

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ENTREGA LÍQUIDO PARA
Pseudomonas fluorescens PF14**



MARTHA FERNANDA ARIAS CRISTANCHO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar al título de

Microbióloga Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTÁ, D.C. 2012**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946 .

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ENTREGA LÍQUIDO PARA
Pseudomonas fluorescens PF14**



MARTHA FERNANDA ARIAS CRISTANCHO

APROBADO

Martha Isabel Gómez A. Ph.D.
Directora

Laura Fernanda Villamizar R. Ph.D.
Codirectora

Marcela Franco Ph.D.
Jurado

Ingrid Schuler Ph.D.
Decana Académica

Janeth Arias M.Sc, M.Ed.
Directora de Carrera

*A MIS PADRES POR CREER
EN MÍ, POR SU PACIENCIA Y
POR SU APOYO
INCONDICIONAL.*

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Martha Isabel Gómez Ph.D. Directora de la Planta de Bioproductos de CORPOICA, por todo su apoyo incondicional, paciencia, enseñanzas, colaboración, y dedicación en el desarrollo de este trabajo y por su contribución en mi formación profesional.

A la Doctora Laura Fernanda Villamizar Ph.D. Directora del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA, por su orientación, colaboración y por sus enseñanzas en el desarrollo de este trabajo y por su contribución en mi formación profesional.

A los investigadores del Laboratorio de Control Biológico por aportes a este trabajo.

A los estudiantes y auxiliares del Laboratorio de Control Biológico por su cooperación, apoyo incondicional y amabilidad.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
2.1. Justificación.....	13
2.2. Planteamiento del Problema	14
3. MARCO TEÓRICO.....	14
3.1. Características del género <i>Pseudomonas</i>	14
3.1.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
3.1.2. Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
3.1.3. Importancia de <i>Pseudomonas</i> spp. como agente de control biológico.....	15
3.1.4. Mecanismos de acción de <i>Pseudomonas</i>	16
3.2. Formulación de bioplaguicidas.....	16
3.2.1. Uso de polioles en formulaciones de bioplaguicidas.....	17
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. Objetivo General.....	17
4.2. Objetivos Específicos.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Microorganismo biocontrolador.....	18
5.2. Producción del principio activo (<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14).....	18
5.3. Diseño y caracterización de preformulaciones a base de <i>pseudomonas fluorescens</i> Pf14	19
5.4. Determinación de la estabilidad de los sistemas líquidos seleccionados bajo condiciones de almacenamiento.....	20
5.5. Análisis estadístico.....	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
6.1. Producción del principio activo.....	20
6.2. Diseño y caracterización de preformulaciones a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	21
6.3. Estudio de la estabilidad de los sistemas líquidos seleccionados bajo condiciones de almacenamiento	26

7. CONCLUSIONES.....	30
8. RECOMENDACIONES.....	31
9. LITERATURA CITADA.....	31
10. ANEXOS.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prototipos de formulación a base de <i>P. fluorescens</i> Pf14.....	20
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de dos lotes de fermentación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	21
Tabla 3. Matriz binaria de calificación de preformulados a base de la biomasa separada del caldo de fermentación.....	25
Tabla 4. Matriz binaria de calificación de preformulados a base del caldo de fermentación.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Viabilidad (UFC/mL) de <i>P. fluorescens</i> Pf14 en preformulaciones a base de biomasa separada del caldo de fermentación b) Viabilidad (UFC/mL) de <i>P. fluorescens</i> Pf14 en preformulaciones a base del caldo de fermentación.....	22
Figura 2. a) Actividad de agua de las preformulaciones a base de la biomasa separada del caldo de fermentación b) Actividad de agua de las preformulaciones a base del caldo de fermentación.	24
Figura 3. a) pH de las preformulaciones a base de la biomasa separada del caldo de fermentación b) pH de las preformulaciones a base del caldo de fermentación	25
Figura 4. pH de las preformulaciones a base de la biomasa de <i>P. fluorescens</i> Pf14 separada del medio de fermentación con polioles al 5% y almacenadas durante dos meses a) 28±2°C. b) 18±2°C.	27
Figura 5. Actividad de agua de las preformulaciones a base de la biomasa de <i>P. fluorescens</i> Pf14 separada del medio de fermentación, con polioles al 5% y almacenadas durante dos meses a) 28±2°C. b) 18±2°C.	28
Figura 6. Contenido de levaduras (Log UFC/mL) en las preformulaciones a base de biomasa de <i>P. fluorescens</i> Pf14 con polioles al 5% almacenadas durante dos meses a) 28±2°C b) 18±2°C.	29
Figura 7. Contenido de mohos (Log UFC/mL) en las preformulaciones a base de la biomasa de <i>P. fluorescens</i> Pf14 con polioles al 5% almacenadas durante dos meses a) 28±2°C b) 18±2°C.	29
Figura 8. Pérdida de viabilidad de <i>P. fluorescens</i> Pf14 en formulaciones líquidas con polioles al 5% durante dos meses de almacenamiento a) 28±2°C b) 18±2°C.	30

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica de dos lotes de fermentación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	36
Anexo 2. Análisis estadístico de la variable pH de los lotes de fermentación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	36
Anexo 3. Análisis estadístico de la variable peso seco (%) de los lotes de fermentación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	37
Anexo 4. Análisis estadístico de la variable concentración (UFC/mL) de fermentación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	38
Anexo 5. Resultados de la caracterización (UFC/mL) de preformulaciones a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	39
Anexo 6. Análisis estadístico de la variable concentración (UFC/mL) del caldo de fermentación a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	40
Anexo 7. Análisis estadístico de la variable concentración (UFC/mL) de la biomasa separada del caldo de fermentación a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	41
Anexo 8. Resultados de la caracterización (A_w) de preformulaciones a base de <i>pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	42
Anexo 9. Análisis estadístico de la variable actividad de agua del caldo de fermentación a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	43
Anexo 10. Análisis estadístico de la variable actividad de agua de la biomasa separada del caldo de fermentación a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	44
Anexo 11. Resultados de la caracterización (pH) de preformulaciones a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	45
Anexo 12. Análisis estadístico de la variable pH del caldo de fermentación a base de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf14.....	46
Anexo 13. Análisis estadístico de la variable pH de la biomasa separada del caldo de fermentación a base de <i>P. fluorescens</i> Pf14.....	47
Anexo 14. pH de los sistemas líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.....	49
Anexo 15. Análisis estadístico de la variable pH de los soportes líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C.....	49
Anexo 16. Análisis estadístico de la variable pH de los soportes líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 28°C.....	51

Anexo 17. Actividad de agua (A_w) de los sistemas líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.....	53
Anexo 18. Análisis estadístico de la variable A_w de los soportes líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C.....	54
Anexo 19. Análisis estadístico de la variable A_w de los soportes líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 28°C.....	55
Anexo 20. Contenido de levaduras (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.....	57
Anexo 21. Análisis estadístico del contenido de levaduras (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C.....	58
Anexo 22. Análisis estadístico del contenido de levaduras (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 28°C.....	60
Anexo 23. Contenido de mohos (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.....	62
Anexo 24. Análisis estadístico del contenido de mohos (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C.....	62
Anexo 25. Análisis estadístico del contenido de mohos (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 28°C.....	64
Anexo 26. Pérdida de viabilidad (%) del principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 mezclado con los soportes líquidos durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.....	66
Anexo 27. Análisis estadístico de la Pérdida de viabilidad (%) del principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 mezclado con los soportes líquidos durante dos meses de almacenamiento a 18°C.....	67
Anexo 28. Análisis estadístico de la pérdida de viabilidad (%) del principio activo <i>P. fluorescens</i> Pf14 mezclado con los soportes líquidos durante dos meses de almacenamiento a 28°C.....	68

RESUMEN

El cultivo de uchuva se ve afectado por varios problemas fitosanitarios dentro de los que se destaca el hongo *Fusarium oxysporum* que genera pérdidas de importancia. El control de este hongo generalmente se realiza con agroquímicos que generan problemas ambientales y para el ser humano, sin embargo en la actualidad el uso de microorganismos con potencial biocontrolador surge como una alternativa amigable con el medio ambiente. El Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA, aisló la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Pf14, la cual fue seleccionada en estudios previos por su actividad biocontroladora contra *Fusarium oxysporum* Map 5 y por su capacidad inductora del crecimiento vegetal en el cultivo de uchuva. Teniendo en cuenta que *P. fluorescens* tiene gran potencial para el control de esta enfermedad, surge la necesidad de desarrollar una formulación adecuada que le brinde al microorganismo condiciones de estabilidad, por esta razón el presente trabajo tuvo como objetivos diseñar un sistema de entrega líquido a base de *P. fluorescens* Pf14 y determinar su estabilidad en condiciones de almacenamiento durante dos meses. Para esto se evaluaron dos principios activos uno correspondiente al caldo de fermentación y el otro a la biomasa separada del caldo de fermentación. A partir de los resultados obtenidos en la caracterización de las preformulaciones se seleccionaron los prototipos a base de biomasa de *P. fluorescens* Pf14 separada del caldo de fermentación en mezcla con polioles a una concentración del 5%. Estos sistemas fueron seleccionados, ya que presentaron la mayor viabilidad, la menor A_w , pH cercanos a la neutralidad y mayor concentración del producto final. Posteriormente, se evaluó la estabilidad de los prototipos de formulación durante dos meses de almacenamiento a temperaturas de 18 y $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Los sistemas con la menor pérdida de viabilidad durante los dos meses de almacenamiento a las dos temperaturas fueron las preformulaciones consistentes en biomasa de *P. fluorescens* Pf14 separada del caldo de fermentación con adición de los polioles 1 y 3 al 5 %.

1. INTRODUCCIÓN

Boyacá es el principal departamento productor de uchuva en Colombia, con una participación del 36,3% en el total de la producción nacional y 400 hectáreas cultivadas; en segundo lugar se encuentra el departamento de Antioquia con el 30,3%, seguido de Cundinamarca con el 28,4% (1). Sin embargo, a pesar de que Colombia tiene un gran potencial para la producción de uchuva, este cultivo se ve afectado por varias enfermedades como el marchitamiento vascular causado por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, el cual produce clorosis, necrosis y posteriormente la muerte de la planta originando grandes pérdidas económicas (2).

Los métodos actuales para el control de este hongo son de origen químico (3). Sin embargo, estos productos generan residualidad en el fruto afectando la salud humana por su alta toxicidad (4, 5), ocasionan impactos negativos a nivel ambiental y generan resistencia por parte del patógeno (5, 6). Por esta razón, el control biológico utilizando bioplaguicidas microbianos es una alternativa promisoría para reducir las aplicaciones de productos químicos sobre el cultivo de uchuva (4, 7). En este sentido, se destaca el uso de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, por su amplio espectro para el control de diferentes patógenos (8, 9), como *Fusarium oxysporum* (8). Además, *P. fluorescens* es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (7) que favorece la producción en diferentes cultivos, debido al efecto positivo que tiene sobre el crecimiento de las plantas (7, 8).

Teniendo en cuenta el alto potencial de este microorganismo como agente de control biológico, surge la necesidad de desarrollar un producto seguro, eficaz y confiable que le brinde estabilidad al microorganismo en condiciones de campo y almacenamiento, mediante una adecuada formulación que permita aumentar la vida útil del producto, tolerando condiciones ambientales extremas y facilitando la manipulación por parte del agricultor (10, 11). Las formulaciones de estos microorganismos pueden ser sólidas o líquidas, aunque estas últimas son las más utilizadas a nivel internacional para formulaciones de bioplaguicidas bacterianos (12).

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 JUSTIFICACIÓN

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) es uno de los frutos más importantes en Colombia principalmente en el departamento de Boyacá, con una participación del 36,3% del total de la producción nacional (1). Es la fruta más rentable en las exportaciones nacionales (13) y a nivel mundial Colombia es considerada como el mayor productor seguido por Sudáfrica (14). Actualmente, la producción del cultivo de uchuva se ve disminuida a causa de enfermedades como la marchitez vascular, causada por el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, que genera grandes pérdidas económicas (13). Sin embargo, hasta el momento no se encuentran registradas cifras del daño ocasionado por este hongo en este cultivo.

El control químico es el más utilizado para reducir esta enfermedad. Sin embargo, su uso continuo puede generar resistencia por parte del patógeno e impactos negativos a nivel ambiental (6). Una alternativa que no afecta el medio ambiente, no causa deterioro en la fruta y

permite aumentar el crecimiento de las plantas, es la utilización de microorganismos con potencial biocontrolador como por ejemplo *Pseudomonas fluorescens*. El uso del control biológico con este tipo de bacterias permitirá ofrecer productos agrícolas de mejor calidad, que cumplan con las exigencias requeridas para su exportación.

Para que este microorganismo pueda ser utilizado en condiciones de campo, es necesario desarrollar una adecuada formulación que mantenga estable a *P. fluorescens* durante su producción, distribución y almacenamiento y que facilite su manipulación y aplicación (3). Para lograrlo, es preciso iniciar los estudios de preformulación, en los cuales se determinan las características del principio activo y los cambios químicos, físicos y microbiológicos que éste puede sufrir, solo o al combinarlo con los auxiliares de formulación requeridos para la obtención del producto final (15).

Dentro de los tipos de formulación con aplicabilidad para *P. fluorescens* sobresalen los sistemas líquidos; estos sistemas utilizan comúnmente polioles que disminuyen la actividad de agua (A_w), causando latencia del microorganismo, reduciendo posibles problemas de contaminación y aumentando la estabilidad del principio activo (16).

2.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA aisló la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Pf14, la cual fue seleccionada en estudios previos por su actividad biocontroladora de *Fusarium oxysporum* Map 5 (26% de inhibición del patógeno en comparación con un 18% de inhibición con el control químico) y por su capacidad de generar mayor crecimiento en el sistema radicular (% de germinación del 90 % con respecto al control 25% a los 20 días) en cultivos de uchuva. Teniendo en cuenta que *P. fluorescens* tiene gran potencial para el control de esta enfermedad, surge la necesidad de desarrollar un producto que sea eficaz y establezca al microorganismo, tanto en condiciones de almacenamiento como después de su aplicación en campo. El éxito de este producto, va a depender principalmente del desarrollo de una formulación adecuada, sobresaliendo los sistemas líquidos, que son los más vendidos a nivel internacional y representan el 60% del mercado para los bioplaguicidas bacterianos (12). Dentro de los auxiliares de formulación que se utilizan comúnmente en las formulaciones líquidas, se encuentran los polioles que disminuyen la actividad de agua (A_w), causando latencia del microorganismo y reduciendo posibles problemas de contaminación (17).

En estudios previos en el Laboratorio de Control Biológico, se realizó un trabajo evaluando la estabilidad de *P. fluorescens* Ps013 en medios acuosos isotónicos, evidenciándose una importante reducción en la viabilidad de las células suspendidas (>90%) durante dos meses de almacenamiento (18). Por esta razón, surge la necesidad de evaluar otro sistema de formulación líquida de *P. fluorescens* con la utilización de polioles de bajo peso molecular.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Características del género *Pseudomonas*

Son bacilos rectos o ligeramente curvos saprofitos, su tamaño oscila entre 0,5 y 1,0 μm de ancho por 1,5 a 4,0 μm de largo. Son Gram negativos, móviles por medio de flagelos polares, no producen esporas y las células no están envainadas, apendiculadas o con yemas (19, 8).

Presentan requerimientos nutritivos simples, crecen a pH neutro, en un rango mesofílico de temperaturas óptimas (25-30°C), son quimiorganótrofos y aerobios (19,20). Se distinguen fácilmente de otras bacterias por presentar oxidasa positiva y catalasa positiva (21). Presentan un alto contenido genómico de guanina + citosina (G+C) (8).

3.1.1 *Pseudomonas fluorescens*

Se encuentra como saprófita en el suelo (22) y es ampliamente conocida por su capacidad de promover el crecimiento vegetal (19,23). No produce piocianina, presenta un penacho de flagelos polares y su contenido genómico de G+C es del 59 al 61% (19). Produce un pigmento extracelular difusible llamado pioverdina, el cual es el sideróforo más común secretado por esta especie (8). En el medio King B, se evidencia fluorescencia debido a la producción de fluoresceína, pigmento amarillo-verdoso hidrosoluble que produce fluorescencia bajo la luz ultravioleta (24).

3.1.2. Clasificación taxonómica de *Pseudomonas fluorescens* (25)

Reino: Bacteria
División: Proteobacteria
Clase: Gammaproteobacteria
Orden: Pseudomonadales
Familia: Pseudomonadaceae
Género: *Pseudomonas*
Especie: *Pseudomonas fluorescens*

3.1.3. Importancia de *Pseudomonas* spp. como agente de control biológico

Las bacterias del género *Pseudomonas* spp. tienen gran uso como agente de control biológico, debido a que protegen a las plantas de varias enfermedades fúngicas y bacterianas, permitiendo una reducción del patógeno y ofreciendo beneficios sobre el crecimiento vegetal, lo que mejora el rendimiento de los cultivos (26). Por ejemplo, en cultivos de tomate en donde se aplicó *P. fluorescens* se encontraron reducciones de la enfermedad del 82,67% y del 95,19% sobre *Fusarium oxysporum* causante del marchitamiento y la pudrición de la raíz en condiciones de invernadero y campo respectivamente (26, 27). Adicionalmente, en cultivos de uchuva se presentó una disminución en la incidencia del Damping-off en un 80%, al aplicar *P. fluorescens* (28).

Así mismo, en la incidencia de la fusariosis de la espiga ocasionada por el patógeno *Fusarium culmorum* se presentó una reducción del 74% al 79% en cultivos de trigo y cebada donde esta enfermedad genera pérdidas de hasta un 50% en el rendimiento (29). Contra la enfermedad de la pudrición de la vaina causada por *Rhizoctonia solani* en cultivos de arroz, se obtuvo una reducción del 76% (30) y también *P. fluorescens* ha demostrado actividad antagonista de *Erwinia amylovora* en cultivos de manzana (3) y pera (31).

3.1.4. Mecanismos de acción de *Pseudomonas* spp

Pseudomonas spp. presenta varios mecanismos de acción utilizados para el control biológico. Entre estos se encuentran, la síntesis de compuestos antibióticos que inhiben el crecimiento de diferentes fitopatógenos (23). Dentro de los antibióticos producidos por *P. fluorescens* tenemos las fenazinas (fenanzina 1-carboxilato), el fluoroglucinol (2,4-diacetilfloroglucinol), la pirrolnitrina, el pioluteorin, los lipopéptidos cíclicos y el ácido cianhídrico (HCN) (8).

Otro mecanismo de acción es la competencia, la cual puede darse por espacio o por nutrientes generando daño en el patógeno (8). Adicionalmente, *P. fluorescens* produce enzimas líticas (glucanasas, quitinasas y proteasas) que actúan degradando los componentes de la pared celular del patógeno (32) y produce sideróforos, que son compuestos de bajo peso molecular con capacidad de quelar el hierro presente en el medio y dejarlo disponible en pequeñas cantidades, afectando el desarrollo de microorganismos patógenos (33).

Otro mecanismo de acción es la Induced Systemic Resistance (ISR), que es la capacidad defensiva desarrollada por la planta, al producir moléculas señalizadoras y elicitoras que activan el sistema de defensa, contra diferentes tipos de patógenos. Los microorganismos pertenecientes al género *Pseudomonas* spp. tienen la capacidad de inducir esta resistencia en las plantas, sin causar síntomas necróticos a diferencia de la Resistencia Sistemática Adquirida (33,34).

3.2. FORMULACIÓN DE BIOPLAGUICIDAS

Los bioplaguicidas son productos a base de organismos vivos con potencial benéfico para la protección de cultivos (15). El logro de un bioplaguicida implica el cumplimiento de diversas etapas técnicas que aseguren la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichas etapas comprenden el aislamiento del microorganismo y su conservación, estudios para conocer la ecología, fisiología y taxonomía del microorganismo, la evaluación de su actividad biocontroladora, el estudio de los mecanismos de acción implicados en dicha actividad, su producción masiva, su preformulación, formulación, la determinación de dosis, formas y frecuencias de aplicación, la evaluación del producto en campo, los estudios de impacto ambiental y por último su patentamiento y registro (15).

La etapa de formulación es una de las más importantes ya que de ésta depende la eficacia y vida útil del producto. Una adecuada formulación protegerá a los microorganismos de factores ambientales extremos deletéreos, mejorará la estabilidad en el almacenamiento y facilitará su aplicación y manipulación por parte de los agricultores (3). Las formulaciones pueden ser sólidas y líquida (8), las sólidas se caracterizan por presentar bajo contenido de humedad, lo cual disminuye posibles problemas de contaminación debido a un bajo A_w , pero requieren procesos de secado que en su mayoría son deletéreos para los microorganismos (35) y pueden generar polvos finos generando problemas en la salud. En cuanto a las formulaciones líquidas, éstas son fáciles de aplicar y reconstituir, pero presentan altos riesgos de contaminación debido a que son medios acuosos que favorecen el desarrollo de los microorganismos (35).

Existen al menos cuatro productos comerciales de *P. fluorescens* disponibles en Estados Unidos y Europa: Bligh ban A506 cuya presentación es un polvo mojable y se recomienda contra *Erwinia amylovora* en cultivos de pera y manzana, Conquer y Victus formulados como una suspensión acuosa contra *P. tolaasii* en cultivos de setas (3) y Bio-cure contra *Rhizoctonia*

solani, *Botrytis cinerea* y *Fusarium spp* en cultivos de tomate, con una presentación líquida y una en polvo (36).

Actualmente en Colombia no existen productos a base de *P. fluorescens* registrados comercialmente como bioplaguicidas (37).

3.2.1. Uso de polioles en formulaciones de bioplaguicidas

Los polioles o también llamados alcoholes de azúcar, son alcoholes polihídricos con varios grupos hidroxilos (17, 38). Se clasifican en alditoles que son aquellos que tienen cadena lineal de átomos de carbono y ciclitoles los cuales tiene cadena cíclica (17). Entre ellos encontramos el glicerol (tres carbonos); el eritritol y el treitol (cuatro carbonos); el ribitol, el arabitol y el xilitol (cinco carbonos); el galactitol, el sorbitol y el manitol (seis carbonos) entre otros (38). Estos polioles se acumulan intracelularmente en los microorganismos y disminuyen la actividad de agua (A_w) reduciendo así la actividad metabólica (39,10).

El A_w es un parámetro termodinámico, que se define como el cociente entre la presión de vapor del aire en equilibrio con una sustancia o solución y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura, también describe la disponibilidad de agua para la actividad microbiana (19, 40). A valores de A_w bajos los microorganismos entran en una fase latencia disminuyendo su velocidad de crecimiento (41).

Cabe resaltar que la literatura referente a estudios del uso de *Pseudomonas spp.* con polioles es muy escasa y la mayoría de trabajos disponibles son realizados con levaduras (42, 43). Por ejemplo Abadías y colaboradores (2000) diseñaron una formulación líquida a base de *Candida sake* y determinaron que el sorbitol y la trealosa mantuvieron estable la viabilidad durante siete meses a 4°C, garantizando su eficacia contra *Penicillium expansum* (42); Teixidó y colaboradores (1998) también utilizaron la levadura *Candida sake* y establecieron que la glicerina y el eritritol aumentaron la viabilidad celular (44). Adicionalmente, en estudios publicados recientemente por Manikandan y colaboradores (2010) se encontró que después de 120 días de almacenamiento se mantuvo viable una formulación líquida a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf1 formulada con trealosa (10mM), polivinilpirrolidona (PVP) (2%) y glicerol (10mM) (26).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un preformulado líquido para *Pseudomonas fluorescens* Pf14

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar en condiciones de laboratorio preformulados líquidos a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14 utilizando como excipientes polioles de bajo peso molecular.
- Seleccionar los preformulados líquidos a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14 que presenten la mayor estabilidad durante dos meses de almacenamiento

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en la planta de Producción de Bioplaguicidas del Centro de Biotecnología y Bioindustria de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) ubicada en el municipio de Mosquera Cundinamarca.

5.1 MICROORGANISMO BIOCONTROLADOR

La cepa de *Pseudomonas fluorescens* Pf14 fue proporcionada por el Banco de Gemoplasma del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA.

La bacteria se sembró en cajas de Petri con medio Agar Nutritivo, se incubó por 24 horas a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y posteriormente fue crioconservada en una solución de glicerol al 10% y peptona al 0,1%. Esta suspensión fue dividida en alícuotas de 1 mL y dispensada en crioviales previamente rotulados, los cuales posteriormente fueron almacenados en un ultracongelador a -70°C hasta su posterior recuperación.

5.2. PRODUCCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO (*Pseudomonas fluorescens* Pf14)

La producción de principio activo (*Pseudomonas fluorescens* Pf14) se realizó mediante un proceso de fermentación en medio líquido, para lo cual inicialmente se tomó un criovial de la cepa, se reactivó en cajas de Petri con medio Agar Nutritivo y se incubó durante 24 h a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Después de este tiempo, se preparó el inóculo de la fermentación, cuya concentración se estimó en un espectrofotómetro mediante la lectura de su absorbancia a 300 nm, y posterior extrapolación en una curva de calibración previamente estandarizada (18).

Se realizaron dos lotes de fermentación, cada uno consistente en tres erlenmeyers de 1000 mL de capacidad con 500 mL de caldo Luria Bertani (LB), los cuales fueron inoculados a razón de 1×10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL). Las condiciones de fermentación fueron $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 h a 180 rpm. Al finalizar el tiempo de fermentación a cada medio de cultivo se le verificó la pureza mediante coloración de Gram y observación en microscopio. Posteriormente se realizó su caracterización determinando los parámetros pH, peso seco (%) y viabilidad (UFC/mL) por triplicado.

pH: La determinación del pH se realizó mediante un potenciómetro marca Hanna Instruments previamente calibrado (45).

Peso seco: Se determinó por la técnica de pérdida de peso por secado utilizando una balanza de humedad KERN MLS 50-03 (45).

Viabilidad: La viabilidad se determinó por la técnica recuento en placa. Se tomaron muestras de 1000 μl de cada erlenmeyer y se realizaron diluciones seriadas en base 10 en agua peptonada. Posteriormente, se sembraron en cajas de Petri con medio Agar Nutritivo las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} y 10^{-10} por triplicado y se llevaron a incubar por 24 horas a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, al cabo de este tiempo se realizó el recuento de UFC/mL.

5.3 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE PREFORMULACIONES A BASE DE *Pseudomonas fluorescens* Pf14

Para el desarrollo de los sistemas de preformulación se evaluaron dos principios activos, el primero correspondiente al caldo de fermentación de *Pseudomonas fluorescens* Pf14 y el segundo a la biomasa retirada del caldo de fermentación por un proceso previo de centrifugación en un centrifuga Sorval a 15000 rpm durante 15 minutos y dos lavados con tampón fosfato a pH 7,5.

Para los dos principios activos se evaluaron tres polioles a dos concentraciones distintas (5% y 10%) y como control se utilizó para el caldo de fermentación, el medio líquido sin adición de polioles, y para la biomasa separada del caldo de fermentación, la biomasa resuspendida en un tampón de fosfatos pH 7,5. Las preformulaciones fueron preparadas utilizando un dispersor Ultra Turrax marca IKA a 6000 rpm y se mantuvieron durante 48 horas a temperatura ambiente. Tres muestras de 3 mL de cada una de las prefomulaciones recién preparadas y después de 48 horas de reposo fueron tomadas para la determinación del pH, la actividad de agua (A_w) y la viabilidad (UFC/mL).

La determinación del pH y la viabilidad (UFC/mL) se realizó siguiendo la metodología previamente descrita y la actividad de agua y el contenido de contaminantes de la siguiente manera:

Actividad de agua (A_w): Se determinó por medio de un Termoconstante marca Novasina AW 40 (18).

Contenido de contaminantes: Se tomaron muestras de 1000 μ l de cada formulación y se realizaron diluciones seriadas en agua estéril. Posteriormente para la evaluación de levaduras, se sembraron las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} en cajas de Petri con medio Agar Extracto de Malta-Levadura (YM) y se llevaron a incubar por 48 h a $26\pm 2^\circ\text{C}$. Para la evaluación de hongos se empleó el medio Sabouraud Dextrosa más cloranfenicol y una incubación a $26\pm 2^\circ\text{C}$ por 5 días. Cada dilución se sembró por triplicado. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el recuento de colonias y el resultado se expresó en UFC/mL.

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial y las variables fueron las siguientes: Principio activo (caldo de fermentación, biomasa separada del caldo de fermentación), polioles (1, 2 y 3) y concentración del poliol (5% y 10%). En total se contó con 12 tratamientos (Tabla 1), los cuales fueron evaluados al tiempo cero y después de 48 horas de reposo.

Con los resultados obtenidos se elaboró una matriz de decisión binaria que incluyó las variables de viabilidad (UFC/mL), A_w en el sistema, estabilidad del A_w en el tiempo, pH, costos y concentración final del prototipo. Por cada variable de respuesta por tratamiento se asignó un valor de uno (1) para el comportamiento deseado y cero (0) para el comportamiento no deseado. Una vez calificados todos los prototipos, se realizó la sumatoria y se seleccionaron los que presentaron el mayor puntaje para ser utilizados en el ensayo de estabilidad en almacenamiento

Tabla 1. Prototipos de formulación a base de *P. fluorescens* Pf14

Prototipo	Descripción
1	B+Poliol 1 al 5%
2	B+Poliol 1 al 10%
3	B+Poliol 2 al 5%
4	B+Poliol 2 al 10%
5	B+Poliol 3 al 5%
6	B+Poliol 3 al 10%
7	C+Poliol 1 al 5%
8	C+Poliol 1 al 10%
9	C+Poliol 2 al 5%
10	C+Poliol 2 al 10%
11	C+Poliol 3 al 5%
12	C+Poliol 3 al 10%

B: Biomasa separada del caldo de fermentación
C: Caldo de fermentación

5.4. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL SISTEMA LÍQUIDO BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Para evaluar la estabilidad de los sistemas líquidos seleccionados a base de *P. fluorescens* Pf14 en condiciones de almacenamiento, se prepararon 30 tubos Falcon con 15 mL de cada preformulación, los cuales fueron almacenados durante dos meses, 15 tubos a $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ y los restantes a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. Antes de iniciar el almacenamiento (tiempo cero) y cada 15 días durante dos meses, se tomaron tres tubos de cada temperatura y a cada uno de estos sistemas se les evaluó el pH, la actividad del agua (A_w) y la concentración (UFC/mL) siguiendo las metodologías previamente descritas.

El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo y arreglo factorial, con tres repeticiones para cada tiempo y tratamiento.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en la selección de polioles y en la evaluación de la estabilidad de los sistemas fueron sometidos a pruebas de Bartlett y Shapiro Wilk para determinar homogeneidad de varianzas y la normalidad respectivamente y posteriormente se realizó un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación de medidas de Tukey (95%). Para todos los análisis se empleó el programa estadístico Statistix 8.1.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PRODUCCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO

Para la producción del principio activo se elaboraron dos lotes y se realizó su caracterización determinando los parámetros de pH, peso seco (%) y concentración (UFC/mL). Los resultados

promedio de cada característica para cada lote de producción se presentan en la Tabla 2 (**Anexo 1**).

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de dos lotes de fermentación de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Características	Lote 1	Lote 2	Promedio	Desviación
pH	7,96	7,59	7,77	0,26
Peso seco (%)	1,24	1,52	1,38	0,19
Concentración (UFC/mL)	6,73x10 ⁹	8,03x10 ⁹	7,38x10 ⁹	9,19x10 ⁸

En el análisis de varianza, el cual se realizó por triplicado, no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los dos lotes de producción para las características de pH, peso seco (%) y concentración (UFC/mL), lo que sugiere que hay repetibilidad entre estos (**Anexos 2,3 y 4**).

En cuanto al pH se encontró un valor promedio de 7,77 para los dos lotes con una desviación de 0,26. El peso seco promedio fue de 1,38 con una desviación de 0,19 y por último la concentración fue de 7,38x10⁹ UFC/mL con una desviación de 0,05.

El valor de pH obtenido estuvo de acuerdo con lo reportado por Kamal *et al.* (2008) quienes describieron un pH de 7,85 al final de la fermentación de *Pseudomonas fluorescens* generando una acidificación del medio de cultivo. En lo que se refiere a la concentración (UFC/mL), cada lote presentó valores superiores a una concentración de 1x10⁹ UFC/mL, resultados similares obtuvieron Vidhyasekaran *et al.* (1996) quienes cultivaron otro aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* en caldo King B a 28±2°C durante 48 h a 150 rpm, con un resultado final de 1X10⁹ UFC/mL. De igual forma Kamal *et al.* (2008) utilizando las mismas condiciones de fermentación mencionadas anteriormente y otro aislamiento de *Pseudomonas fluorescens*, obtuvieron una concentración de 9X10⁸ UFC/mL.

6.2 DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE PREFORMULACIONES A BASE DE *Pseudomonas fluorescens* Pf14

Las preformulaciones a base de *Pseudomonas fluorescens* se caracterizaron fisicoquímica y microbiológicamente determinando los parámetros de viabilidad (UFC/mL), pH y A_w antes (tiempo cero) y después de 48 horas de reposo.

En cuanto a la viabilidad (UFC/mL) (**Anexo 5**) obtenida inicialmente y después de 48 horas, para las preformulaciones a base de la biomasa separada del caldo de fermentación, los recuentos se encontraron entre 1,08x10¹² UFC/mL y 1,84x10¹² UFC/mL (Figura 1a). El análisis de varianza no detectó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores obtenidos en el tiempo cero y después de 48 horas de reposo para todas las preformulaciones con los polioles al 5% al 10% (**Anexo 6**) comportamiento similar presentó el tratamiento control. Por otra parte, en las preformulaciones en las que se usó como principio activo el caldo de fermentación, los recuentos estuvieron entre 1,66x10⁹UFC/mL y 7,66x10⁹ UFC/mL, presentándose el mismo

comportamiento que para las preformulaciones a base de la biomasa separada del caldo de fermentación. La prueba de comparación de medias de Tukey detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) para la preformulación con el poliol 1 al 5%, ya que la concentración al tiempo cero fue de $7,66 \times 10^9$ UFC/mL y después de las 48 horas, ésta se redujo hasta $1,66 \times 10^9$ UFC/mL (**Figura 1b, Anexo 7**).

La viabilidad de la mayoría de los sistemas evaluados se mantuvo estable durante 48 horas de reposo. Sin embargo, cuando se utilizó como principio activo la biomasa separada del caldo de fermentación, todas las preformulaciones presentaron concentraciones altas del orden de 10^{12} UFC/mL; mientras que cuando se usó el caldo de fermentación, la concentración fue inferior a 10^{10} UFC/mL. Teniendo en cuenta que la dosis de aplicación recomendada para esta bacteria es del orden de 10^9 UFC/mL, sería más conveniente contar con un producto concentrado que permita la manipulación de volúmenes bajos.

Además, la producción de un sistema en el que la biomasa es separada del caldo de fermentación y lavada dos veces con tampón fosfato pH 7,5, posiblemente permitirá contar con un principio activo más puro (células de *P. fluorescens* Pf14), con pocos residuos del medio de cultivo que puedan quedar en la biomasa, favoreciendo así la estabilidad del microorganismo durante períodos de tiempo prolongado y aumentando la vida útil de la formulación.

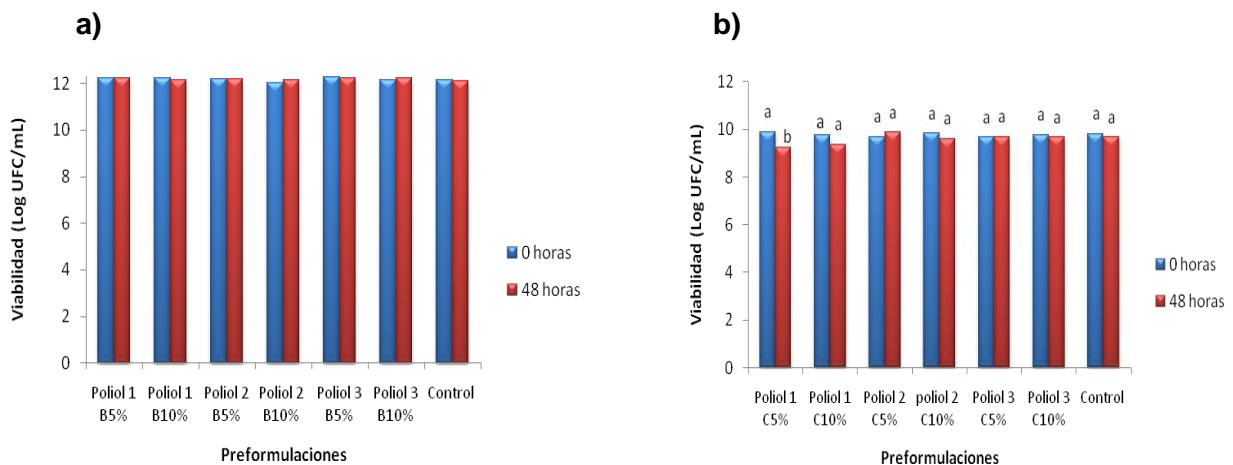


Figura 1. a) Viabilidad (UFC/mL) de *P. fluorescens* Pf14 en preformulaciones a base de biomasa separada del caldo de fermentación **b)** Viabilidad (UFC/mL) de *P. fluorescens* Pf14 en preformulaciones a base del caldo de fermentación. C: Caldo de fermentación; B: Biomasa separada del caldo de fermentación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Por el contrario, cuando se utiliza como principio activo el caldo de fermentación, en el producto puede haber sales, fuentes de carbono y nitrógeno que no fueron consumidas totalmente en el proceso de fermentación. Durante el almacenamiento, este tipo de sustancias podrían afectar la viabilidad de las células y su actividad. Igualmente, las sales presentes podrían precipitar causando alguna inestabilidad química con los excipientes adicionados a la formulación y la acumulación de productos tóxicos del metabolismo microbiano, generando un ambiente perjudicial para la estabilidad del microorganismo utilizado como principio activo (46).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, sería más conveniente trabajar con un principio activo más puro, como la biomasa separada del medio del medio de cultivo.

En lo relacionado a la actividad de agua o (A_w) para las preformulaciones a base de biomasa separada del caldo de fermentación se obtuvieron bajas actividades de agua entre 0,907 y 0,938 (Figura 2a), mientras que el tratamiento control al cual no se le adicionó ningún poliol presentó una A_w de uno, tanto al tiempo cero como a las 48 horas de reposo (**Anexo 8**). Estos resultados confirmaron el efecto del poliol sobre el parámetro evaluado. La prueba de comparación de medidas no detectó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el valor de A_w antes y después de 48 horas para los tratamientos y para el control, excepto para la preformulación con el poliol 2 al 10%, el cual en el tiempo cero mostró un A_w de 0,938 y a las 48 horas éste disminuyó significativamente ($p < 0,05$) hasta 0,911 (**Anexo 9**). Los bajos valores de A_w obtenidos para todos los tratamientos podrían favorecer que el microorganismo entre en una fase de latencia disminuyendo su actividad metabólica y mejorando su estabilidad (47). Por ejemplo Limsong *et al.* (1996) estableció que la reducción del A_w citoplasmático está relacionada con el efecto de los polioles que al acumularse intracelularmente, disminuyen también su actividad metabólica y permiten que las enzimas permanezcan activas durante períodos de estrés hídrico.

El A_w de las preformulaciones a base del caldo de fermentación con el poliol 1 al 5% y al 10% osciló entre 0,968 y 0,983 (Figura 2b), mientras que para los otros cuatro tratamientos la actividad de agua fue menor (0,911 y 0,938). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para cada tratamiento en los dos tiempos evaluados. En cuanto al tratamiento control la actividad de agua fue de 0,957 tanto al tiempo cero como después de 48 de reposo (**Anexo 10**).

En general se puede concluir que cuando se utilizaron las preformulaciones a base del caldo de fermentación, se encontraron valores de A_w superiores a los obtenidos cuando el principio activo fue la biomasa separada del caldo de fermentación; Este efecto es confirmado con el principio activo correspondiente al caldo de fermentación que antes de adicionar el poliol presentó un A_w de uno, mientras que cuando el principio activo fue la biomasa separada del caldo de fermentación, éste presentó una actividad de agua de 0,957. Para poder lograr estos mismos niveles posiblemente es necesario, utilizar mayores concentraciones de polioles que las evaluadas en el presente trabajo.

La disponibilidad de agua libre es un factor de gran importancia, ya que los microorganismos requieren de agua para llevar a cabo sus funciones metabólicas. Se ha demostrado que a valores de A_w por debajo de 0,98 la velocidad de crecimiento disminuye (48) y se aumenta la duración de la fase de latencia, cesando el crecimiento. El valor mínimo requerido para el crecimiento se ha estimado en 0,91 y a valores de 0,55 se genera la desnaturalización del ADN (49).

En general para la mayoría de los sistemas evaluados no se detectó un cambio significativo del A_w al tiempo cero y después de 48 horas de reposo, siendo estos aptos para realizar el estudio de estabilidad, a excepción de los tratamientos correspondientes a la biomasa con el poliol 2 al 10% y el caldo de fermentación con el poliol 1 al 5%.

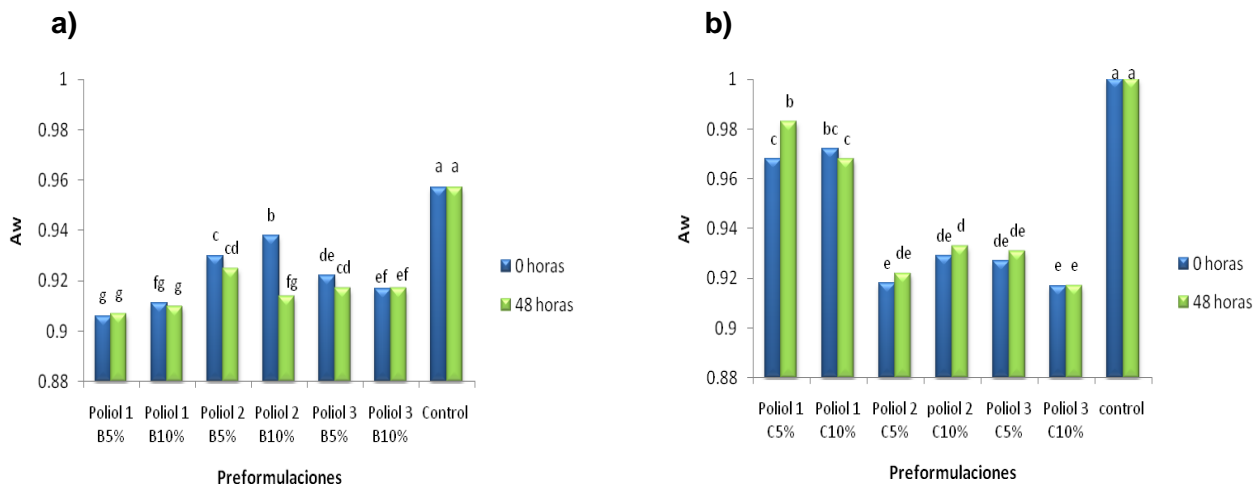


Figura 2. a) Actividad de agua de las preformulaciones a base de la biomasa separada del caldo de fermentación **b)** Actividad de agua de las preformulaciones a base del caldo de fermentación. C: Caldo de fermentación; B: Biomasa separada del caldo de fermentación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

En cuanto al pH se observó que en todas las preformulaciones a base de biomasa separada del caldo de fermentación (Figura 3a), se presentaron valores entre 7,32 y 7,44 (**Anexo 11**). El análisis de varianza no detectó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores obtenidos antes y después de las 48 horas de reposo para el poliol 1 al 10% y para los polioles 2 y 3 al 5%, excepto para las preformulaciones con el poliol 1 al 5% y poliol 2 y 3 al 10% (Figura 3a) (**Anexo 13**).

El pH de las preformulaciones a base del caldo de fermentación (Figura 3b) osciló entre 7,53 y 7,89, valores superiores a los obtenidos en las preformulaciones a base de la biomasa separada del caldo de fermentación (**Anexo 11**); los cuales estuvieron muy cercanos a la neutralidad, siendo adecuados para asegurar la estabilidad de la bacteria, ya que *Pseudomonas* sp. tiene un mejor crecimiento a pH neutro (19). Este es un parámetro de gran importancia, debido a que los cambios drásticos de pH pueden interferir en la estabilidad del microorganismo y modificar sus propiedades (51). En el análisis de varianza no se detectaron diferencias significativas para las preformulaciones a base del poliol 1 al 5% y del poliol 2 al 10% antes y después de 48 horas de reposo a diferencia de los sistemas con los polioles 1 y 3 al 10% y los polioles 2 y 3 al 5% (**Anexo 12**).

Los valores de pH más altos registrados cuando se trabajó con el caldo de fermentación, se deben posiblemente a que el medio de cultivo presentaba un valor de pH inicial de 7,77. Por el contrario al utilizar la biomasa separada del caldo de fermentación posiblemente se retiraron diferentes sustancias durante los lavados con la solución tampón fosfato pH 7,5 lo que pudo generar una disminución del pH.

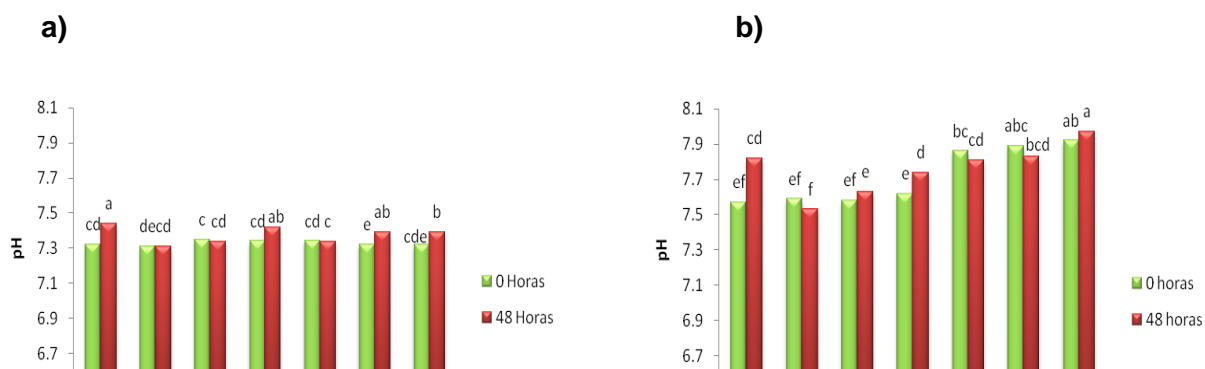


Figura 3. a) pH de las preformulaciones a base de la biomasa separada del caldo de fermentación **b)** pH de las preformulaciones a base del caldo de fermentación. C: Caldo de fermentación; B: Biomasa separada del caldo de fermentación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente y además los costos de producción y la concentración final del producto, se elaboró la matriz de decisión binaria y una vez calificados todos los prototipos con todas las variables, se realizó la sumatoria. Los preformulados a base de la biomasa separada del caldo de fermentación al 5% fueron los que presentaron el mayor puntaje (Tabla 3 y 4), por lo que se seleccionaron para el estudio de estabilidad en almacenamiento

Tabla 3. Matriz binaria de calificación de preformulados a base de la biomasa separada del caldo de fermentación.

Variable	Comportamiento deseado	Principio					
		Biomasa separa del caldo de fermentación					
		P1(5%)	P2(5%)	P3(5%)	P1(10%)	P2(10%)	P3(10%)
Viabilidad (UFC/mL)	Estable	1	1	1	1	1	1
Aw en el sistema	< 0,94	1	1	1	1	0	1
Estabilidad Aw	Estable	1	1	1	1	0	1
pH en el sistema	Cercano a la neutralidad	1	1	1	1	1	1
Costos	< costos	1	1	1	0	0	0
Concentración de la formulación	> concentración	1	1	1	1	1	1
Total		6	6	6	5	3	5

Tabla 4. Matriz binaria de calificación de preformulados a base del caldo de fermentación.

Variable	Comportamiento deseado	Principio	
		Caldo de fermentación	

		P1(5%)	P2(5%)	P3(5%)	P1(10%)	P2(10%)	P3(10%)
Viabilidad (UFC/mL)	Estable	0	1	1	1	1	1
Aw en el sistema	< 0,94	0	1	1	0	1	1
Estabilidad Aw	Estable	0	1	1	0	1	1
pH en el sistema	Cercano a la neutralidad	0	0	0	0	0	0
Costos	< costos	1	1	1	0	0	0
Concentración de la formulación	> concentración	0	0	0	0	0	0
Total		1	5	5	2	3	4

6.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS SISTEMAS LÍQUIDOS SELECCIONADOS

La estabilidad de los preformulados seleccionados se evaluó determinando la viabilidad (UFC/mL), el pH, la actividad de agua y el contenido de contaminantes de cada uno de ellos durante dos meses de almacenamiento a dos temperaturas ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $18\pm 2^{\circ}\text{C}$).

En cuanto al pH de los preformulados a base de los polioles 1, 2 y 3 almacenados a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, se encontró que inicialmente estos presentaron valores de 7,26, 7,28 y 7,27 respectivamente y después de dos meses de almacenamiento los valores fueron 7,11, 7,24 y 7,30 respectivamente (Figura 4a). Al almacenar los sistemas líquidos a $18\pm 2^{\circ}\text{C}$, el pH del prototipo 1 osciló entre 7,18 y 7,25 durante los dos meses de almacenamiento. El pH del prototipo a base del poliol 2 fue 7,29 y para el sistema con el poliol 3 el pH estuvo entre 7,27 y 7,30 (Figura 4b) (**Anexo 14**).

Los valores de pH iniciales y finales de los preformulados a base de los polioles 2 y 3 no fueron significativamente diferentes entre sí ($p > 0,05$) tanto a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ como a $18\pm 2^{\circ}\text{C}$, mientras que para el preformulado a base del poliol 1 se detectaron diferencias significativas a las dos temperaturas entre los valores obtenidos antes y después de los dos meses de almacenamiento (**Anexo 15 y 16**). Estas diferencias entre los valores de pH podrían estar relacionados con el equipo utilizado para la medición (Potenciómetro marca HANNA), el cual tiene una alta sensibilidad ($\pm 0,2$) por que la desviación estándar de cada dato fue mínima.

El pH es un parámetro de vital importancia, debido a que los cambios fuertes pueden afectar la estabilidad del principio activo y modificar sus propiedades (52). En el presente trabajo se presentaron valores cercanos a la neutralidad, que aseguran la estabilidad de la bacteria durante el almacenamiento, debido a que como se mencionó anteriormente, la literatura reporta que el género *Pseudomonas* sp. presenta una mejor estabilidad a pH neutro (51). Además, es necesario tener en cuenta que valores de pH extremos afectan la membrana de las bacterias, el transporte de solutos y ocasionan cambios en el metabolismo, limitando su desarrollo e incluso generado su inhibición, debido a que influye sobre la expresión de genes y la degradación de aminoácidos (53).

La estabilidad de los preformulados podría mejorarse con la utilización de una solución reguladora del pH que podría minimizar las variaciones de este parámetro, favoreciendo el almacenamiento prolongado y reduciendo problemas de contaminación y degradación de las

proteínas, las cuales pueden afectar grupos funcionales causando una reducción en la actividad del microorganismo (54).

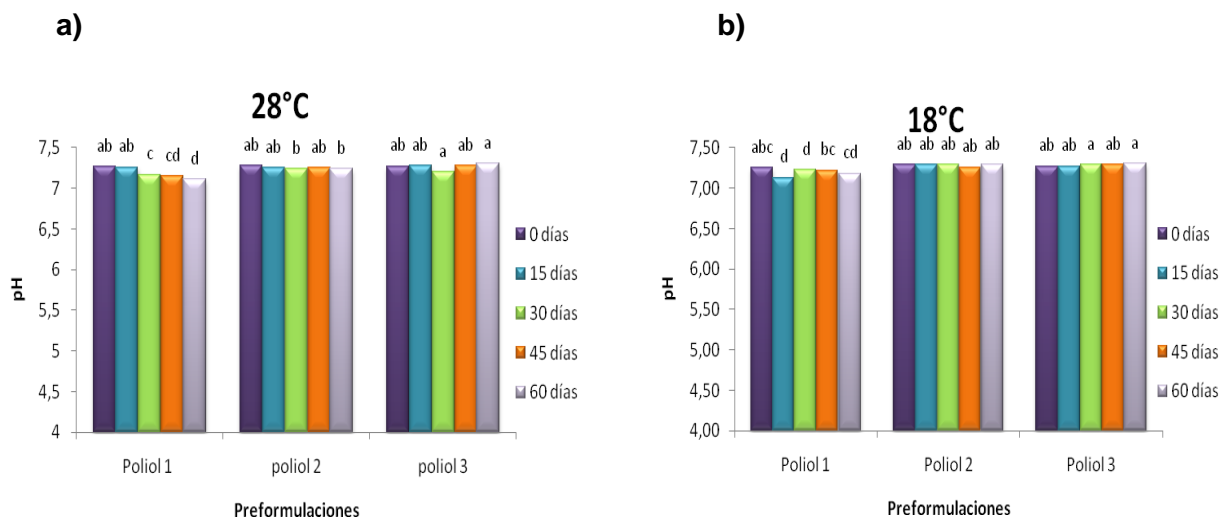


Figura 4. pH de las preformulaciones a base de la biomasa de *P. fluorescens* Pf14 separada del medio de fermentación con polioles al 5% y almacenadas durante dos meses **a)** $28\pm 2^\circ\text{C}$. **b)** $18\pm 2^\circ\text{C}$. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

En lo relacionado al A_w del preformulado a base del poliol 1, éste osciló entre 0,905 y 0,908. Para el prototipo con el poliol 2 se encontró entre 0,922 y 0,926 y para el preformulado a base del poliol 3 entre 0,902 y 0,905 cuando fueron almacenados a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y a $18\pm 2^\circ\text{C}$ (**Anexo 17**). El análisis de varianza no detectó diferencias significativas ($p>0,05$) en el A_w de las preformulaciones, cuando fueron almacenadas dos meses a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y a $18\pm 2^\circ\text{C}$ (**Anexo 18 y 19**). Sin embargo, en las preformulaciones a base de los polioles 1 y 3 se evidenciaron valores más bajos de A_w (0,902 y 0,908), mientras que en las preformulaciones a base del poliol 2 se encontraron valores superiores (0,922 y 0,926) tanto a $28\pm 2^\circ\text{C}$ como a $18\pm 2^\circ\text{C}$. El menor A_w de las preformulaciones a base de los polioles 1 y 3 posiblemente podría estabilizar más eficientemente al microorganismo con respecto al prototipo con el poliol 2, ya que el A_w es un factor que influye en el crecimiento y la viabilidad de los microorganismos. A valores de A_w bajos, los microorganismos entran en una fase de latencia disminuyendo la velocidad de crecimiento y extendiendo su tiempo de supervivencia (48), lo cual está relacionado con el efecto de los polioles al acumularse intracelularmente. Se ha demostrado que un valor óptimo de A_w para el crecimiento de las bacterias se encuentra entre 0,95 y 0,98 y un valor mínimo se encuentra entre 0,91 y 0,95 (55). A valores de A_w por debajo de 0,7 se inhibe la germinación de las esporas y el crecimiento de las bacterias, ya que la excesiva absorción de agua puede causar disminución en la supervivencia celular (56). Por ejemplo, Abadías *et al.* (2001) diseñó una formulación líquida a base de *Candida sake* y demostró que al cultivar las células, utilizando diferentes polioles se evidencia una reducción de la actividad de agua de 0,996 hasta 0,960, la cual favoreció el mantenimiento de la viabilidad y la actividad biológica, teniendo mayor resistencia al estrés hídrico. Además, en otros estudios en los cuales se utilizaron polioles en una formulación líquida a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf1 se demostró que el

glicerol protegió a las células de los efectos de desecación, manteniéndose la viabilidad de la bacteria durante seis meses (26).

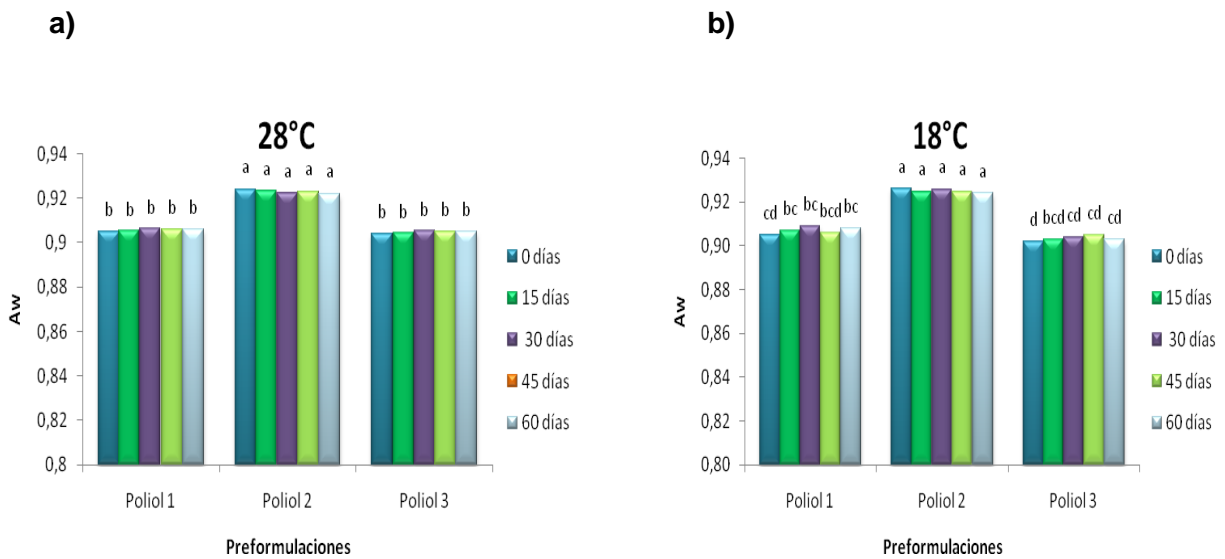
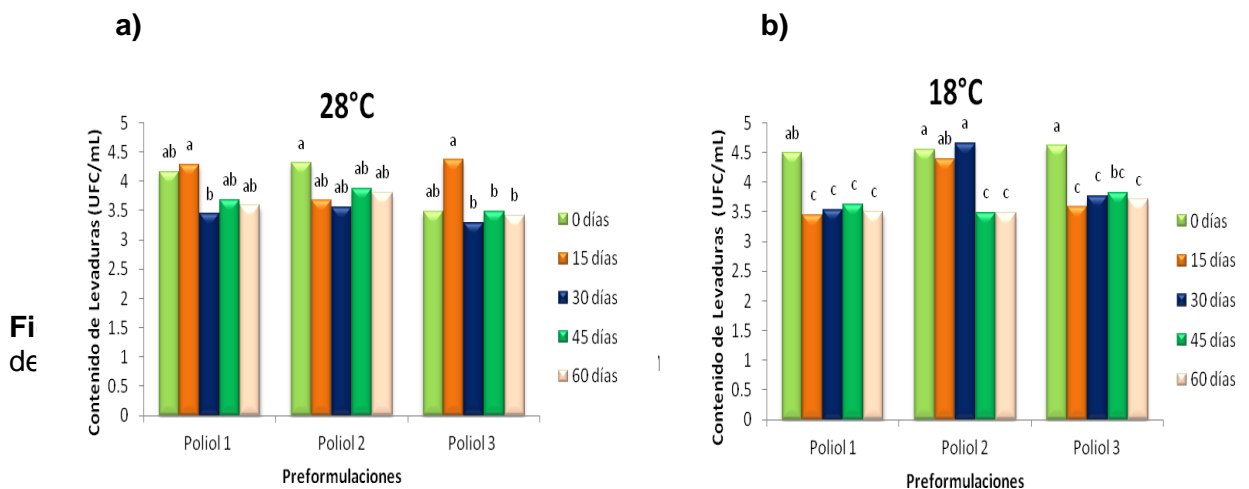


Figura 5. Actividad de agua de las preformulaciones a base de la biomasa de *P. fluorescens* Pf14 separada del medio de fermentación, con polioles al 5% y almacenadas durante dos meses **a)** $28\pm 2^\circ\text{C}$. **b)** $18\pm 2^\circ\text{C}$. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

En cuanto al contenido de contaminantes en las preformulaciones se observó que a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y a $18\pm 2^\circ\text{C}$ las bacterias contaminantes oscilaron entre 0 y 10 UFC/mL. El contenido inicial de levaduras para los preformulados a base del polioliol 1 y 2 fue de 10^4 UFC/mL y después de dos meses se evidenció una disminución a 10^3 UFC/mL. Por otra parte en el preformulado a base del polioliol 3 la concentración de levaduras se mantuvo en el mismo exponente (10^3 UFC/mL) a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y a $18\pm 2^\circ\text{C}$ y se observó una disminución durante los dos meses de almacenamiento (**Anexo 20**). El contenido de contaminantes para las tres preformulaciones no cambió durante los dos meses de almacenamiento a $28\pm 2^\circ\text{C}$, pero la prueba de comparación de medias de Tukey si detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos antes y después de los dos meses de almacenamiento a $18\pm 2^\circ\text{C}$ para las tres formulaciones (**Anexo 21 y 22**).



b) 18±2°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

En cuanto al contenido inicial de mohos para los preformulados a base del poliol 1 y 2, éste fue de 10^2 UFC/mL y después de dos meses se evidenció un aumento a 10^4 UFC/mL, mientras que para el preformulado a base del poliol 3 la concentración de levaduras se mantuvo en el mismo exponente (10^2 UFC/mL) a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y a $18\pm 2^\circ\text{C}$ y se observó un aumento durante los dos meses de almacenamiento (**Anexo 23**). El contenido de contaminantes de las tres preformulaciones no se redujo significativamente ($p>0,05$) durante los dos meses para los preformulados a base del poliol 2 tanto a $28\pm 2^\circ\text{C}$ como a $18\pm 2^\circ\text{C}$ (**Anexo 24 y 25**). La prueba de comparación de medida de Tukey detectó diferencias significativas ($p<0,05$) entre los valores obtenidos antes y después de los dos meses de almacenamiento para los preformulados a base del poliol 1 y 3 a las dos temperaturas evaluadas (**Anexo 24 y 25**).

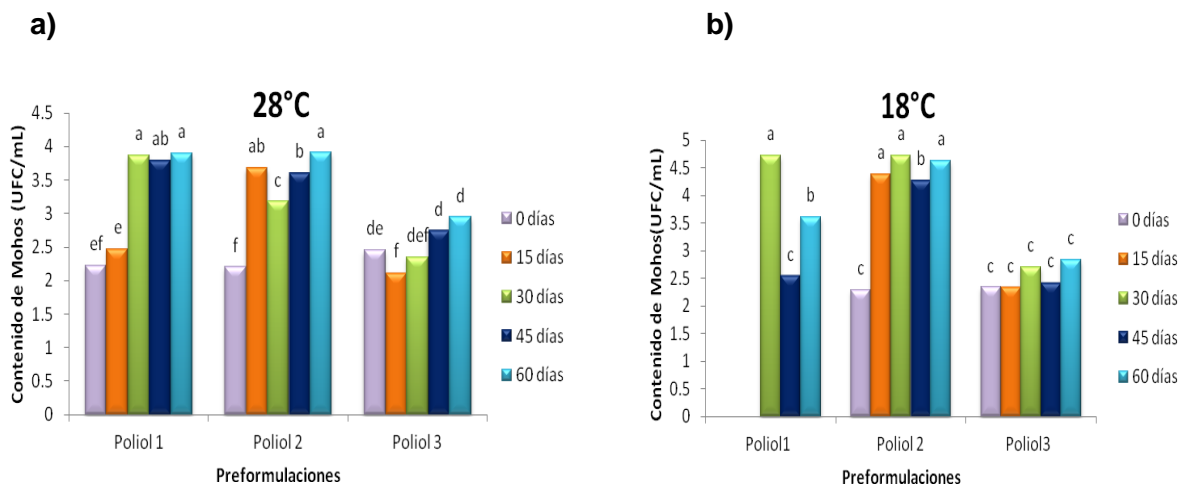


Figura 7. Contenido de mohos (Log UFC/mL) en las preformulaciones a base de la biomasa de *P. fluorescens* Pf14 con polioles al 5% almacenadas durante dos meses **a) 28±2°C** **b) 18±2°C.** Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Para determinar la estabilidad de la viabilidad de *Pseudomonas fluorescens* Pf14 en los sistemas líquidos seleccionados, ésta fue evaluada por la técnica de recuento en placa y se expresó como Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL), posteriormente estos valores fueron transformados determinando el logaritmo decimal de los mismos para normalizarlos y homogeneizar las varianzas y de esta forma realizar el análisis estadístico, utilizando las pruebas paramétricas de varianza y comparación de medias de Tukey (95%).

En cuanto a la viabilidad se observaron pérdidas tanto a los $18\pm 2^\circ\text{C}$ como a los $28\pm 2^\circ\text{C}$ después de 60 días de almacenamiento. A $18\pm 2^\circ\text{C}$ la pérdida para los preformulados a base del poliol 1, 2 y 3 fue de 9,84%, 9,26%, 9,49% respectivamente (**Anexo 26**) y no se evidenciaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los tres tratamientos (**Anexo 27**). Por otra a $28\pm 2^\circ\text{C}$ los preformulados presentaron pérdidas del 3,59%, 9,47%, y del 3,98%, respectivamente (**Anexo 26**), siendo está significativamente mayor para el prototipo 2 en

comparación con las demás (**Anexo 28**), lo cual podría estar relacionado con su mayor A_w , que posiblemente permitió que el metabolismo siguiera activo, repercutiendo negativamente en la viabilidad a través del tiempo, mientras que para los otros dos sistemas el bajo A_w posiblemente favoreció que el microorganismo entrara en un estado de latencia.

En términos generales, la actividad de agua, el pH y el contenido de contaminantes de todos los sistemas se encontraron dentro de los rangos aceptables para este tipo de formulación, razón por la cual la selección se realizó con base en la pérdida de viabilidad. A partir de los resultados obtenidos el único sistema inestable fue el poliol 2, por esta razón se seleccionaron las preformulaciones a base del poliol 1 y 3 para continuar con la fase de formulación en estudios futuros.

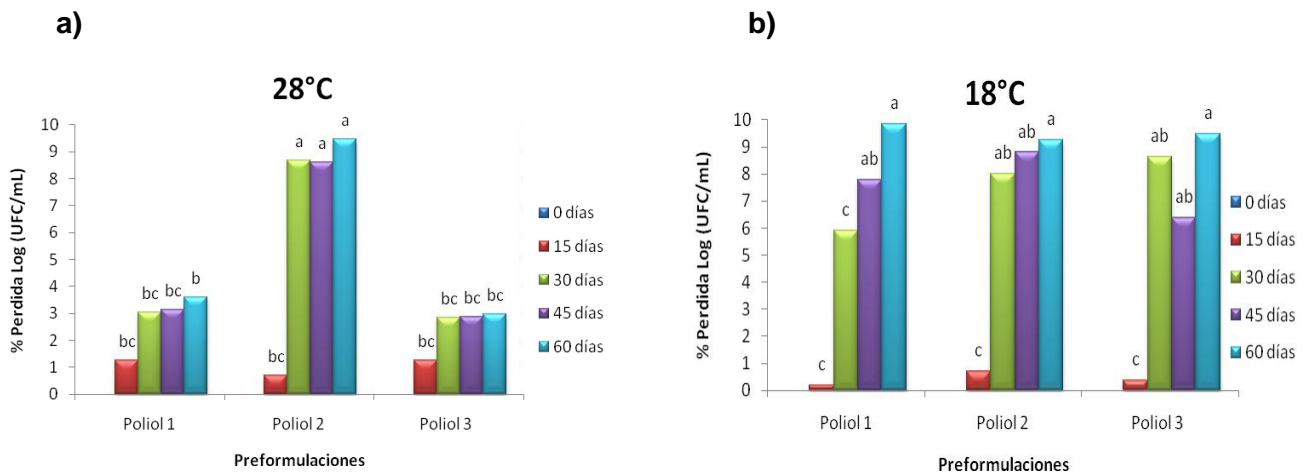


Figura 8. Pérdida de viabilidad de *P. fluorescens* Pf14 en formulaciones líquidas con polioles al 5% durante dos meses de almacenamiento **a)** $28 \pm 2^\circ\text{C}$ **b)** $18 \pm 2^\circ\text{C}$. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

7. CONCLUSIONES

- Se diseñaron doce preformulados líquidos a base de *Pseudomonas fluorescens* PF14 utilizando como excipientes tres polioles diferentes de bajo peso molecular
- Se seleccionó la biomasa separada del caldo de fermentación con adición de los polioles 1 y 3 al 5% como el principio activo más adecuado para el desarrollo de las preformulaciones por permitir la obtención de productos más concentrados y más estables.

8. RECOMENDACIONES

- Escalar y optimizar la producción del principio activo a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.
- Optimizar los prototipos de formulación seleccionados.
- Evaluar la actividad biocontroladora de los sistemas de entrega líquidos seleccionados en condiciones de invernadero y campo.
- Realizar un estudio de estabilidad a largo plazo.

9. LITERATURA CITADA

1. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Anuario Estadístico de frutas y hortalizas 2004-2008 y sus calendarios de siembras y cosechas. [http://www.agront.gov.co/www/docs_agronet//20101715620_AnuarioEstaticofrutasyhortalizas2004 - 2008. pdf](http://www.agront.gov.co/www/docs_agronet//20101715620_AnuarioEstaticofrutasyhortalizas2004-2008.pdf). Consultado el 24 de abril de 2011.
2. Agrios G. *Plant Pathology*. Quinta edición. Editorial Elsevier Academic Press. San Diego, California. 2005, 638p.
3. Nakkeeran S, Fernando D, Siddiqui A. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization of the management of pests and diseases. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Editado por Zaqui Siddiqui. Springer 2006, 257 - 258.
4. Stark J, Banks J, Acheampong. Estimating susceptibility of biological control agents to pesticides: influence of life history strategies and population structure. *Biological Control* 2004; **29**, 392 - 398.
5. Gerhardson B. Biological substitutes for pesticides. *TRENDS in Biotechnology* 2002; **20** (8): 338 - 343.
6. Wang S, Yen Y, Tzeng G, Hsieh C. Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin wastes fermented by *Pseudomonas fluorescens* K-188. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; **36**, 49 - 56.
7. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barky A. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *American Society for Microbiology* 1992; **56** (4): 662- 676.

8. Hass D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by Fluorescents Pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 1- 3.
9. Kuker E, Scisel J. Rye (*Secale cereale*) growth promoting by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biological Control* 2003; **26**, 48 - 56.
10. Academia mexicana de ciencia. <http://revistaciencia.amc.edu.mx/>. Consultado el 6 de enero del 2011.
11. Vendan R, Thangaraju M. Development and standardization of cyst based liquid formulation of *Azospirillum* bioinoculant. *Acta microbiologica et immunologia hungárica* 2007; **54** (2): 167 - 177.
12. Thakore Y. The Biopesticide market for global agricultura use. *Industrial Biotechnology* 2006; **2** (3): 194 - 208.
13. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. La uchuva colombiana líder en el mundo. http://www.minagricultura.gov.co/archivos/boletin-_agenda_004.pdf. Consultado el 15 de abril del 2011.
14. Lancho O, Velandia G, Fischer G, Varela N, García H. Comportamiento de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en poscosecha bajo condiciones de atmósfera modificada activa. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 2007; **8** (1): 61 - 68.
15. Gómez M. Villamizar L. *Formulación de bioplaguicidas*. En: Primer curso taller internacional de control biológico. Corpoica. Bogotá D.C. Colombia. 2000, 108 -112 p.
16. Abadias M, Teixidó N, Usual J, Viñas I, Magan N. Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses based media by physiological manipulation. *Candida Journal of Microbiology* 2001; **47**, 123 - 128.
17. Noiraud N. Moursousset L, Lemoine R. Transport of polyols in higher plants. *Plant physiol. Biochem* 2001; **39**, 717- 728.
18. Cely M. Caracterización de *Pseudomonas fluorescens* Ps013 y estudio de la estabilidad en medio acuosos isotónicos. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 2010, 21 p.
19. Madigan M, Martinko J, Parker J. *Brock: Biología de los microorganismos*. Doceava edición. Editorial Prentice Hall. Madrid, España. 2009, 1259 p.
20. Barbara H. Iglewski J. *Medical Microbiology*. Cuarta edición. Edited Samuel Baron. Texas, US. 1996, 963 p.

21. Bergey D. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Novena edición. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. 2000, 787 p.
22. Ramos J. Flilloux A. *Pseudomonas*. Springer. Washington,USA. 2007, 3p.
23. Kamal M, Elyousr A,Hendawy E. Integration of *Pseudomonas fluorescens* and acibenzolar-S-methyl to control bacterial spot disease of tomato. *Crop protection*. 2008; **27**, 1118 -1124.
24. Laboratorios Britania S.A. [http:// www.Britanianlab.com.ar/esp/productos/ B 02 / pseudoagarf.html](http://www.Britanianlab.com.ar/esp/productos/B_02/pseudoagarf.html). Consultado el 2 de enero del 2011.
25. NCBI. National Center for Biotechnology Information. <http://ncbi.nlm.nih.gov>. Consultado el 3 de enero del 2011.
26. Manikandan R, Saravanakumar D, Rajendra L, Raguchander T, Samiyappan R. Standarization of liquid formulation of *Pseudomonas Fluorescens* PF1 for its efficacy against *Fusarium Wilt* of tomato. *Biological Control* 2010; **54**, 83 - 89.
27. Ramamoorthy V, Viswanathan P, Raguchander T, Samiyappan R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Plant and Soil* 2002; **239**, 55 - 68.
28. Zapata J, Saldarriaga C, Londoño M, Díaz C. Manejo Del Cultivo De La Uchuva En Colombia.[http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Manejo%20del%20cultivo%20de%20la %20uchuva.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Manejo%20del%20cultivo%20de%20la%20uchuva.pdf). Consultado el 6 de enero del 2011.
29. Mojibur K, Doohan F. Comparison of the efficacy of chitosan with that of a fluorescent pseudomonad for the control of *Fusarium* head blight disease of cereals and associated mycotoxin contamination of grain. *Biological Control* 2009; **48**, 48 - 54.
30. Rabindran R, Vidhyasekaran P. Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. *Crop Protection* 1996; **15** (8): 115 - 721.
31. Wilson M, Lindow S. Interaction between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Ecology Epidemiology* 1993; **83** (1): 117 - 123.
32. Adesina M. Lembke A. Costa R. Speksnijder A. Smalla K. Screening of bacterial isolates from various European soils for in vitro antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: Site-dependent composition and diversity revealed. *Soil Biology & Biochemistry* 2007; **39**, 2818 - 2828.
33. Stephane C, Brion D, Nowak J, Clement C, Barka E. Use of Plant Growth Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71** (9): 4951- 4959.
34. Podile A, Kishore A. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*. Springer. 2006: 195 - 230.

35. Albareda M, Rodriguez D, Camacho M, Temprano F. Alternatives to peat as a carrier for rhizobial inoculants solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry* 2008; **40** (11): 2771- 2779.
36. ICA. Instituto Colombiano Agropecuario. <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas-Quimicos.aspx>. Consultado el 2 de enero del 2011.
37. Nanda M, Verhoeven M, Wamelink C. Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics 2008, 473 - 482.
38. Teixido N, Viñas I, Usall J, Magan N. Control of Blue Mold of Apples by Preharvest Application of *Candida sake* Growth in media with Different Water Activity. *The American Phytopathological Society* 1998; **88**, 960 - 964.
39. Abadías M, Teixido N, Usall J, Viñas I, Magan N. Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses - based media by physiological manipulation. *Can.J.Microbiol* 2001; **47**, 123 - 129.
40. Connick W, Daigle D, Boyette C, Williams K, Vunyard B, Quimby P. Water activity and other factors for biocontrol of plant diseases: principles mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; **71** (9): 4951-4959.
41. Abadías M, Usall J, Teixido N, Viñas I. Liquid Formulation of the Postharvest Biocontrol Agent *Candida sake* CPA-1 in Isotonic Solutions. *The American Phytopathological Society* 2003: **93** (4); 436 - 442.
42. Abadías M, Benabarre A, Teixido N, Usall J. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* 2001: **65**, 173 -182.
43. Teixido N, Viñas L, Usall J, Magan N. Control blue apples by preharvest applications of *Candida sake* grown in media different water activity. *Biological Control* 1998: **88** (9); 960 – 964.
44. Wang S, Yen Y, Tzeng G, Hsieh C. Production of antifungal materials by bioconversion of shellfish chitin wastes fermented by *Pseudomonas fluorescens* K-188. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; **36**, 49-56.
45. Ruiz J. Caracterización de un principio activo a base de *Pseudomonas fluorescens* Ps006 y estudio de su compatibilidad con soportes sólidos. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 2011, 16 p.
46. Costa E, Usall S, Teixido N, Torres R, Viñas I. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze- dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain Cpa-2. *Journal of Applied Microbiology* 2002; **92**: 873 - 878.

47. Universidad Navarra. Grupo de Investigación de genética y microbiología. <http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-7.htm> Consultado el 24 de agosto del 2011.
48. Galván P, Beneyto M. *Curso de Manipulador de agua de consume humano*. Universidad de Alicante. Alicante, España. 2009, 96p.
49. Gould G, Measures J. Water relations in single cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 1997; 278: 151-166.
50. Universidad Nacional de la plata. Cátedra de Ecología Microbiana. Facultad de Ciencias exactas. <http://www.biol.unlp.edu.ar/ecologiamicrobiana/ecofisiologia.Pdf>. Consultado el 13 de julio del 2011.
51. Padan E, Bibi E, Lto M, Krulwich T. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; **17** (17); 67 -68.
52. Ertola R, Yantorno O, Mignone C. Crecimiento microbiano. Programa Regional de desarrollo Científico y tecnológico de la OEA. <http://biología.edu.ar/microind/crecimiento%2520bacteriano.htm>. Consultado el 4 de Julio del 2011.
53. Scragg A. *Bioteología para Ingenieros: Sistemas Biológicos en procesos tecnológicos*. Editorial Limusa. México, Ciudad de México. 1996, 415p.
54. Friesen T, Holloway G, Hill G, Pugsley T. Effect of conditions and protectants on the survival of *Penicillium bilaiae* during storage. *Biocontrol Science and Technology* 2006; **16** (1); 89- 98
55. Fraser A. Explain what water activity is and how it relates to bacterial growth. <http://www.foodsafetysite.com/educators/competencies/general/bacteria/bac5.html>. Consultado 17 de Agosto del 2011
56. Raventós M. *Industrial alimentaria Tecnologías Emergentes*. Primera Edición. Universidad Politécnica de Cataluña. Cataluña, España. 2003, 115p.

10. ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica de dos lotes de fermentación de *Pseudomonas fluorescens* Pf14

Características de los prototipos		LOTE 1	LOTE 2	Promedio entre lotes
pH	R1	8,21	7,05	7,77
	R2	7,70	7,89	
	R3	7,98	7,83	
	Promedio	7,96	7,59	
	Desviación Estándar	0,25	0,46	
Peso seco (%)	R1	1,04	1,64	1.38
	R2	1,3	1,63	
	R3	1,39	1,29	
	Promedio	1,24	1,52	
	Desviación Estándar	0,18	0,19	
Concentración (UFC/mL)	R1	$7,00 \times 10^9$	$7,20 \times 10^9$	$7,38 \times 10^9$
	R2	$7,10 \times 10^9$	$8,00 \times 10^9$	
	R2	$6,00 \times 10^9$	$9,00 \times 10^9$	
	Promedio	$6,70 \times 10^9$	$8,06 \times 10^9$	
	Desviación Estándar	$5,77 \times 10^8$	$9,02 \times 10^8$	

Anexo 2. Análisis estadístico de la variable pH de los lotes de fermentación de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0
14:29:16

26/05/2011,

One-Way AOV for: E1 E11 E2 E22 E3 E33

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	0.68232	0.13646	2.88	0.1616
Within	12	0.56773	0.04731		
Total	17	1.25005			

Grand Mean 7.8717 CV 2.76

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	33.7	5	0.0000
Cochran's Q	0.9839		
Largest Var / Smallest Var	1197.0		

Component of variance for between groups 0.02972
Effective cell size 3.0

Variable	Mean
E1	8.2100

E11 7.6100
 E2 7.7000
 E22 7.8900
 E3 7.9867
 E33 7.8333
 Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 0.1256
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1776

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0
 14:29:38

26/05/2011,

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
E1	8.2100	A
E3	7.9867	AB
E22	7.8900	AB
E33	7.8333	AB
E2	7.7000	AB
E11	7.6100	AB

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1776
 Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 0.5966
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

ANEXO 3. Análisis estadístico de la variable peso seco (%) de los lotes de fermentación de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0
 26/05/2011, 14:31:47

One-Way AOV for: E1 E11 E2 E22 E3 E33

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	0.45478	0.09096	0.57	0.7233
Within	12	1.92120	0.16010		
Total	17	2.37598			

Grand Mean 1.4389 CV 27.81

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.65	5	0.8948
Cochran's Q	0.3070		
Largest Var / Smallest Var	3.8995		

Component of variance for between groups -0.02305
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean
E1	1.3667
E11	1.6367
E2	1.2967
E22	1.2733
E3	1.3833
E33	1.6767
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.2310
Std Error (Diff of 2 Means)	0.3267

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0
26/05/2011, 14:32:07

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
E33	1.6767	A
E11	1.6367	A
E3	1.3833	A
E1	1.3667	A
E2	1.2967	A
E22	1.2733	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.3267
Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 1.0975
There are no significant pairwise differences among the means.

ANEXO 4. Análisis estadístico de la variable concentración (UFC/mL) de fermentación de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0
26/05/2011, 14:30:10

One-Way AOV for: E1 E11 E2 E22 E3 E33

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	0.02072	0.00414	2.25	0.1160
Within	12	0.02210	0.00184		
Total	17	0.04281			

Grand Mean 9.8678 CV 0.43

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	1.36	5	0.9284
Cochran's Q	0.3087		
Largest Var / Smallest Var	4.8299		

Component of variance for between groups 7.672E-04
Effective cell size 3.0

Variable Mean
 E1 9.8248
 E11 9.9018
 E2 9.8315
 E22 9.8487
 E3 9.8911
 E33 9.9088
 Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 0.0248
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0350

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0
 26/05/2011, 14:30:32

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
E33	9.9088	A
E11	9.9018	A
E3	9.8911	A
E22	9.8487	A
E2	9.8315	A
E1	9.8248	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0350
 Critical Q Value 4.751 Critical Value for Comparison 0.1177
 There are no significant pairwise differences among the means.

ANEXO 5. Resultados de la caracterización (UFC/mL) de preformulaciones a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Concentración (UFC/mL)									
		Caldo de fermentación				Biomasa separada del caldo de fermentación			
Concentración		5%		10%		5%		10%	
Tiempo(horas)		0	48	0	48	0	48	0	48
Poliol 1	R1	8X10 ⁹	1X10 ⁹	6X10 ⁹	2X10 ⁹	2X10 ¹²	2X10 ¹²	2X10 ¹²	2X10 ¹²
	R2	7X10 ⁹	3X10 ⁹	6X10 ⁹	1X10 ⁹	2,11X10 ¹²	1,23X10 ¹²	1X10 ¹²	1,47X10 ¹²
	R3	8X10 ⁹	1X10 ⁹	5X10 ⁹	4X10 ⁹	1,22X10 ¹²	2X10 ¹²	2X10 ¹²	1X10 ¹²
	Promedio	7,66X10 ⁹	1,66X10 ⁹	5,66X10 ⁹	2,33X10 ⁹	1,77X10 ¹²	1,74X10 ¹²	1,66X10 ¹²	1,49X10 ¹²
	Control	7X10 ⁹	7,12X10 ⁹	7X10 ⁹	7,12X10 ⁹	2X10 ¹²	1X10 ¹²	2X10 ¹²	1X10 ¹²
Poliol 2	R1	6X10 ⁹	6X10 ⁹	7X10 ⁹	6X10 ⁹	1,48X10 ¹²	2X10 ¹²	1,10X10 ¹²	1X10 ¹²
	R2	5X10 ⁹	4X10 ⁹	6,12X10 ⁹	2X10 ⁹	2X10 ¹²	1,35X10 ¹²	1X10 ¹²	2X10 ¹²
	R3	4X10 ⁹	6X10 ⁹	7,14X10 ⁹	4X10 ⁹	1,42X10 ¹²	1,22X10 ¹²	1,14X10 ¹²	1,15X10 ¹²

	Promedio	5X10 ⁹	5,33X10 ⁹	6,75X10 ⁹	4X10 ⁹	1,63X10 ¹²	1,52X10 ¹²	1,08X10 ¹²	1,38X10 ¹²
	Control	7X10 ⁹	7,12X10 ⁹	7X10 ⁹	7,12X10 ⁹	1,12X10 ¹²	1X10 ¹²	1,12X10 ¹²	1X10 ¹²
Poliol 3	R1	5X10 ⁹	5X10 ⁹	6X10 ⁹	6X10 ⁹	2,52X10 ¹²	2X10 ¹²	2,30X10 ¹²	1X10 ¹²
	R2	4X10 ⁹	5,12X10 ⁹	6X10 ⁹	5X10 ⁹	1X10 ¹²	1,47X10 ¹²	2X10 ¹²	2X10 ¹²
	R3	5X10 ⁹	4X10 ⁹	5X10 ⁹	3X10 ⁹	2X10 ¹²	1X10 ¹²	1X10 ¹²	2,20X10 ¹²
	Promedio	4,66X10 ⁹	4,70X10 ⁹	5,66X10 ⁹	4,66X10 ⁹	1,84X10 ¹²	1,49X10 ¹²	1,76X10 ¹²	1,37X10 ¹²
	Control	7X10 ⁹	7,12X10 ⁹	7X10 ⁹	7,12X10 ⁹	1X10 ¹²	1X10 ¹²	1,11X10 ¹²	1X10 ¹²

ANEXO 6. Análisis estadístico de la variable concentración (UFC/mL) del caldo de fermentación a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0
10/05/2011, 14:17:11

One-Way AOV for: a b c d i j k l q r s t

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	11	1.10183	0.10017	6.29	0.0001
Within	24	0.38207	0.01592		
Total	35	1.48391			

Grand Mean 9.6731 CV 1.30

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	21.2	11	0.0311
Cochran's Q	0.3972		
Largest Var / Smallest Var	67.690		

Component of variance for between groups 0.02808
Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
a	9.8838	k	9.8285
b	9.1590	l	9.5604
c	9.7518	q	9.6600
d	9.7518	r	9.6668
i	9.6931	s	9.7518
j	9.7195	t	9.6514
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			0.0728
Std Error (Diff of 2 Means)			0.1030

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

10/05/2011, 14:18:20

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
a	9.8838	A
k	9.8285	A
c	9.7518	A
d	9.7518	A
s	9.7518	A
j	9.7195	A
i	9.6931	A
r	9.6668	A
q	9.6600	A
t	9.6514	A
l	9.5604	A
b	9.1590	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1030
Critical Q Value 5.098 Critical Value for Comparison 0.3714
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

ANEXO 7. Análisis estadístico de la variable concentración (UFC/mL) de la biomasa separada del caldo de fermentación a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0
10/05/2011, 14:22:23

One-Way AOV for: a b c d i j k l q r s t

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	11	0.11759	0.01069	0.48	0.9001
Within	24	0.53904	0.02246		
Total	35	0.65663			

Grand Mean 12.182 CV 1.23

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	6.20	11	0.8599
Cochran's Q	0.1619		
Largest Var / Smallest Var	50.427		

Component of variance for between groups -0.00392
Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
a	12.237	k	12.033
b	12.231	l	12.121
c	12.201	q	12.234
d	12.156	r	12.156
i	12.208	s	12.221
j	12.173	t	12.214

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 0.0865
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1224

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0
 10/05/2011, 14:22:53

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
a	12.237	A
q	12.234	A
b	12.231	A
s	12.221	A
t	12.214	A
i	12.208	A
c	12.201	A
j	12.173	A
d	12.156	A
r	12.156	A
l	12.121	A
k	12.033	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1224
 Critical Q Value 5.098 Critical Value for Comparison 0.4411
 There are no significant pairwise differences among the means.

ANEXO 8. Resultados de la caracterización (A_w) de las preformulaciones a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

A_w									
		Caldo de fermentación				Biomasa separada del caldo de fermentación			
Concentración		5%		10%		5%		10%	
Tiempo(horas)		0	48	0	48	0	48	0	48
Poliol 1	R1	0,958	0,980	0,974	0,962	0,907	0,908	0,912	0,910
	R2	0,968	0,990	0,962	0,974	0,906	0,908	0,912	0,911
	R3	0,979	0,980	0,982	0,970	0,906	0,907	0,911	0,910
	Promedio	0,968	0,983	0,972	0,968	0,906	0,907	0,911	0,910
Control		1	1	1	1	1	1	1	1
Poliol 2	R1	0,915	0,922	0,928	0,934	0,926	0,926	0,937	0,918
	R2	0,919	0,923	0,928	0,931	0,932	0,924	0,940	0,906
	R3	0,921	0,922	0,931	0,934	0,934	0,926	0,939	0,910
	Promedio	0,918	0,922	0,929	0,933	0,930	0,925	0,938	0,911
Control		1	1	1	1	1	1	1	1
Poliol 3	R1	0,929	0,930	0,919	0,915	0,923	0,916	0,917	0,916

	R2	0,928	0,930	0,917	0,919	0,922	0,918	0,916	0,918
	R3	0,925	0,934	0,916	0,918	0,922	0,918	0,919	0,918
	Promedio	0,927	0,931	0,917	0,917	0,922	0,917	0,917	0,917
	Control	1	1	1	1	1	1	1	1

ANEXO 9. Análisis estadístico de la variable actividad de agua del caldo de fermentación a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0
14:38:13

07/06/2011,

One-Way AOV for: a b c d e f g h I j k l lm n

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	13	0.02167	0.00167	74.64	0.0000
Within	28	6.253E-04	2.233E-05		
Total	41	0.02230			

Grand Mean 7.2444 CV 0.16

At least one group variance is near zero,
variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 5.482E-04
Effective cell size 3.0

Variable	Mean	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
a	0.9683	3	0.0105
b	0.9833	3	5.774E-03
c	0.9727	3	0.0101
d	0.9687	3	6.110E-03
e	0.9183	3	3.055E-03
f	0.9223	3	5.774E-04
g	0.9290	3	1.732E-03
h	0.9333	3	1.155E-03
I	0.9273	3	2.082E-03
J	0.9313	3	2.309E-03
K	0.9173	3	1.528E-03
L	0.9173	3	2.082E-03
Lm	0.9570	3	0.0000
N	0.9570	3	0.0000
TOTAL	0.9431	42	4.726E-03

CASES INCLUDED 42 MISSING CASES 0

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0
14:38:34

13/06/2011,

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
b	0.9833	A
c	0.9833	AB
d	0.9833	BC
a	0.9833	AC
lm	0.9833	C
n	0.9833	C
h	0.9833	D
j	0.9833	DE
g	0.9833	DE
i	0.9833	DE
f	0.9833	DE
e	0.9833	E
k	0.9833	E
l	0.9833	E

Alpha 5.175 Standard Error for Comparison 3.859E-03
 Critical Q Value 5.210 Critical Value for Comparison 0.050
 There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ANEXO 10. Análisis estadístico de la variable actividad de agua de la biomasa separada del caldo de fermentación a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0
 14:22:23

10/05/2011,

One-Way AOV for: a b c d i j k l q r s t

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	11	0.11759	0.01069	0.48	0.9001
Within	24	0.53904	0.02246		
Total	35	0.65663			

Grand Mean 12.182 CV 1.23

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	6.20	11	0.8599
Cochran's Q	0.1619		
Largest Var / Smallest Var	50.427		

Component of variance for between groups -0.00392
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
a	12.237	k	12.033
b	12.231	l	12.121
c	12.201	q	12.234
d	12.156	r	12.156
i	12.208	s	12.221
j	12.173	t	12.214

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 0.0865
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1224

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0
 14:24:40

10/05/2011,

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
k	0.9387	A
i	0.9307	A
j	0.9253	A
q	0.9223	A
s	0.9173	A
t	0.9173	A
c	0.9117	A
l	0.9113	A
d	0.9103	A
lm	1.0000	A
n	1.0000	A
b	0.9077	A
a	0.9063	A
r	0.3060	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1157
 Critical Q Value 5.175 Critical Value for Comparison 0.4233
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

ANEXO 11. Resultados de la caracterización (pH) de preformulaciones a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

pH									
		Caldo de fermentación				Biomasa separada del caldo de fermentación			
Concentración		5%		10%		5%		10%	
Tiempo(horas)		0	48	0	48	0	48	0	48
Poliol 1	R1	7,58	7,88	7,66	7,55	7,32	7,44	7,32	7,38
	R2	7,57	7,82	7,57	7,48	7,32	7,45	7,30	7,32
	R3	7,56	7,78	7,60	7,56	7,34	7,43	7,31	7,33
	Promedio	7,57	7,82	7,59	7,53	7,32	7,44	7,31	7,31
Control		7,92	7,97	7,92	7,97	7,32	7,39	7,32	7,39
Poliol 2	R1	7,65	7,63	7,66	7,73	7,33	7,34	7,36	7,44
	R2	7,58	7,62	7,66	7,76	7,36	7,36	7,35	7,41
	R3	7,51	7,64	7,61	7,74	7,36	7,33	7,33	7,42

	Promedio	7,58	7,63	7,64	7,74	7,35	7,34	7,34	7,42
	Control	7,92	7,97	7,92	7,97	7,32	7,39	7,32	7,39
Poliol 3	R1	7,88	7,88	7,90	7,85	7,35	7,35	7,28	7,42
	R2	7,86	7,81	7,87	7,82	7,34	7,34	7,29	7,43
	R3	7,84	7,82	7,90	7,84	7,34	7,35	7,30	7,41
	Promedio	7,86	7,81	7,89	7,83	7,34	7,34	7,29	7,42
	Control	7,92	7,97	7,92	7,97	7,32	7,39	7,32	7,39

ANEXO 12. Análisis estadístico de la variable pH del caldo de fermentación a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0
20:17:32

30/05/2011,

One-Way AOV for: c d e f g h i j k l lm n o p q

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	12	1.21343	0.10112	87.83	0.0000
Within	26	0.02993	0.00115		
Total	38	1.24336			

Variable	Mean	Sample siza	Group std Dev
c	7.8267	3	0.0503
d	7.6100	3	0.0458
e	7.5300	3	0.0436
f	7.5800	3	0.0700
g	7.6300	3	0.0653
h	7.6433	3	0.0289
i	7.7433	3	0.0153
j	7.8600	3	0.0200
k	7.8367	3	0.0379
l	7.8900	3	0.0173
lm	7.8367	3	0.0153
n	7.8200	3	0.0000
o	7.3900	3	0.0000

Cases included: 39
Missing cases:0

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0
20:17:49

30/05/2011,

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
o	7.9700	A
l	7.8900	AB
j	7.8600	ABC
k	7.8367	ABC
lm	7.8367	ABC
c	7.8267	ABC
i	7.7433	ABC
n	7.6800	ABC
h	7.6433	ABC
g	7.6300	ABC
d	7.6100	BC
f	7.5800	BC
b	7.5700	BC
e	7.5300	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0946
 Critical Q Value 5.175 Critical Value for Comparison 0.0946
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ANEXO 13. Análisis estadístico de la variable pH de la biomasa separada del caldo de fermentación a base de *Pseudomonas fluorescens* Pf14.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0
 20:17:32

30/05/2011,

One-Way AOV for: c d e f g h i j k l lm n o p q

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	13	0.07847	0.00604	32.09	0.0000
Within	28	0.00527	1.88		
Total	41	0.08373			

Component of variance for between groups 0.00195
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Sample Siza	group STD DEV
b	7.3267	3	0.0115
c	7.4400	3	0.0100
d	7.3100	3	0.0100
e	7.3433	3	0.0321
f	7.3500	3	0.0173
g	7.3433	3	0.0153
h	7.3467	3	0.0153

i	7.4233	3	0.0153
j	7.3433	3	0.0177
k	7.3467	3	0.0177
l	7.2900	3	0.0100
lm	7.4200	3	0.0100
n	7.3200	3	0.0000
o	7.3900	3	0.0000

CASES INCLUDED 42 MISSING CASES 0

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0
20:17:49

30/05/2011,

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
c	7.4400	A
i	7.4233	AB
lm	7.4200	AB
o	7.3900A	BC
f	7.3500	CD
h	7.3467	D
k	7.3467	D
e	7.3433	D
g	7.3433	D
j	7.3433	D
b	7.3267	DE
n	7.3200	DE
d	7.3100	DE
l	7.2900	E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0112
Critical Q Value 5.175 Critical Value for Comparison 0.0410
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ANEXO 14. pH de los sistemas líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.

pH															
28°C															
Poliol	Poliol 1					Poliol 2					Poliol 3				
Tiempo	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	7,19	7,22	7,15	7,15	7,15	7,28	7,25	7,24	7,23	7,25	7,30	7,27	7,32	7,29	7,29
R2	7,22	7,25	7,16	7,14	7,13	7,29	7,24	7,25	7,25	7,25	7,31	7,27	7,32	7,28	7,28
R3	7,25	7,25	7,16	7,14	7,13	7,29	7,25	7,25	7,24	7,24	7,29	7,29	7,32	7,27	7,29
18°C															
Poliol	Poliol 1					Poliol 2					Poliol 3				
Tiempo	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	7,26	7,16	7,16	7,25	7,17	7,28	7,30	7,29	7,26	7,27	7,26	7,26	7,30	7,30	7,30
R2	7,27	7,18	7,15	7,25	7,19	7,29	7,29	7,27	7,25	7,30	7,25	7,27	7,29	7,30	7,30
R3	7,28	7,15	7,10	7,24	7,17	7,29	7,29	7,28	7,24	7,26	7,26	7,27	7,29	7,28	7,28

ANEXO 15. Análisis estadístico de la variable pH de los soportes líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0

07/06/2011, 14:40:09

One-Way AOV for: c d e f g h i j k l lm n o p q

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	14	0.09945	0.00710	33.0	0.0000
Within	30	0.00647	0.00022		
Total	44	0.10592			

Grand Mean 7.2520 CV 0.20

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	16.9	14	0.2613

Cochran's Q 0.3196
 Largest Var / Smallest Var 31.000

Component of variance for between groups 0.00230
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
c	7.2367	k	7.2500
d	7.1633	l	7.2767
e	7.1367	lm	7.2567
f	7.2467	n	7.2667
g	7.2067	o	7.2933
h	7.2867	p	7.2933
i	7.2933	q	7.2933
j	7.2800		

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 8.477E-03
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0120

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

07/06/2011, 14:40:31

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
i	7.2933	A
o	7.2933	A
p	7.2933	A
q	7.2933	A
h	7.2867	AB
j	7.2800	ABC
l	7.2767	ABC
n	7.2667	ABC
lm	7.2567	ABC
k	7.2500	ABCD
f	7.2467	BCD
c	7.2367	CD

g	7.2067	DE
d	7.1633	EF
e	7.1367	F

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0120
 Critical Q Value 5.210 Critical Value for Comparison 0.0442
 There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ANEXO 16. Análisis estadístico de la variable pH de los soportes líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 28°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0

07/06/2011, 14:38:13

One-Way AOV for: c d e f g h i j k l lm n o p q

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	14	0.11831	0.00845	63.4	0.0000
Within	30	0.00400	0.00013		
Total	44	0.12231			

Grand Mean 7.2444 CV 0.16

At least one group variance is near zero, variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 0.00277
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
c	7.2200	k	7.2400
d	7.2400	l	7.2467
e	7.1967	lm	7.3000
f	7.1433	n	7.2767
g	7.1367	o	7.3200
h	7.2867	p	7.2800

i	7.2467	q	7.2867
j	7.2467		
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			6.667E-03
Std Error (Diff of 2 Means)			9.428E-03

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

07/06/2011, 14:38:34

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
o	7.3200	A
lm	7.3000	AB
h	7.2867	AB
q	7.2867	AB
p	7.2800	BC
n	7.2767	BC
i	7.2467	CD
j	7.2467	CD
l	7.2467	CD
k	7.2400	D
d	7.2400	D
c	7.2200	DE
e	7.1967	E
f	7.1433	F
g	7.1367	F

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 9.428E-03

Critical Q Value 5.210 Critical Value for Comparison 0.0347

There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ANEXO 17. Actividad de agua (Aw) de los sistemas líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.

Actividad de Agua (Aw)															
28°C															
Poliol	Poliol 1					Poliol 2					Poliol 3				
Tiempo	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	0,900	0,899	0,904	0,907	0,905	0,925	0,920	0,921	0,923	0,922	0,902	0,902	0,906	0,905	0,908
R1	0,902	0,903	0,906	0,903	0,908	0,920	0,921	0,919	0,919	0,923	0,900	0,901	0,903	0,903	0,906
R1	0,909	0,907	0,907	0,905	0,905	0,922	0,922	0,922	0,920	0,923	0,901	0,901	0,902	0,904	0,905
R2	0,909	0,908	0,908	0,907	0,907	0,929	0,927	0,927	0,925	0,925	0,905	0,906	0,908	0,909	0,905
R2	0,908	0,906	0,906	0,904	0,903	0,927	0,928	0,925	0,925	0,926	0,908	0,908	0,908	0,908	0,906
R2	0,906	0,908	0,909	0,910	0,908	0,925	0,925	0,923	0,923	0,920	0,908	0,909	0,906	0,905	0,905
18°C															
Poliol	Poliol 1					Poliol 2					Poliol 3				
Tiempo	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	0,906	0,910	0,907	0,908	0,908	0,927	0,927	0,928	0,926	0,925	0,902	0,906	0,906	0,905	0,904
R1	0,903	0,909	0,912	0,910	0,908	0,926	0,925	0,923	0,923	0,923	0,902	0,908	0,904	0,902	0,903
R1	0,909	0,908	0,910	0,909	0,905	0,926	0,924	0,925	0,924	0,920	0,901	0,909	0,903	0,903	0,901
R2	0,903	0,908	0,912	0,904	0,910	0,928	0,928	0,929	0,929	0,927	0,902	0,907	0,904	0,907	0,905
R2	0,905	0,903	0,911	0,903	0,909	0,926	0,925	0,928	0,928	0,926	0,903	0,903	0,905	0,905	0,907
R2	0,908	0,908	0,909	0,906	0,908	0,928	0,927	0,926	0,928	0,926	0,905	0,904	0,908	0,906	0,904

ANEXO 18. Análisis estadístico de la variable Aw de los soportes líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

One-Way AOV for: c d e f g h i j k l lm n o p q

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	14	0.00827	5.906E-04	135	0.0000
Within	75	0.00033	4.369E-06		
Total	89	0.00860			

Grand Mean 0.9127 CV 0.23

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	8.58	14	0.8571
Cochran's Q	0.1200		
Largest Var / Smallest Var	8.1379		

Component of variance for between groups 9.771E-05
 Effective cell size 6.0

Variable	Mean	Variable	Mean
c	0.9057	k	0.9263
d	0.9077	l	0.9245
e	0.9102	lm	0.9025
f	0.9067	n	0.9062
g	0.9080	o	0.9050
h	0.9268	p	0.9047
i	0.9260	q	0.9040
j	0.9265		
Observations per Mean		6	
Standard Error of a Mean		8.533E-04	
Std Error (Diff of 2 Means)		1.206E-03	

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
h	0.9268	A
j	0.9265	A
k	0.9263	A
i	0.9260	A
l	0.9245	A
e	0.9102	B
g	0.9080	BC
d	0.9077	BC
f	0.9067	BCD
n	0.9062	BCD
c	0.9057	CD
o	0.9050	CD
p	0.9047	CD
q	0.9040	CD
lm	0.9025	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.206E-03
Critical Q Value 4.954 Critical Value for Comparison 4.227E-03
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

ANEXO 19. Análisis estadístico de la variable Aw de los soportes líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 28°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0

30/05/2011, 20:16:33

One-Way AOV for: c d e f g h i j k l lm n o p q

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	14	0.00646	4.613E-04	57.7	0.0000
Within	75	0.00060	8.000E-06		
Total	89	0.00706			

Grand Mean 0.9115 CV 0.31

Chi-Sq DF P

Bartlett's Test of Equal Variances 11.4 14 0.6520
 Cochran's Q 0.1222
 Largest Var / Smallest Var 10.732

Component of variance for between groups 7.555E-05
 Effective cell size 6.0

Variable	Mean	Variable	Mean
c	0.9057	k	0.9225
d	0.9052	l	0.9232
e	0.9067	lm	0.9040
f	0.9060	n	0.9045
g	0.9060	o	0.9055
h	0.9247	p	0.9057
i	0.9238	q	0.9058
j	0.9228		
Observations per Mean		6	
Standard Error of a Mean		1.154E-03	
Std Error (Diff of 2 Means)		1.633E-03	

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

30/05/2011, 20:16:57

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
h	0.9247	A
i	0.9238	A
l	0.9232	A
j	0.9228	A
k	0.9225	A
e	0.9067	B
f	0.9060	B
g	0.9060	B
q	0.9058	B
c	0.9057	B

p 0.9057 B
o 0.9055 B
d 0.9052 B
n 0.9045 B
lm 0.9040 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.633E-03
Critical Q Value 4.954 Critical Value for Comparison 5.721E-03
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

ANEXO 20. Contenido de levaduras (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.

Contenido de levaduras (UFC/mL)															
28°C															
Poliol	Poliol 1					Poliol 2					Poliol 3				
Tiempo	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	1,20x10 ⁴	1,50x10 ⁴	1,70x10 ³	1,00x10 ³	2,00x10 ³	2,00x10 ⁴	2,00x10 ³	5,00x10 ³	9,00x10 ³	7,00x10 ³	1,00x10 ³	1,00x10 ⁴	1,90x10 ³	3,00x10 ³	3,20x10 ³
R1	2,00x10 ⁴	1,10x10 ⁴	2,00x10 ³	3,00x10 ³	5,00x10 ³	3,00x10 ⁴	8,00x10 ³	4,00x10 ³	5,00x10 ³	8,00x10 ³	3,00x10 ³	4,00x10 ⁴	2,00x10 ³	5,00x10 ³	2,80x10 ³
R2	1,00x10 ⁴	3,00x10 ⁴	2,10x10 ³	6,00x10 ³	3,00x10 ³	1,00x10 ⁴	3,90x10 ³	2,00x10 ³	7,00x10 ³	6,00x10 ³	5,00x10 ³	3,00x10 ⁴	1,50x10 ³	3,00x10 ³	1,90x10 ³
R2	1,50x10 ⁴	2,00x10 ⁴	5,00x10 ³	9,00x10 ³	5,00x10 ³	2,00x10 ⁴	4,50x10 ³	9,00x10 ³	8,00x10 ³	4,00x10 ³	3,00x10 ³	1,00x10 ⁴	2,20x10 ³	1,00x10 ³	2,10x10 ³
18°C															
Poliol	Poliol 1					Poliol 1					Poliol 1				
Tiempo	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	5,00x10 ⁴	5,00x10 ³	3,10x10 ³	3,10x10 ³	2,80x10 ³	1,00x10 ⁴	2,00x10 ⁴	5,00x10 ⁴	3,00x10 ³	2,00x10 ³	1,00x10 ⁴	5,00x10 ³	6,00x10 ³	9,00x10 ³	7,00x10 ³
R1	4,00x10 ⁴	1,00x10 ³	3,30x10 ³	3,30x10 ³	3,10x10 ³	6,00x10 ⁴	3,00x10 ⁴	3,00x10 ⁴	6,00x10 ³	5,00x10 ³	3,00x10 ⁴	2,00x10 ³	4,00x10 ³	6,00x10 ³	5,00x10 ³
R2	1,00x10 ⁴	1,00x10 ³	3,40x10 ³	3,40x10 ³	3,29x10 ³	5,00x10 ⁴	2,10x10 ⁴	7,00x10 ⁴	1,00x10 ³	4,00x10 ³	7,00x10 ⁴	2,00x10 ³	8,00x10 ³	4,00x10 ³	3,00x10 ³

R2	2,00x10 ⁴	4,00x10 ³	3,70x10 ³	6,00x10 ³	3,32x10 ³	2,00x10 ⁴	2,60x10 ⁴	3,00x10 ⁴	2,00x10 ³	1,00x10 ³	5,00x10 ⁴	6,00x10 ³	5,00x10 ³	7,00x10 ³	5,00x10 ³
-----------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

ANEXO 21. Análisis estadístico del contenido de levaduras (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0

30/05/2011, 20:20:49

One-Way AOV for: c d e f g h i j k l lm n o p q

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	14	12.4050	0.88607	14.8	0.0000
Within	45	2.7021	0.06005		
Total	59	15.1070			

Grand Mean 3.8552 CV 6.36

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	30.2	14	0.0072
Cochran's Q	0.1584		
Largest Var / Smallest Var	139.99		

Component of variance for between groups 0.20651
Effective cell size 4.0

Variable	Mean	Variable	Mean
c	4.4005	k	3.3891
d	3.3253	l	3.4005
e	3.5274	lm	4.5053
f	3.5976	n	3.5198
g	3.4942	o	3.7456
h	4.4445	p	3.7949
i	4.3788	q	3.6801
j	4.6246		
Observations per Mean			4
Standard Error of a Mean			0.1225
Std Error (Diff of 2 Means)			0.1733

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

30/05/2011, 20:22:16

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
j	4.6246	A
lm	4.5053	A
h	4.4445	A
c	4.4005	AB
i	4.3788	AB
p	3.7949	BC
o	3.7456	C
q	3.6801	C
f	3.5976	C
e	3.5274	C
n	3.5198	C
g	3.4942	C
l	3.4005	C
k	3.3891	C
d	3.3253	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1733
Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 0.6209
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

ANEXO 22. Análisis estadístico del contenido de levaduras (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 28°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0

30/05/2011, 20:19:49

One-Way AOV for: c d e f g h i j k l lm n o p q

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	14	6.1108	0.43649	4.83	0.0000
Within	45	4.0697	0.09044		
Total	59	10.1806			

Grand Mean 3.7514 CV 8.02

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	23.0	14	0.0595
Cochran's Q	0.3775		
Largest Var / Smallest Var	45.876		

Component of variance for between groups 0.08651
 Effective cell size 4.0

Variable	Mean	Variable	Mean
c	4.1391	k	3.8504
d	4.2489	l	3.7821
e	3.3882	lm	3.7188
f	3.5524	n	4.2698
g	3.5440	o	3.4549
h	4.2698	p	3.4133
i	3.6121	q	3.3883
j	3.6391		
Observations per Mean			4
Standard Error of a Mean			0.1504
Std Error (Diff of 2 Means)			0.2126

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

30/05/2011, 20:20:11

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
h	4.2698	A
n	4.2698	A
d	4.2489	A
c	4.1391	AB
k	3.8504	AB
l	3.7821	AB
lm	3.7188	AB
j	3.6391	AB
i	3.6121	AB
f	3.5524	AB
g	3.5440	AB
o	3.4549	B
p	3.4133	B
q	3.3883	B
e	3.3882	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.2126
Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 0.7620
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

ANEXO 23. Contenido de mohos (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.

Contenido de Hongos UFC/mL

28°C

Poliol	Poliol 1					Poliol 2					Poliol 3				
	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	1,50x10 ²	2,50x10 ²	7,00x10 ³	5,00x10 ³	7,60x10 ³	1,45x10 ²	5,00x10 ³	1,80x10 ³	3,50x10 ³	3,00x10 ³	2,50x10 ²	1,75x10 ²	2,00x10 ²	4,00x10 ²	9,30x10 ²
R1	1,00x10 ²	2,30x10 ²	8,60x10 ³	6,50x10 ³	7,90x10 ³	2,00x10 ²	6,50x10 ³	1,70x10 ³	5,50x10 ³	9,70x10 ³	2,00x10 ²	1,15x10 ²	1,50x10 ²	6,00x10 ²	8,90x10 ²
R2	2,00x10 ²	3,30x10 ²	8,10x10 ³	6,00x10 ³	8,00x10 ³	1,10x10 ²	4,00x10 ³	1,90x10 ³	4,00x10 ³	7,10x10 ³	3,00x10 ²	1,00x10 ²	3,50x10 ²	7,00x10 ²	7,60x10 ²
R2	2,10x10 ²	3,70x10 ²	7,60x10 ³	7,00x10 ³	8,30x10 ³	1,80x10 ²	3,50x10 ³	1,60x10 ³	3,00x10 ³	6,90x10 ³	3,80x10 ²	1,30x10 ²	1,90x10 ²	5,00x10 ²	9,50x10 ²
18°C															
Poliol	Poliol 1					Poliol 2					Poliol 3				
	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	>10 ³	>10 ³	2,16x10 ²	2,00x10 ²	3,10x10 ³	1,50x10 ²	1,36x10 ⁴	5,00x10 ⁴	3,00x10 ⁴	3,00x10 ⁴	2,00x10 ²	2,50x10 ²	3,50x10 ²	4,50x10 ²	6,30x10 ²
R1	>10 ³	>10 ³	3,15x10 ²	4,00x10 ²	3,90x10 ³	3,25x10 ²	2,25x10 ⁴	6,10x10 ⁴	1,50x10 ⁴	4,00x10 ⁴	1,75x10 ²	2,20x10 ²	4,30x10 ²	2,00x10 ²	7,40x10 ²
R2	>10 ³	>10 ³	2,00x10 ²	5,00x10 ²	4,20x10 ³	2,10x10 ²	3,10x10 ⁴	4,00x10 ⁴	1,00x10 ⁴	4,50x10 ⁴	2,70x10 ²	3,00x10 ²	5,90x10 ²	1,00x10 ²	7,00x10 ²
R2	>10 ³	>10 ³	1,00x10 ²	3,00x10 ²	4,80x10 ³	1,00x10 ²	3,00x10 ⁴	5,90x10 ⁴	2,00x10 ⁴	5,70x10 ⁴	2,50x10 ²	1,00x10 ²	6,30x10 ²	3,00x10 ²	6,90x10 ²

ANEXO 24. Análisis estadístico del contenido de mohos (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 18°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0

09/08/2011, 9:10:59

One-Way AOV for: c d e f h i j k m n o p

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	14	116.376	8.31256	204.38	0.0000
Within	45	1.83028	0.04067		
Total	59	118.206			

Component of variance for between groups 2.06797
Effective cell size 4.0

Variable	Mean	Sample siza	Group Std Dev
----------	------	-------------	---------------

c	0.0000	4	0.0000
d	0.0000	4	0.0000
e	2.2834	4	0.2077
f	2.5198	4	0.1718
g	3.5967	4	0.0795
h	2.2525	4	0.2174
I	4.3636	4	0.1656
J	4.7143	4	0.0838
K	4.2386	4	0.2014
L	4.6221	4	0.1159
Lm	2.3266	4	0.1146
n	2.3044	4	0.2103
o	2.6869	4	0.1196
p	2.3578	4	0.2785
q	2.5881	4	0.4962

CASES INCLUDED: 60
MISSING CASES:0

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

07/06/2011, 14:38:34

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
J	4.7143	A
l	4.6221	A
i	4.3636	A
k	4.2386	A
g	3.5967	B
o	2.6869	c
q	2.5881	C
f	2.5198	C
p	2.3578	C
lm	2.3266	C
n	2.3044	C
e	2.2834	C

h	2.2525	C
c	0.0000	D
D	0.0000	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1426
 Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 0.5110
 There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

ANEXO 25. Análisis estadístico del contenido de mohos (UFC/mL) de los sistemas líquidos con el principio activo *P. fluorescens* Pf14 durante dos meses de almacenamiento a 28°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0

30/05/2011, 20:19:49

One-Way AOV for: c d e f g h i j k l lm n o p q

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	14	28.2590	2.01850	210.03	0.0000
Within	45	0.43246	0.00961		
Total	59	28.615			

Grand Mean 3.7514 CV 8.02

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	21.05	14	0.1005
Cochran's Q	0.1685		
Largest Var / Smallest Var	97347		

Component of variance for between groups 0.50222
 Effective cell size 4.0

Variable	Mean	sample size	group	STD	DEV
c	2.1998	4		0.1480	
d	2.4616	4		0.0977	
e	3.8667	4		0.0346	
f	3.7838	4		0.0628	

g	3.9002	4	0.0158
h	2.1898	4	0.1147
i	3.6645	4	0.1178
j	3.2421	4	0.0322
k	3.5909	4	0.1120
l	3.9016	4	0.0695
lm	2.4390	4	0.1183
n	2.1044	4	0.1183
o	2.3250	4	0.1559
p	2.7311	4	0.1047
q	2.9441	4	0.0438

CASES INCLUDE:60 MISSING CASES:0

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

07/06/2011, 14:38:34

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
l	3.9016	A
g	3.9002	A
e	3.8667	A
f	3.7838	AB
i	3.6645	AB
k	3.5909	B
j	3.2421	C
q	2.9441	D
p	2.7311	DE
d	2.4616	DE
lm	2.4309	DEF
o	2.3250	EF
c	2.1898	F
h	2.1898	F
n	2.1044	F

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0693
 Critical Q Value 5.068 Critical Value for Comparison 0.2484
 There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

ANEXO 26. Pérdida de viabilidad (%) del principio activo *P. fluorescens* Pf14 mezclado con los soportes líquidos durante dos meses de almacenamiento a 18°C y 28°C.

Pérdida de Viabilidad (%)															
28°C															
Poliol	Poliol 1					Poliol 2					Poliol 3				
Tiempo	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	0	9,15	19,45	46,98	59,34	0	10,17	25,60	35,0	64,39	0	15,77	56,78	80,05	92,38
R2	0	8,45	15,11	54,47	55,67	0	13,33	29,88	43,44	66,92	0	19,56	53,46	81,89	88,25
R3	0	10,12	17,58	39,22	49,45	0	11,46	30,11	45,87	70,74	0	20,45	60,09	78,35	90,81
18°C															
Poliol	Poliol 1					Poliol 2					Poliol 3				
Tiempo	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60	0	15	30	45	60
R1	0	7,76	25,03	16,42	50,15	0	19,89	16,55	50,6	85,34	0	35,31	17,17	23,62	68,97
R2	0	8,15	19,66	27,32	52,45	0	14,94	11,16	55,22	91,59	0	30,15	16,94	47,18	60,04
R3	0	10,13	26,83	22,41	60,10	0	17,52	20,67	57,90	93,66	0	29,70	15,19	43,51	64,95

ANEXO 27. Análisis estadístico de la pérdida de viabilidad (%) del principio activo *P. fluorescens* Pf14 mezclado con los soportes líquidos durante dos meses de almacenamiento a 18°C.

Análisis de Varianza (ANOVA)

One-Way AOV for: c d e f h i j k m n o p

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	11	19965.6	1815.06	67.1	0.0000
Within	24	649.3	27.06		
Total	35	20615.0			

Grand Mean 36.028 CV 14.44

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	15.0	11	0.1845
Cochran's Q	0.5092		
Largest Var / Smallest Var	165.33		

Component of variance for between groups 596.001
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
c	8.333	j	54.000
d	23.333	k	89.667
e	21.667	m	31.333
f	54.000	n	16.000
h	16.667	o	37.667
i	15.667	p	64.000
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			3.0031
Std Error (Diff of 2 Means)			4.2470

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

09/08/2011, 9:12:28

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
k	89.667	A
p	64.000	B
f	54.000	B

j	54.000	B
o	37.667	C
m	31.333	CD
d	23.333	DE
e	21.667	DEF
h	16.667	EF
n	16.000	EF
i	15.667	EF
c	8.3333	FG
b	0.0000	G
g	0.0000	G
l	0.0000	G

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.7986
 Critical Q Value 5.210 Critical Value for Comparison 13.994
 There are 7 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

ANEXO 28. Análisis estadístico de la pérdida de viabilidad (%) del principio activo *P. fluorescens* Pf14 mezclado con los soportes líquidos durante dos meses de almacenamiento a 28°C

Análisis de Varianza (ANOVA)

Statistix 8.0

09/08/2011, 9:10:59

One-Way AOV for: c d e f h i j k m n o p

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	11	24358.3	2214.39	167	0.0000
Within	24	318.0	13.25		
Total	35	24676.3			

Grand Mean 43.139 CV 8.44

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	12.4	11	0.3358
Cochran's Q	0.3543		
Largest Var / Smallest Var	56.333		

Component of variance for between groups 733.714
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
c	9.000	j	41.000
d	17.000	k	66.667
e	46.333	m	18.000
f	54.333	n	56.333
h	11.333	o	79.667
i	28.000	p	90.000
Observations per Mean		3	
Standard Error of a Mean		2.1016	
Std Error (Diff of 2 Means)		2.9721	

Comparación de Medias de TUKEY (95%)

Statistix 8.0

09/08/2011, 9:07:43

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
p	90.000	A
o	79.667	B
k	66.667	C
n	56.333	D
f	54.333	DE
e	46.333	EF
j	41.000	F
i	28.000	G
m	18.000	H
d	17.000	H
h	11.333	H
c	9.0000	HI
b	0.0000	I
g	0.0000	I
l	0.0000	I

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.6583
Critical Q Value 5.210 Critical Value for Comparison 9.7930
There are 9 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

