una zoonosis parasitaria causada por la larva del nematodo *Toxocara canis* o *T. felis*, cuyos adultos habitan el intestino de perros o gatos. Los huevos eliminados con las heces de los perros y gatos maduran en el medio ambiente hasta la formación de una larva en el interior del huevo, este estadio es la forma infectante para perros gatos y también para el hombre de forma accidental. Las larvas de estos nematodos eclosionan en el intestino del perro o gato y van a realizar un ciclo por los pulmones antes de alcanzar el intestino y desarrollarse los adultos; en el caso del ser humano estas larvas que no alcanzan nunca el estadio adulto quedan migrando en los tejidos dando lugar a la denominada larva migrans visceral o toxocarosis. La frecuencia de las infecciones humanas por el estado larvario de *T. canis* es elevado en las zonas tropicales y cálidas de las ciudades donde generalmente está asociado a las poblaciones de bajos niveles socioeconómicos.<sup>1,2,3,4,5</sup>

La toxocarosis es una de las zoonosis más prevalentes a nivel mundial.<sup>6,7,8,9,10,11,12</sup> La prevalencia de esta entidad varía de acuerdo al nivel socioeconómico y ubicación geográfica del país; así, se han registrado seroprevalencias de 3.7% en Japón 5, 13.9% en Estados Unidos 6, 47.5% en Colombia y 92.8% en la Isla de La Reunion-Oceano Índico. En el Perú se han realizado distintos estudios de seroprevalencia tanto en Lima como provincias habiéndose encontrado: 7.33% en Lima, 22.5% en tres comunidades rurales del distrito de Canta, 27.9% en el distrito Perené, 32.4% en niños del distrito de Mórrope y 46.7% en niños de instituciones educativas en el distrito de San Juan de Lurigancho.<sup>13,14,15</sup>

La infección en humanos por *T. canis* está estrechamente asociada a la infección de perros con el parásito adulto y al grado de contaminación de espacios de esparcimiento, como parques y traspatios y las prevalencias registradas en diferentes países varía entre 2 y 43%. En el Perú, se han realizado diversos estudios al respecto con resultados que oscilan entre 27.7% de perros en el Distrito de Lurigancho (Chosica), hasta 80.3% en el distrito de Amarilis (Huánuco); por su lado, la contaminación de parques con huevos del parásito varía entre 2.9 y 75%.<sup>16</sup>

El control de la toxocarosis se hace principalmente a nivel de personas infectadas con las L3 de *T. canis* o *T. cati* o en perros parasitados con la forma adulta, mediante el uso de antihelmínticos, básicamente se hace búsqueda de componentes químicos bioactivos de plantas nativas con propiedades anti agentes infecciosos o vectores, que no generen resistencia como los antihelmínticos a base de quimicos<sup>17</sup>. Una de esas plantas puede ser *Coriandrum sativum*, que es una hierba comestible que pertenece a la familia Apiaceae, cuyos miembros se caracterizan por ser plantas aromáticas, con un olor y sabor a anisado, en general son plantas herbáceas, arrosetadas, y de hojas alternada, contiene principalmente: coriandromas A,B,C,D,E, coriandrin, dihidrocoriandrin;cumarinas: umbeliferona, isoescopoletin, Ácidos:ferulicos, veratrico ; Fenoles: 2-(4-hidroxifenil)- etanol, 2-(4-hidroxifenil)-2-metoxietanol;flavonoides,componentes fenolicos: ácidos caféicos, triterpeno: corandriol;aceite esencial;aceites grasos; glucósidos;taninos. Otros compuestos importantes en el aceite de la fruta son  $\beta$ - pineno (1,82%), m-cimeno (1,27%), citronela (1,96%), citronelol (1,31%), citral (1,36%), geraniol (1,87%), citronelilo acetato (1,36%),  $\alpha$ -cedreno (3,87%), y  $\alpha$ -farneseno (1,22%) y  $\beta$ -sesquiphellandrene (1,56%).<sup>18, 19,20,21,22</sup>

*C. sativum* es una planta nativa de Irán, sin embargo, está ampliamente distribuida alrededor del mundo. Las semillas, como se ha mencionado, contienen aceites esenciales (sobre el 1%) y, además de tener Vitamina A y Vitamina C, lo que le da usos tónico, son usados en la medicina tradicional para la indigestión, contra los helmintos intestinales, reumatismo y dolor de articulaciones, asimismo presenta actividad nematicida contra el fitonematodo *Bursaphelenchus xilophilus*, el nematodo de los ovinos, *Haemonchus contortus*, bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Campilobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*), *Candida albicans* y contra el mosquito vector *Anopheles*.<sup>23, 24,25, 26,27</sup>



Teniendo en cuenta que la toxocarosis es una enfermedad frecuente sobre todo en la población de zonas donde la infraestructura y educación sanitarias son deficientes, que el control de esta enfermedad sólo se hace a nivel de individuos parasitados utilizando antihelmínticos importados de precios elevados y que poco se ha hecho para controlar al huevo del parásito cuando se encuentra en el ambiente, resulta necesario ejecutar investigaciones tendientes a encontrar sustancias que puedan causar daño a los huevos de helmintos antes de que se pongan en contacto con el huésped e ingresen a ellos. Una de esas sustancias lo constituyen los principios activos de plantas de fácil acceso, como es el caso del culantro, *C. sativum*. Por estas razones se propuso una investigación que estuvo dirigida a contestar la siguiente interrogante: ¿Cuál es el efecto del extracto hidroalcohólico de semillas de *Coriandrum sativum* “culantro” a las concentraciones de 0.5 y 1.0mg/ml sobre la infectividad de huevos embrionados completamente (con L2) de *T. canis* inoculados experimentalmente en *Mus musculus* BALB/c? Teniendo en cuenta los antecedentes se planea que: el extracto hidroalcohólico de semillas de *Coriandrum sativum* a la concentración de 1.0 mg/mL disminuye la infectividad de huevos completamente embrionados de *T. canis* sobre *Mus musculus* BALB/c, mas no a la concentración de 0.5 mg/mL.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

- Huevos embrionados de *T. canis*.
- Extracto hidroalcohólico de *Coriandrum sativum*.

### Obtención de huevos embrionados de *T. canis*

Del intestino delgado de un perro infectado con *T. canis* se obtuvieron hembras maduras de éste nematodo, luego de ser lavadas con agua destilada se conservó en SSF 0,9% a 4°C durante 24 horas. Luego se colocó en placas de Petri y utilizando el estereoscopio se diferencio parásitos hembras y machos, seleccionándose los parásitos hembras, se realizó la disección y extracción de los úteros grávidos, con la ayuda de navajas se rompió las paredes del útero para liberar los huevos, los cuales fueron lavados 4 veces con SSF estéril. Los huevos libres de tejido uterino fueron colocados en placas de Petri con SSF 0,9%, solución que fue removida diariamente para evitar contaminación también se realizo observación microscópica cada dos días hasta obtener los huevos infectivos con L2, los cuales se obtuvieron en un tiempo de 15 días.

### Obtención del extracto hidroalcohólico de *Coriandrum sativum*

Se recolectó una planta de un cultivo de “culantro” en el distrito Sinsicap provincia de Otuzco (La libertad – Perú), teniendo en cuenta las consideraciones para la recolección y transporte de material vegetal, luego fue llevada al **Herbarium Truxillense (HUT)**, Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo, para su identificación taxonómica, de ése cultivo se recolectaron las semillas por sacudimiento manual de las plantas que no presentaban enfermedades por microorganismos o deficiencias nutricionales con el fin de obtener semillas en buen estado, éstas fueron colocadas en bolsas plásticas de primer uso para su transporte. Las semillas fueron seleccionadas y lavadas con hipoclorito de sodio al 2% durante 30 segundos, luego con agua destilada tres veces.

Las semillas fueron llevadas con un químico farmacéutico para la elaboración del extracto hidroalcohólico.

### Tratamiento de huevos embrionados de *T. canis* con extracto hidroalcohólico de *Coriandrum sativum*

De cada placa de Petri, donde estaban contenidos los huevos con SSF, se retiró parte de esta solución con la finalidad de concentrar los huevos y se realizo el recuento, se añadió 1000 huevos embrionados a cada concentración del extracto hidroalcohólico (0.5mg/ml y 1.0mg/ml); luego se llevó a refrigeración y se mantuvo en oscuridad para no perder los principios activos del extracto. Además se mantuvo 1000 huevos embrionados en SSF a temperatura ambiente (Control)

### Infección experimental en *Mus musculus* cepa BALB/c .

Se utilizaron ocho ejemplares de *M. musculus* cepa BALB/c. Luego de transcurrido los 12 días en los cuales los huevos embrionados de *T. canis* estuvieron en las dos concentraciones del extracto (0.5 y 1.0 mg). Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos; el sedimento se resuspendió en 2 ml de agua destilada y se administro vía oral, 1 mL de cada suspensión a cada ratón (administrándoles pequeñas



dosis hasta completar 1 mL), esto se realizó para ambas concentraciones, este procedimiento se realizó también con los huevos embrionados que estuvieron en SSF(Control).

Los ratones fueron separados y puestos en jaulas, durante 12 días. Administrándoles diariamente su comida y realizando la limpieza de las jaulas para evitar situaciones de estrés, además se realizó el monitoreo para observar alguna alteración en su comportamiento.

#### Obtencion de larvas tisulares de *T. canis*.

Trascurrido 12 días de infección se realizó la disección de los ratones, de los cuales se extrajo pulmones, ojos y cerebro, a los ojos se realizó un “squash”, a los demás órganos se trituró con SSFE en un mortero y se realizó el método de Baerman<sup>28</sup> y se verificó la presencia de larvas en dichos órganos, éstos procesos se realizaron en cada ratón experimental y en el control.

## RESULTADOS

Se logró la embrionación de aproximadamente 27 mil huevos con L1 a los siete días y de 20 mil con L2 (totalmente embrionados) a los 15 días a temperatura ambiente: entre 18 y 23°C. Asimismo, cuando se necropsiaron los ratones para buscar a las larvas, sólo se encontró en los pulmones y ojos del grupo control (Tabla 1)

**Tabla 1.** Larvas encontradas en órganos de *Mus musculus* post-infección a los doce días, con 1000 huevos embrionados de *Toxocara canis* tratados con dos concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Coriandrum sativum*.

N° de ratones	Concentración del extracto (mg/ml)	Órganos		
		Ojos	Pulmones	Cerebro
C1	*	+	+	-
E <sub>1</sub>	0.5	-	-	-
E <sub>2</sub>	0.5	-	-	-
E <sub>3</sub>	0.5	-	-	-
E <sub>4</sub>	1.0	-	-	-
E <sub>5</sub>	1.0	-	-	-
E <sub>6</sub>	1.0	-	-	-

C= Ratón control, E= Ratón experimental, += presencia de larvas, -= sin presencia de larvas

## DISCUSIÓN

La infección experimental fue realizada en ratones *Mus musculus* BALB/c, debido a que es un huésped sensible para este tipo de nematodo<sup>27</sup>. En el presente trabajo se encontró larvas en ojos y pulmón que son los órganos mayormente afectados, a los 12 días post-infección con 1000 huevos embrionados (L2) en el ratón control, este resultado es similar a los obtenidos por otro autor<sup>20</sup>; en los grupos experimentales no se encontró larvas en estos órganos posiblemente debido a la acción de los principios activos del extracto hidroalcohólico de *C. sativum*.

En trabajos realizados, la eficacia antihelmíntica de los extractos obtenidos de varias plantas se ensayó in vivo en animales de laboratorio e in vitro, los extractos utilizados fueron: etanólico, metanólico, acuoso, o cloroformo, sobre diversos nematodos<sup>19,21</sup>. Dentro de la familia Apiaceae<sup>29</sup>, se encuentra *C. sativum*, utilizado en la antigüedad como antihelmíntico, es conocido como “cilantro” y se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo. Las semillas contienen un aceite esencial (hasta 1%) y flavonoides como principio activo, se utilizan en medicina natural debido a su actividad nematocida, los extractos de esta planta se ha probado su acción contra bacterias (*Staphylococcus*



*aureus*, *Bacillus* spp), *Candida albicans*, fitonematodos (*Bursapehelechus xylophilus*), nematodos (*Haemonchus contortus*) y larvas de *Anopheles*,<sup>18,19,26,27,31,32</sup>

Las actividades antihelmínticas del extracto hidroalcohólico y acuoso de las semillas de *C. sativum* (Apiaceae) fueron investigados en el huevo y el adulto nematodo parásito *Haemonchus contortus*<sup>30</sup>. El extracto acuoso de *C. sativum* también se investigó in vivo para actividad antihelmíntica en ovejas infectadas con *Haemonchus contortus*, ambos tipos de extracto de inhibe la eclosión de los huevos a una concentración inferior de 0,5 mg / ml. El extracto hidroalcohólico mostró mejor actividad in vitro contra parásitos adultos que la acuosa<sup>30</sup>; en el presente estudio se investigó la actividad inhibitoria del extracto de semillas de *C. sativum*, enfocado a la infectividad de larvas (L2) de *Toxocara canis*, partiendo de la concentración de 0.5 mg/ml y 1.0 mg/ml.

## CONCLUSIÓN

- Las concentraciones de 0.5 mg/ml y 1.0 mg/ml del extracto hidroalcohólico de semillas de *Coriandrum sativum* “culantro” inhiben la infectividad de huevos embrionados (L2) de *Toxocara canis*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Breña Chávez Judith P, Hernández Díaz Roger, Hernández Peña Arturo, Castañeda Isaías Rolando, Espinoza Blanco Yrma, Roldán Gonzalez William et. al. Toxocariosis humana en el Perú: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Acta Med Per 2011; 28(4): 220-230.
2. Roldán WH, Espinoza YA, Huapaya PE, Jiménez S. Diagnostico de la Toxocarosis Humana. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2010; 27 (4): 613-20.
3. Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. Clin Microbiol Rev 2003; 16 (2): 265-72.
4. Wiwanitkit V, Waenlor W. The frequency rate of *Toxocara* species contamination in soil samples from public yards in a urban area "Payathai", Bangkok, Thailand. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2004; 46 (2): 113-4.
5. Cortez RT, Ramirez G, Collet L, Giuliani GP. Ocular parasitic diseases: a review on toxocariasis and diffuse unilateral subacute neuroretinitis. J Pediatr Ophthalmol Strabismus 2011; 48 (4): 204-12.
6. Souza RF, Dattoli VC, Mendonça LR, Jesus JR, Baqueiro T, Santana Cde C et. al. Prevalência e fatores de risco da infecção humana por *Toxocara canis* em Salvador, Estado da Bahia. Rev Soc Bras Med Trop 2011; 44 (4): 516-9.
7. Romano N, Nor Azah MO, Rahmah N, Lim Y AL, Rohela M. Seroprevalence of toxocariasis among Orang Asli (Indigenous people) in Malaysia using two immunoassays. Trop Biomed 2010; 27 (3): 585-94.
8. Radman NE, Archelli SM, Fonrouge RD, del V Guardis M, Linzitto OR. Human toxocarosis. Its seroprevalence in the city of La Plata. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95 (3): 281-5.
9. Demirci M, Kaya S, Cetin E, Aridoğan B, Onal S, Korkmaz M. Seroepidemiological investigation of toxocariasis in the isparta region of Turkey. Iran J Parasitol 2010; 5 (2): 52-9.
10. Othman RA. Prevalence of *Toxocara canis* in dogs, North West Bank of Palestine. Korean J Parasitol 2011; 49 (2): 181-2.
11. Hotez PJ, Wilkins PP. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance?. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3 (3): e400.
12. Sariego I, Kanobana K, Rojas L, Speybroeck N, Polman K, Núñez FA. Toxocariasis in Cuba: a literature review. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6 (2): e1382.
13. Roldán WH, Cavero YA, Espinoza YA, Jiménez S, Gutiérrez CA. Frequency of human toxocariasis in a rural population from cajamarca, peru determined by dot-elisa test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2010; 52 (2): 67-71.
14. Roldán WH, Cavero YA, Espinoza YA, Jiménez S, Gutiérrez CA. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the amazonian city of Yurimaguas, Peru. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2010; 52 (1): 37-42.
15. Espinoza YA, Huapaya PH, Roldán WH, Jiménez S, Arce Z, Lopez E. clinical and serological evidence of *toxocara* infection in school children from Morrope district, Lambayeque, Peru. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2008; 50 (2): 101-5.



16. Espinoza YA, Huapaya PE, Roldán WH, Jiménez S, Abanto EP, Rojas CA et. al. Seroprevalence of human toxocariasis in andean communities from the northeast of Lima, Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010; 52 (1): 31-6.
17. Geerts S, Gryseels B. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13 (2): 207-22.
18. Cheng SS, Huang CG, Chen YJ, Yu JJ, Chen WJ, Chang ST. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species. *Bioresour Technol* 2009; 100 (1): 452-6.
19. Kim J, Seo SM, Lee SG, Shin SC, Park IK. Nematicidal Activity of Plant Essential Oils and Components from Coriander (*Coriandrum sativum*) Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) Essential Oils against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *J Agric Food Chem* 2008; 56 (16): 7316-20.
20. Nejad Ebrahimi S, Hadian J, Ranjbar H. Essential oil compositions of different accessions of *Coriandrum sativum* L. from Iran. *Nat Prod Res* 2010; 24 (14): 1287-94.
21. Klimpel S, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KA, Aksu G, Fischer K, Strassen B et. al. The effects of different plant extracts on nematodes. *Parasitol Res* 2011; 108 (4): 1047-54.
22. Rondon FC, Bevilaqua CM, Accioly MP, Morais SM, Andrade-Júnior HF, Carvalho CA. *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21 (3): 185-91.
23. Chithra V, Leelamma S. Hypolipidemic effect of coriander seeds (*Coriandrum sativum*): mechanism of action. *Plant Foods Hum Nutr* 1997; 51 (2): 167-72.
24. Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira GM. Action of *Coriandrum sativum* L. Essential Oil upon Oral *Candida albicans* Biofilm Formation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011
25. Kubo I, Fujita K, Kubo A, Nihei K, Ogura T. Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. *J Agric Food Chem* 2004; 52 (11): 3329-32.
26. Rahman MS, Rahman MZ, Abdul Wahab Md, Rasheduzzaman Chowdhury, Rashid MA. Antimicrobial Activity of Some Indigenous Plants of Bangladesh. *Dhaka Univ. J. Pharm. Sci.* 7(1): 23-26, 2008
27. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Potential of coriander (*Coriandrum sativum*) oil as a natural antimicrobial compound in controlling *Campylobacter jejuni* in raw meat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74 (1): 31-5.
28. Sedaghat M, Dehkordi AS, Abai M, Khanavi M, Mohtarami F, Abadi YS. Larvicidal Activity of Essential Oils of Apiaceae Plants against Malaria Vector, *Anopheles stephensi*. *Iran J Arthropod Borne Dis* 2011;5 (2): 51-9.
29. Del Valle M, Radman NE, Burgos L, Fonrouge RD, Archelli SM. *Toxocara canis*: migración larval y eosinofilia en el hospedador paraténico. *Parasitol Latinoam* 2002; 57: 46 – 49.
30. Eguale T, Tilahun G, Debella A, Feleke A, Makonnen E. In vitro and in vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *J Ethnopharmacol* 2007; 110 (3): 428-33.
31. Wangenstein H, Samuelsen AB, Malterud KE. Antioxidant activity in extracts from coriander. *J Ethnopharmacol* 2004; 88 (2): 293 – 7.
32. Fazal SS, Singla RK. Review on the Pharmacognostical & Pharmacological Characterization of *Apium Graveolens* Linn. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 2 (1): 36-42.



# Efecto biofungicida de *Trichoderma harzianum* y de extractos de *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis* y *Ricinus communis* sobre *Rhizoctonia solani*.

## Biofungicide-effect of *Trichoderma harzianum* and extracts of *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis*, and *Ricinus communis* on *Rhizoctonia solani*.

Katty Gonza Carnero<sup>1</sup>, Eloy López Medina<sup>2</sup>, Carmen Zavaleta Salvatierra<sup>1</sup>,  
Jordan De La Cruz Castillo<sup>1</sup> y William Mendoza Miranda<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Escuela AP de Ciencias Biológicas. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. (aracely152@hotmail.com)

### RESUMEN

*Solanum tuberosum* "papa", es un cultivo muy afectado por plagas y enfermedades. Las de mayor impacto son la rizoctoniasis, causada por el hongo *Rhizoctonia solani* que afecta las partes subterráneas de la planta, produciéndose canchales en brotes, tallos, estolones y raíces, lo que disminuye la emergencia de la planta y la calidad comercial del tubérculo. El empleo del hongo antagonista y de extractos de algunos vegetales para el manejo de *R. solani* constituye una alternativa y un avance en estrategias de control biológico, ya que se pueden obtener en cantidades suficientes como para ser aplicados en cultivos comerciales, con la consiguiente reducción en el uso de fungicidas de origen químico. El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de *Trichoderma harzianum* y extractos vegetales de *Eucalyptus globulus* "eucalipto", *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Ricinus communis* "higuerilla" como biofungicidas para el control de *Rhizoctonia solani* en tubérculos de papa. Para ello, se diseñó un estudio experimental cuantitativo dirigido a encontrar la mayor actividad antimicótica representada en los halos de inhibición que tuvieron los extractos obtenidos de las tres especies vegetales y del hongo antagonista de *R. solani*. Se encontró que el extracto de eucalipto (T1), presentó el mayor efecto inhibitorio ( $p < 0,05$ ) y que el extracto de las hojas de romero (T2) e higuerilla (T3) no presentaron efecto inhibitorio. Asimismo, que *T. harzianum* es un excelente antagonista porque crece y cubre completamente la colonia de *R. solani*.

**Palabras clave.** *Trichoderma harzianum*, extractos vegetales, *Solanum tuberosum*, *Rhizoctonia solani*, *Ricinus communis*, *Eucalyptus globulus*, *Rosmarinus officinalis*.

### ABSTRACT

*Solanum tuberosum* "potato" is a crop severely affected by pests and diseases. Being one of them and rizoctoniasis greater impact, caused by the fungus *Rhizoctonia solani*, which is of great importance in the cultivation of potatoes as affected underground parts of the plant, causing cankers on shoots, stems, stolons and roots, which reduces plant emergence and tuber commercial quality, hence the possibility of using the antagonist fungi and plant extracts for the management of *Rhizoctonia solani* in potato *Solanum tuberosum* are an alternative and advancement strategies biological control, since these can be obtained in sufficient quantities for use in commercial crops, with consequent reduction in fungicide chemical use. The aim this work was to determine the effect of *Trichoderma harzianum* and vegetable extracts *Eucalyptus globulus* "eucalyptus" *Rosmarinus*



*officinalis* "rosemary" and *Ricinus communis* "castor" as biofungicides to control *R. solani* potato tubers. For this, it was conducted a quantitative experimental study designed to find the greatest antifungal activity displayed in halos inhibition of the extracts obtained had three plant species. It was found that the extract from the leaves of eucalyptus (T1), had the highest inhibitory effect ( $p < 0,05$ ), and extract from the leaves of rosemary (T2), and castor (T3) had no inhibitory effect, as well as, that *T. harzianum* is an excellent antagonist because it grows and completely covers the colony of *R. solani*.

**Keywords.** *Trichoderma harzianum*, plant extracts, fungicide, *Solanum tuberosum*, *Rhizoctonia solani*, *Ricinus communis*, *Eucalyptus globules*, *Rosmarinus officinalis*

## INTRODUCCION

Las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos, tales como bacterias, nematodos u hongos, constituyen la mayor causa de pérdida en la producción agrícola, tanto en cosecha como en post cosecha. Dentro de los distintos fitopatógenos, los hongos constituyen uno de los principales grupos tanto por la diversidad de especies existentes como por las pérdidas que originan. <sup>(1)</sup>

La papa (*Solanum tuberosum*) es un cultivo muy afectado por plagas y enfermedades. Entre las enfermedades de mayor impacto, se encuentra la rizoctoniasis causado por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn, el cual es de gran importancia en el cultivo de la papa, ya que se ven afectadas las partes subterráneas de la planta, produciéndose canchales en brotes, tallos, estolones y raíces, lo que disminuye la emergencia de plantas, además de la costra negra, que corresponde a la formación de esclerocios sobre la piel de los tubérculos, disminuyendo su calidad comercial. <sup>(2)</sup>

La utilización extensiva de compuestos químicos para el control de enfermedades, la emergencia de patógenos resistentes a fungicidas y el deterioro en la salud de productores y consumidores, ha promovido la búsqueda de alternativas viables que garanticen una mayor sostenibilidad en la producción agrícola, minimizando el impacto sobre el medio ambiente. El control biológico de enfermedades con agentes microbianos como hongos y extractos vegetales son una de estas alternativas sostenibles ya que no solo disminuye el uso de agroquímicos (reduciendo los costos), sino que se puede manejar el cultivo con buena producción, reducir la incidencia de la enfermedad y a la vez asegurar la salud de aquellos que trabajan en las plantaciones <sup>(3)</sup>.

Uno de los agentes microbianos más estudiados por su impacto positivo en el control de enfermedades es el hongo *Trichoderma harzianum*. Éste tiene efectos significativos en la reducción de enfermedades fúngicas y una importante acción cuando se realiza su aplicación de forma preventiva al suelo. Es un eficiente controlador biológico que está siendo ampliamente usado en agricultura como agente de biocontrolador debido a su habilidad para colonizar sustratos rápidamente, inducir resistencia sistémica adquirida en plantas, promover el crecimiento vegetal y poseer actividad antagonista contra un amplio rango de hongos patógenos <sup>(6)</sup>.

Los extractos de plantas constan de una combinación de elementos activos producto del metabolismo vegetal. La gran cantidad de sustancias químicas que contiene interacciona de modo sinérgico, es decir, dan como resultado efectos superiores al efecto de los mismos elementos por separado. Las sustancias coadyuvantes, contenidas en menor proporción y sólo aparentemente superfluas, hacen posible el desarrollo óptimo de la sustancia principal o principio activo, al fomentar su absorción y acelerar y reforzar de esta manera el efecto antimicótico <sup>(4)</sup>.

A través de las rutas de obtención de los metabolitos primarios, y por procesos bioquímicos ayudados por enzimas, se generan metabolitos secundarios que son los componentes finales del metabolismo de las plantas. Estos metabolitos secundarios (alcaloides, esteroides, flavonoides, terpenoides, quinonas, entre otros) deben ser extraídos de la forma en que se presenten tratando de no alterar sus propiedades biológicas (Sanabria, 1983). Por lo tanto, los extractos de plantas constituyen una fuente natural importante en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad fungistática de interés, cuya comprensión de sus procesos bioquímicos ha perfilado una nueva estrategia orientada al manejo de estas defensas químicas contra microorganismos <sup>(7)</sup>.



El eucalipto tiene muchas propiedades benéficas para la salud humana y animal así como también para el control de enfermedades causadas por hongos debido a su composición es decir sus principios activos. El principal componente del aceite esencial es el éter óxido terpénico cineol o eucaliptol, constituyendo el 70-80%. Asimismo, tanto las hojas como las pequeñas Flores de romero tienen propiedades anti fúngicas. (4). Por su parte las semillas de la higuera contienen alcaloides (ricina y ricinina) y aceite el cual está compuesto por una mezcla de triglicéridos,  $\beta$ -sistosterol y pequeñas cantidades de ácidos linoleico y esteárico. Por lo tanto sus semillas y sus hojas crudas son venenosas

La posibilidad de emplear al hongo antagonista y los extractos vegetales para el manejo de *Rhizoctonia solani* en papa *solanum tuberosum* son una alternativa y un avance en estrategias de control biológico, ya que estos se pueden obtener en cantidades suficientes para aplicaciones en cultivos comerciales, con la consiguiente reducción en el uso de fungicidas de origen químico. (3)

Por lo tanto el objeto del presente trabajo es determinar el efecto de *Trichoderma harzianum* como agente antagonista de *Rhizoctonia solani*, así como el uso de extractos vegetales de *Eucalyptus globulus* "eucalipto", *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Ricinus communis* "higuera" para reducir daños causados por este patógeno en tubérculos de papa.

## MATERIAL Y METODOS

### Material biológico

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología Y cultivos de tejidos vegetales de la Universidad Nacional de Trujillo. Las hojas de *Eucalyptus globulus* "eucalipto", *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Ricinus communis* "higuera", de apariencia sana, fueron recolectadas en los alrededores de la Universidad Nacional de Trujillo, escogiéndose para la investigación las más grandes y las más antiguas. La identificación taxonómica se hizo en el Herbario Truxillense. Por su parte, el hongo antagonista se obtuvo de manera comercial.

### Aislamiento y cultivo de *Rh. solani*

La obtención de los hongos fitopatógenos se hizo directamente de papas con síntomas evidentes compatibles con el ataque por *Rh. solani*. El cultivo se hizo en Agar papa (20g de papa + 50 mL de agua, cocción hasta presentar un aspecto espeso, filtrado y aforamiento hasta los 100 mL con agua destilada, + 2g de azúcar y 2g de agar-agar, autoclavado durante dos horas). Para el aislamiento se practicaron monocultivos en frascos de penicilina con el mismo medio de cultivo. La identificación se hizo por observación microscópica de sus características morfológicas.

### Preparación de los extractos y confrontación

Para la preparación de los extractos se hizo la desinfestación de las hojas con lejía al 2% y agua destilada respectivamente, seguidamente las hojas se secaron a temperatura ambiente. Para obtener los extractos se realizó una extracción en frío, para ello las hojas de cada especie fueron cortadas en cuadraditos de 1 cm<sup>2</sup>, luego se pesaron 50 gr y se colocaron en una botella de vidrio de 500 ml posteriormente se adicionó el solvente etanol 96° y se dejó en maceración durante 7 días.

Pasados los 7 días de maceración se realizó una extracción en calor utilizando un equipo de reflujo, por aproximadamente una hora; luego cada extracto se colocó en placas Petri y con ayuda de un ventilador se procedió a evaporar el alcohol, hasta la obtención de un concentrado. Luego se procedió a confrontar el hongo aislado con el extracto de *Eucalyptus globulus* "eucalipto", *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Ricinus communis* "higuera" que correspondieron al tratamiento 1, tratamiento 2 y tratamiento 3 respectivamente

### Análisis estadístico

El análisis estadístico del presente trabajo se determinó por medio de la prueba ANOVA y la comparación de medias de Duncan

Para la preparación del hongo *Trichoderma harzianum* se procedió sembrar el hongo antagonista en placas de Petri conteniendo Agar papa y se esperó que crezca por cinco días. Luego se sembró en la misma placa el hongo *Rhizoctonia solani* en posiciones opuestas y equidistantes al hongo antagonista y se dejó incubar a temperatura ambiental (25 ± 2°C) durante siete días. A los siete días de incubación se evaluó el grado de antagonismo según la escala de Bell y col, donde:

**Grado Antagónico 1:** *Trichoderma harzianum*. Crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.



**Grado Antagónico 2:** *Trichoderma harzianum* Crece al menos en las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.

**Grado Antagónico 3:** *Trichoderma harzianum* Y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.

**Grado Antagónico 4:** El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento de *Trichoderma harzianum*.

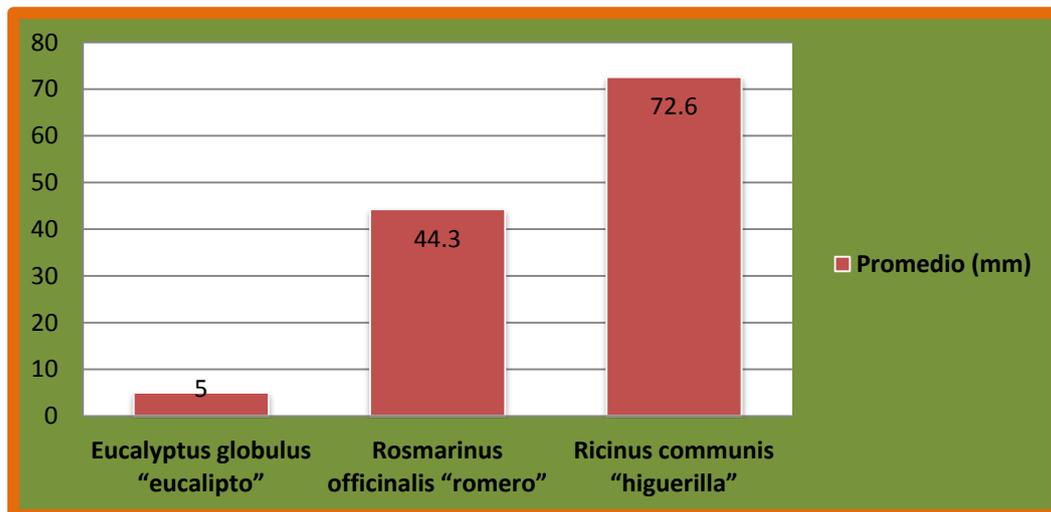
**Grado Antagónico 5:** El patógeno crece sobre la colonia de *Trichoderma harzianum* ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

## RESULTADOS

Se encontró que el extracto de eucalipto produjo los halos mas pequeños en el cultivo de *Rh. Solani*, asi como el porcentaje mayor de inhibición (Tabla 1 y 2, Figs. 1 y 2).

**Tabla 1:** Tamaño de los halos de inhibición (mm) promedio, del extracto de *Eucalyptus globulus* “eucalipto”, *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Ricinus communis* “higuerilla con las concentración de 1 % en la inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia solani*.

TRATAMIENTOS	CONTROL	Repetición 1 (mm)	Repetición 2 (mm)	Repetición 3 (mm)	Promedio (mm)
<i>Eucalyptus globulus</i> “eucalipto” (T 1)	35	3	5	7	5
<i>Rosmarinus officinalis</i> “romero” (T 2)	90	40	51	42	44.3
<i>Ricinus communis</i> “higuerilla” (T 3)	85	75	70	73	72,6



**Fig. 1:** promedio de los halos de inhibición (mm) Vs. Extractos vegetales con sus respectivas concentraciones.



**Tabla 2:** Porcentaje de inhibición del crecimiento radial en mm, del extracto de *Eucalyptus globulus* “eucalipto”, *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Ricinus communis* “higuerilla” con la concentración de 1 % en la inhibición de crecimiento de *Rhizoctonia solani*.

Extracto	Repetición 1(%)	Repetición 2 (%)	Repetición 3 (%)
<i>Eucalyptus globulus</i> “eucalipto”	91	85.7	80
<i>Rosmarinus officinalis</i> “romero”	55.6	43.3	53.3
<i>Ricinus communis</i> “higuerilla”	11.8	17.6	14.2

**Tabla ANOVA para porcentaje de inhibición por extractos**

Fuente	Suma de Cuadrados	G I	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7569.63	2	3784.81	140.56	0.0000
Intra grupos	161.56	6	26.9267		
Total (Corr.)	7731.19	8			

**Pruebas de Múltiple Rangos para porcentaje de inhibición por extractos**

Método: 95.0 porcentaje Duncan

Extractos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
<i>Ricinus communis</i> "higuerilla"	3	14.5333	X
<i>Rosmarinus officinalis</i> "romero"	3	50.7667	X
<i>Eucalyptus globulus</i> "eucalipto"	3	85.5667	X

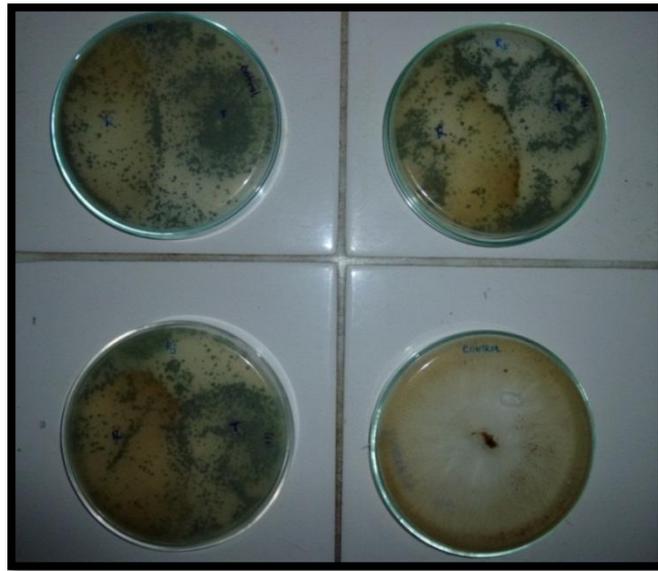
Contraste	Sig	Diferencia
<i>Eucalyptus globulus</i> "eucalipto" - <i>Ricinus communis</i> "higuerilla"	*	71.0333
<i>Eucalyptus globulus</i> "eucalipto" - <i>Rosmarinus officinalis</i> "romero"	*	34.8
<i>Ricinus communis</i> "higuerilla" - <i>Rosmarinus officinalis</i> "romero"	*	-36.2333

\* indica una diferencia significativa.

## DISCUSIÓN

De acuerdo con el análisis de varianza se obtuvo con respecto a los tratamientos un valor **P** de 0.0000 el cual nos indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos con un nivel de 95 % de confianza, por lo que se rechaza la hipótesis nula.

Para hallar dicha diferencia significativa se procedió a realizar la Prueba Duncan, la que nos reveló la no existencia de homogeneidad entre los tratamientos; siendo el mejor tratamiento 1 cuyo rango de inhibición del hongo *Rizoctonia solani* fue mayor.



**Fig. 2:** Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre *Rhizoctonia solani*, extraído de tubérculos de papa (*solanum tuberosum*): **Grado Antagónico 1:** *Trichoderma harzianum*. Crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.

En la gráfica N° 2 Se observa que a los siete días de incubación el grado de antagonismo según la escala de Bell y col, corresponde al de tipo 1 donde, *Trichoderma harzianum* Crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre la superficie del medio de cultivo.

### CONCLUSIONES

- El Tratamiento 1 que corresponde al extracto obtenido a partir de las hojas de *Eucalyptus globulus* “eucalipto, presento el mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de *Rhizoctonia solani*
- Los tratamientos 2 y 3 que corresponden a los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Ricinus communis* “higuerilla respectivamente no presentaron efecto inhibitorio en el crecimiento de *Rhizoctonia solani*
- *Trichoderma harzianum* es un excelente antagonista porque crece y cubre completamente la colonia *Rhizoctonia solani*.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Jaramillo S. Monografía sobre *Rhizoctonia solani*, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Colombia – Medellín. 2003.
2. FAO. Revista agricultura 21. Tesoro enterrado: La papa. Disponible en la página Web: <http://www.fao.org/AG/esp/revista/0611sp1.htm>.2006.
3. Solórzano A., Uso adecuado de fungicidas protectores en programas para el combate de *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa. I Congreso Nacional de Agricultura Conservacionista. San José Costa Rica. 2002.
4. José mostacero león, taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú, editorial normas legales S.A.2002 – Perú
5. Agrios G., Fitopatología. Primera edición. Editorial Limusa. 1995..Pp. 18-20, 317-323.
6. Andrade N., Castro I., Carrasco J.Principales enfermedades del Cultivo de la Papa en la Xa región. Curso – Taller de capacitación para pequeños agricultores de Los Muermos. Chile. 2004.
7. Steel. y J. Torrie .Bioestadística.Mc Graw-Hill.Mexico. 1989



# Efecto de la estratificación en la germinación de semillas del ciruelo europeo, *Prunus domestica*

## Effect of the stratification, on the germination of seeds of European plum, *Prunus domestica*

Jordan De La Cruz Castillo<sup>1</sup>, Eloy López Medina<sup>2</sup>, Carmen Zavaleta Salvatierra<sup>1</sup>, William Mendoza Miranda<sup>1</sup> y Aracely Gonza Carnero<sup>1</sup>

Alumnos de la Escuela AP de Ciencias Biológicas. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. [jdelacruzcastillo@hotmail.com](mailto:jdelacruzcastillo@hotmail.com)

### RESUMEN

La germinación de una semilla es uno de los procesos más vulnerables por los que atraviesa el ciclo vital de una planta, ya que de ella depende el desarrollo de la nueva generación. Dado que las semillas de *Prunus* se caracterizan por poseer un mecanismo de letargo o dormancia y que dicho mecanismo puede ser superado por periodos de reposo en cámara fría, se propuso determinar el efecto de la estratificación en la germinación de semilla de *Prunus domestica* L. "Ciruelo europeo". Se obtuvieron 68 frutos de los que se extrajeron las semillas, las cuales se seleccionaron y almacenaron en recipientes de vidrio previamente etiquetados. Posteriormente, las semillas se sembraron en cuatro grupos de 17 semillas cada una en bandejas de tecnopor; que constituyeron el tratamiento de la estratificación: R1, R2, R3 y R4 (testigo). Dichas bandejas fueron selladas y debidamente rotuladas. Finalmente R1, R2, R3 fueron llevados a condiciones de refrigeración a una temperatura entre 4 y 8 °C, mientras que la bandeja restante (testigo) se mantuvo a temperatura ambiente (18-22°C). Las evaluaciones se tomaron semanalmente; luego de 2 meses se realizó la toma de datos respectivo y se obtuvo un porcentaje de germinación del 100% en R1, R2 y R3, la misma que indicó que la estratificación ejerce un efecto positivo en la germinación de *P. domestica*.

**Palabras clave:** Estratificación, germinación, *Prunus domestica*, ciruelo.

### ABSTRACT

The germination of a seed is one of the most vulnerable processes that beset the life cycle of a plant, since it depends on the development of the new generation. Since *Prunus* seeds are characterized by having a mechanism of dormancy or dormancy, and that this mechanism can be overcome by rest periods in a cold, we propose aim of this study: To determine the effect of stratification in the Seed germination *Prunus domestica* L. "European plum." It was obtained sixty-eight of which were extracted seeds, which were selected and stored in glass containers previously labeled. Then, the seeds were sown in four groups of seventeen seeds each in Styrofoam trays, which were the treatment of stratification: R1, R2, R3 and R4 (control). These trays were sealed and properly labeled plastic wrap. Finally R1, R2, R3 were taken to cooling conditions at a temperature between 4 and 8 °C, while the remaining tray (control) was subjected to room temperature. Assessments were taken weekly, two months after the decision was made and respective data for germination percentage was 100% in R1, R2 and R3, the same as that indicated that stratification has a positive effect on germination of *Prunus domestica*.

**Keywords:** Stratification, germination, *Prunus domestica*, European plum.



## INTRODUCCIÓN

Originario de Turquestan, *Prunus domestica* “ciruelo europeo” (Rosacea) es un árbol de tamaño medio que puede alcanzar los 5 a 6 metros de altura, con un sistema radical superficial, un tronco que se agrieta conforme envejece y ramas erguidas que poseen hojas pecioladas, dentadas y de punta aguda. Su fruto, una drupa jugosa y aromática, se halla cubierto de una piel delgada y brillante, de color amarillo, rojo o violáceo, el cual contiene una semilla de hueso elíptica<sup>1,2</sup>. Se distribuye en las regiones templadas de todo el mundo y en las zonas tropicales montañosas de América Latina y África<sup>3</sup>.

El principal componente del fruto del ciruelo es el agua, es rico en fósforo, calcio y potasio; tiene hidratos de carbono, entre ellos el sorbitol, de leve acción laxante que se ve reforzado por su abundancia en fibra y antocianinas, pigmentos de acción antioxidante y antiséptica<sup>1</sup>.

La propagación de árboles frutales, se realiza de dos formas: la sexual, por medio de la siembra, de la cual derivan los patrones denominados francos, y la asexual o vegetativa de la planta, como trozos de ramas, raíces, etc. Existen diversos procedimientos para lograr partes enraizadas de una planta: estaquillas, acodos, etc. La reproducción sexual, a través de la semilla, es una fase crítica en el ciclo de vida, y cualquier alteración de este proceso puede tener implicaciones importantes para la productividad de las plantas y la supervivencia de las especie<sup>4</sup>.

La temperatura es el principal factor que determina la adaptación de las especies a diferentes localidades dado que altera diversas funciones vitales. Entre las actividades afectadas están la velocidad de las reacciones químicas; los cambios de estado del agua (hielo - líquido - vapor), cambios en la estructura y actividad de las macro moléculas, funciones asociadas a la membrana y la actividad enzimática<sup>5</sup>.

La germinación, uno de los procesos más vulnerables por los que atraviesa el ciclo vital de una planta ya que de ella depende el desarrollo de la nueva generación<sup>6</sup>, incorpora los eventos que comienzan con la toma del agua por parte de la semilla en reposo, no latente y finaliza con la salida de la radícula a través de la testa y la elongación del eje embrionario. La imbibición de las semillas secas en reposo, rápidamente reanuda la actividad metabólica<sup>7</sup>. A su vez, está constituida por factores ambientales como por características genéticas de las especies, que determinan los procesos de desarrollo, morfología y fisiología de las semillas; con alusión a diversos estudios, de que la luz, la temperatura y la humedad son factores importantes para la germinación de las simientes<sup>8</sup>.

Uno de los aspectos más importantes para las plantas es el hecho de que la germinación ocurra en el lugar y tiempo adecuados y que por ello, hay una demora del proceso, en la mayoría de las plantas que va entre días y años; para lo anterior, un mecanismo fundamental es la latencia de las semillas, estado en el cual una semilla viable no germina aunque se la coloque en condiciones de humedad, temperatura y concentración de oxígeno idóneas para hacerlo<sup>9,11</sup>. Esta puede considerarse, simplemente, como un bloqueo a la germinación de las semillas viables, para que esta ocurra bajo condiciones favorables<sup>10</sup>. La latencia puede ser exógena o del pericarpio/cubierta seminal; endógena o del embrión, y combinada, en la que la latencia afecta al mismo tiempo a la cubierta seminal y al embrión<sup>11</sup>.

Los pretratamientos más frecuentemente empleados para vencer la dormición de semillas son: la escarificación, que puede ser mecánica, física o química y la lixiviación, tratamiento con reguladores de crecimiento, estratificación etc. La estratificación es un tratamiento pre germinativo para semillas en letargo, en el cual las semillas embebidas de agua son sometidas a un periodo de enfriamiento para que se efectuara la postmaduración del embrión y así eliminar esta latencia. La estratificación representa un enfriamiento húmedo. En efecto, la baja temperatura se considera como el factor que acciona la iniciación o la aceleración de los procesos que conducen a la eliminación de la latencia y, por tanto, a la germinación<sup>12</sup>. Consiste en colocar las semillas embebidas de agua o no, en capas o estratos húmedos, usando, como sustrato, por ejemplo arena. El período de estratificación varía según la especie. Se utiliza para superar latencias provenientes del embrión, la misma que puede ser: Cálida, si la estratificación se realiza a temperaturas altas (22 a 30 °C) o Fría si la estratificación se realiza a temperaturas bajas (0 a 10 °C).

En este sentido, la estratificación favorece la interrupción de la latencia de las semillas<sup>13</sup>; siendo el tratamiento más tradicional la estratificación templada seguida de otra estratificación a 4°C. En relación



al almacenamiento, determinados autores sugieren que un secado excesivo durante este periodo es perjudicial para la germinación<sup>14</sup>. El medio de estratificación debe proporcionar aireación, retención de humedad y no contener sustancias tóxicas para las semillas. Diversos medios se han empleado con este propósito, por ejemplo: arena, vermiculita, turba con arena de lima, etc.

Dado que las semillas de *Prunus* se caracterizan por poseer un mecanismo de letargo o dormancia y que dicho mecanismo puede ser superado por periodos de reposo en cámara fría, el presente trabajo estuvo dirigido a determinar el efecto de la estratificación en la germinación de semilla *P. domestica* "Ciruelo europeo".

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología Y cultivos de tejidos vegetales de la Universidad Nacional de Trujillo. El material vegetal procedió de un conocido supermercado de nuestra ciudad; del mismo que se compró 1 Kg de fruto de *Prunus domestica* "ciruelo europeo" (68 frutos) en bolsas de papel, para luego ser llevadas al laboratorio para su respectivo procesamiento.

### Siembra y tratamientos

En el laboratorio, se extrajeron las semillas, las cuales fueron seleccionadas y almacenadas en recipientes de vidrio previamente etiquetados. Se seleccionaron las 68 semillas y se sembraron en cuatro grupos de diecisiete semillas en las bandejas de tecnopor; de los cuales tres de ellos fueron expuestos a temperaturas de 4°C, que constituyeron el tratamiento I; mientras que el recipiente restante se colocó a Temperatura ambiente y correspondió al tratamiento II.

Para la estratificación se esterilizaron 4 bandejas de tecnopor de 25 cm de largo, 15 cm de ancho y 10 cm de altura previamente lavadas y desinfectadas. La desinfección se realizó con una solución de lejía al 2 %, durante diez minutos, como sustrato de germinación se utilizó musgo, el cual se distribuyó en capas o estratos húmedos, de la siguiente manera: una base de musgo, sobre ella una capa de papel secante, a continuación se procedió a uniformizar las semillas, para luego ser cubiertas por otra capa de papel y musgo respectivamente.

Las bandejas de tecnopor fueron selladas con plástico adherente debidamente rotuladas. Finalmente tres de las bandejas fueron llevadas a condiciones de refrigeración, a una temperatura entre 4 y 8 °C, mientras que la bandeja restante se sometió a temperatura ambiente.

### Evaluaciones

Las evaluaciones se tomaron semanalmente. Para La toma de datos, se tomó en cuenta: El número de semillas que germinaron hasta el último día de ensayo y se consideró una semilla germinada cuando la radícula salía de la testa y comenzaba a elongarse. El criterio para determinar que un hueso había germinado, era cuando la radícula había atravesado la cubierta seminal y había alcanzado como mínimo 1 mm de longitud.

## RESULTADOS

**Tabla 1:** Análisis de Varianza (ANOVA), para determinar diferencias significativas entre los tratamientos T1 y T2 en el efecto de la estratificación en la germinación de semillas de: *Prunus domestica* "Ciruelo europeo", laboratorio de Fisiología y cultivo de tejidos vegetales, UNT

Entre grupos	2.20066	1	2.20066	83.38	0.0000
Intra grupos	0.844576	32	0.026393		
Total (Corr.)	3.04524	33			



**Tabla 2:** Pruebas de Múltiple Rangos para determinar el mejor tratamiento en el Efecto de la estratificación en la germinación de semillas de: *Prunus domestica* “Ciruelo europeo”, laboratorio de fisiología y cultivo de tejidos vegetales

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTOS	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AMBIENTE	17	0.0	X
ESTRATIFICACION	17	0.508824	X

Contraste	Sig	Diferencia	+/- Límites
AMBIENTE – ESTRATIFICACION	*	-0.508824	0.113504

\* indica una diferencia significativa.

## DISCUSIÓN

Las diferencias significativas en los tratamiento observados de acuerdo al análisis de Varianza (ANOVA) cuadro 1, nos están indicando probablemente que la temperatura ejerce un efecto importante en la germinación de semillas de *Prunus domestica* L. “Ciruelo europeo”.

De allí que trabajos realizados por Pérez y Pita 1999 afirman que para cada especie existe un rango de temperaturas dentro del cual puede tener lugar la germinación de sus semillas. Este rango queda definido por una temperatura máxima y una temperatura mínima para la germinación; considerándose como temperatura óptima de germinación, la temperatura, dentro del intervalo, más idónea para obtener el mayor porcentaje de semillas germinadas en el menos tiempo posible.

Respecto al mejor resultado en la germinación de semillas de *Prunus domestica* L. dado en el tratamiento 1, según el cuadro 2, nos afirma que la estratificación, optimiza los procesos de germinación para esta especie.

De allí las bajas temperaturas pueden hacer que las semillas salgan de la dormición, es por ello que muchas semillas necesitan un periodo de frío (0-10° C) en un estado totalmente hidratado (embebido), para germinar<sup>15</sup>.

Este es debido a que en la Estratificación fría según (Pérez y Pita.1999); las semillas de algunas especies son capaces de vencer su dormición cuando se las estratifica, durante períodos variables, en un ambiente con un elevado contenido de humedad y a baja temperatura (alrededor de 5°C). En las semillas de ciertas especies, se ha comprobado que con la estratificación fría disminuye el nivel de ABA. Por otra parte, con la estratificación fría se tiende a imitar las condiciones naturales a las cuales se ven sometidas las semillas de muchas especies, propias de nuestras latitudes, durante el invierno.

## CONCLUSIÓN

- La estratificación ejerce un enorme poder germinativo en la semillas de *Prunus domestica* L.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calvo L. El Cultivo Del Ciruelo (*Prunus doméstica*) Área: Manejo integrado de cultivos / frutales de altura. San José, Costa Rica Noviembre, 2009
2. Mataix E, Villarrubia D. "Poda de Frutales" Edit Generalitat Valenciana. Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación.
3. INFOAGRO. El cultivo del ciruelo (en línea). Consultado 24 de octubre 2012. Disponible en [www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tradicionales/ciruela.htm](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/ciruela.htm)
4. Black V, Black C, Roberts J, Stewart C. A Impact of ozone on the reproductive development of plants. *New Phytologist* 147: 421–447. 2000.
5. Fernández G, Johnston M. "Crecimiento y Temperatura" *Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile .2006.
6. Matilla A. Ecofisiología de la germinación de semillas. Cap. 29 (p. 901-922). 2003. En: Reigosa M, Pedrol N, Sánchez-Moreiras A. *La Ecofisiología Vegetal. Una ciencia de síntesis*. Paraninfo S.A., Madrid.
7. Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C. The effect of a- amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles 304 B. Kucera et al. of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology* 134: 1598–1613. 2004.
8. Ramírez G, Blas A, López E, Peña M, Barbosa M, Ponce de León G. *Memorias del XVII Congreso Mexicano de Botánica. Zacatecas, Zac.* 2007.
9. Fenner M, Thompson K. *The ecology of seeds*. Cambridge, UK: Cambridge University Press. Fennimore SA, Foley ME. Genetic and physiological evidence for the role of gibberellic acid in the germination of dormant Avena fatua seeds. *Journal of Experimental Botany* 49: 89–94. 1998.
10. Bewley J. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055–1066. 1997.
11. Pérez J. PITA M. *Dormición de semillas. Hojas divulgadoras*. 1999.
12. Lewak S, *Regulatory pathways in removal of apple seed dormancy. Acta Horticulturae*, 120: 149-159. 1981.
13. Çetinbas M. Koyuncu F. Improving germination of prunus avium l., seeds by gibberellic acid, potassium nitrate and thiourea. *Hort. Sci. (Prague)* 33 (3):119-123. 2006.
14. Olson R.J. and Nagle J.P. *Adaptation tests of trees and shrubs for the intermountain area of the Pacific Northwest. Circ. 450. Pullman: Washington Agricultural Experiment Station. 43 p.*1965.
15. Taiz L, Zeiger E. *Fisiología vegetal. Vol 1, ed III. Universitat de Jaume I. Castellón. España.* 2006.



# Valoración económica de bienes y servicios ambientales de la Laguna Conache, Laredo (La Libertad, Perú)

## Economic valuation of environmental wealths and services Conache lagoon, Laredo (La Libertad, Peru)

Alexis J. Verona Ezcurra<sup>1</sup> y Andrés Rodríguez Castillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Exalumno, Tesista, de la Escuela AP de Pesquería. <sup>2</sup>Departamento de Pesquería. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

### RESUMEN

Los problemas ambientales llaman mucho el interés de la sociedad por sus consecuencias; sin embargo, en países como el nuestro la preocupación es menos acuciante y, a pesar de existir ciertas políticas relacionadas a la conservación, éstas no se vienen ejerciendo como se debe, por ello la valoración surge como un instrumento útil, que no solo evalúa los efectos de la contaminación ambiental sino también le atribuye un valor monetario que permita evaluarlo en el presente y en el futuro. Por ello, la investigación pretende identificar los bienes y servicios ambientales, encontrar un valor económico aproximado y determinar el valor del disfrute de las personas que visitan la laguna ubicada en el caserío de Conache, empleando el Método de Valoración Contingente. En el caso de los bienes y servicios se identificaron el abastecimiento de agua, su flora (Sauce, Molle, Algarrobos, ígnea, entre otras), su fauna (pollas de agua, tilapia, guppys, garzas, Martin pescador, charcocha, entre otros), abastecimiento de agua de riego, control de inundaciones, recreación y turismo, recambio del agua subterránea, apoyo a ecosistemas externos, estabilización micro climática y costera, belleza escénica, la navegación, toma de fotos, sustento de la productividad biológica y asiento de organismos migratorios. En el caso del valor anual, la cantidad promedio declarada de la disposición a pagar (DAP) por conservar la laguna fue de S/. 2 808 937.66 nuevos soles; y el valor anual que las personas creen que vale su disfrute fue de S/. 4 185 720.00 nuevos soles. La diferencia se debe a que a las personas se les está pidiendo que paguen por algo, y a nadie le agrada la idea de gastar; pero en cambio cuando se refieren al valor de su disfrute su valoración es mayor por lo que no se les está hablando de pago alguno.

**Palabras claves:** Valoración Contingente, Valor del disfrute, Laguna, Bienes y servicios ambientales.

### ABSTRACT

Environmental problems attract much interest of society in its consequences, however, in countries like ours is less pressing concern and, although there certain policies related to conservation, they are not exercising as you should, by the valuation emerges as a useful tool which not only evaluates the effects of environmental pollution but also ascribed a monetary value that allows to evaluate it in the present and in the future. Therefore, the research aims to identify environmental wealths and services, finding an approximate economic value and determine the value of the enjoyment of visitors to the lake located in the hamlet of Conache using Contingent Valuation Method. In the case of goods and services were identified water supply, its flora (Sauce, Molle, Locusts, igneous, among others), fauna (moorhens, tilapia, guppies, herons, kingfisher, Charcocha, among other ), water supply, irrigation, flood control, recreation and tourism, groundwater recharge, support external ecosystem, micro climate and coastal stabilization, scenic beauty, browsing, taking pictures, sustaining biological



productivity and seat migratory organisms. In the case of the annual value, the average amount declared willingness to pay (WTP) to preserve the lagoon was S /. 2808 937.66 nuevos soles, and the annual value that people believe that their enjoyment was worth S /. 4185 720.00 nuevos soles. The difference is that people are being asked to pay for something, and no one likes the idea of spending, but instead when referring to the value of your enjoyment their valuation is higher so that they are not talking of payment.

**Keywords:** Contingent Valuation, Value of enjoyment, Laguna, Environmental goods and services.

## INTRODUCCION

En el mundo los problemas que llaman el interés son los relacionados a la contaminación del ambiente por las consecuencias que, como por ejemplo, la extinción de especies y la destrucción de zonas naturales. Es por ello que se han creado políticas para preservar y conservar la biodiversidad biológica aunque la política actual esta dirigida hacia la búsqueda de un beneficio económico a corto plazo sin prever la sobreexplotación de los recursos<sup>1</sup>.

Una forma de evitar la contaminación es valorando económicamente la mayoría de los recursos naturales, pero la ausencia de un valor económico y un precio definido en el mercado hace mucho mas compleja la tarea de su consecución, ya que implica no sólo evaluar los costos generados por los efectos de la degradación ambiental que afecta la cantidad y calidad de los recursos naturales, sino también atribuirle un valor monetario que permita evaluarlo en el presente y en el futuro<sup>2</sup>.

Los humedales, como cualquier otro ecosistema, poseen bienes y servicios los cuales son aprovechados de alguna forma por el hombre, quien es el mismo que ha llevado a numerosos ecosistemas a sus escasas, incluso a su degradación. Su valor económico depende de estos bienes y servicios representado por los valores de uso y no uso<sup>3</sup>. Esto ha hecho que las autoridades solo tomen decisiones basadas en señales de mercado, favoreciendo siempre proyectos únicamente por su rentabilidad económica sin considerar el costo beneficio del ambiente y sus recursos. En este contexto, aparece la valoración económica, que resulta ser un instrumento importante para conocer los bienes y servicios que nos brindan los humedales para la adecuada gestión de ellos<sup>4</sup>.

En la laguna de Conache (Laredo, La Libertad, Perú) se observa la constante contaminación por residuos sólidos, orgánicos, etc., la depredación de los algarrobos y el aumento excesivo de la flora a sus alrededores que no permite apreciar la totalidad de la laguna. Este hecho justifica la valoración económica, del mismo modo como ha sucedido en el lago de Termas de Río Hondo en Argentina, pero con una singularidad en su metodología al basar su valoración ambiental en el producto bruto interno del país<sup>5</sup>. Esta metodología también se ha aplicado en temas de daños ambientales y en programas medioambientales<sup>6</sup>, para valorar paisajes<sup>7</sup>, así como, áreas silvestres, parques nacionales, biodiversidad, antigüedades, características de un pueblo o un sitio histórico en particular<sup>8</sup>.

El Método de la Valoración Contingente (MVC) consiste en preguntar directamente las preferencias de las personas, obteniéndose la Disposición A Pagar (DAP) a cambio de su bienestar. Aplicado en la laguna de Mucubají (Venezuela), se encontró que la DAP aumento a 8.625,00 bolívares al proponerles a las personas un cambio en su bienestar, con respecto a los 5.612,68 bolívares de su DAP<sup>1</sup>.

La presente investigación está dirigida a, usando el Método de Valoración Contingente (MVC), determinar la valoración económica de la laguna de Conache en el distrito de Laredo (Perú)". La investigación será útil en el análisis de la demanda de los visitantes y en la planificación para el desarrollo del programa eco-turístico que se pretende realizar mas adelante. Así mismo, será útil en la conservación del ecosistema, mejorando en el uso sostenible de este; estableciendo un incremento en la tarifa, que sea razonable para el disfrute de los bienes y servicios que brinda la laguna para que de esta manera no disminuya la demanda turística.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Ubicación geográfica

Formada en base al afloamiento acuático, la laguna Conache se encuentra ubicada en el Caserío de Conache, del Distrito de Laredo, de la Provincia de Trujillo, de la Región La Libertad, en Perú. A  $08^{\circ}07'40''$  LS y a  $78^{\circ}57'11''$  LW, a una altura de 81 m.s.n.m.



Fig. 1. Vista aérea de la Laguna Conache. (Tomada de Google Earth.Ink.)

Se ubica a aproximadamente 9 km de la ciudad de Trujillo, Capital del Departamento de La Libertad<sup>9</sup>.

### Area de estudio.

La laguna Conache es un humedal de aproximadamente nueve Ha de espejo de agua, rodeado de un bosque de algarrobos y un local campestre. Considerando este espacio se obtiene un total de 11.9 Ha como área de estudio. El local campestre se encuentra ubicado a orillas de la laguna y brinda: servicios turísticos, recreativos (tablas para Sandbording, vóley, fútbol, botes y juegos infantiles).

La laguna presenta vegetación acuática (ígnea), distintas especies de garzas, peces (*Oreochromis niloticus* “tilapia” y *Poecilia reticulata* “guppys”). En sus alrededores aparecen algarrobos, *Prosopis pallida*, “algarrobo” entre otras plantas y diversos cultivares, principalmente de caña de azúcar<sup>10</sup>.

### Método de Valoración Contingente (MVC)<sup>11</sup>

- **Valoración en unidades monetarias:** se valoró económicamente la laguna como ecosistema a beneficio para las personas que visitaron el lugar para el desarrollo de sus actividades recreacionales.
- **La población relevante:** los visitantes a la laguna con mayoría de edad, fueron encuestados *in situ* en determinados días. No se consideraron los grupos escolares o de investigación por no tener una frecuencia de llegada definida.
- **Los elementos de simulación del mercado:** consistió en la implementación de un plan de conservación para las 9 hectáreas de espejo de agua que ofrece la laguna, en los próximos 5 años, o que el ecosistema se siga degradando.
- **La modalidad de la entrevista:** se utilizó la entrevista personal, con apoyo de material gráfico.



- **Selección de la muestra:** se tuvo en cuenta que los fines de semana la laguna es visitada por aproximadamente 500 turistas<sup>12</sup> para el cálculo del tamaño de la muestra empleando la tabla de Fisher-Arkin-Colton<sup>13</sup> que dio como resultado un total de 83 personas con un margen de error del 10%.
- **Redacción del cuestionario:** inicialmente se redactó una encuesta con preguntas abiertas a un grupo de 20 personas con el que se resolvieron y corrigieron algunas preguntas. Posteriormente, con las modificaciones se realizó la encuesta piloto con valores discretos y con un formato a la pregunta de DAP del tipo abierto<sup>15</sup>. Por último se realizó la encuesta final, en tres bloques: (i) **antecedentes**, que es la descripción del bien que se pretende valorar en forma precisa, corta e informativa, para que la persona no pierda el interés: se abordaron preguntas relacionadas a las características de su visita, su preferencia, su satisfacción, actividades desarrolladas, servicios que le gustaría mejorar, su tiempo de visita, su ciudad de origen, etc; (ii) **valoración**, se planteó el escenario hipotético mencionando el vehículo de pago (en efectivo), así como lo que se pretende conservar y la forma de provisión del bien (responsable del plan de conservación y el tiempo de ejecución), se preguntó la DAP; (iii) **socio-económico**, que es la información sobre la persona entrevistada, fue rápido y de fácil respuesta. Las preguntas fueron sobre su género, edad, nivel educativo, estado civil, sobre su trabajo, etc. Esto permite entender mejor las razones de las respuestas, en especial a las del segundo bloque, y ver la coherencia que existe.
- **La entrevista:** se realizó en determinados utilizando los bloques previamente descritos.
- **Análisis estadísticos:** una vez terminada todas las entrevistas, se codificaron todas las preguntas para elaborar la matriz de datos utilizando el programa Microsoft Excel Starter 2010. Posteriormente la matriz se empleó para la elaboración de cuadros de doble entrada, para la distribución de datos (valoración monetaria). A partir de ello se elaboraron las gráficas pertinentes. Para el bloque de valoración, se consideró los estadísticos descriptivos (valor mínimo, valor máximo, media y desviación estándar), a partir de ello se elaboraron los cuadros comparativos de los diferentes modelos estadísticos (lineal, logarítmico y polinómico), escogiendo al que mejor se ajusta con los datos por medio de su coeficiente de correlación múltiple ( $R^2$ ). A continuación se paso a determinar lo siguiente:

#### **Excedente del consumidor (EC).**

Del modelo seleccionado, se desprende la ecuación para las curvas de demanda donde el área bajo la curva es el Excedente del consumidor<sup>15</sup>. El área se calculó por medio de la integral de la función logarítmica, con ayuda del programa Derive versión 6.0 en español

#### **Excedente del consumidor individual (ECI).**

Se obtuvo dividiendo el valor del excedente del consumidor (EC) entre el número total de entrevistados (n).

$$ECI = EC/n$$

#### **Excedente del consumidor anual total (ECAT)**

Con el dato anterior se encontró el valor del Excedente del consumidor anual total (ECAT), multiplicándolo por el número de personas que visitan la laguna por un año. La fórmula se muestra a continuación:

$$ECAT = ECI * 12$$

#### **Valor del disfrute (VALDISF).**

Por último, se calculó el la variable valor del disfrute (VALDISF); es decir con lo que las personas entrevistadas creen que vale el disfrute. Para esto, se elaboró la gráfica de regresión lineal, y como el ajuste es a una recta se convierte en un triángulo, se calculó el área bajo la línea; base por la altura (coordenada de origen) dividido entre dos; lo que se obtiene es el excedente del consumidor (EC). Luego se calcula el valor individual del excedente del consumidor de la misma forma que en el anterior; y por último, se multiplica el valor encontrado por la población que visita el lugar en el año.

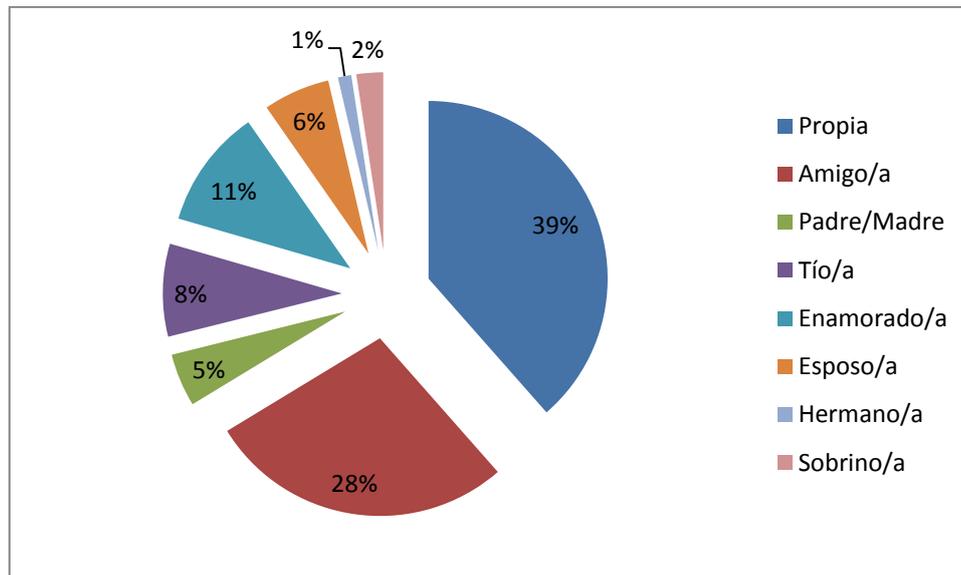
$$VALDISF = ECI * N^{\circ} \text{ VISITAS (año)}$$

## RESULTADOS

Se aplicaron 83 encuestas a las personas que venían a visitar la laguna y se encontró que ofrecen 14 tipos de servicios ambientales (Tabla 1), que la idea de acudir a la Laguna fue mayormente propia (Fig. 2).

**Tabla 1.** Bienes y servicios ambientales de la Laguna Conache, La Libertad (Perú)

Bien ambiental	Servicio ambiental
Provisión de agua	Almacenamiento de agua
Flora	Abastecimiento de agua de riego
Fauna	Control de inundaciones
	Recreación y turismo
	Recambio del agua subterránea
	Apoyo a ecosistemas externos
	Estabilización micro climática y costera
	Belleza escénica
	Retención de sedimentos y nutrientes
	Reservorio de biodiversidad
	Toma fotográfica
	Navegación
	Sustento de la productividad biológica
	Asiento de organismos migratorios



**Fig. 2.-** Porcentaje de respuestas a la pregunta sobre la idea ir a la Laguna Conache, La Libertad (Perú)

Se encontró, asimismo, que el 11.8% de entrevistados indicaron que se debe de implementar los guías turísticos y un porcentaje similar (11.4%) que debe haber diferentes instrumentos de pesca en el local (Fig. 3), como parte de la mejora y que las actividades realizadas dentro de la laguna (Fig. 4) son en su mayoría los paseos en bote (28%) y las caminatas (24%)

La Fig. 5 muestra la tendencia del consumo de los visitantes a la laguna, en su mayoría disfrutaban de un almuerzo (22.4%), seguido por la compra de bebidas que lo acompañe (18.2%) y la Fig. 6, que la mayoría de los entrevistados consideran que los principales servicios que ofrece la laguna de Conache es su belleza escénica o paisaje (28.81%), seguido de aire puro (16.53%).

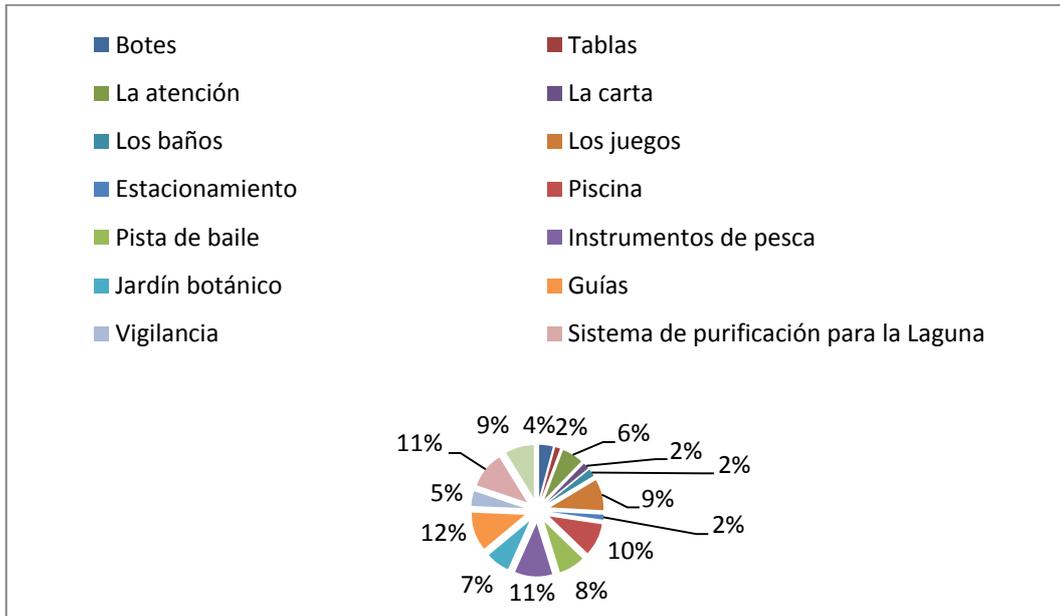


Fig. 3.- Porcentaje de respuestas a la pregunta sobre la implementación o mejora de servicios en la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

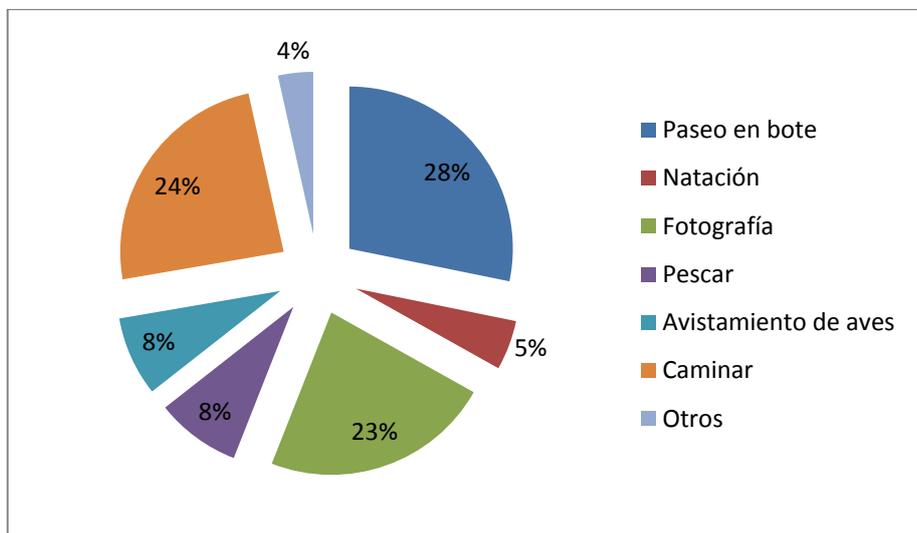


Fig. 4.- Porcentaje de respuestas a la pregunta acerca de las actividades realizadas en la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

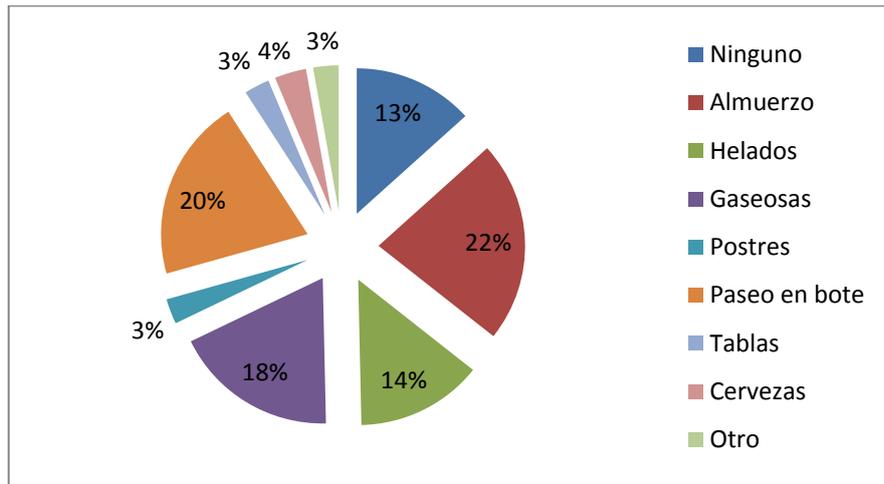


Fig. 5.- Porcentaje de respuestas a la pregunta acerca de los gastos realizados en la Laguna Conache, La Libertad (Perú) .

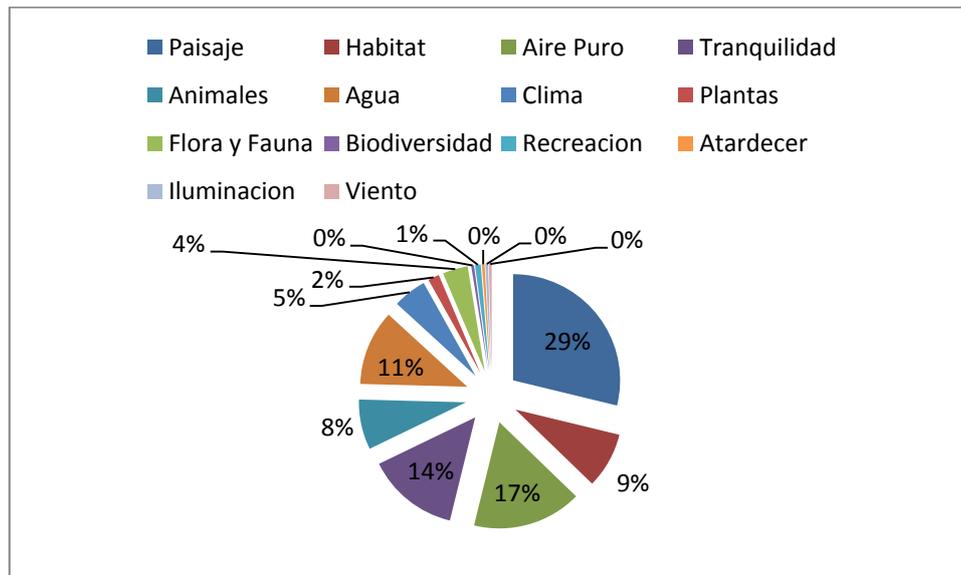


Fig. 6.- Porcentaje de respuestas a la pregunta acerca de los servicios más relevantes que consideran las personas que ofrece la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

Cuando se analizó la frecuencia de visitas a la laguna, se encontró que la mayoría de personas (54.22%) visitaron el lugar por primera vez, mientras que el 33% lo hicieron con distinta frecuencia (Fig. 7), mientras que el mayor porcentaje de entrevistados consideran más relevante en la laguna su paisaje (42%) conjuntamente con sus aguas (46%) (Fig.8).

La Fig. 9 muestra que el 98.80% de las personas piensan regresar de nuevo a la laguna; mientras que solo el 1.20% piensa lo contrario y la Fig. 10 muestra que la presencia de mujeres concurrentes a las zona de estudio es mayor que la de los hombres, con un 54.22% y un 45.78%, respectivamente, que los jóvenes entre 21 y 25 años son los más frecuentes visitantes (43.4%) seguidos por el intervalo inmediatamente superior de 26 a 30 año, con 21.7% (Fig. 11), que la mayoría eran solteros (69%) y tenían instrucción superior (Figs. 12 y 13).

Al mismo tiempo, se observó que en su mayoría (31.3%) de visitantes no trabajan cotidianamente (Fig. 14), de los que trabajan lo hacen cumpliendo las ocho horas de Ley (Fig. 15), que la mayoría son de bajos recursos económicos (Fig. 16)

En otro aspecto, la mayoría le dieron una buena valoración a la guas de la laguna (Fig. 17) y estuvieron dispuestos a pagar, en su mayoría, entre 5 y 20 nuevos soles para cumplir con llevar a cabo el plan de conservación –DAP-(Fig. 18)

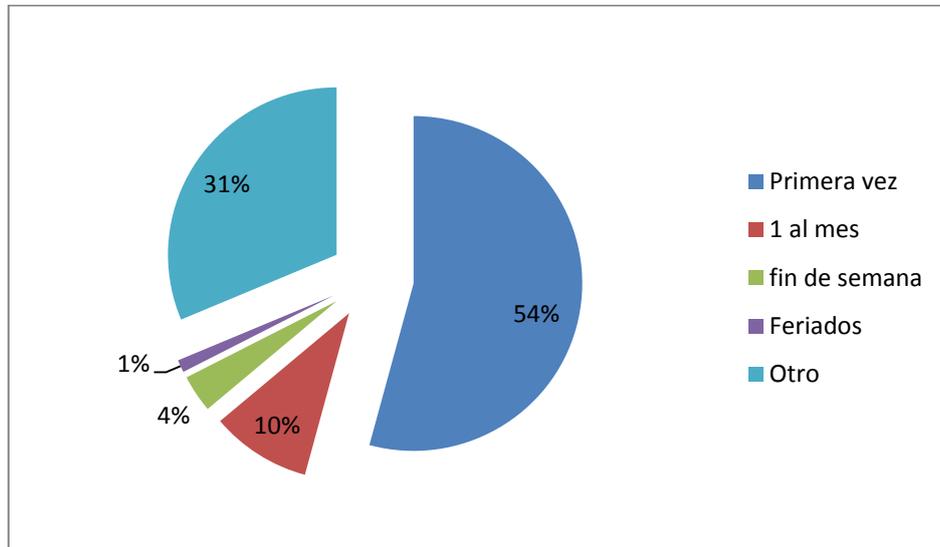


Figura 7.- Porcentaje de respuestas a la acerca de la frecuencia de visita a la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

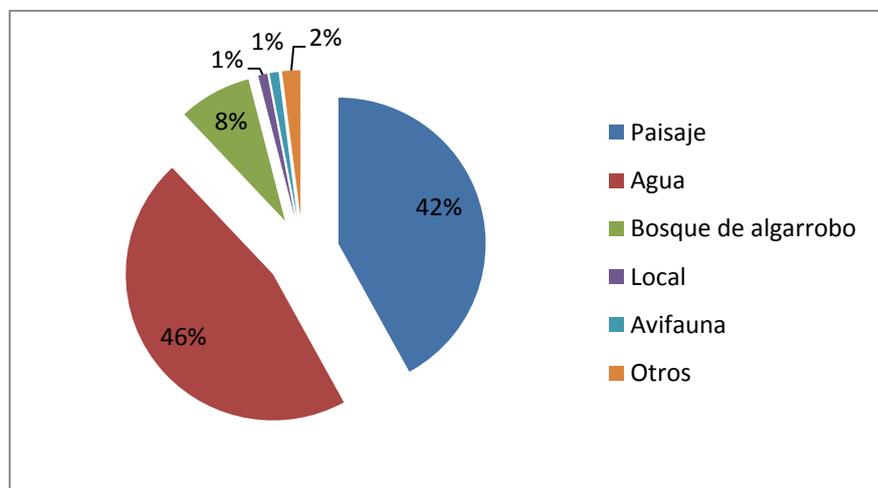


Fig. 8.- Porcentaje de respuestas acerca de los aspectos mas relevantes de la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

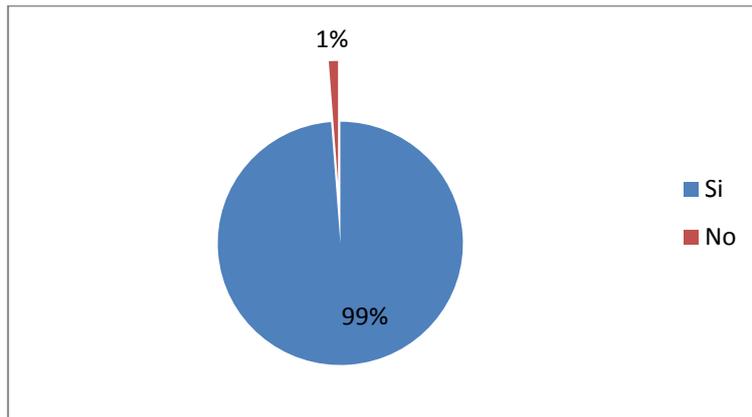


Fig. 9.- Porcentaje de respuestas sobre su opinión si volverían o no a la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

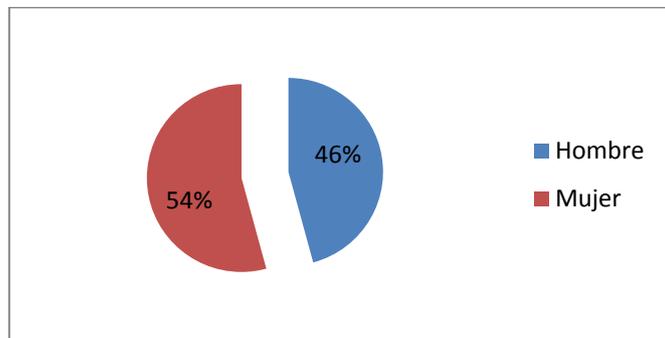


Fig. 10. Porcentaje de hombres y mujeres entrevistados en la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

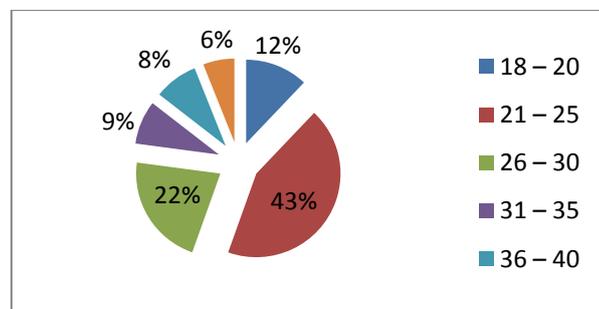


Fig. 11. Porcentaje de los rangos de edad de las personas entrevistados en la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

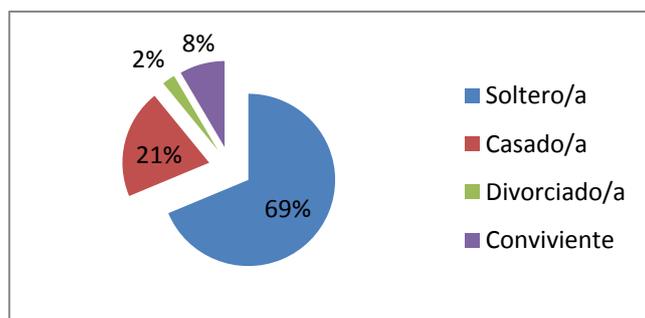


Fig. 12. Porcentaje del estado civil de las personas entrevistadas en la Laguna Conache, la Libertad (Perú).

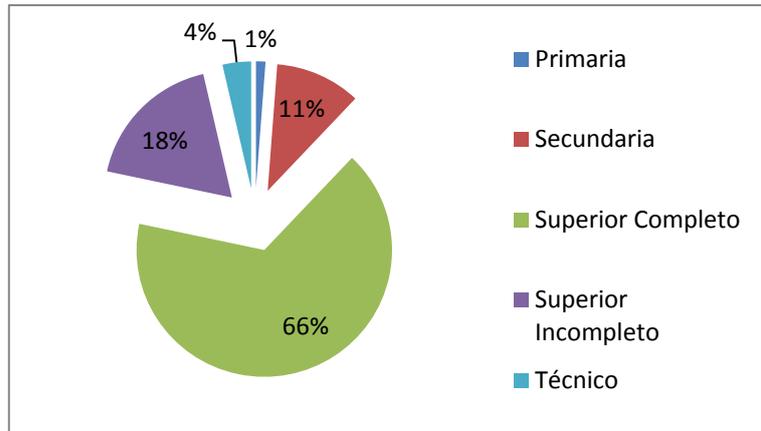


Fig. 13. Porcentaje del nivel educativo de las personas entrevistadas en la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

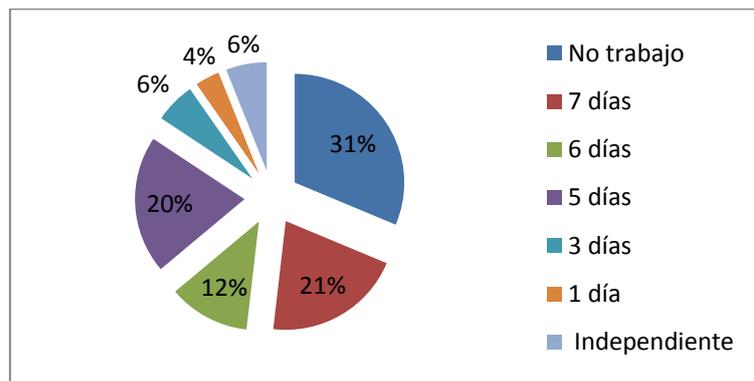


Fig. 14. Porcentaje del nivel educativo de las personas entrevistadas en la Laguna Conache, la Libertad (Perú).

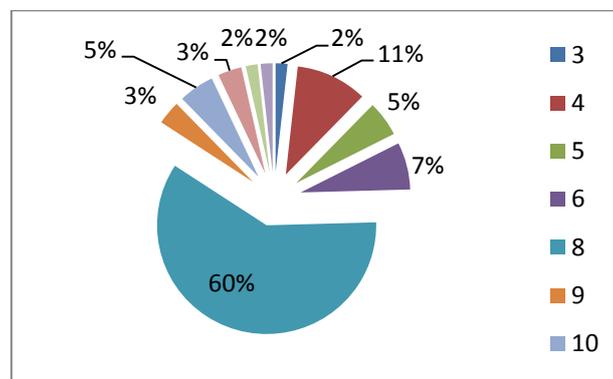


Fig. 15. Porcentaje del número de horas diarias que las personas entrevistadas que visitaron la Laguna Conache, La Libertad (Perú) trabajan.

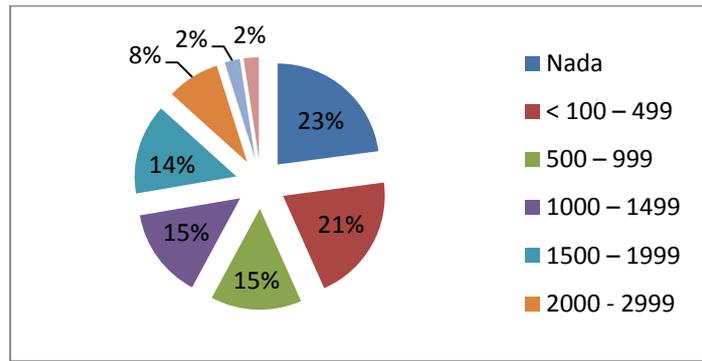


Fig. 16. Porcentaje de ingresos de las personas entrevistadas que visitaron la Laguna Conache, La Libertad (Perú)

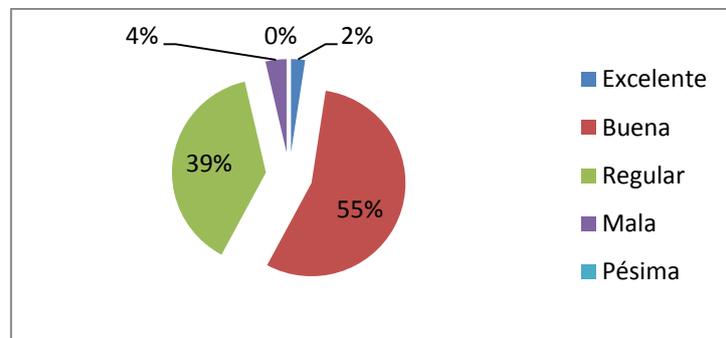


Fig. 17.- Porcentaje de respuestas acerca de su opinión sobre la calidad del agua de la Laguna Conache, La Libertad (Perú).

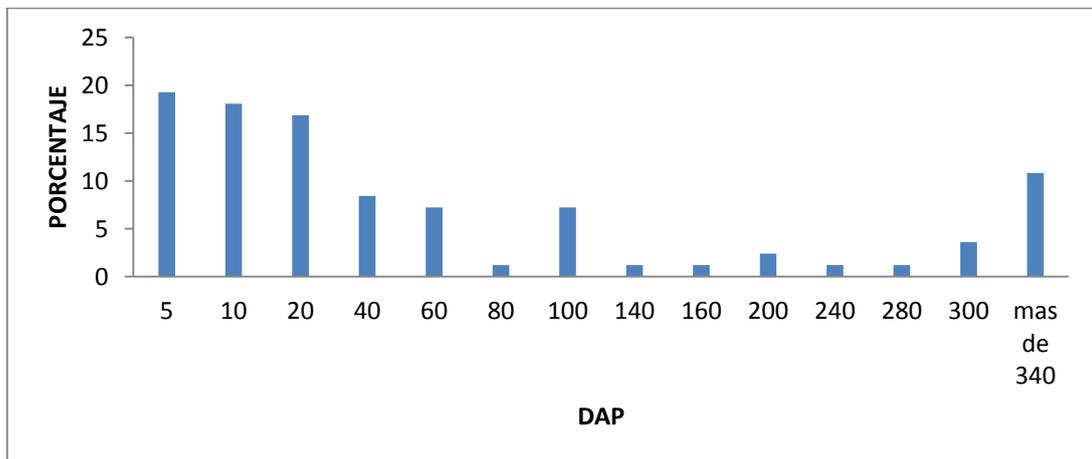


Fig. 18.- Distribución en porcentajes de la disposición a pagar para llevar a cabo el plan de conservación (DAP) de la Laguna Conache, La Libertad (Perú).



**Tabla 2.** Estadísticos descriptivos de la DAP.

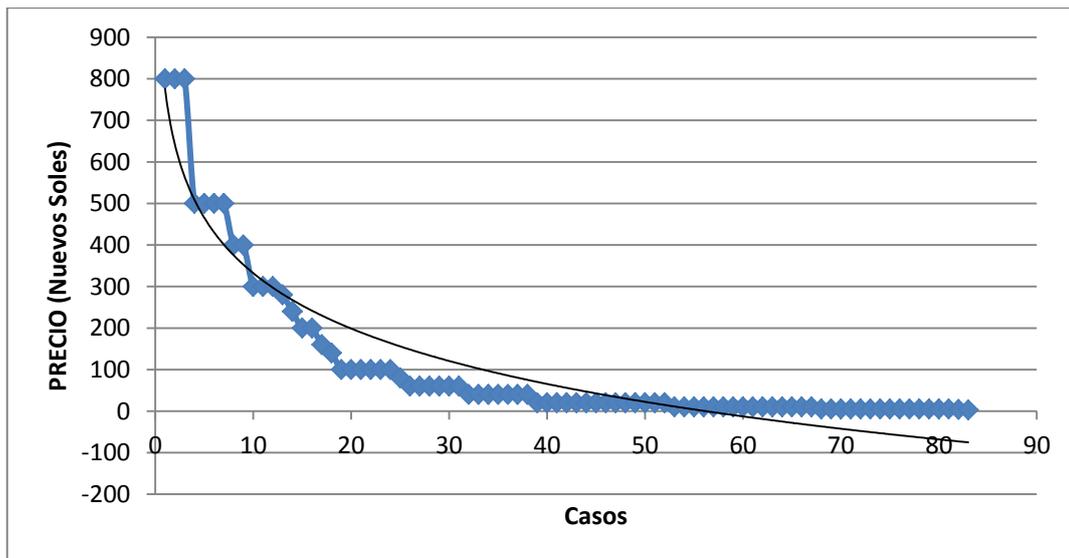
Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
5	800	110.24	187.06

La Tabla 2 muestra que el valor promedio que estarían dispuestos a pagar los visitantes a la laguna de Conache es de 100.24 nuevos soles, encontrando un valor máximo de 800, con una desviación estándar de 187.06 nuevos soles.

**Tabla 3.** Modelos estadísticos para la DAP indicando su valor de R<sup>2</sup>.

Modelo	Expresión	R <sup>2</sup>
Lineal	$y = -5.6828x + 348.88$	0.536
Logarítmico	$y = -192.5\ln(x) + 775.76$	0.8946
Polinómica	$y = 0.2019x^2 - 22.638x + 589.05$	0.846

La Tabla 3 muestra la comparación de los diferentes modelos, encontrándose que el logarítmico es el que se ajusta más a los datos obtenidos, con un valor de R<sup>2</sup> de 0.8946 y la gráfica es la que sigue:



**Fig. 19.** Curva de la disposición a pagar (DAP) de los entrevistados en la laguna Conache, La Libertad (Perú).

La ecuación de la curva de demanda es la siguiente:

$$y = -192.5\ln(x) + 775.65$$

El excedente del consumidor (EC) se obtuvo de la aplicación integral a dicha función.

$$\int_0^{83} (192.5 \cdot \ln(x) + 775.76) dx$$

**Tabla 4.** Valores del EC y ECI para el cálculo de DAP.

EC	ECI
----	-----

9 714.24	117.039
----------	---------

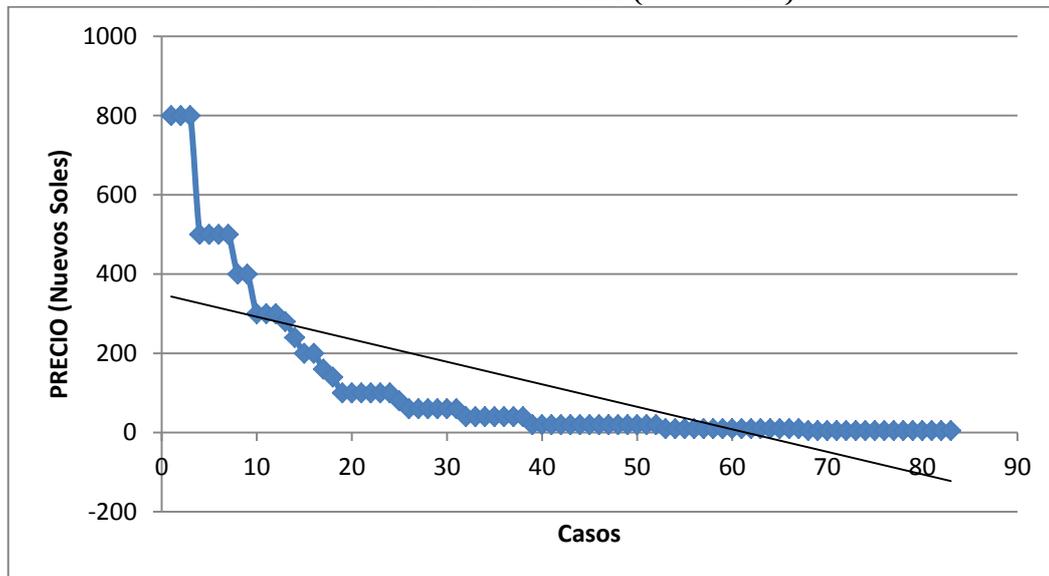
La Tabla 4 muestra el EC, resultado de la integral con su forma individual (ECI) y la Disposición A Pagar (DAP) en nuevos soles.

**Tabla.** Valor anual de la laguna de Conache.

Valor anual
2 808 937.66

La Tabla 5 muestra el valor anual que las personas darían por conservar el ecosistema.

### 1.1.1 Valor del Disfrute (VALDISF).



**Fig. 20.** Curva de demanda de lo que los entrevistados valoran como servicio del disfrute (VALDISF).

**Tabla 6.** Valores del EC y ECI para el cálculo del VALDISF

EC	ECI	VALDISF
14 475.615	174.405	4 185 720.00

La Tabla 6 muestra el Excedente del Consumidor (EC), resultado del área bajo la línea con su forma individual (ECI) y el valor del disfrute (VALDISF) en Nuevos Soles.

## DISCUSIÓN

La laguna Conache es un humedal, esto es por lo sujeto de las disposiciones en el texto de la convención Ramsar<sup>16</sup>, en el que se aplica un criterio amplísimo para determinar humedales. En su primer párrafo del artículo 1 menciona que son extensiones de marismas, pantanos o turberas cubiertas de agua, sean estas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros. Además, en el primer párrafo del artículo 2, estipula que los humedales podrán comprender zonas ribereñas o costeras adyacentes, así como las islas o extensiones de agua marina de una profundidad superior a los seis metros en marea baja cuando se encuentren dentro del humedal.



Estas disposiciones hacen que la convención se aplique a muchos tipos de hábitat, con inclusión de ríos, aguas costeras poco profundas e inclusive a los arrecifes de coral, pero no a la alta mar.

Este ecosistema (laguna de Conache) nos provee bienes y servicios ambientales como los identificados en el trabajo (belleza escénica, flora, fauna, leña, biodiversidad, entre otros), todo esto enfocado a la recreación<sup>1</sup>, en donde las múltiples funciones bioecológicas y socioeconómicas que desempeñan los ecosistemas han dinamizado la recreación al aire libre en las economías Locales, Regionales y Nacionales al satisfacer una de las crecientes necesidades del ser humano.

Al realizar la primera encuesta de preguntas abiertas, se presentaron una serie de dificultades que se fueron resolviendo en el camino. Se consideró evitar las preguntas con cálculos, evitar la calificación, las preguntas de plazos muy largos de tiempo, evitar las preguntas que motiven a la opinión del público, tener secuencia entre las preguntas y colocar algunas preguntas en rangos (la edad e ingresos).

En relación a la entrevista se tuvo que considerar a cada persona ignorante sobre el tema de conservación, no se pronunció ninguna opinión personal con el fin de no influenciar sobre la respuesta del entrevistado, así mismo, no se mencionó información alguna que no estuviera en la encuesta.

El mayor porcentajes de los entrevistados indicaron que fue de ellos la idea de visitar la laguna de Conache (38.55%), esto influye en su disposición a pagar y por lo general es mucho mas elevada a comparación de los que visitaron el lugar convencidos por algún amigo (27.71%), miembro familiar, su pareja, etc. Sin embargo, este porcentaje (38.55%) es muy bajo frente al 61.45% de quienes vienen por idea de otros, lo que disminuye su valoración.

Respecto a los servicios para mejorar o implementar en la zona de estudio, hay una tendencia en la implementación de nuevas actividades, como son los guías (11.79%), compra de artes de pesca (11.41%) y el plan de conservación de la laguna (11.03%), esto frente al menor porcentaje de personas que apoyan a la mejorar los servicios existentes, es un indicador que, los servicios actuales, que no son de excelente calidad, pero son buenos y las personas se sienten satisfechas de alguna forma. Es mas estos resultados podrían motivar a la inversión para la implementación de las actividades mencionadas.

Por otro lado, una de las actividades realizadas en la laguna de Conache como es el típico paseo en bote presenta el mayor porcentaje con 28%, esto es un reflejo de que las personas les agrada esta actividad y de ahí su satisfacción. También se observa el bajo porcentaje de los visitantes que vienen a pescar (8%), esto podría deberse a que en sitio carecen de instrumentos para realizar dicha actividad, sin embargo por el alto porcentaje de personas que desean que implemente estos instrumentos de pesca, se podría mejorar en su porcentaje. Esto generaría un negocio de alquiler o ventas de instrumentos de pesca.

Y dentro de los consumos que genera la laguna esta en su mayoría en almuerzos (22.38%), en bebidas (18.18%) y helados (13.99%), esto debido a que la mayoría de personas cuando visitan la laguna se quedan hasta el atardecer y con el calor, típico de una zona de campo, incentivan al consumo de bebidas como gaseosas e hidratantes, y no al consumo de cerveza (3.5%), muy a parte que los encargados del local dejan de vender cervezas si es que observan un consumo excesivo de ella.

El alto porcentaje (28.81%) de personas que consideran el paisaje como el principal atractivo de la laguna, se puede deber a que es lo primero que observan las personas, y van revelando otros servicios a medida de que pasa el tiempo. Acá se produce el típico sesgo de orden, cuando se mencionan varias opciones, la alternativa que más se marca es aquella que aparece en los primeros lugares o lo que sea lo primero que se observe del lugar. Como ha sido mencionado<sup>15</sup>, este tipo de problemas se puede evitar diseñando bien las preguntas y recordar a los entrevistados, a lo largo de la entrevista, que son muchos los servicios ofrecidos por el ecosistema de la laguna. Sin embargo Boyle et al<sup>17</sup>. mencionan que este tipo de situación aparece en quienes no han tenido una experiencia previa con el bien, pero no entre quienes ya están familiarizados con en el bien. Es por ello, que se considero importante incorporar la pregunta 6 en el cuestionario (ver anexo 02), que pregunta acerca de la frecuencia de visita; no obstante la mayoría (54.22%) fueron personas que visitaron la laguna por primera vez y no tenían familiaridad con el bien a valorar, por lo que explica el porcentaje encontrado.

Lo que las personas consideran más relevante son: el paisaje (42%) y las aguas (46%) de la laguna, corresponde como ya había mencionado a los aspectos más fáciles de observar, es por ello su alto porcentaje. Así mismo, se muestra que solo el 1% considera relevante a la avifauna y al local, esto podría deberse al hecho que como la mayoría de las personas visitaban el sitio por primera vez, y que la



entrevista se realizó por lo general antes de las 05:00 pm (hora que empiezan a llegar las aves a la laguna), las personas no apreciaron ese evento por lo cual lo dejaron de lado.

Por otro lado, el 98.80% de las personas piensan en regresar a la laguna, esto podría ayudar en un estudio posterior ya que este gran porcentaje ya estará familiarizado con la laguna; que hay que mencionar no tiene mucha publicidad y que poco a poco se ha ido dando por conocido, e incluso aun varios personas de mi alrededor no conocen este lugar o si saben de él, nunca han ido.

Respecto a la calidad del agua de la laguna, que es como se ha visto por los resultados el atractivo principal, la mayoría de entrevistados consideraron que estaba entre buena y regular, 55.42% y 38.55%, respectivamente. Esto refleja lo que indico Ponce (2012), quien realizó un estudio sobre la calidad de agua en la laguna de Conache, llegándose a la conclusión de que el estado de la laguna es aceptable para el uso recreacional. Por otro lado, solo el 3.61% menciona que el estado del agua de la laguna esta en malas condiciones, esto es probablemente debido a que a las orillas de la laguna crece demasiada flora, y por el material orgánico se queda atascado generando malos olores, y formándose una película blanca, esto podría haber sido objeto a juicio por los entrevistados que dieron tal opinión.

El método de valoración contingente determina un valor económico aproximado en nuevos soles, midiendo los cambios en el bienestar de la persona por el incremento en la calidad de la laguna de Conache (mercado hipotético). Este valor se expresa como la cantidad que pagarían los visitantes por un bien (DAP). Esto nos permite, como considera Azqueta<sup>15</sup>, tener una herramienta útil que mida el bienestar de las personas y que permita compararlo con otros componentes del mismo. Es así que ahora la tendencia es tener a la mano esta herramienta en el momento de tomar decisiones en cuestiones de aprobación de proyectos; puesto que se sabe que actualmente los proyectos están orientados a un beneficio económico a corto plazo; y si a esto le sumamos la poca importancia que se le da a la valoración económica en nuestro País, es obvio que solo se tomaran decisiones basadas en señales de mercado, favoreciendo los proyecto basados únicamente en su rentabilidad económica<sup>18</sup>.

Las personas que visitan la laguna de Conache están dispuestas a pagar como promedio individual S/. 110.24 nuevos soles para la conservación de la laguna. se puede entender que cuando a la persona paga por determinado bien trata siempre que sea lo menos posible e incluso cuando se les pregunta por la máxima cantidad de dinero que aportaría tratan de aumentarlo pero solo el mínimo.

Por lo expresado, el valor anual de los bienes y servicios ambientales que hacen uso las personas que visitan la laguna de Conache es de S/. 2 808 937.66 nuevos soles y el valor anual del disfrute de la laguna es de S/. 4 185 720.00 nuevos soles. Esta diferencial se debe a que a las personas se les esta pidiendo que paguen por algo, a pesar de que sea por el bien del ecosistema a las personas no les agrada mucho la idea de "Perder" dinero; en cambio cuando se refieren al valor de su disfrute su valoración es mayor pues a las personas se les esta sugiriendo un valor de eso y no se esta hablando de pago alguno.

Por otro lado, existe controversia entre la diferencia de la DAP y la DAC (disposición a aceptar compensación), esto es porque en la DAP cada persona manifiesta su valor de acuerdo al nivel de sus ingresos, a medida que su nivel de ingresos aumentan su disposición también. Por otra parte, la DAC suele ser más elevada que la DAP, esto debido a que las personas, como son las que van a determinar ese valor, ven su beneficio e intentan apuntalar siempre al valor más alto. Ahora bien, en el informe de la comisión NOAA<sup>18</sup>, hecho público en enero de 1993, indica que la polémica se basa en que los valores que se obtienen son distintos cuando la pregunta se formula en unos términos o en otros, y a pesar de que el informe fue claramente favorable a la utilización del método de valoración contingente, recomendaba una serie de medidas bastantes estrictas en su diseño y aplicación. En el peor de los casos, la DAC indica un límite inferior de valoración. Entre estas recomendación Azqueta<sup>15</sup>, hace mención a que se debe de preguntar por la DAP aun cuando la compensación exigida sea la variable teóricamente correcta, ya que ello minimiza el riesgo de sobrestimación en las respuestas. De igual manera, Riera et al<sup>11</sup> explica que si una persona esta disfrutando de un bien público y se le propone disfrutar de más unidades, seria natural que su DAP se ubique entre estos dos puntos, y que la DAC también se ubique en el mismo tramo cuando la situación es inversa. Así mismo, Garibotto<sup>19</sup> indica que en algunos casos la DAP es cinco veces mayor que el valor de la DAC para un mismo bien.

Sin embargo, la teoría económica explica claramente que las variables aplicadas no tienen por qué ser iguales o similares. Es por ello que es fundamental plantear el escenario de evaluación lo mejor posible, tratando de disminuir sesgos. El análisis socioeconómico es de vital importancia, puesto que



influye en la determinación de la DAP así como las variables relevantes, consideradas en el trabajo, relacionadas con el medio ambiente.

El método de la valoración contingente se relaciona con el momento que esta puede realizarse, permitiendo valorar cambios en el bienestar de las personas antes de que se produzcan; puede así mismo obtener valores ex – post para ver la disposición a pagar en seguir disfrutando de determinado bien como contrastes con los métodos indirectos, que miden la valoración de los bienes a posteriori, o sea una vez consumidos.

El porcentaje de hombres (45.78%) y mujeres (54.22%) que visitan la laguna de Conache no difiere mucho, esto es debido a que, en la laguna concurre mayormente parejas de enamorados o grupos de familia, por lo que los porcentajes son similares.

Con respecto a la edad, todos fueron mayores de 18 años, comprendidos entre los 18 a 50 años de edad, la mayoría de ellos, jóvenes entre 21 a 30 años, por lo que en el lugar se practica deportes como el sandbording, futbol, largas caminatas, entre otros deportes. Por otro lado, se observa la nula presencia de personas de la tercera edad probablemente a que se les es más difícil y pesado de llegar, e incluso en la laguna los vientos fuertes pueden afectar a su salud.

El mayor porcentaje de los entrevistados eran solteros (68.67%), esto corresponde al elevado porcentaje de jóvenes que no superan los 30 años y se refleja al observar que concurren a la laguna con sus enamorados (as).

Se observó un elevado porcentaje (66.27%) de personas con estudios superiores, lo que puede indicar que presentan un cierto nivel de conocimiento en relación a temas ambientales y de conservación, lo que es fundamental para entender los objetivos del trabajo, por lo que su valoración es mucho mayor de aquellas que muestran desinterés en temas de conservación debido a la ignorancia que muestran.

Por otro lado, el 70.61% de los entrevistados están actualmente trabajando; donde el mayor porcentaje (59.65%) trabajan sus ocho horas diarias; y un 31.33% no trabaja, esto es indicador que como el mayor porcentaje eran jóvenes entre los 21 a 25 años y como recién están terminando la universidad les cuesta mayor esfuerzo en establecerse en un trabajo. Por su parte, al haber mayor porcentaje de entrevistados que están trabajando también hay un porcentaje elevado (79.52%) de quienes perciben un ingreso, y el porcentaje menor de 2.41% que ganan entre 3000 a 4999 nuevos soles, se debe al porcentaje menor de entrevistados (8.43%) que tienen entre 31 a 40 años, quienes probablemente sean estables en su trabajo permitiéndoles ascender a puestos superiores y con mejor sueldo.

## CONCLUSIONES

- Los principales bienes y servicios ambientales fueron: en general fauna, flora, provisión de agua, almacenamiento de agua, abastecimiento de agua de riego, control de inundaciones, recreación y turismo, recambio del agua subterránea, apoyo a ecosistemas externos, estabilización micro climática y costera, belleza escénica, la navegación, toma de fotos, sustento de la productividad biológica y asiento de organismos migratorios.
- El valor económico anual de la disposición a pagar de los visitantes a la laguna de Conache fue de S/. 2 808 937.66 nuevos soles, con una media individual de S/. 110.24 nuevos soles; encontrándose un valor máximo de 800 nuevos soles.
- El valor del disfrute anual fue de S/. 4 185 720.00 nuevos soles.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez J. Valoración Contingente y Costo de Viaje aplicados al área recreativa Laguna de Mucubají. *Economía* 2008; 33(26): 119-150.
2. Alfageme A. Importancia de la Valoración Económica de los Recursos Naturales. Introducción. Lima. BCRP. 2006.
3. Lomas P, Martín B, Louit C, Montoya D, et al. Guía práctica para la valoración económica de los Bienes y servicios ambientales de los ecosistemas. Fundación Interuniversitaria Fernanda González Bernáldez. España. 2005.



4. Barbier E, Dereman M, Knowler D. Valoración económica de los humedales, guía para decisores y planificadores. Oficina de la convención de Pensar: Suiza. 1997.
5. Sarmiento M. Desarrollo de un nuevo método de valoración económica ambiental. Tesis doctoral. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid. España. 2003.
6. Carson R. Contingent Valuation: A user's guide. Discussion Paper 99 – 26. Department of Economics. University of California, San Diego. 1999.
7. Augusta M, Gonzáles Y. Valoración económica del paisaje para la gestión sostenible del área de Playa Puerto Viejo, municipio Gómez, estado de Nueva Esparta. Venezuela. Gestión turística 2010; 13: 63-91.
8. Sarmiento M. Valoración económica ambiental de servicios recreativos del lago de Termas de Río Hondo, Santiago del Estero. Método de valoración contingente versus método del costo del viaje. En: 2da Jorn Asoc Argentino-Uruguay Econ Ecol. Universidad Nacional de Luján Argentina 2004; p.83
9. Mincetur. Sitios naturales. Cuerpo de agua. Laguna. Laguna de Conache. Ruta de acceso. Perú. 2010 Disponible en:  
[http://www.mincetur.gob.pe/TURISMO/OTROS/inventario%20turistico/Ficha.asp?cod\\_Ficha=4638](http://www.mincetur.gob.pe/TURISMO/OTROS/inventario%20turistico/Ficha.asp?cod_Ficha=4638).
10. Lucy M. Conache, Pueblo Mochica. Trujillo – La Libertad. 2009. Disponible en: <http://www.absolut-peru.com/conache-pueblo-mochica/>
11. Riera P. Manual de valoración contingente Para el instituto de estudios fiscales. 1994. Disponible en: <http://pagines.uab.cat/pere.riera/sites/pagines.uab.cat.pere.riera/files/manualcvm2.pdf>.
12. Sandboarding Perú. 2010. Conache, información geográfica. Disponible en: <http://trujillo.sandboardperu.com/conache.html>.
13. Pérez C, Pari R. Población y muestra. Metodología de la investigación. Escuela profesional de ingeniería económica. Universidad nacional del altiplano – Puno. 2011. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/63990567/Metodologia-de-La-Investigacioj-Poblacion-y-Muestra>.
14. Riera P, Dolores G, Kriström B, Runar B. Manual de economía ambiental y de los recursos naturales. Editorial Thomson. Unigraf, S.L, Móstoles – Madrid, España. 2005. Disponible en: [http://books.google.com.pe/books?id=0qbfSFDIeBwC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_vpt\\_bu#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.pe/books?id=0qbfSFDIeBwC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_vpt_bu#v=onepage&q&f=false).
15. Azqueta D. Valoración económica de la calidad ambiental. Universidad de Alcalá de Henares. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 1994.
16. RAMSAR. Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional, Especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas. Compilación de Tratados de las Naciones Unidas N° 14583. Modificada según el Protocolo de París, 3 de diciembre de 1982, y las Enmiendas de Regina, 28 de mayo de 1987. 1971. Disponible en: [http://www.ramsar.org/cda/es/ramsar-documents-texts-convention-on/main/ramsar/1-31-38%5E20671\\_4000\\_2\\_](http://www.ramsar.org/cda/es/ramsar-documents-texts-convention-on/main/ramsar/1-31-38%5E20671_4000_2_).
17. Boyle K, Welsh M, Bishop R. The Role of Question Order and Respondent Experience in Contingent – Valuation Studies. J Environ Econ & Manag 1999; 35: 54-62.
18. Guerrero N, Sarmiento M, Arraiza M. Uso y valoración de plantas medicinales y tintóreas presentes en Santiago del Estero, Argentina. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes. Proyecto fin de carrera. 2008.
19. Garibott S. Valoración económica de bienes ambientales y su inclusión en un análisis de costo – beneficio. Maestría en economía internacional, opción Economía Ambiental. Departamento de Economía, Facultad de Ciencias Sociales, Universidad de la República, Uruguay. 1999.



## Nota para los autores

La revista REBIOLEST es un órgano oficial de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, que publica, en español y en formato virtual, investigaciones realizadas por los estudiantes y tesis, relacionadas con las diferentes disciplinas de estas ciencias. Se admiten informes de investigaciones descriptivas, explicativas o bibliográficas, de aquellas básicas o aplicadas, siempre que constituyan aportes a la ciencia.

La recepción de trabajos es continua y la prioridad en las publicaciones se establece en base al orden que fueron aceptados, luego de ser sometidos al arbitraje por pares. La periodicidad de la publicación es de un Volumen anual constituido por dos números.

Los **Artículos Originales** están orientados al registro de hechos o fenómenos y al desarrollo de conceptos (generalizaciones, leyes, teorías), las **Notas Científicas**, o artículos cortos, son informes sobre asuntos específicos que aportan al conocimiento, pero no necesariamente al desarrollo de conceptos, cuyos resultados son difícilmente verificables, debido a que corresponden a hechos muy esporádicos en los que la muestra es difícil de volver a encontrar (nuevos métodos, técnicas o aparatos que por razones de propiedad intelectual no pueden repetirse, también pueden redactarse de esta manera). Las **Monografías o Revisiones**, por su parte, son artículos críticos en los que se reúnen, analizan y discuten informaciones ya publicadas y relativas a un solo tema.

Siguiendo normas gramaticales, de puntuación, de escrituras de nombres científicos, de abreviaciones y de escritura de símbolos químicos de aceptación universal, la redacción deberá hacerse de modo impersonal en una extensión máxima de 20 páginas para los Artículos Originales, 10 para las Notas Científicas y 30 para las Monografías. El tipeado deberá hacerse a espacio y medio, en papel Bond de 80g, A4, con márgenes de 2,5cm a cada lado y los informes, por duplicado acompañados de la versión grabada en CD, podrán ser presentados en Mesa de Partes de la Facultad de Ciencias Biológicas (Campus universitario de la Universidad Nacional de Trujillo, Av Juan Pablo II s/n, Trujillo, Perú).

Los Artículos Originales deberán estructurarse como sigue: título (sin abreviaturas, símbolos químicos, ni autores de taxa científicos), auto(es), dirección(es), resumen, abstract (ambos en aproximadamente 200 palabras y con palabras clave y key words de seis, como máximo), introducción, material y métodos, resultados, discusión, agradecimientos (opcional y sólo para los que han aportado significativamente con la investigación), referencias bibliográficas, Tablas y/ o figuras (opcional y con su leyenda).

Las Notas Científicas deberán tener la misma estructura que los Artículos Originales, con la diferencia que a partir de la introducción la redacción deberá ser continuada, sin separarse una parte de la otra, a excepción de las referencias bibliográficas. Los Artículos de Revisión, por su parte, deben contener: título, autor(es), dirección(es), tabal de contenido, introducción, tópicos de revisión, conclusión, reconocimientos (opcional), referencias bibliográficas, Tablas y figuras con sus correspondientes leyendas (opcional).

Las citas de los autores deberán hacerse utilizando números, a modo de superíndice, separados por comas y las referencias deberán enumerarse de acuerdo al orden de aparición en el texto y deberán ser estructuradas siguiendo Las Normas Vancouver.

Formalmente, las Tablas deberán tener solamente líneas horizontales, un título claro, completo y entendible sin necesidad de recurrir al texto y con esta denominación numerada con números arábigos, por ejemplo: Tabla 1. Las llamadas o notas de pie de Tabla se harán mediante letras como exponentes en orden alfabético o con asteriscos, en caso que sean una o dos.

Las figuras, que incluyen gráficas, fotografías y/o esquemas, deberán abreviarse como **Fig.** y numerada, por ejemplo **Fig. 1.**, seguida de un título claro y entendible por sí mismo.

El Comité Editorial se reserva el derecho de rechazar los artículos cuando: (i) hayan sido sometidos, aunque sea en parte, a otro medio de difusión, (ii) el informe de uno o ambos árbitros descalifican la calidad del artículo y (iii) cuando se considere invalorable el aporte científico. Al mismo tiempo, el Comité se reserva el derecho de efectuar algunas modificaciones que mejoren la redacción y presentación del informe.