

COMUNICACIÓN CORTA

Metodología de superficie respuesta para evaluar estabilidad en almacén de un agente de control biológico

Ileana Miranda, Jersys Arévalo, Leopoldo Hidalgo-Díaz

Dirección de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, CP 32700, Cuba. Correo electrónico: ileanam@censa.edu.cu

RESUMEN: Se evaluaron 8 formulaciones elaboradas según combinación de polvo puro del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* IMI SD 187, uso de zeolita como relleno (50%, 80%, 90%) y sellaje (ausencia o presencia de aire atmosférico), y se modificaron las condiciones de almacenamiento (4°C ó 25°C), para un total de 16 tratamientos. Para cada tratamiento, se midió el porcentaje de humedad y la concentración de hongo viable (UFC.g⁻¹). Para identificar estabilidad se empleó la prueba no paramétrica de Friedman comparando cuatro momentos de evaluación (inicio, 15, 30 y 45 días). Mediante un análisis de componentes principales se identificaron los factores de mayor incidencia en la germinación de clamidosporas. Finalmente, por medio de la metodología de superficie respuesta se obtuvo la combinación de porcentaje de relleno de zeolita y temperatura de almacenamiento que favoreció la germinación. En todos los tratamientos el porcentaje de humedad permaneció por debajo del 10%, pero en solo 6 tratamientos la concentración de hongo viable se mantuvo estable. El oxígeno y nitrógeno del aire no modificaron significativamente los resultados. Se localizó un punto de máxima germinación de clamidosporas con el empleo de 30 a 40% de zeolita como relleno, almacenando el producto a 15°C. Se propuso un diseño compuesto central 10+2x2+2 para validar el proceso.

Palabras clave: *Pochonia chlamydosporia*, control biológico, formulación, tiempo de vida útil.

Response surface methodology to evaluate stability of a biological control agent in storage conditions

ABSTRACT: Eight formulations elaborated according to combinations of the pure powder of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* IMI SD 187, zeolite as additive at 50%, 80% or 90%, sealing in absence or presence of atmospheric air, and storage at 4°C or 25°C, for 16 treatments were evaluated. For each treatment, the percentage of humidity and the concentration of viable fungi (UFC.g⁻¹) were measured; for stability identification, Friedman's non-parametric test was used comparing four evaluation times (beginning, 15, 30 and 45 days). By means of the principal component analysis, the main factors influencing chlamyospore germination were identified. Finally, using the response surface methodology, a maximum of germination percentage was identified. In all the treatments, the humidity percentage remained below 10%, but the concentration of viable fungi was stable only in six treatments. Results were not significantly modified by the presence of air in the packages. A point of maximum chlamyospore germination was reached using 30 to 40% of zeolite and the storage at 15°C. A compound central design 10+2x2+2 was recommend to validate the process.

Key words: *Pochonia chlamydosporia*, biocontrol, formulation, shelf-life.

Una etapa importante para lograr la obtención de un bioplaguicida seguro, eficaz y confiable es el estudio de las preformulaciones, teniendo en cuenta que, por preformulación se define, al conjunto de actividades organizadas conducentes a la determinación de

las características del principio activo y de los cambios químicos, físicos y microbiológicos que pueda sufrir el bioplaguicida solo o combinado con los auxiliares de la formulación, necesarios para la elaboración del producto final (1).

El Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) cuenta con un producto bionemático cuyo ingrediente activo son las clamidosporas producidas por el hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams (ex *Verticillium chlamydosporium* Goddard) (2). El producto registrado bajo el nombre de KlamiC® (3), es obtenido mediante una tecnología de fermentación en estado sólido en bolsas, según Sistema de Gestión de la Calidad bajo la Norma Cubana NC ISO 9001 (4).

Entre los factores que inciden en la temprana fecha de caducidad del bioplaguicida se encuentran: el ingrediente activo (5), el aditivo (6), el proceso de secado (7), la temperatura de almacenamiento (8), la actividad del agua y la atmósfera de empaquetamiento (9). Además, se conoce que algunas formulaciones de esporas que incluyen materiales inertes como la zeolita lograron incrementar la estabilidad (10).

Por otra parte, una vez determinado los factores que se desean evaluar en el proceso de preformulación, se recomienda construir una superficie respuesta que permita identificar el diseño para efectuar la formulación del producto final (11).

En consecuencia, en el presente trabajo se empleó la metodología de superficie de respuesta para evaluar la estabilidad del polvo de clamidosporas de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* cepa IMI SD187 mezclado con zeolita, en condiciones de almacenamiento.

El trabajo se realizó en la Unidad de Investigación-Desarrollo de Hongos Agentes de Control Biológico del CENSA. Se utilizaron 6 Kg de KlamiC y se separaron en el Micoharvester para la obtención del polvo de clamidosporas concentrado. El polvo obtenido se mezcló con tres proporciones diferentes de zeolita estéril (50 %, 80 % y 90 %) en 50 g de producto final y se utilizó un tratamiento control de clamidosporas puras sin zeolita. Los productos obtenidos se empaquetaron en bolsas de polipropileno de baja densidad, herméticas y cubiertas con nylon para protegerlos de la luz. Se evaluaron diferentes condiciones, según combinaciones de sellaje al vacío o en presencia de oxígeno, almacenando el producto a temperatura controlada (25°C) o en refrigeración (4°C) (Tabla 1).

En este diseño factorial completo, se realizaron dos réplicas por tratamiento. Las evaluaciones se efectuaron cada 15 días hasta los 45 días. Se midió: el porcentaje de humedad, con el uso de balanza infrarroja, la concentración de hongo viable (UFC.g⁻¹) mediante el conteo del número de colonias a partir de la dilución de 1g de producto y siembra en placas de Agar Papa y Dextrosa (PDA) (PDA, BioCen: 39 g.L⁻¹), las cuales se

TABLA 1. Tratamientos utilizados en el experimento./
Experimental treatments.

Tratamientos	Zeolita (%)	Presencia de Oxígeno	Temp. (°C)
1	0	Si	4
2	0	No	4
3	0	Si	25
4	0	No	25
5	50	Si	4
6	50	No	4
7	50	Si	25
8	50	No	25
9	80	Si	4
10	80	No	4
11	80	Si	25
12	80	No	25
13	90	Si	4
14	90	No	4
15	90	Si	25
16	90	no	25

incubaron a 25°C durante 5 días. El porcentaje de germinación de clamidosporas se evaluó a las 48 horas en Agar Agua con Antibiótico (AAA) (agar bacteriológico, BioCen: 15 g.L⁻¹; cloranfenicol, clortetraciclina y sulfato de estreptomina: 50 mg.L⁻¹ de cada uno) (4).

El tratamiento que logró mayor estabilidad en la concentración de hongo viable (UFC.g⁻¹) se seleccionó mediante la comparación de los momentos de evaluación, según la prueba no paramétrica de Friedman. Se empleó un análisis de componentes principales para determinar cuáles de los factores (proporción de zeolita, temperatura o presencia de aire atmosférico en el sellado) ejerció mayor influencia sobre la germinación. Finalmente, se construyó la superficie respuesta mediante regresión cuadrática, lo que permitió calcular el punto de máxima germinación de *P. chlamydosporia*, a partir del cual se podrá construir un diseño para la validación de los resultados.

La concentración de hongo viable (UFC.g⁻¹) se mantuvo estable en los tratamientos con polvo de clamidosporas puras a 4°C sellando las bolsas en presencia o no de oxígeno (Tratamientos 1 y 2). Al introducir la zeolita como relleno a diferentes proporciones, la estabilidad fue variable; sin embargo, tratamientos con un relleno del 80% a 4°C resultaron estables (Tratamientos 9 y 10). Con otras combinaciones como: relleno de zeolita al 80 % a 25°C; relleno de zeolita al 90 % a 4°C sellando las bolsas con aire atmosférico (Tratamientos 12 y 14) también se obtuvieron buenos

resultados. Los restantes tratamientos no mantuvieron la estabilidad (Tabla 2).

Para todos los tratamientos los porcentajes de humedad se mantuvieron en un nivel adecuado (por debajo del 10%) (10), lo que indicó que la zeolita contribuyó al secado de las esporas, manteniendo el contenido de humedad en un intervalo que se considera apropiado para la conservación del producto (4).

A través del análisis de componentes principales se pudo determinar que los tres factores son importantes para explicar las variaciones en la germinación del hongo (correlación cofenética 0,98); pero, la temperatura y la proporción de zeolita están correlacionadas de forma negativa con la germinación y la concentra-

ción de *P. chlamydosporia* explicando el 48% de las variaciones que se producen en cuanto a la viabilidad del producto final (Tabla 3).

La función matemática que relacionó la germinación de las clamidosporas con la proporción de zeolita y la temperatura, resultó ser una ecuación cuadrática con un máximo (Figura), lo que sugiere que los mejores resultados se obtendrán utilizando entre 30 y 40% de zeolita para el relleno y almacenando el producto a 15°C. Se estimó que la viabilidad de *P. chlamydosporia* declinará rápidamente a temperaturas superiores a los 25°C, lo cual coincide con otros estudios del efecto de las condiciones de anaquel sobre la viabilidad de *P. chlamydosporia* (8).

TABLA 2. Estabilidad de la Concentración de hongo viable (UFC g⁻¹)./ *Stability of Colony Forming Unit (CFU g⁻¹)*

Tratamiento	Concentración de hongo viable (x10 ⁷ UFC.g ⁻¹)				Significación (p)
	Inicial	15 días	30 días	45 días	
1	19,9	15,3	13,3	17,1	0,747 estable
2	19,9	10,3	19,3	11,7	0,252 estable
3	19,9	21,5	14,0	2,20	0,050 inestable
4	19,9	71,0	8,20	4,00	0,001 inestable
5	9,10	9,70	11,5	3,20	0,050 inestable
6	9,10	5,70	8,00	6,70	0,001 inestable
7	9,10	5,20	5,70	0,70	0,007 inestable
8	9,10	56,3	2,70	1,20	0,001 inestable
9	1,90	2,60	2,30	2,10	0,500 estable
10	1,90	2,40	2,80	1,10	0,500 estable
11	1,90	1,50	0,60	0,40	0,001 inestable
12	1,90	2,10	2,00	0,40	0,126 estable
13	1,40	1,20	0,90	0,30	0,052 inestable
14	1,40	1,10	1,00	0,20	0,292 estable
15	1,40	0,40	0,10	0,02	0,001 inestable
16	1,40	1,40	0,10	0,30	0,006 inestable
ESx	1,35	3,63	1,09	0,91	
CV	0,94	1,58	1,06	1,58	

Valores de p>0,05 indican estabilidad

TABLA 3. Relación de las condiciones de almacenamiento con viabilidad del hongo a los 45 días./ *Relationship of the storage conditions with fungal viability at 45 days.*

Factores	CP1	CP2	CP3
Proporción de Zeolita (%)	-0,74	0,3	0,51
Temperatura (°C)	-0,51	-0,17	-0,81
Ausencia de aire atmosférico	-0,11	-0,93	0,31
Concentración (UFC.g ⁻¹)	0,94	-0,14	0
Germinación (%)	0,83	0,20	0
Varianza explicada	0,48	0,21	0,20
Varianza acumulada	0,48	0,69	0,89
Correlación cofenética: 0,980			

$$\text{Germinación(\%)} = 2,69 + 0,21\text{Relleno} + 18,46\text{Temp} - 0,01(\text{Relleno})^2 + 0,03\text{Relleno} * \text{Temp} - 0,72(\text{Temp})^2$$

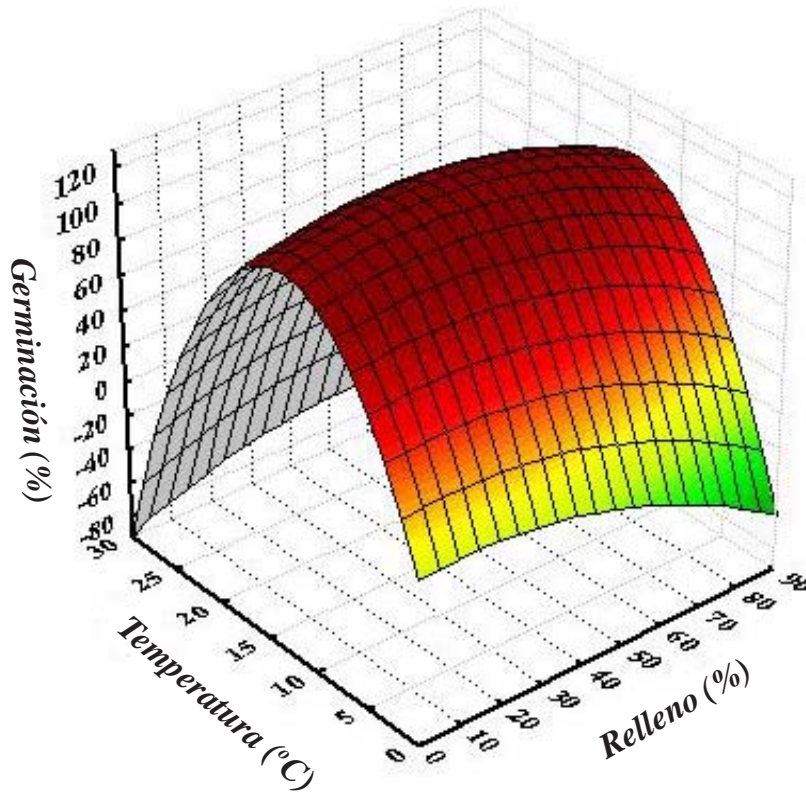


FIGURA. Superficie respuesta de la relación proporción de zeolita (%) - temperatura con el porcentaje de germinación de clamidosporas./ *Response surface of the relationship between zeolita proportion - temperature and chlamydo-spore germination percentage.*

Para el estudio de validación, se recomienda probar valores de proporción de relleno de zeolita y temperatura de almacenamiento cercanos a 30% y 15°C, respectivamente; siguiendo para la selección de los puntos un diseño compuesto central 10+2x2+2; el cual es recomendado para optimizar procesos (12).

REFERENCIAS

1. Espinel C, Torres L, Grijalba E, Villamizar L, Cotes A. Preformulados para control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio. *Rev Colomb Entomol.* 2008;34(1):22-27.
2. Hernández MA, Hidalgo-Díaz L. KlamiC®: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydo-sporea* var. *catenulata*. *Rev Protección Veg.* 2008;23(2):131-134.
3. Registro Central de Plaguicidas, Ministerio de la Agricultura. Lista Oficial de Plaguicidas Autorizados en la República de Cuba. p. 325, 2010.
4. Montes de Oca N, Arévalo J, Núñez A, Riverón Y, Villoch A, Hidalgo-Díaz L. KlamiC: Experiencia Técnica-Productiva. *Rev Protección Veg.* 2009;24(1):62-65.
5. Elzein A, Kroschel J, Muller-Stover D. Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of «Pesta» formulation of *Fusarium oxysporum* «Foxy 2», a Potential mycoherbicide for *Striga*: Effects of temperature, granule size and water activity. *Biocontrol Sci Techn.* 2004;14:545-559.
6. Guijarro B, Melgarejo P, De Cal A. Effect of stabilizers on the shelf-life of *Penicillium frequentans* conidia and their efficacy a biological

- agent against Peach Brown Rot. *Int J Food Microbiol.* 2007;103:117-124.
7. Teshler M, Ash G, Zolotarov Y, Watson A. Increased shelf-life of a bioherbicide through combining modified atmosphere packaging and low temperatures. *Biocontrol Sci Techn.* 2007;17:387-400.
 8. Duan W, Yang E, Xiang M, Liu X. Effect of storage conditions on the survival of two potential biocontrol agents of nematodes, the fungi *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*. *Biocontrol Sci Techn.* 2008;18(6):613-620.
 9. Faria M, Hotchkiss J, Hajek A, Wraight S. Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. *J Invertebr Pathol.* 2010;105(1):74-83.
 10. Wraight S, Jackson M, Kock S. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. *Fungal Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential.* CAB International, Wallingford, UK; 2001. p. 253-287.
 11. Liu C, Chen Q, Tang B, Ruan H, He G. Response surface methodology for optimizing the fermentation medium of alpha-galactosidase in solid-state fermentation. *Lett Appl Microbiol.* 2007;45(2):206-212.
 12. López E, Arteaga H, Castro P, Nolasco I, Siche R. El Método de Superficie Respuesta y la Programación Lineal en el desarrollo de un néctar mixto de alta aceptabilidad y mínimo costo. *Scientia Agropecuaria.* 2012;3(4):309-318.

Recibido: 10-5-2013.
Aceptado: 12-9-2013.