

INFLUENCIA DE CAMPOS MAGNÉTICOS EN LA ESPORULACIÓN DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *METARHIZIUM* *ANISOPLIAE*

*Felipe Arias Olaya**
*Natalia Ruiz Camacho***
*Giselle Rivera Pineda****

RESUMEN

El presente proyecto está encaminado a encontrar una alternativa de solución en la búsqueda de una mayor eficiencia en el proceso de producción de esporas de dos tipos de hongos entomopatógenos para el desarrollo de agentes de control biológico, mediante la exposición a campos magnéticos controlados y estables, durante tiempos definidos.

Palabras Claves: *Hongo Entomopatógeno, Metarhizium anisopliae, Agente de Control Biológico, Campos Magnéticos.*

INTRODUCCIÓN

Las plagas han sido controladas durante años mediante el empleo de plaguicidas químicos de fuerte impacto negativo sobre los organismos benéficos presentes en el ambiente. Es por eso que se están implementando técnicas más amigables como lo es el uso del control biológico, siendo esta alternativa parte fundamental de un control integrado de plagas y una alternativa que contribuye sustancialmente a la minimización de impactos ambientales y de riesgos para la salud humana.

En las investigaciones que se han realizado hasta hoy en la utilización del control biológico de plagas a partir de hongos entomopatógenos, en la mayoría de los casos se destaca un componente de gran importancia como lo es la tasa de crecimiento y esporulación de los hongos, generando un valor significativo para la producción industrial, dado a la relación mayor tasa de crecimiento, mayor eficiencia en el proceso y por ende una disminución en los costos de producción de los hongos entomopatógenos, reduciendo los tiempos

* Ingeniero Ambiental y Sanitario. Universidad Autónoma de Colombia. E-mail: felipeand414@hotmail.com, felipeand414@yahoo.com.

** Ingeniera Ambiental y Sanitaria. Universidad Autónoma de Colombia. E-mail: natar128@hotmail.com.

*** Microbióloga M.Sc. Directora del Proyecto. Docente Universidad Autónoma de Colombia. E-mail: giselariver@gmail.com

tanto en la producción como en la aplicación “in situ” del hongo como controlador.

Es así como este proyecto realizado durante el transcurso de los años 2007 y 2008 en el laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Colombia, presenta una propuesta de investigación buscando una mayor eficiencia en el proceso de producción de esporas de dos tipos de hongos entomopatógenos, exponiéndolos a campos magnéticos controlados y estables, durante un tiempo definido.

Para esto la propuesta constó de tres etapas. La primera basada en el aislamiento y selección de los hongos que fueron utilizados en el laboratorio y que actuaron de control biológico del mosquito *Culex quinquefasciatus*. La segunda etapa que consistió en la preparación del cultivo madre para cada uno de los hongos seleccionados. La tercera etapa basada en la aplicación de campos magnéticos a los hongos y que estuvo precedida por una evaluación de la esporulación de los hongos sometidos a campos magnéticos.

Para el desarrollo de este proyecto de investigación fue fundamental tomar como base los adelantos que se han realizado, en primera instancia por el Centro Nacional De Electromagnetismo Aplicado de la Universidad de Oriente, en Santiago de Cuba. Cuba¹ y en segunda instancia los avances realizados por los investigadores de la Universidad Autónoma de Colombia en el proyecto denominado “EVALUACION DE MICROORGANISMOS BIOCONTROLADORES SOBRE EL MOSQUITO *Culex quinquefasciatus*”² en donde se aislaron diferentes variedades de hongos entomopatógenos para el control biológico del *Culex quinquefasciatus*, y que fueron de ayuda para seleccionar en nuestro proyecto el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, por presentar mayor patogenicidad frente a las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

Cabe aclarar que para el control biológico de un organismo plaga es fundamental que se involucre el desarrollo de un agente de control biológico, en donde se encuentren implicados los siguientes aspectos:

- Selección de los hongos patógenos.
- Multiplicación masiva de los hongos seleccionados en laboratorio.

- Formulación del hongo para su aplicación.
- Aplicación del hongo in situ.
- Evaluación de la eficiencia in situ.

En este proyecto de investigación se pretendió estudiar la eficiencia en la *Multiplicación masiva de los hongos seleccionados en laboratorio* para el desarrollo del agente de control biológico. De ahí el interés del uso de campos magnéticos, ya que según reportes del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Santiago de Cuba, Cuba³; la exposición a campos magnéticos es una alternativa para la eficiencia en el crecimiento y esporulación del hongo que va a ser utilizado como agente del control biológico.

Es importante hacer la salvedad, que los resultados expuestos en el documento corresponden a experimentos a nivel de laboratorio, pero podrían ser implementados en campo para evaluar su viabilidad “in situ”.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Descripción del Área de Estudio:

Para el desarrollo de la investigación, se utilizaron hongos entomopatógenos recolectados en el embalse de Muña, ubicado en el municipio de Sibate – Cundinamarca.

El municipio de Sibate está situado en la cordillera oriental de los Andes a 2.574 m.s.n.m, a 4°30' latitud norte y 74°16' longitud oeste y se encuentra aproximadamente a una hora y quince minutos de la ciudad de Bogotá.

También fue parte fundamental de la investigación el uso del laboratorio de microbiología de la Universidad Autónoma de Colombia, Facultad de Ingeniería Ambiental, ubicado en la Calle 18 No. 4 - 45 de Bogotá, D.C.

2) Proceso de Aislamiento de Hongos Entomopatógenos:

Recolección de insectos muertos en el embalse del Muña.
Desinfección

¹ Fuente: **Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado Universidad de Oriente**, Memorias de diplomado Santiago de Cuba. 2005. Pág. 11

² Fuente: RIVERA PINEDA, Giselle. **Evaluación de Microorganismos Biocontroladores sobre el Mosquito *Culex quinquefasciatus***: Segundo Informe de Avance. Bogotá D.C. Octubre de 2006. Pág. 19.

³ Fuente: **Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado Universidad de Oriente**, Op. Cit., Pág. 27.

Cámara húmeda

Siembra en medios de cultivo.

Identificación. (Materiales: laminas, azul de lactofenol, claves)

3) Mantenimiento de Aislamientos

Los aislamientos de hongos se mantuvieron en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) o Papa Dextrosa Agar (PDA), a 4 C y se realizaron pases cada 45-60 días.

4) Selección de Aislamientos

Los aislamientos utilizados en el presente estudio se seleccionaron con base en los resultados obtenidos en el proyecto **Evaluación de Microorganismos Biocontroladores Sobre El Mosquito *Culex quinquefasciatus***.

5) Preparación de Cultivo Madre

Para la evaluación de la esporulación fue necesario preparar un cultivo madre, de cada uno de los hongos estudiados, como se describe a continuación.

5.1.) Hongos Aislados en el Laboratorio

- A partir de cepas madre conservadas a 4°C se prepararon cultivos madre de cada uno de los hongos estudiados.

- Las esporas se recolectaron mediante extracción. (Materiales: Pipetas, Agua Destilada Estéril, Tween 80 (0.05%).

- Se realizaron diluciones decimales de la solución de extracción. (Materiales: Tubos de Ensayo, Pipetas).

- Se procedió al conteo de esporas del hongo por medio de la cámara de Neubauer o hematocitómetro. (Materiales: Microscopio Óptico Compuesto con aumento de objetivo mínimo de 45X, Cámara de Neubauer). *Ver fotografía N 04 y N 05.*

- Ajuste de concentración de esporas.

- Siembra de volumen específico en cajas de Petri con SDA. (Materiales: Pipetas, Cajas de Petri de 9 cm de diámetro, Medio de Cultivo).

- Incubación a 25°C. (Materiales: Incubadora para microorganismos).

5.2.) Hongos Comerciales

- Se pesan 10 g de producto

- Se suspende en 90 ml de Agua con Tween 80 (0.05%)

- Se realiza diluciones decimales para facilidad del conteo.

- Se realiza la lectura en la cámara de Neubauer.

- Ajuste de concentración de esporas.

- Siembra un volumen específico en cajas de Petri con SDA.

- Incubación a 25°C

6) Evaluación de la Esporulación

6.1.) Diseño Experimental:

- Diseño factorial.

6.2.) Constantes del Experimento:

- Temperatura de incubación: 25 C.

- Exposición de los imanes: A los 7 días de incubación.

- Periodo de incubación: 13 días.

- Medio de Cultivo: SDA

6.3.) Variables del Experimento:

- Hongos Entomopatógenos:

Metarhizium anisopliae CB 990614 (insecto hospedero del orden coleóptera-larva *Premnotrypes vorax*)

Metarhizium anisopliae CB 99068 (insecto hospedero del orden coleóptera-adulto)

- Intensidad de los imanes:

800 Gauss; de característica Diámetro Externo 100 mm, Diámetro Interno 50mm, y Espesor 15mm. (*Ver Fotografía No. 01.*)

1200 Gauss; de característica Diámetro Externo 70 mm, Diámetro Interno 32mm, y Espesor 10mm. (*Ver Fotografía No. 02.*)

- Tiempo de Exposición:

15 minutos.

30 minutos.



Fotografía No. 1.

Ímán 800 Gs.

Fotografía No. 2.

Ímán 1200 Gs.

Fuente: Autores

6.4.) Tratamientos:

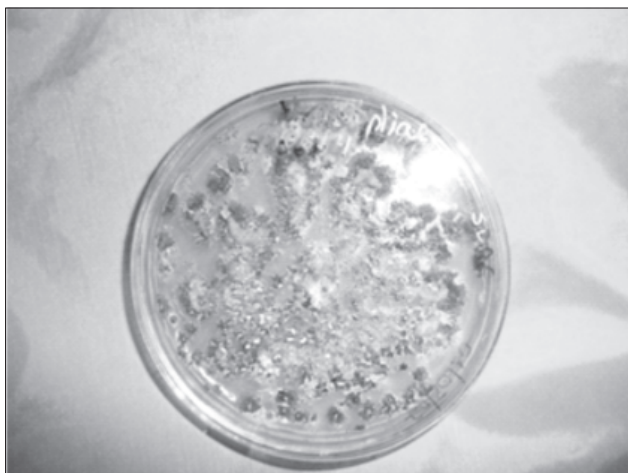
- T1. *Metarhizium anisopliae* CB990614–Imán 800Gs–15min
- T2. *Metarhizium anisopliae* CB990614–Imán 800Gs–30min
- T3. *Metarhizium anisopliae* CB990614–Imán 1200Gs–15min
- T4. *Metarhizium anisopliae* CB990614–Imán 1200Gs–30min
- T5. *Metarhizium anisopliae* CB99068–Imán 800Gs–15min
- T6. *Metarhizium anisopliae* CB99068–Imán 800Gs–30min
- T7. *Metarhizium anisopliae* CB99068–Imán 1200Gs–15min
- T8. *Metarhizium anisopliae* CB99068–Imán 1200Gs–30min
- T9. *Metarhizium anisopliae* CB990614 (control)
- T10. *Metarhizium anisopliae* CB99068 (control)

6.5.) Número de Replicas por Tratamiento:

- Se realizan tres replicas por tratamiento y dos repeticiones del experimento.

7) Cultivo de los Hongos

A partir de los cultivos madre, los hongos fueron sembrados en tres cajas de Petri nuevamente en SDA, a una temperatura de incubación de 25 C. (Ver Fotografía No. 3.) Para determinar el tiempo de incubación es necesario un ensayo preliminar para seleccionar el tiempo más apropiado.



Fotografía No. 3. Colonia del hongo *Metarhizium anisopliae* en SDA. Fuente: Autores

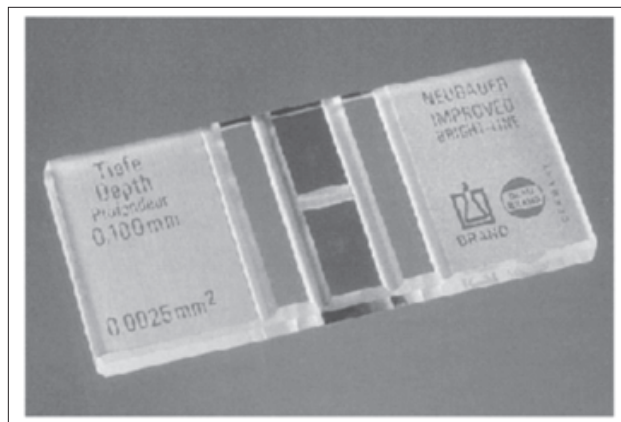
8) Recolección de las Esporas

- A partir de cada una de las cajas de Petri sembradas fueron recolectadas las esporas mediante extracción con agua destilada estéril con Tween 80 (0.05%).

9) Conteo de Esporas

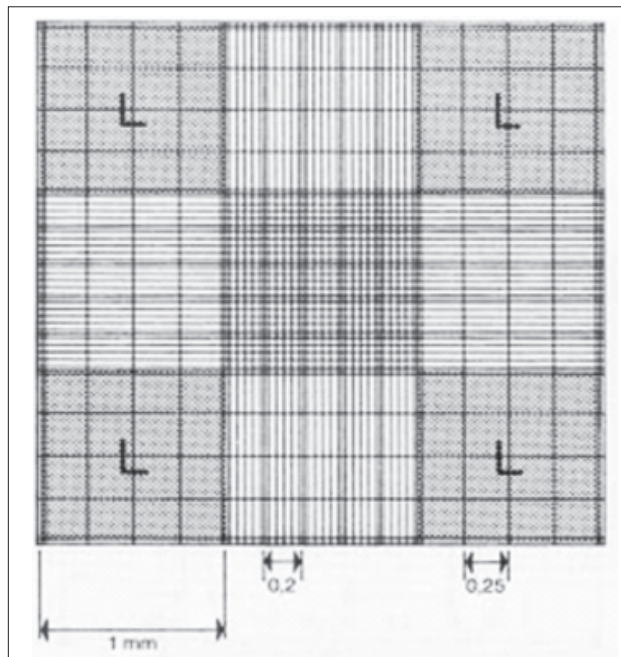
- Diluciones decimales de cada suspensión de extracción.

- Conteo de esporas de cada suspensión por medio de la cámara de Neubauer o Hematocitómetro. (Ver Fotografía No. 4 y No. 5).



Fotografía No. 4. Cámara de Neubauer o Hematocitómetro.

Fuente: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>



Fotografía No. 5. Sistema de Cuadrícula para el Conteo en la Cámara de Neubauer o Hematocitómetro

Fuente: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>

RESULTADOS

1) Tabulación de los Resultados obtenidos, expresados como Número de Esporas por Caja de Petri

Tabla No. 1. Tabulación de Datos del Primer Experimento

Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
T1	23 x 10 ⁷ e/c	15 x 10 ⁷ e/c	20 x 10 ⁷ e/c	19 x 10 ⁷ e/c
T2	23 x 10 ⁷ e/c	24 x 10 ⁷ e/c	29 x 10 ⁷ e/c	25 x 10 ⁷ e/c
T3	21 x 10 ⁷ e/c	21 x 10 ⁷ e/c	26 x 10 ⁷ e/c	23 x 10 ⁷ e/c
T4	16 x 10 ⁷ e/c	14 x 10 ⁷ e/c	20 x 10 ⁷ e/c	17 x 10 ⁷ e/c
T5	26 x 10 ⁷ e/c	22 x 10 ⁷ e/c	25 x 10 ⁷ e/c	24 x 10 ⁷ e/c
T6	22 x 10 ⁷ e/c	29 x 10 ⁷ e/c	17 x 10 ⁷ e/c	23 x 10 ⁷ e/c
T7	30 x 10 ⁷ e/c	29 x 10 ⁷ e/c	28 x 10 ⁷ e/c	29 x 10 ⁷ e/c
T8	23 x 10 ⁷ e/c	22 x 10 ⁷ e/c	23 x 10 ⁷ e/c	23 x 10 ⁷ e/c
T9	9 x 10 ⁷ e/c	11 x 10 ⁷ e/c	10 x 10 ⁷ e/c	10 x 10 ⁷ e/c
T10	10 x 10 ⁷ e/c	8 x 10 ⁷ e/c	10 x 10 ⁷ e/c	9 x 10 ⁷ e/c

* e/c: Esporas obtenidas por Caja de Petri de 9 cm de Diámetro

Fuente: Autores

Tabla No. 2. Tabulación de Datos del Segundo Experimento

Tratamiento	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
T1	13 x 10 ⁷ e/c	15 x 10 ⁷ e/c	18 x 10 ⁷ e/c	15 x 10 ⁷ e/c
T2	19 x 10 ⁷ e/c	15 x 10 ⁷ e/c	18 x 10 ⁷ e/c	17 x 10 ⁷ e/c
T3	24 x 10 ⁷ e/c	22 x 10 ⁷ e/c	22 x 10 ⁷ e/c	23 x 10 ⁷ e/c
T4	20 x 10 ⁷ e/c	20 x 10 ⁷ e/c	15 x 10 ⁷ e/c	18 x 10 ⁷ e/c
T5	23 x 10 ⁷ e/c	26 x 10 ⁷ e/c	25 x 10 ⁷ e/c	25 x 10 ⁷ e/c
T6	30 x 10 ⁷ e/c	26 x 10 ⁷ e/c	28 x 10 ⁷ e/c	28 x 10 ⁷ e/c
T7	23 x 10 ⁷ e/c	19 x 10 ⁷ e/c	29 x 10 ⁷ e/c	24 x 10 ⁷ e/c
T8	15 x 10 ⁷ e/c	14 x 10 ⁷ e/c	16 x 10 ⁷ e/c	15 x 10 ⁷ e/c
T9	10 x 10 ⁷ e/c	5 x 10 ⁷ e/c	8 x 10 ⁷ e/c	8 x 10 ⁷ e/c
T10	9 x 10 ⁷ e/c	4 x 10 ⁷ e/c	8 x 10 ⁷ e/c	7 x 10 ⁷ e/c

* e/c: Esporas obtenidas por Caja de Petri de 9 cm de Diámetro

Fuente: Autores

Para la obtención de cada resultado de las replicas, se realizó el promedio de las dos lecturas obtenidas en la Cámara de Neubauer, siendo este resultado expresado en Número de Esporas por mililitro (e/ml), y luego en Número de Esporas por Caja Petri (e/c) como se presenta en las Tablas No. 1. y No. 2.

Tabla No. 3. Tabulación de Datos de Valores Máximos, Minimos y Varianza de los Experimentos

Primer Experimento				Segundo Experimento			
Tratamientos	Varianza	Max	Min	Tratamientos	Varianza	Max	Min
1	16	23	15	1	6	18	13
2	10	29	23	2	4	19	15
3	8	26	21	3	1	24	22
4	9	20	14	4	8	20	15
5	4	26	22	5	2	26	23

Primer Experimento				Segundo Experimento			
Tratamientos	Varianza	Max	Min	Tratamientos	Varianza	Max	Min
6	36	29	17	6	4	30	26
7	1	30	28	7	25	29	19
8	0	23	22	8	1	16	14
9	1	11	9	9	6	10	5
10	1	10	8	10	7	9	4

* e/c: Esporas obtenidas por Caja de Petri de 9 cm de Diámetro

Fuente: Autores

2) Comparación de Resultados entre los Hongos tratados y no tratados con Campos Magnéticos

Después de realizado el conteo de las esporas de los tipos de hongos con referencia (CB 990614 y CB 99068), tratados y no tratados con campos magnéticos, se efectuó una comparación de acuerdo a las esporas producidas, en un periodo de incubación de 13 días. Aclarando que se realizaron dos experimentos, teniendo en cuenta para cada uno las mismas variables evaluadas.



Gráfico No. 1. Primer Experimento Tratamientos Vs No. de Esporas/Cajas Petri. Fuente: Autores

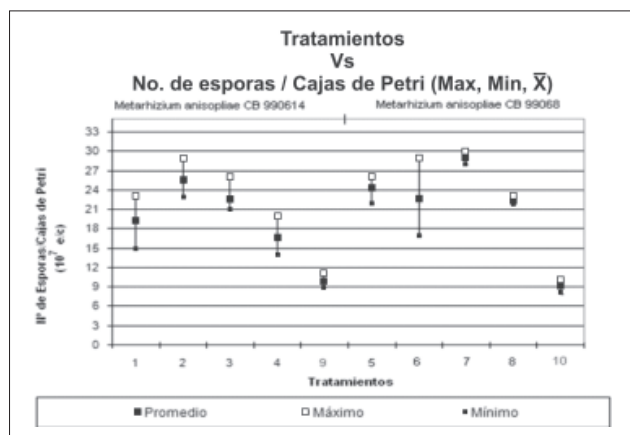


Gráfico No. 2. Valores Máximos, Mínimos y Promedios del Primer Experimento. Fuente: Autores



Gráfico No. 3. Segundo Experimento Tratamientos Vs N° de Esporas/Cajas Petri. Fuente: Autores

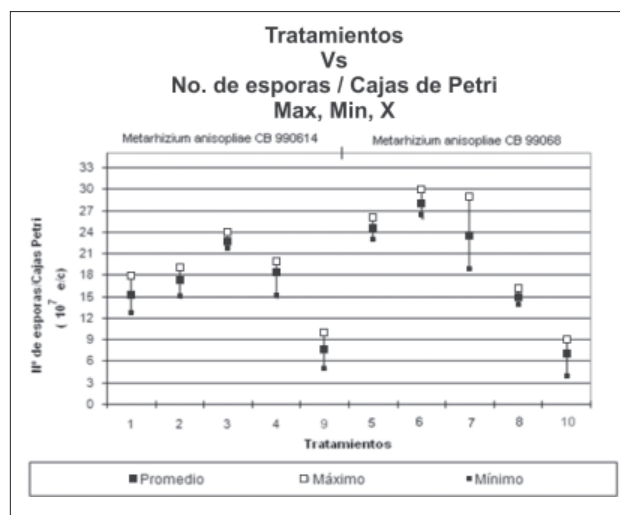


Gráfico No. 4. Valores Máximos, Mínimos y Promedios del Segundo Experimento. Fuente: Autores

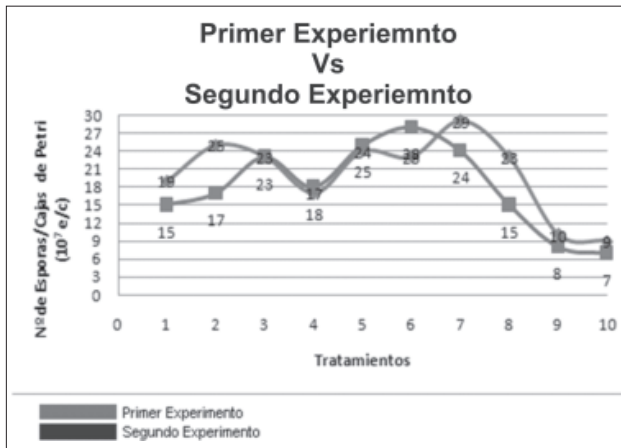


Gráfico No. 5. Comparación Primer Experimento Vs Segundo Experimento. *Fuente:* Autores

En el Gráfico No. 5 se observa cómo los dos experimentos, demuestran una tendencia muy similar de acuerdo con la cantidad de esporas por cajas de Petri en cada uno de los tratamientos, esto ratifica el cambio que produce los campos magnéticos en la esporulación de los aislamientos del hongo *Metarhizium anisopliae*.

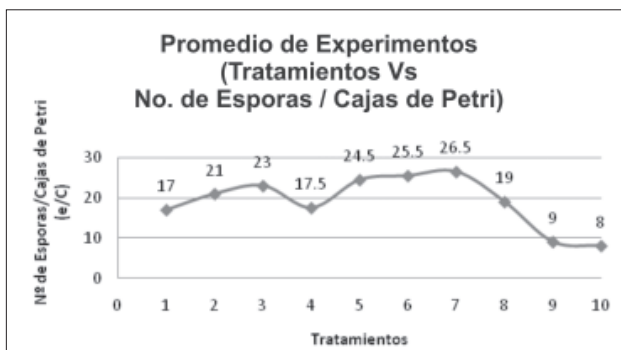


Gráfico No. 6. Media Aritmética de los Experimentos. *Fuente:* Autores



Gráfico No. 7. Promedio Porcentual de Esporulación de los Experimentos. *Fuente:* Autores

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Efecto del Magnetismo sobre el Hongo Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*:

Al someter el hongo Entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* a intensidades de magnetismo (800 y 1200 Gs) y tiempos de exposición (15 y 30 min), se presentaron diferencias en la esporulación entre los hongos con tratamientos y los dos hongos denominados testigos, para los experimentos realizados en el laboratorio de la Universidad Autónoma de Colombia, Facultad de Ingeniería Ambiental, lo cual demuestra el efecto que causa los campos magnéticos en el hongo *Metarhizium anisopliae*, siendo el Tratamiento 7 (*Metarhizium anisopliae* CB 99068 – Imán 1200 Gs - 15 min) el más representativo en los dos experimentos realizados, obteniendo los valores más altos en la lectura de Número de Esporas / Cajas de Petri, así como también en su respectivo Porcentaje de Esporulación, como se puede observar en el Gráfico No. 07. y en la siguiente tabla:

Tabla No. 4. Recopilación Resultados de los Experimentos. *Fuente:* Autores

Tratamientos	Nº de Esporas / Caja de Petri	Porcentaje de Esporulación (%)
1	17 x 10 ⁷ e/c	189
2	21x 10 ⁷ e/c	233
3	23 x 10 ⁷ e/c	255
4	17.5 x 10 ⁷ e/c	194
5	24.5x 10 ⁷ e/c	306
6	25.5x 10 ⁷ e/c	319
7	26.5x 10 ⁷ e/c	331
8	19 x 10 ⁷ e/c	237
9	9 x 10 ⁷ e/c	100
10	8 x 10 ⁷ e/c	100

Los resultados del experimento indican que el Tratamiento 7 (*Metarhizium anisopliae* CB 99068 – Imán 1200 Gs.-15 min) es el tratamiento que mostro un mejor efecto cuando fue sometido a campos magnéticos, constituyendo una alternativa viable si se desea obtener gran cantidad de esporas en un corto periodo de tiempo, para luego ser empleadas en un programa de control biológico. Se observo también que los hongos sometidos a campos magnéticos, desarrollaron un porcentaje de esporulación del orden del 90 a 230% más alto con respecto a los hongos que fueron utilizados como testigos o que no fueron sometidos a campos magnéticos.

CONCLUSIONES

- Con la investigación se demostró que al someter el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* a campos magnéticos controlados, aumenta considerablemente la producción de esporas del hongo.
- El campo magnético actúa de forma favorable en la Producción de Esporas / Cajas de Petri en el Tratamiento N° 7 (*Metarhizium anisopliae* CB 99068 – Imán 1200 Gs.-15 min), obteniendo un 231% de esporulación más alto con respecto al hongo *Metarhizium anisopliae* CB 99068 denominado de control o testigo.
- El tratamiento N° 1 (*Metarhizium anisopliae* CB 990614 – Imán 800 Gs.-15 min), obtuvo los porcentajes más bajos en cuanto a Producción de Esporas / Cajas de Petri, con respecto a los hongos tratados con campos magnéticos.
- Los hongos que fueron sometidos a campos magnéticos siempre presentaron una mayor Producción de Esporas / Cajas de Petri que aquellos hongos que no tuvieron contacto con algún campo magnético.
- Con la investigación se demostró que el campo magnético actúa de una mejor forma sobre el hongo entomopatógeno de referencia CB 99068.

BIBLIOGRAFÍA

- CANTU, Luis. Electricidad y Magnetismo para Estudiantes de Ciencias e Ingeniería. Editorial Limusa. México. 1997. Pág. 139
- CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL Y ENSEÑANZA. Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación: Uso de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico del salivazo (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* spp.) en pastizales de *Brachiaria decumbens* en El Petén, Guatemala. 2006. Pág. 17-20
- CENTRO NACIONAL DE ELECTROMAGNETISMO APLICADO. Memorias de Diplomado. Eletromagnetismo Aplicado al Medio Ambiente. Santiago de Cuba. Cuba. 2005.
- LÓPEZ, Ávila A. Control Biológico Componente Fundamental del MIP. In: Memorias I Curso-Taller Internacional: Control biológico, componente fundamental del Manejo Integrado de plagas en una agricultura sostenible. Ed. A. López-Avila. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas, Corpoica. Bogotá, DC, noviembre de 2002.
- ORTIZ, Sergio. Biodiversidad en el Control Biológico de Larvas de Mosquitos. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas. 1993
- RIVERA P, Giselle. Evaluación de Microorganismos Biocontroladores Sobre el Mosquito *Culex quinquefasciatus*: Segundo Informe de Avance. Bogotá D.C. Octubre de 2006. Pag 19.
- URIBE D, PINTO L, MARTÍNEZ W, RIVERA G, CERÓN J. 1998. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de hongos entomopatógenos con actividad biopesticida contra el gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax*. En: XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, Socolen, Cali, Colombia. Julio 16-18.

- Documentos Electrónicos:

- Rodríguez del Bosque, L. Teoría y Aplicación del Control Biológico. [en línea]. [consultado 13 oct. 2007]. Disponible en <<http://www.controlbiologico.org.mx/pdf/teoria&applCB.pdf>>
- Giraldo, Javier. Uso de Hongos Entomopatógenos en el Control de Ectoparásitos. [en línea]. [consultado 17 oct. 2007]. Disponible en <<http://www.monografias.com/trabajos29/hongos-entomopatogenos/hongos-entomopatogenos.shtml>>
- Organización Mundial de la Salud. Campos Electromagnéticos y Salud Pública. [en línea]. [consultado 10 Sep. 2007]. Disponible en <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs299/es/index.html>>

Flores, Alfredo. *Metarhizium anisopliae*. [en línea]. [consultado 16 Ene. 2008]. Disponible en<http://es.beekeeping.wikia.com/wiki/Metarhizium_anisopliae>

Negrett, Álvaro José. Notas Sobre el Origen de los Insectos. [en línea]. [consultado 25 Mar. 2008]. Disponible en<<http://www.unet.edu.ve/~frey/varios/entomología/origen>>

Marsh, Vanessa. El campo magnético terrestre aumenta la virulencia microbiana. [en línea]. [consultado 17 Oct. 2007]. Disponible en<http://www.tendencias21.net/index.php?action=article&id_article=110439>

