

Nota técnica

KLAMIC: EXPERIENCIA TÉCNICA-PRODUCTIVA

Nivian Montes de Oca*, Jersys Arévalos**, Amalia Nuñez*, Yamilka Riverón*,
Alejandra Villoch* y L. Hidalgo-Díaz**

*Dirección de Calidad y **Dirección de Protección de Plantas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana. Cuba. Correo electrónico: nivian@censa.edu.cu

RESUMEN: El Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria cuenta con una tecnología para la fabricación de un bionemático agrícola conocido como KlamiC, que se obtiene a partir de la cepa IMI SD 187 del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y W. Gams, agente de control biológico de nematodos formadores de agallas. Durante cinco años se han producido 98 lotes a una escala piloto de 25 kg que representan más de 1500 kg de producto. Los indicadores de calidad de KlamiC se han mantenido dentro de los rangos establecidos para el producto con un comportamiento promedio de concentración de $1,6 \times 10^7$ clamidosporas.g de sustrato⁻¹, 91,32% de viabilidad de las clamidosporas, 77,04% de parasitismos de huevos de *M. incognita*, 5,43% de contenido de agua y una concentración de microorganismos contaminantes de $8,1 \times 10^4$ UFC.g de producto⁻¹. La aplicación de la tecnología de fermentación en estado sólido en bolsas de polipropileno bajo el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación ha permitido la obtención de un inóculo de calidad utilizado principalmente en los estudios de caracterización, para los ensayos de toxicología y ecotoxicología, formulación, así como en las aplicaciones en cultivos protegidos y huertos intensivos para demostrar las capacidades del hongo de establecerse en el suelo y de reducir las poblaciones del nematodo.

(Palabras clave: *Pochonia chlamydosporia*; *Meloidogyne* spp.; bionemático; fabricación de bioplaguicidas; gestión de la calidad)

KLAMIC: TECHNICAL-PRODUCTIVE EXPERIENCE

ABSTRACT: The National Center of Animal and Plant Health has a technology for manufacturing an agriculture bionematicide known as KlamiC. It is obtained from the strain of the fungus SD 187 IMI *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron and Onions) Zare and W. Gams, which is a biological control agent of root-knot nematodes. For five years, 98 batches of 25 kg at pilot scale have been produced, representing more than 1500 kg of product. The quality indicators of the product KlamiC have remained within the ranges established for the product with an average concentration of $1,6 \times 10^7$ chlamydospore.g of substrate⁻¹, 91,32% viability of chlamydospores, 77,04% parasitism of *M. incognita* eggs, 5,43% water content and a concentration of micro-pollutants of $8,1 \times 10^4$ CFU.g of product⁻¹. The application of the fermentation technology in solid state in polypropylene bags under the fulfilment of good manufacturing practices has enabled the obtaining of a quality inoculum, mainly used in characterization studies for toxicological and ecotoxicological testing, formulation, as well as in applications in sheltered crops and intensive orchards to demonstrate the capabilities of the fungus to settle in the soil and reduce nematode populations.

(Key words: *Pochonia chlamydosporia*; *Meloidogyne* spp.; bionematicide; manufacture of biopesticides; quality management)

En Cuba la Agricultura Urbana ha proporcionado un incremento relevante en la producción de vegetales frescos y sanos para el consumo de la población (1,2,3). Los organopónicos y huertos intensivos cons-

tituyen modalidades tecnológicas superiores para la producción de hortalizas dentro de este sistema (4), donde se cultiva un alto número de especies y variedades de plantas, que son afectadas por un conjunto

de plagas y enfermedades, en especial, los nematodos formadores de agallas, que ocasionan fuertes daños y reducen los rendimientos (5).

La cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y W. Gams fue seleccionada como agente de control biológico potencial de *Meloidogyne* spp. (6). Atendiendo a las potencialidades de esta cepa para el control de nematodos formadores de agallas, se han establecido como principales direcciones de trabajo la obtención de un producto comercial y la propuesta fundamentada de una estrategia de manejo que permita una aplicación eficaz y segura en sistemas de producción intensiva de hortalizas (7).

Para dar respuesta a estos objetivos se desarrolló la producción de un bionemático a partir de una tecnología de Fermentación en Estado Sólido en Bolsa (FESB) con la aplicación de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).

Requisitos para la fabricación

A partir del diseño y aplicación de esta metodología y de la creación de una guía de BPF se definieron requisitos específicos para la fabricación de este tipo de producto, logrando los siguientes resultados:

- Se adaptó una instalación con un flujo unidireccional, una adecuada segregación de las operaciones, mínimo riesgos de errores, limpieza efectiva, prevención de contaminación cruzada, y en general cualquier efecto no deseado sobre el producto.
- Se estableció la estructura, responsabilidades e interrelaciones del personal, y la capacitación para

cada plaza vinculada a la evaluación del desempeño de cada trabajador.

- Se diseñó un sistema de documentación que recoge toda la información generada durante el proceso productivo de un lote, lo cual permite seguir la trazabilidad y otorgar la liberación de los productos y su seguimiento pos comercialización.
- Se definieron los requisitos de calidad para la identificación, estabilidad y protección de la cepa de producción.
- Se caracterizó cada proceso y el ambiente desde el punto de vista físico y microbiológico, así como los residuales.
- Se establecieron las especificaciones y métodos de evaluación de todas las materias primas, productos intermedios y final que intervienen en la producción.
- Se identificaron los puntos de controles de procesos y con herramientas estadísticas los rangos o valores que permitieran normalizar la producción.
- Se estandarizaron los ensayos de evaluación y el muestreo para el control de proceso y producto final.

Resultados del control de la calidad

En los primeros años la mayoría de los lotes fabricados fueron utilizados para el estudio de mejoras de procesos, definición de especificaciones de productos intermedios y producto final (Tabla 1).

El comportamiento promedio de estos requisitos se puede apreciar en la Tabla 2, donde se mantiene un cumplimiento de todas las especificaciones, a pesar de que existe una alta variabilidad, elemento intrínseco en estos procesos donde interviene un mi-

TABLA 1. Resumen de la especificación de calidad del bionemático KlamiC./ *Summary of the quality specification of the bionematicide KlamiC*

Requisitos de calidad	Método de ensayo	Criterio de aceptación
Características organolépticas	Observación visual	Bolsas de polipropileno que contiene un granulado de color ocre
Masa promedio	USP XXIX (8)	500g o 1kg $\pm 10\%$
Identidad	Viabilidad y conteo de clamidosporas	Conidios en cadenas y presencia de clamidosporas
Concentración del principio activo	Conteo de clamidosporas en cámara de Neubauer Kerry y Bourne (9)	$\geq 5 \times 10^6$ clamidosporas.g de sustrato ⁻¹
Actividad biológica	Viabilidad y parasitismo Kerry y Bourne (9)	$\geq 85\%$ de viabilidad de clamidosporas $\geq 70\%$ de parasitismo de huevos de <i>M. incognita</i> cada cuatro lotes
Contaminación microbiana	Límite microbiano USP XXIX (8)	Menor de 10^3 UFC.g de producto ⁻¹
Contenido de agua	USP XXIX (8) o Balanza infrarroja	No presencia de bacterias, ni hongos patógenos Menor e igual al 7%
Hermeticidad	FEUM (10)	Bolsas de polipropileno herméticas

TABLA 2. Resultados del control de calidad de los lotes de KlamiC en cinco años de producción./ *Results of the quality control of KlamiC batches in five years of production*

Año	Concentración (10^7 clam.g ⁻¹ ± DS)	Viabilidad (% ± DS)	Contaminación (10^5 UFC.g sustrato ⁻¹ ± DS)	Contenido de agua (% ± DS)	Actividad biológica (% de parasitismo de huevos de <i>M. incognita</i>)
2003	2,03 ± 1,14	92,94 ± 1,49	1,90 ± 3,70	8,26 ± 1,03	77,0 ± 2,10
2004	2,27 ± 1,40	90,61 ± 2,70	0,030 ± 0,043	3,93 ± 0,70	79,2 ± 3,23
2005	2,16 ± 1,25	91,67 ± 2,44	0,92 ± 0,26	5,90 ± 2,39	76,0 ± 2,12
2006	0,87 ± 0,47	90,00 ± 2,80	0,036 ± 0,017	4,05 ± 1,01	75,0 ± 1,01
2007	1,05 ± 3,40	91,39 ± 1,47	0,085 ± 2,40	5,05 ± 1,69	78,0 ± 1,90
Promedio	1,60 ± 1,52	91,32 ± 2,17	0,81 ± 0,88	5,43 ± 1,20	77,04 ± 2,27

croorganismo vivo que depende de múltiples factores para lograr un crecimiento estable y de la poca automatización de este proceso.

En el primer año no se cumplió el indicador del 7% de contenido de agua, porque la metodología de secado no permitía alcanzar este valor. Con el desarrollo de las producciones se fueron ajustando las condiciones para lograr disminuir el contenido de agua, lo que finalmente se alcanzó. Este indicador es de vital importancia, ya que se logra exponiendo el producto a condiciones de secado y como se conoce temperaturas superiores a los 30°C afectan la viabilidad de las clamidosporas de la cepa IMI SD 187 de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (6,11,12).

El mantenimiento de la concentración de contaminantes viables por debajo de 10^5 UFC.g de sustrato⁻¹ se explica por la implementación de adecuadas prácticas de fabricación en los diferentes momentos del proceso productivo y al análisis sistemático de los puntos críticos y la toma de acciones correctivas eficientes. La contaminación del producto, constituye una de las dificultades en estas producciones, donde se informan resultados muy variables para este indicador que van desde 10^3 hasta 10^8 UFC.g de sustrato⁻¹ (13,14) y que son muy dependientes de las condiciones y método de producción.

Resultados productivos

Las mejoras al proceso de producción y la implementación en paralelo de las Buenas Prácticas de Fabricación, han permitido que se disponga de este producto, como se observa en la Figura 1.

La planta de producción de KlamiC cuenta con la licencia de la instalación otorgada por el Centro Nacional de Seguridad Biológica (CNSB). Tiene una capacidad máxima de producción de tres lotes mensuales de 25 kg de sustrato inicial por lote. Las producciones se han incrementado hasta alcanzar 27 lotes en el año 2007. En estos primeros cinco años de producción se han fabricado 98 lotes que representan más de 1500 kg de producto.

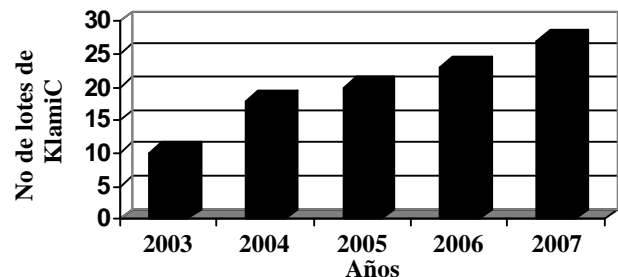


FIGURA 1. Producción de KlamiC en el período 2003-2007./ *KlamiC production in the period 2003-2007.*

La tecnología de producción masiva mediante FESB tiene como limitante que para la obtención de las clamidosporas se requiere de un alto periodo de incubación y de operaciones manuales que atentan contra la factibilidad económica del producto final.

Estos resultados aunque son alentadores, obligan a trabajar en la optimización del proceso productivo para mejorar los rendimientos y disminuir las mermas por concepto de contaminación microbiana. Otra vía es la obtención de nuevas formulaciones que incrementen los niveles de concentración de clamidosporas por gramo de sustrato inicial, alarguen la vida útil del producto y hagan más resistente a la clamidosporas a los efectos del ambiente.

Los lotes producidos se han utilizado principalmente para la caracterización morfológica, enzimática y molecular (15) y para demostrar la seguridad del uso del producto a través del desarrollo de pruebas toxicológicas y ecotoxicológicas, lo cual avala su mínimo riesgo para la salud animal, humana y para el ecosistema (16) y para evaluar su efectividad como agente de control biológico de nematodos formadores de agallas.

El producto se ha aplicado con éxito en áreas experimentales, túneles y organopónicos (17). Recientemente se desarrolló una metodología para la aplicación de KlamiC, dentro de una secuencia de culti-

vos hospedantes y pobres hospedantes de *Meloidogyne* spp. en sistemas de producción sostenibles de hortalizas; demostrando que una aplicación anual del hongo asegura su persistencia en el suelo y reduce en más de un 90% las poblaciones de nematodos (12).

KlamiC es un producto que se encuentra en trámites de Registro, ha demostrado ser inocuo para el hombre, animales y plantas, y es compatible con otros hongos agentes de control biológico que habitan en el suelo. La tecnología de producción conjuntamente con la aplicación de BPF, han permitido una producción sostenida de este producto con el cumplimiento de sus especificaciones de calidad, asegurando así el inóculo necesario para todos los estudios que permitan su introducción segura y eficaz en el manejo de nematodos del género *Meloidogyne* en los cultivos agrícolas.

REFERENCIAS

- Peña E, Companioni N, Rodríguez A, González N, González R. La Agricultura Urbana en Cuba. En: Agroecología. Conquistando la Soberanía Alimentaria. Canuto JC, Costabeber JA. (Eds). Emater/RS-Ascar, Porto Alegre; Embrapa Clima Temperado, Pelotas. 2004; p. 84-99.
- Rodríguez A. La Agricultura Urbana en Cuba. Impactos económicos, sociales y productivos. Revista Bimestre Cubana. 2004; XCV(20):115-137.
- Quintero S, Rodríguez A, Companioni N, Rodríguez A. Agricultura en las ciudades: una experiencia agroecológica aplicada a nivel nacional en Cuba". Leisa, Revista de Agroecología. 2005;20(4):40-41.
- Grupo Nacional de Agricultura Urbana: Manual Técnico de Organopónicos y Huertos Intensivos. MINAGRI-INIFAT-ACTAF, La Habana, 2003; 145p.
- Cuadra R, Cruz Xiomara, Zayas M, González N. Incidencia de plagas en policultivos de organopónicos. II. Nematodos fitoparásitos. Rev Protección Veg. 2002;17(1):54-58.
- Hidalgo L. Potencialidades de cepas autóctonas de *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH-CENSA, 2000;100 p.
- Kerry BR, Hidalgo L. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. En: Multitrophic Interactions in Soil and Integrated Control. Sikora R, Gowen S, Hauschild R, Kiewinick S. (Eds). IOBC/WPRS Bull. 2004;27(1):123-127.
- USP XXIV: United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 2006; Ed. 25. Rockville: Mack Printing.
- Kerry BR, Bourne JM. (Eds): A manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes. IOBC/WPRS, University of Gent, 2002;84 p.
- FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 1988; 5^{ta} Edición, México.
- Montes de Oca N. Buenas prácticas de fabricación para la obtención de un bionemática a partir de la cepa Vcc 108 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH-CENSA. 2004;152 p.
- Puertas A. Uso de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams como agente de control biológico de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en cultivos hortícolas. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH-CENSA, 2007;126 p.
- Guillon M. Production of biopesticides: scale up and quality assurance. In: Microbial insecticides: Novelty or necessity. In: Proceedings of British Crop Protection Symposium, 1997;(68):151-162.
- Grzywacz D, McKinley D, Jones KA, Moawad G. Microbial contamination in *Spodopten littoralis* nuclear polyhedrosis virus produced in insects in Egypt. J Inver Pathol. 1997;6:151-156.
- Peteira B. Caracterización del hongo nematófago cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH-CENSA, 2005;118 p.
- García L. Evaluación toxicológica y ecotoxicológica de un bionemática constituido por la cepa Vcc-108 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. UNAH-CENSA, 2005;118 p.
- Hidalgo L, Kerry BR. Integration of biological control with other methods of nematode management. In: Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. Ciancio A, Mukerji KG. (Eds). Springer: 2008;29-44.

(Recibido 18-7-2008; Aceptado 30-10-2008)