

Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad

Adriana Marcela Santos Díaz

Erika Paola Grijalba Bernal

Lisette Torres Torres

Liz Alejandra Uribe Gutiérrez

AGROSAVIA
EDITORIAL

Colección Transformación del Agro

Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad

Adriana Marcela Santos Díaz
Erika Paola Grijalba Bernal
Lisette Torres Torres
Liz Alejandra Uribe Gutiérrez

Mosquera, Colombia, 2022

AGROSAVIA
EDITORIAL

Colección Transformación del Agro

Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad. / Adriana Marcela Santos Díaz [y otros tres]. – Mosquera (Colombia) : AGROSAVIA, 2022.

240 páginas (Colección Transformación del Agro)

Incluye gráficos y tablas

ISBN E-book: 978-958-740-512-5

1. Microorganismos 2. Agentes de control biológico 3. Control de calidad 4. Plaguicidas 5. Métodos estadísticos. I. Santos Díaz, Adriana Marcela II. Grijalba Bernal, Erika Paola III. Torres Torres, Lisette IV. Uribe Gutiérrez, Liz Alejandra.

Palabras clave normalizadas según Tesauro Multilingüe de Agricultura Agropecuaria
Catalogación en la publicación – Biblioteca Agropecuaria de Colombia

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
- AGROSAVIA

Centro de Investigación Tibaitatá, km 14 vía Mosquera-
Bogotá, Cundinamarca. Código postal 250047,
Colombia.

Esta publicación es resultado de la experiencia adquirida en el desarrollo de proyectos de investigación del grupo de Control Biológico de Plagas Agrícolas y del Departamento de Bioproductos, y fue una iniciativa de los proyectos “Técnicas de laboratorios acreditadas y registradas ante organismos de inspección”, “Plan de vinculación Red de Servicios de Laboratorios Fase I” y “Plan de vinculación Red de Servicios de Laboratorios Fase II”, desarrollados por el Departamento de Laboratorios de Investigación y Servicios de AGROSAVIA.

Colección: Transformación del Agro

Fecha de recepción: 15 de enero de 2021

Fecha de evaluación: 10 de mayo de 2021

Fecha de aceptación: 2 de septiembre de 2021

Primera edición: marzo de 2022

Publicado en Mosquera, Cundinamarca

Editorial AGROSAVIA
editorial@agrosavia.co

Líder editorial: Astrid Verónica Bermúdez Díaz

Edición: Verónica Barreto Riveros

Corrección de estilo: Amalia Tapiero Barreto y Jorge Enrique Beltrán

Diagramación: Diego Abello Rico

Fotografía de cubierta: Banco de fotos AGROSAVIA

Citación sugerida: Santos Díaz, A. M., Grijalba Bernal, E. P., Torres Torres, L., & Uribe Gutiérrez, L. A. (2021). *Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA.
<https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7405125>

Cláusula de responsabilidad: AGROSAVIA no es responsable de las opiniones y de la información recogida en el presente texto. Los autores asumen de manera exclusiva y plena toda responsabilidad sobre su contenido, ya sea este propio o de terceros, declarando en este último supuesto que cuentan con la debida autorización de terceros para su publicación. Igualmente, expresan que no existe conflicto de interés alguno en relación con los resultados de la investigación propiedad de tales terceros. En consecuencia, los autores serán responsables civil, administrativa o penalmente, frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros, relativa a los derechos de autor u otros derechos que se vulneren como resultado de su contribución.

Línea de atención al cliente: 018000121515
atencionalcliente@agrosavia.co
<http://www.agrosavia.co/>



https://co.creativecommons.org/?page_id=13

Contenido

Las autoras	17
Agradecimientos	21
Introducción	23
Capítulo I	29
Control de calidad microbiológico de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico	29
<i>Adriana Marcela Santos Díaz</i>	
Identificación del agente de control biológico	30
Cuantificación del principio activo	31
Recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer)	32
Caso de estudio I	36
Métodos espectrofotométricos	38
Cuantificación por PCR	40
Viabilidad de principio activo	42
Recuento en placa	43
Goteo en placa	47
Germinación de conidios	49
Contenido de contaminantes: pureza	56
Perspectivas	59
Referencias	59
Capítulo II	67
Control de calidad fisicoquímico de bioplaguicidas microbianos	67
<i>Erika Paola Grijalba Bernal</i>	
Bioplaguicidas microbianos sólidos	68

Bioplaguicidas microbianos líquidos	76
Caso de estudio I: granulado dispersable	80
Caso de estudio II: concentrado emulsionable	84
Perspectivas	87
Referencias	89

Capítulo III **95**

Control de calidad de bioinsumos recomendados para el manejo de fitopatógenos (bacterias y hongos)	95
<i>Liz Alejandra Uribe Gutiérrez</i>	
Criterios biológicos	96
Microorganismos patógenos	96
Agentes de control biológico	100
Tipos de formulaciones	104
Criterios para la elaboración de los controles de calidad y evaluación de la eficacia	105
Reconstitución de los bioproductos	105
Características y mecanismos de acción de los agentes de control biológico	106
Aplicación de los bioinsumos y microorganismos patógenos	107
Parámetros de evaluación de la actividad biológica	108
Aceptación o rechazo de bioinsumo	109
Material de referencia	109
Metodologías	110
Caso de estudio	128
Resultados del caso estudio	129
Análisis	133
Perspectivas	134
Referencias	134

Capítulo IV

143

Control de calidad de la actividad biológica contra insectos 143

Lisette Torres Torres

Criterios biológicos 144

Con relación al insecto plaga 144

Con relación al agente de control 148

Criterios de evaluación 154

Condiciones físicas y ambientales 155

Sistemas de aplicación 155

Montaje de la unidad experimental 161

Identificación de síntomas y signos de infección 163

Material de referencia 167

Caso de estudio 168

Criterios biológicos 169

Criterios de evaluación 169

Criterios para el aseguramiento de los resultados 169

Criterios estadísticos 170

Perspectivas 174

Referencias 175

Capítulo V

181

Aseguramiento de resultados aplicables a metodologías de control de calidad de bioplaguicidas 181

Adriana Marcela Santos, Lisette Torres Torres,

Liz Alejandra Uribe, Erika Paola Grijalba

Estandarización de métodos 183

Método de los rangos 187

Método de promedios y rangos 188

Interpretación de resultados: pruebas r&R 190

Criterios de calidad de resultados 191

Coeficiente de variación	192
Parámetros de aceptación para la metodología	193
Criterios estadísticos	193
Tratamientos	194
Número de réplicas	194
Unidad experimental	194
Diseño experimental	195
Variable respuesta	198
Análisis estadístico	198
Casos de estudio	199
Caso de estudio I	199
Caso de estudio II	210
Validación de metodologías analíticas	216
Etapas en el desarrollo de la validación de una metodología analítica y criterios de aceptación	218
Parámetros de validación	219
Caso de estudio para validar un método	224
Referencias	225
Glosario	231
Referencias	233
Medios de cultivo y soluciones	234

Lista de figuras

Figura 1.1	Secciones de la cámara de Neubauer y dimensiones de la cuadrícula del hemocitómetro	34
Figura 1.2	Introducción de la muestra (volumen de 10µl) en la cámara de Neubauer	34
Figura 1.3	Instrucciones de lectura de la cámara de Neubauer	35
Figura 1.4	Esquema general de un sistema de turbidez (espectrofotometría)	39
Figura 1.5	Viabilidad de principio activo (hongos y bacterias) de bioplaguicidas. Método de recuento en placa y siembra en superficie mediante diluciones en base 10	45
Figura 1.6	Viabilidad de principio activo (hongos y bacterias) de bioplaguicidas. Método de goteo en placa	47
Figura 1.7	Proceso de germinación de conidios	50
Figura 1.8	Esquema representativo de tipos de conidios y de un conidio germinado con el respectivo tubo germinal. Dimensiones morfológicas (largo y ancho) de acuerdo con cada tipo de conidio	51
Figura 1.9	Montaje de la prueba de germinación para el proceso de cuantificación de conidios germinados y no germinados	53
Figura 2.1	Granulado dispersable a base de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (Basidiomycota: Sporidiobolales)	68
Figura 2.2	Bioplaguicidas microbianos líquidos	76
Figura 2.3	Evaluación del tiempo de humectabilidad	82
Figura 2.4	Tiempo de desintegración de un granulado	83
Figura 2.5	Determinación del tamaño de partícula por granulometría	83
Figura 2.6	Distribución de tamaño de partícula de un granulado a base de <i>B. bassiana</i> Bv060	84
Figura 2.7	Determinación del índice de sedimentación a partir de la altura del sedimento formado	85

Figura 2.8	Vista al microscopio óptico de una emulsión aceite agua con un objetivo de 40×	88
Figura 2.9	Distribución de tamaño de partícula de una emulsión formada a partir de la reconstitución de un concentrado emulsionable a base de <i>B. bassiana</i> Bv060	88
Figura 3.1	Principales tipos de formulación e ingredientes activos de bioinsumos registrados ante el ICA hasta diciembre de 2019 para el control de fitopatógenos	105
Figura 3.2	Interacciones entre microorganismos patógenos y agentes biocontroladores (mecanismos de acción)	107
Figura 3.3	Medidas perpendiculares del diámetro de la colonia	111
Figura 3.4	Técnica de enfrentamiento entre el agente biocontrolador y la bacteria fitopatógena	114
Figura 3.5	Medición del halo de inhibición causado por el enfrentamiento del agente biocontrolador y la bacteria fitopatógena	115
Figura 3.6	Halo de inhibición causado por el enfrentamiento entre el agente biocontrolador y la bacteria fitopatógena inoculada mediante la adición de agar semisólido	116
Figura 3.7	Inhibición del crecimiento micelial mediante la determinación de peso seco (g)	118
Figura 3.8	Cámara húmeda de bioensayo	126
Figura 3.9	Inhibición producida por <i>B. amyloliquefaciens</i> sobre <i>Fusarium</i> sp.	133
Figura 4.1	Hábitos de insectos plaga	145
Figura 4.2	Ciclos de vida de los insectos de acuerdo al tipo de metamorfosis	146
Figura 4.3	Esquema del mecanismo de acción de un hongo entomopatógeno	149
Figura 4.4	Estructura de un nucleopoliedrovirus y un granulovirus	150
Figura 4.5	Ciclo de infección de los baculovirus	151
Figura 4.6	Ciclo de infección de <i>Bacillus thuringiensis</i>	152

Figura 4.7	Aplicación directa por aspersión del agente de control sobre el insecto blanco	156
Figura 4.8	Aplicación directa por inmersión de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> de seis días de edad en una suspensión de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> (Ascomycota: Clavicipitaceae)	157
Figura 4.9	Aplicación <i>M. anisopliae</i> sobre el pronoto de una ninfa de <i>R. schistocercoides</i>	157
Figura 4.10	Ingestión de la suspensión viral de una larva neonata de <i>S. frugiperda</i>	158
Figura 4.11	Aplicación del agente de control por inyección directa.	159
Figura 4.12	Aplicación por aspersión de un agente biológico	160
Figura 4.13	Tubérculos de papa - semilla	161
Figura 4.14	Montaje de la unidad experimental de un ensayo de evaluación de la actividad biocontroladora de <i>B. bassiana</i> sobre <i>D. saccharalis</i>	162
Figura 4.15	Montaje de la unidad experimental de un ensayo de evaluación de la actividad biocontroladora de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>R. schistocercoides</i>	163
Figura 4.16	Infecciones características de hongos entomopatógenos.	164
Figura 4.17	Larva de <i>E. ello</i> infectada por el granulovirus de <i>Erinnyis ello</i> EeGV	165
Figura 4.18	Larvas de <i>T. solanivora</i> de tercer ínstar, sana e infectadas con el granulovirus de <i>Phthorimaea operculella</i> (PhopGV)	166
Figura 4.19	Diferencias entre larvas de <i>T. absoluta</i> sanas e infectadas por baculovirus	166
Figura 4.20	Evaluación del material de referencia en el control de calidad de una muestra a base de <i>B. bassiana</i> para el control de adultos de <i>C. tingomariana</i>	168
Figura 4.21	Evaluación biológica de <i>Lecanicillium lecanii</i> sobre mosca blanca	171

Figura 4.22	Individuos de <i>T. vaporariorum</i>	173
Figura 4.23	Fotografías de <i>L. lecanii</i>	174
Figura 5.1	Posibles escenarios de precisión y exactitud de resultados	183
Figura 5.2	Ejemplo de la distribución de seis tratamientos en tres bloques organizados completamente al azar	197
Figura 5.3	Ubicación de los esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> sobre el suelo.	207
Figura 5.4	Evaluación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de <i>T. koningiopsis</i> sobre esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i>	209
Figura 5.5	Confirmación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de <i>T. koningiopsis</i> sobre esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i>	210
Figura 5.6	Determinación de la eficacia de <i>M. anisopliae</i> sobre larvas de <i>D. saccharalis</i>	212
Figura 5.7	Montaje de la unidad experimental para determinar la actividad biocontroladora de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>D. saccharalis</i>	213
Figura 5.8	Características microscópicas del aislamiento Mt004 de <i>M. anisopliae</i>	216

Lista de tablas

Tabla 1.1	Metodologías utilizadas para la determinación de la viabilidad del principio activo de bioplaguicidas a base de hongos filamentosos, levaduras y bacterias	42
Tabla 1.2	Medios de cultivos y método de siembra más utilizados para el recuento del principio activo de bioplaguicidas a base de bacterias, hongos filamentosos y levaduras	43
Tabla 1.3	Condiciones de temperatura y tiempo de crecimiento de acuerdo con el principio activo del bioplaguicida, para su recuento en placa	44
Tabla 1.4	Medios de cultivo comúnmente utilizados para evaluar la germinación de conidios de hongos biocontroladores	54
Tabla 2.1	Sistemas de entrega de bioplaguicidas microbianos sólidos	69
Tabla 2.2	Variables fisicoquímicas para evaluar en bioplaguicidas microbianos sólidos	70
Tabla 2.3	Metodologías y descripción de las variables evaluadas en bioplaguicidas microbianos sólidos	73
Tabla 2.4	Sistemas de entrega de bioplaguicidas microbianos líquidos	77
Tabla 2.5	Variables fisicoquímicas para evaluar en bioplaguicidas microbianos líquidos	78
Tabla 2.6	Metodologías y descripción de las variables evaluadas en bioplaguicidas microbianos líquidos	79
Tabla 2.7	Caracterización fisicoquímica de un granulado a base de <i>B. bassiana</i> Bv060	81
Tabla 2.8	Caracterización fisicoquímica de un concentrado emulsionable a base de <i>B. bassiana</i> Bv060	84
Tabla 3.1	Principales patógenos que afectan algunos de los cultivos más importantes en Colombia en 2019	97

Tabla 3.2	Principales agentes de control biológico de bioinsumos registrados ante el ICA hasta diciembre de 2019 para el control de fitopatógenos	101
Tabla 3.3	Determinación cualitativa de patogenicidad con base en el número de conidióforos por lesión	127
Tabla 3.4	Datos brutos del diámetro de colonia (mm) obtenidos con el analista 1	129
Tabla 3.5	Determinación del porcentaje de inhibición obtenido con el analista 1	130
Tabla 3.6	Datos brutos del diámetro de colonia (mm) obtenidos con el analista 2	131
Tabla 3.7	Determinación del porcentaje de inhibición obtenido con el analista 2	132
Tabla 3.8	Determinación del coeficiente de reproducibilidad	133
Tabla 4.1	Porcentaje de eficacia de un bioplaguicida a base de <i>L. lecanii</i> sobre ninfas de <i>T. vaporariorum</i>	172
Tabla 5.1	Condiciones de evaluación de estudios de repetibilidad y reproducibilidad	185
Tabla 5.2	Tabla de ANOVA para un sistema de medición con dos factores	187
Tabla 5.3	Valores de las constantes K_1 y K_2	190
Tabla 5.4	Ejemplo de la asignación aleatoria de réplicas en un Diseño Experimental Completamente al Azar	196
Tabla 5.5	Resultados de la determinación del porcentaje de germinación del agente microbioal a base de <i>T. koningiopsis</i> obtenidos por cada analista	201
Tabla 5.6	Resultados de la prueba T pareada	202
Tabla 5.7	Porcentajes de germinación del agente microbioal a base de <i>T. koningiopsis</i> transformados mediante la función arcoseno	202
Tabla 5.8	Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad, reproducibilidad y de r&R (%) para la determinación del porcentaje de germinación del agente microbioal a base de <i>T. koningiopsis</i>	203

Tabla 5.9	Resultados de la determinación del pH del agente microbial a base de <i>T. koningiopsis</i> , obtenidos por cada analista	203
Tabla 5.10	Resultados de la prueba T	204
Tabla 5.11	Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad, reproducibilidad y de r&R (%) para la determinación de pH del agente microbiano a base de <i>T. koningiopsis</i>	205
Tabla 5.12	Porcentaje de parasitismo del bioplaguicida a base de <i>T. koningiopsis</i> sobre esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> , obtenidos por cada analista	207
Tabla 5.13	Porcentaje de parasitismo del bioplaguicida a base de <i>T. koningiopsis</i> sobre esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i> transformados mediante la función arcoseno	208
Tabla 5.14	Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad, reproducibilidad y de r&R (%) para la evaluación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de <i>T. koningiopsis</i> sobre esclerocios de <i>S. sclerotiorum</i>	208
Tabla 5.15	Mortalidad expresada como eficacia (%) del aislamiento Mt004 de <i>M. anisopliae</i> sobre larvas de <i>D. sacchralis</i> , obtenidos por cada analista	214
Tabla 5.16	Resultados de la prueba T pareada	214
Tabla 5.17	Mortalidad (porcentaje de eficacia) del aislamiento Mt004 de <i>M. anisopliae</i> sobre larvas de <i>D. saccharalis</i> , transformados mediante la función arcoseno	215
Tabla 5.18	Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad (r), reproducibilidad (R) y de r&R (%) para la evaluación de la actividad biológica (mortalidad) del aislamiento Mt004 de <i>M. anisopliae</i>	215
Tabla 5.19	Guías para la validación de metodologías analíticas	218
Tabla 5.20	Pasos para tener en cuenta para la validación de técnicas de análisis	218

Tabla 5.21	Parámetros de validación a tener en cuenta de acuerdo con el tipo de ensayo de control de calidad	219
Tabla 5.22	Resultados normalizados obtenidos del recuento de colonias de tres analistas	221
Tabla 5.23	Análisis de datos obtenido entre analistas	223
Tabla 5.24	Datos brutos de recuento UFC/ml	224
Tabla 5.25	Análisis de datos con prueba F	225

Las autoras

Adriana Marcela Santos Díaz

asantos@agrosavia.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-3248-7322>

Magíster en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional de Colombia y microbióloga industrial de la Pontificia Universidad Javeriana. Investigadora máster sénior de AGROSAVIA, donde se desempeña desde 2014 como coordinadora técnica de la Red de Laboratorios de Microbiología Agrícola. Cuenta con más de diez años de experiencia liderando procesos de registro de laboratorios de control de calidad de bioinsumos agrícolas (bioplaguicidas e inoculantes biológicos). Ha participado en diferentes proyectos de investigación enfocados hacia la búsqueda, la selección y el desarrollo de productos biológicos a base de bacterias, hongos y virus. Dentro de sus publicaciones más recientes se destaca el artículo “Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad biocontroladora de micoinsecticidas” y la participación en el segundo volumen del libro *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (2018).

Erika Paola Grijalba Bernal

egrijalba@agrosavia.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7385-3408>

Magíster en Ciencias Biológicas con énfasis en Microbiología de la Universidad de los Andes y química farmacéutica de la Universidad Nacional. Investigadora máster sénior de AGROSAVIA, donde se desempeña como investigadora en el Departamento de Bioproductos. Tiene experiencia en el diseño y desarrollo de productos biológicos a base de bacterias y hongos para el control de plagas agrícolas, biofertilizantes y nutrición, y salud animal. Dentro de sus publicaciones de destacan “*Metarhizium rileyi* biopesticide to control *Spodoptera frugiperda*: Stability and insecticidal activity

under glasshouse conditions”, “Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos y desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas”.

Lisette Torres Torres

latorres@agrosavia.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6841-2851>

Bióloga con experiencia en procesos de registro ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) relacionados con la estandarización y verificación de análisis microbiológicos, fisicoquímicos y de actividad biológica para el control de calidad de plaguicidas microbianos. Diseño y ejecución de proyectos de investigación en control biológico de plagas agrícolas y conservación de microorganismos. Se desempeñó como profesional de apoyo en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de AGROSAVIA y actualmente es profesional de apoyo a la investigación de la misma institución. Sus publicaciones más recientes son: “Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad biocontroladora de micoínsecticidas” (*Revista Colombiana de Entomología*) y tres capítulos como coautora en el libro *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros* (2018).

Liz Alejandra Uribe Gutiérrez

luribe@agrosavia.co

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8282-7196>

Microbióloga industrial de la Pontificia Universidad Javeriana y magíster en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia. Desde febrero de 2008 es investigadora máster de AGROSAVIA, donde actualmente lidera la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB) y participa en proyectos de bioprospección. Su experiencia se ha enfocado en la conservación y caracterización de microorganismos con potencial de uso en el sector agropecuario y cuenta con experiencia como analista de microbiología para el control de calidad de bioinsumos de uso agrícola.





Agradecimientos

Las autoras agradecemos a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y, en especial, al grupo de investigación “Control Biológico de Plagas Agrícolas” por el liderazgo y desarrollo de proyectos de investigación que a través de los años fortalecieron el conocimiento y algunas de las metodologías que se comparten en este libro.

Las autoras expresamos un especial agradecimiento a los doctores Alba Marina Cotes, Laura Fernanda Villamizar, Martha Isabel Gómez y Carlos Espinel Correal, quienes lideraron las primeras investigaciones en AGROSAVIA sobre control de calidad en bioplaguicidas microbianos.

Asimismo, agradecemos al Departamento de Laboratorios de Investigación y Servicios, liderado por María Angélica Pichimata, por el apoyo continuo en el fortalecimiento del área de control de calidad de bioinsumos de la Corporación.



Introducción

A diferencia de los plaguicidas de síntesis química, los cuales se producen bajo estándares de calidad establecidos por la industria, los bioplaguicidas a base de agentes de control biológico (ACB) presentan inconvenientes en la adopción de criterios de calidad debido, principalmente, a su forma de producción y a la alta variación de los principios activos (Satapathy, 2018). Así pues, uno de los aspectos más importantes a la hora de adoptar y comercializar agentes de control biológico es la implementación de un programa de control de calidad que garantice las características microbiológicas, fisicoquímicas y biológicas en cada etapa de producción y en el producto terminado, de manera tal que se cumplan los requerimientos exigidos por los entes gubernamentales y por el agricultor (Dunham & Trimmer, 2018; Marrone, 2019).

La idea de controlar insectos plaga y enfermedades mediante agentes de control biológico tiene más de 150 años. Sporeine, el primer bioplaguicida comercial, fue producido en 1938 en Francia y se fabricó a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt). A partir de esa fecha, se han creado más de 400 compañías de bioplaguicidas y numerosos productos se han desarrollado, registrado e introducido en el mercado y, aunque su uso está en aumento, tan solo corresponde a un pequeño porcentaje del total de productos utilizados para la protección de cultivos en el mundo (Ibrahim et al., 2010). Se estima que el mercado de bioplaguicidas oscila entre US \$ 3 y US \$ 4 mil millones, lo cual corresponde, aproximadamente, al 5 % y 6 % del mercado global de plaguicidas (Marrone, 2019). Además, se proyecta que el crecimiento más

rápido corresponderá a las regiones de América Latina, América del Norte y Europa, lo cual representa para el año 2020 el 67 % de las ventas mundiales (Dunham & Trimmer, 2018; Marrone, 2019).

Sin embargo, entre las limitaciones y los desafíos que trae consigo la utilización de bioinsumos se destacan la variabilidad en la calidad y la eficacia (pues en muchas ocasiones los bioinsumos presentan un desempeño inconsistente en condiciones de campo); la baja estabilidad en el almacenamiento; los problemas con los resultados de control de calidad y los costos relativamente altos en comparación con los plaguicidas convencionales; razones que han relegado históricamente la adopción de esta tecnología (Arthurs & Dara, 2019; Díaz et al., 2018; Zaki et al., 2020). Con el fin de generar cambios significativos en el mercado, uno de los grandes desafíos en la implementación del uso de bioplaguicidas se centra en el diseño de una legislación adecuada que incluya criterios de producción y de calidad, así como el desarrollo y la ejecución de políticas de promoción y adopción de su uso. Lo anterior generará cambios significativos que contribuirán a la adaptación a este tipo de productos, ya que en diferentes países los bioplaguicidas aún están regulados por sistemas diseñados para plaguicidas de síntesis química (Arjjumend & Koutouki, 2018; Santos et al., 2018).

En general, los bioplaguicidas a base de microorganismos pueden incluir como principio activo células vegetativas o esporas (en el caso de las bacterias), conidios, clamidosporas, blastosporas o micelio (en el caso de mohos), células vegetativas (en el caso de levaduras) o suspensión de células o virus (en el caso de baculovirus) (Arthurs & Dara, 2019; Liu et al., 2019). Las etapas de desarrollo abarcan diversos procesos: la selección de cepas que tengan una actividad biológica promisorio, su caracterización microbiológica, bioquímica y molecular, el diseño del medio de cultivo, la definición del sistema de fermentación para la producción masiva del microorganismo seleccionado como principio activo y los estudios de preformulación para la evaluación y selección de los excipientes finales de formulación que favorezcan la estabilidad del producto en campo. Finalmente, se deben realizar estudios de vida útil para definir su estabilidad en el tiempo bajo condiciones determinadas de almacenamiento, teniendo como referente el sistema de control de calidad en el proceso interno de producción y en el producto final, así como evaluaciones de eficacia o actividad biológica (Díaz et al., 2018; Jenkins & Grzywacz, 2000; Ravensberg, 2011).

Por lo tanto, el control de calidad es de gran importancia para garantizar la producción y comercialización de bioplaguicidas que cumplan con las especificaciones

predeterminadas y generen la eficacia dentro de las condiciones establecidas para su uso. Ahora bien, el control de calidad no solo debe hacerse en el producto terminado, también durante el proceso de producción. De acuerdo con esto, los objetivos del control de calidad deben abarcar diversos aspectos, como los descritos a continuación.

1. Las materias primas y los equipos e insumos utilizados deben cumplir con las especificaciones definidas para la producción y con los límites de inocuidad adecuados.
2. El control de calidad durante el proceso es un procedimiento destinado a garantizar la ejecución de la producción de acuerdo con los parámetros determinados previamente con el fin de obtener los mayores rendimientos y entregar productos formulados de manera estándar.
3. El control de calidad del producto terminado (bioplaguicida) es un procedimiento destinado a garantizar que el bioproducto cuente con las especificaciones establecidas: un conjunto previamente definido de estándares que asegure la eficacia del bioplaguicida dentro de las condiciones de uso descritas y el cumplimiento de los criterios establecidos por las autoridades de registro. (Ravensberg, 2011).

Dicho sistema de control de calidad en cada fase de producción asegura la máxima eficacia en campo y el cumplimiento de los requerimientos del agricultor. Asimismo, contribuye a la reducción de los costos de producción, maximiza los rendimientos, garantiza la seguridad del producto y reduce los riesgos por fallas o errores, lo cual suscita confianza en los usuarios (Lacey, 2017; Jenkins & Grzywacz, 2000).

Actualmente, la disponibilidad de metodologías estandarizadas es limitada y existen pocos reportes en los cuales se describa de manera detallada el proceso de implementación de control de calidad de agentes de control biológico; debido a esto, se dificulta la comparación de resultados entre pares y grupos de investigación. La mayoría de estas metodologías provienen del desarrollo de proyectos de investigación y de la necesidad de obtener resultados veraces y más confiables para el agricultor.

Por lo anterior, el presente libro pretende dar a conocer los criterios que se deben tener en cuenta, así como las metodologías que se pueden implementar para la realización eficaz del control de calidad microbiológico, fisicoquímico y de actividad biológica de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico.

Este libro recopila los estudios y los desarrollos más relevantes del mundo en esta temática. A lo anterior se suma la experiencia de más de 15 años de las autoras en la realización y diseño de este tipo de pruebas que se reflejan en los casos de estudio que se presentan a través de los diferentes capítulos. Así pues, el presente texto constituye una guía para aquellos interesados en mejorar o implementar metodologías para el control de calidad rutinario de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico.

Referencias

- Arjjumend, H., & Koutouki, K. (2018). Science of biopesticides and critical analysis of Indian legal frameworks regulating biocontrol agents. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 11(716), 563-571. <https://doi.org/10.30954/0974-1712.06.2018.20>
- Arthurs, S., & Dara, S. K. (2019). Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 165(1), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008>
- Díaz, A., Gómez, M., Grijalba, E., Santos, A., Cruz, F., León, D., Alarcón, E., & Cotes, A. (2018). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 628-692). AGROSAVIA.
- Dunham, W., & Trimmer, D. (2018). *Biological Products Around the World, Bioproducts Industry*. Alliance Spring Meeting & Interna.
- Ibrahim, M., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. (2010). *Bacillus thuringiensis*. A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31-50. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>
- Jenkins, N., & Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents assurance of products performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 753-777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- Lacey, A. L. (2017). *Microbial control of insect and mite pests*. Elsevier.
- Liu, X., Cao, A., Yan, D., Ouyang, C., & Wang, Q. (2019). Overview of mechanisms and uses of biopesticides. *International Journal of Pest Management*, 67(1), 65-72. <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789>
- Marrone, P. G. (2019). Pesticidal natural products - status and future potential. *Perspective*, 75(9), 2325-2340. <https://doi.org/10.1002/ps.5433>

- Ravensberg, W. (2011). Quality control. En J. Grould, K. Hoelmer, & J. Goolshy (Eds.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods* (pp. 129-197). Springer.
- Santos, A. M., Uribe, L. A., Torres, L., Betancourt, R. A., Moreno, F., Andrea, E., & Gómez, M. I. (2018). Marco regulatorio para el registro de bioplaguicidas. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 692-716). AGROSAVIA.
- Satapathy, S. N. (2018). Regulatory norms and quality control of biopesticides in India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(11), 3118-3122. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.711.357>
- Zaki, O., Weekers, F., Thonart, P., Tesch, E., Kuenemann, P., & Jacques, P. (2020). *Limiting factors of mycopesticide development*. *Biological Control*, 144(1), 104220. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104220>



Capítulo I

Control de calidad microbiológico de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico

Adriana Marcela Santos Díaz

En el proceso de producción de bioplaguicidas, el control de calidad microbiológico constituye un factor clave porque permite garantizar y predecir la eficiencia del producto en condiciones de campo (Miranda-Hernández et al., 2016). Dicho análisis microbiológico consiste en la evaluación rigurosa durante cada etapa del proceso de producción y en el producto terminado. El objetivo principal es monitorear y evitar los problemas de contaminación y garantizar la calidad del principio activo de la formulación. Sin embargo, la mayoría de las metodologías microbiológicas que son utilizadas en el proceso de control de calidad de bioplaguicidas son el resultado de procesos de investigación y, por esta razón, no se cuenta con metodologías estandarizadas para este tipo de productos (Díaz et al., 2018). El alcance de las técnicas y los procedimientos a aplicar depende del ingrediente activo del bioproducto. Asimismo, su adecuada selección, implementación y análisis es responsabilidad del productor (Ravensberg, 2011).

A continuación se describen las metodologías de control de calidad microbiológico más utilizadas. Se

hará énfasis, principalmente, en técnicas analíticas para establecer los parámetros de calidad en la producción y en el producto terminado de bioplaguicidas a base de hongos, bacterias y virus de interés comercial. De acuerdo con lo anterior, este capítulo está dividido en las siguientes secciones: identificación del agente de control biológico, cuantificación del principio activo, viabilidad del principio activo y contenido de contaminantes. En cada una de dichas secciones se profundiza en la metodología y se hacen las recomendaciones pertinentes de acuerdo con el tipo de agente de control biológico a evaluar.

En general, los parámetros de calidad microbiológica para bioplaguicidas producidos a base de hongos, bacterias y virus son similares, pues se enfocan, principalmente, en la identificación, cuantificación y viabilidad del principio activo y en la determinación del contenido de contaminantes. Sin embargo, existen aspectos particulares que requieren más atención que otros, los cuales dependen del sistema de producción o fermentación, de las características propias del principio activo y del tipo de formulación a utilizar (Burges, 1998; Ibrahim et al., 2015).

Identificación del agente de control biológico

El agente de control biológico utilizado debe ser caracterizado de forma macroscópica, microscópica y metabólica, además de ser identificado por medio de herramientas moleculares. De esta manera, se asegura que el agente utilizado sea el mismo para todo el proceso de producción (Díaz et al., 2018). Generalmente, esta identificación se realiza desde el proceso de selección del agente de control biológico y no como parte del procedimiento de control de calidad de cada lote.

Debido a su asequibilidad y a la facilidad de realización, actualmente, la primera aproximación a la identificación de microorganismos se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas (Bou et al., 2011). Esta identificación fenotípica se basa en la caracterización morfológica, bioquímica y del crecimiento en condiciones diferenciales de temperatura, pH o atmósferas. Sin embargo, existen numerosos sistemas bioquímicos (multipruebas) que garantizan una mayor rapidez en la identificación de algunos microorganismos como bacterias u hongos. Con el fin de garantizar el resultado, todos los sistemas bioquímicos exigen unas condiciones muy precisas de concentración del inóculo, inoculación, incubación y lectura (Bou et al., 2011).

Todos los agentes de control biológico se pueden identificar con base en secuencias de ADN mediante técnicas moleculares. Sin embargo, esta información debe ser contrastada con información morfológica, bioquímica e imágenes macroscópicas y microscópicas (Cotes et al., 2018).

Una vez seleccionado e identificado el agente de control biológico, se debe asegurar la estabilidad genética, fisiológica y, especialmente, su actividad biológica durante largos periodos de tiempo. Lo anterior se realiza a través de la conservación del microorganismo (crioconservación o liofilización) y la generación de un banco de trabajo a partir del cual siempre se debe iniciar el proceso de producción del bioplaguicida. Ravensberg (2011) recomienda que cada vez que se utilice un nuevo vial del banco de trabajo, se identifique otra vez el agente de control biológico. Es entendible que durante el proceso de control de calidad rutinario no sea posible realizar esta identificación, no obstante, es necesario contar con un sistema de identificación de variaciones fenotípicas (fotografías o caracterización bioquímica) que permita generar alertas en la producción del principio activo con el fin de asegurar que el agente de control biológico utilizado mantenga las características por las cuales fue seleccionado (Díaz et al., 2018; Ravensberg, 2011).

Cuantificación del principio activo

La concentración es la cantidad del agente biocontrolador existente en un producto formulado. Generalmente, es un parámetro utilizado como referencia en el proceso de fermentación y formulación, ya que permite garantizar la cantidad adecuada del ingrediente activo en el producto final. Además, esta información es fundamental para la aplicación del producto en campo, razón por la cual debe especificarse en la etiqueta (Díaz et al., 2018).

Las metodologías de cuantificación del principio activo dependerán del agente biocontrolador. Además, este parámetro no garantiza ni refleja la viabilidad ni la virulencia del principio activo. Por esta razón, la implementación de esta metodología se realiza de manera paralela a la ejecución de metodologías en las cuales se evalúe la viabilidad o efectividad del agente biocontrolador (Glare et al., 2016). Dentro de las más utilizadas se destacan las metodologías clásicas de enumeración de microorganismos, tales como el recuento en placa y aquellas basadas en el uso de hemocitómetro. Las metodologías mencionadas tienen la ventaja de ser rápidas y económicas para ser implementadas en un programa de control de calidad. Aunque a la fecha los métodos de cuantificación basados en herramientas moleculares no

son ampliamente utilizados, son más precisos para cierto tipo de agentes de control biológico como, por ejemplo, los virus entomopatógenos (Inglis et al., 2012).

Dentro de las metodologías de control de calidad más utilizadas para los productos terminados se destacan los métodos directos y los métodos indirectos. Por ejemplo, para la enumeración de esporas fúngicas a partir de insectos, sustratos de producción, hojas o suelo se puede utilizar el método directo de recuento en hemocitómetro o el método indirecto de turbidez o recuento en placa (Inglis et al., 2012). A continuación, se explicarán las particularidades de las metodologías más utilizadas en el control de calidad de bioplaguicidas.

Recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer)

Un hemocitómetro o cámara de Neubauer es un portaobjetos diseñado especialmente para realizar el recuento de células mediante el microscopio. Es una técnica rápida y económica que permite cuantificar el principio activo por unidad de volumen o peso. Dentro de las dificultades para el recuento en cámara de Neubauer se destaca la obtención de una alta reproducibilidad, lo que influye en la selección correcta del tamaño de la muestra, la dilución adecuada, la selección de la cámara de recuento, el aumento del microscopio e, incluso, el llenado de la cámara (Sharga & Feketa, 2018).

El hemocitómetro es utilizado en la cuantificación del principio activo de bioplaguicidas a base de hongos (mohos y levaduras) y virus. En el caso de suspensiones fúngicas, es posible cuantificar conidios, blastosporas o partes miceliales (Ravensberg, 2011); sin embargo, no es posible distinguir las células viables de las no viables. Para las suspensiones a base de virus, los cuerpos de inclusión (CI) que tienen un alto grado de refracción son cuantificables en microscopios de campo brillante mediante la cámara de Neubauer (alfabaculovirus, cypovirus y entomopoxvirus). Los betabaculovirus son mucho más pequeños (de 0,15 μm a 0,5 μm) y, por lo tanto, más difíciles de cuantificar; sin embargo el conteo se puede realizar utilizando un hemocitómetro con una profundidad de cámara más pequeña, como una cámara de recuento Petroffe-Hausser de 0,02 mm de profundidad. En este caso, el recuento se debe realizar bajo contraste de fases e iluminación de campo oscuro (Eberle et al., 2012).

En términos generales, la cámara de Neubauer es una placa de vidrio gruesa del tamaño de un portaobjetos de vidrio (30 mm x 70 mm x 4 mm), dividida en tres secciones. La sección media, a su vez, cuenta con un rayado fino que forma una cuadrícula de 3 mm x 3 mm y es identificable fácilmente con el microscopio. Además,

esta sección está exactamente 0,1 mm de distancia más abajo que las secciones laterales, lo cual establece un volumen fijo una vez colocado el cubreobjetos especial (generalmente de cuarzo) (figura 1.1). El cuadrante de 3 mm² se divide en 9 cuadrados grandes, cada uno con un área de 1 mm². El cuadrante central (observable con el objetivo 10×), se divide en 25 cuadrantes medianos con líneas dobles o triples. Asimismo, cada uno de estos 25 cuadrantes se divide en 16 cuadrantes pequeños con líneas simples, de modo que cada uno de los cuadrados más pequeños tiene un área de 1/400 mm² (figura 1.1) (Eberle et al., 2012).

En general, el procedimiento para la cuantificación del principio activo consiste en preparar la muestra, preparar la cámara de Neubauer, introducir la muestra en la cámara de Neubauer, hacer el recuento del principio activo y calcular su cantidad por área y volumen mediante el factor de corrección de la cámara.

- a. **Preparación de la muestra:** dependiendo del tipo de muestra, se debe preparar una dilución a una concentración adecuada para el recuento. Generalmente, el rango de concentración para un recuento utilizando la cámara Neubauer está entre 250.000 células/ml y 2.5 millones de células/ml. Si la muestra no se encuentra diluida de manera correcta, es posible que la cuantificación se dificulte y se generen errores en el resultado. En cambio, si la muestra está muy diluida, el tamaño de la muestra no será suficiente para realizar el recuento y generar confianza en la concentración de la suspensión original. Se recomienda utilizar diluciones en base 10 (Inglis et al., 2012).
- b. **Preparación de la cámara de Neubauer:** para preparar la cámara de Neubauer es necesario limpiar la cámara y el cubreobjetos con etanol al 70 %, pues deben estar libres de polvo y suciedad. Adicionalmente, hay que colocar el cubreobjetos (de cuarzo) en el área central de la cámara Neubauer. Se debe utilizar una superficie plana para colocar la cámara, la cual debe estar nivelada con respecto al suelo (Eberle et al., 2012).
- c. **Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer:** de la dilución o suspensión seleccionada se deben tomar 10 µl con una micropipeta. Posteriormente, se debe colocar la punta de la micropipeta contra el borde del cubreobjetos y expulsar lentamente el líquido hasta que la cámara de Neubauer esté llena. La acción capilar ayudará a asegurar que la cámara se llene de manera homogénea y sin exceso (figura 1.2).

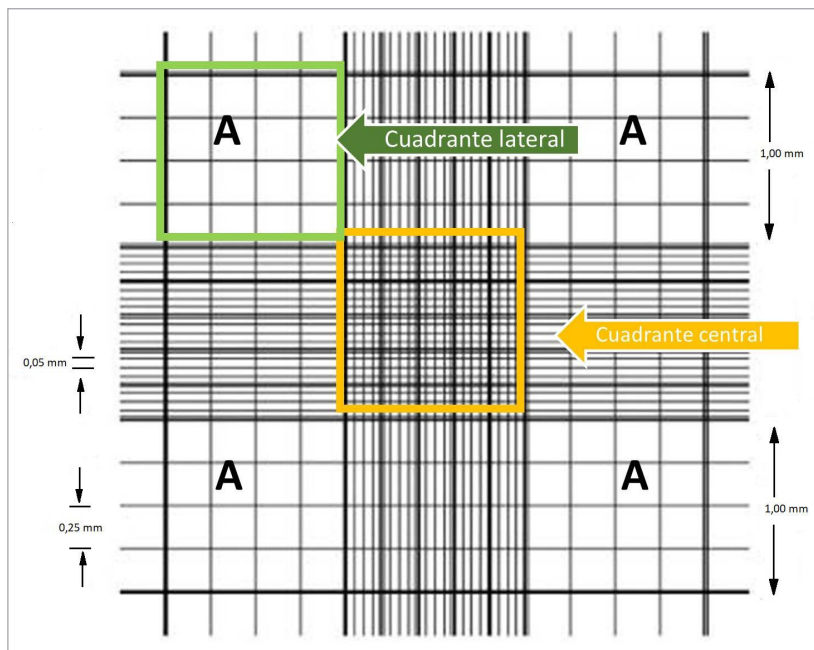


Figura 1.1. Secciones de la cámara de Neubauer y dimensiones de la cuadrícula del hemocitómetro. La letra "A" corresponde a la cuadrícula de un 1 mm^2 utilizada para el recuento de agentes de control biológico.

Fuente: Elaboración propia

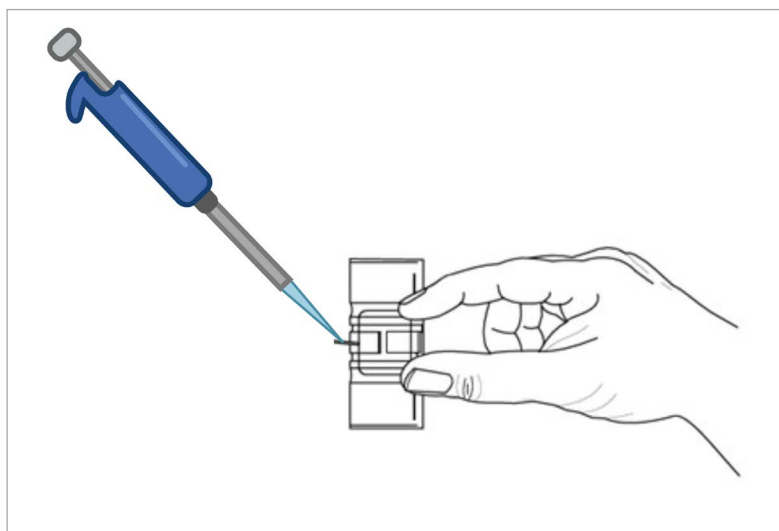


Figura 1.2. Introducción de la muestra (volumen de $10\text{ }\mu\text{l}$) en la cámara de Neubauer.

Fuente: Elaboración propia

Antes de realizar el recuento, la suspensión se debe estabilizar en los cuadrantes a contar, para lo cual hay que esperar de 3 a 5 minutos, aproximadamente. Cuando la dilución contiene como base algún tipo de aceite, se recomienda un mayor tiempo de sedimentación, además de verificar que el aceite no infiltre de manera excesiva la cámara de recuento, ya que el cubreobjetos se puede levantar y aumentar el volumen de la cámara y, por lo tanto, se puede sobreestimar la concentración. Cuando se usa agua como base de la suspensión, se debe garantizar que esta no se evapore antes de realizar el recuento (Inglis et al., 2012). En caso de que aparezcan burbujas o el cubreobjetos se haya movido, es necesario repetir la operación.

- d. **Recuento del principio activo:** para hacer el recuento del principio activo es necesario colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio. Posteriormente, hay que enfocar el patrón de la cuadrícula utilizando el objetivo 10×. Para contar conidios, blastosporas, células (suspensiones fúngicas) o cuerpos de inclusión (suspensiones virales) se debe utilizar el objetivo 40× y ajustar la luz del microscopio para obtener definición y nitidez en la imagen. Se recomienda realizar el recuento de forma organizada por cuadrante (figura 1.3a). Los valores óptimos por cuadrante deben ser mínimo 10 y máximo 100; los valores por fuera de este rango generan una baja precisión en el resultado final (Bioscience, 2018).

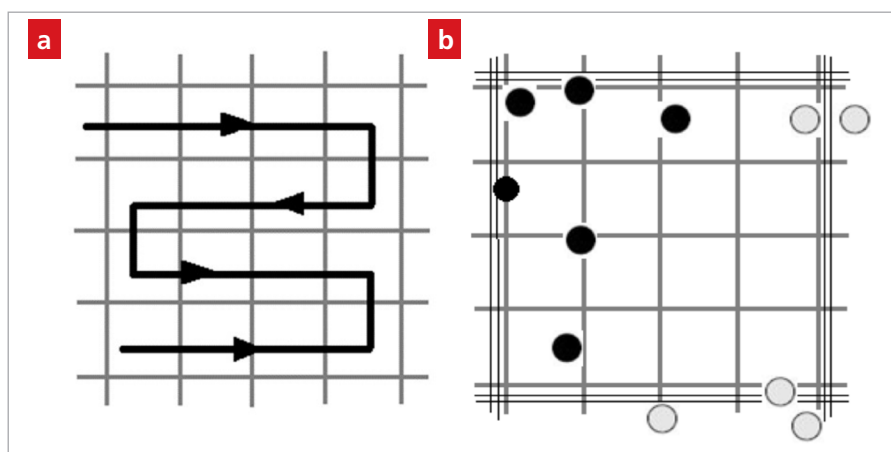


Figura 1.3. Instrucciones de lectura de la cámara de Neubauer. a. Secuencia correcta para realizar el recuento en un cuadrante de la cámara de Neubauer; b. Criterio para realizar el recuento de principio activo en los cuadrantes internos de la cámara de Neubauer. Color negro se puede cuantificar y color gris no se puede cuantificar.

Fuente: Elaboración propia

Para evitar el doble conteo, el criterio es no contabilizar las estructuras (principio activo) que tocan las líneas inferior y derecha que limitan el cuadrado (figura 1.3b). Para el caso de conidios en proceso de germinación o células de levaduras en gemación que tienen la mitad del tamaño de la célula matriz, estas deben contabilizarse. Se ha establecido que existe uniformidad en el recuento cuando la desviación estándar (s) está del 10 % al 15 % de la media (Inglis et al., 2012).

- e. Cálculo del principio activo por área y volumen:** para obtener una estimación de la cantidad de principio activo por mililitro de la suspensión original, el promedio del recuento obtenido en cada cuadrante se multiplica por el factor de conversión de volumen; estos factores de corrección dependerán de la cuadrícula en la cual se realizó el recuento (ecuación 1.1).

$$\frac{\text{Principio activo}}{\text{ml de la muestra}} = \frac{\text{Promedio de recuento de principio activo} * \text{factor de dilución} * 10^3}{\text{Área (mm}^2\text{)} * \text{profundidad de la cámara (mm)}}$$

Ecuación 1.1. Ecuación para el cálculo de principio activo utilizando la cámara de Neubauer. El área y la profundidad dependerán del cuadrante seleccionado para realizar el recuento.

El factor de dilución utilizado en la fórmula está determinado por la dilución de la muestra utilizada en el recuento. La profundidad utilizada en la fórmula es siempre 0,1 mm. La superficie del área corresponderá al área del cuadrante utilizado en el recuento. El factor del cuadrante principal de la cámara de Neubauer (figura 1.1) corresponde a 0,02 cm x 0,02 cm x 0,01 cm = 4,0 x 10⁻⁶. Para los cuadrantes laterales, el factor de la cámara corresponde a 1,0 x 10⁻⁴ (Eberle et al., 2012, Inglis et al., 2012).

Caso de estudio I

Una muestra de un bioplaguicida a base de *Trichoderma* spp. fue reconstituida en solución de Tween 80 al 0,1 %. A partir de la dilución 10⁻² se obtuvo un recuento total de 230 conidios. El recuento se realizó en los cuadrantes laterales empleando 4 cuadros por cuadrante, para un total de 16 (ecuación 1.2).

$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{\text{Recuento obtenido}}{\text{Número de cuadros contados}} * \text{factor de dilución} * \text{factor de la cámara}$$

Ecuación 1.2. Ecuación para el cálculo de conidios de *Trichoderma* spp. utilizando la cámara de Neubauer.

Con base en los datos se hace el reemplazo, tal como se muestra en la ecuación 1.3:

$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{\frac{230}{16} \times 10^2 \times 10^3}{(0,25 \times 0,25) \times 0,1} = \frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = 2,30 \times 10^8$$

Ecuación 1.3. Recuento de conidios de *Trichoderma* spp. utilizando la cámara de Neubauer.

Los datos presentan una distribución normal, por lo tanto, la media y el error de la muestra pueden ser utilizados para calcular los intervalos de confianza. Es importante tener en cuenta que el principio activo que se esté cuantificando mediante la cámara de Neubauer no debe presentar agregados, de manera tal que el recuento siga una distribución de Poisson y el error estándar de la media sea igual a lo descrito en la ecuación 1.4:

$$SD = \sqrt{\frac{\tilde{\mathcal{X}}}{N}}$$

Donde: $\tilde{\mathcal{X}}$ = Número de principio activo cuantificado por cuadrante

N = número de cuadrante contados

Ecuación 1.4. Ecuación para el cálculo de la desviación estándar en recuentos de principio activo utilizando la cámara de Neubauer.

La precisión de la estimación dependerá del número de principio activo cuantificado. Siempre que el número sea superior a 50, se pueden calcular los límites de confianza con una distribución normal de 0,975 y en un cuartil de 1,96.

Para el caso de estudio I, corresponderá la ecuación 1.5:

$$\tilde{\mathcal{X}} = \frac{230}{16} = 14,374$$

$$SD = \sqrt{\frac{14,374}{16}} = 0,947$$

Ecuación 1.5. Cálculo de la desviación estándar para el recuento de conidios de *Trichoderma* spp. (caso de estudio I).

Como el número de conidios contados es mayor que 50 (caso de estudio I) y se asume que los resultados presentan una distribución normal, los límites de confianza (95 %) del recuento medio corresponderá a lo descrito en la ecuación 1.6):

$$\text{Límites de confianza (95 \%)} = 14,374 \pm 1,96 \times \frac{0,9747}{\text{cuadrante}}$$

$$\text{Límites de confianza (95 \%)} = 14,374 \pm \frac{1,910}{16}$$

$$\text{Límites de confianza (95 \%)} = 14,374 \pm 0,11$$

Ecuación 1.6. Cálculo de los límites de confianza al 95% para el recuento de conidios de *Trichoderma* spp. (Caso de estudio I).

A partir de esto, se puede calcular el recuento de conidios de *Trichoderma* spp. con sus respectivos límites de confianza (95 %) (ecuación 1.7).

$$\begin{aligned} \text{Límites de confianza al 95 \%} &= 2,30 \times 10^8 \times (100 \times 0,11 \times 1 \times 10^6) = \\ &= 2,30 \pm 1,10 \times \frac{10^8 \text{ conidios}}{\text{ml}} \end{aligned}$$

Ecuación 1.7. Recuento de conidios de *Trichoderma* spp. con límites de confianza al 95 % (caso de estudio I).

La metodología de recuento en cámara de Neubauer se recomienda para productos a base de hongos (mohos y levaduras) y virus, sin embargo, las suspensiones utilizadas deben tener un bajo nivel de partículas o impurezas diferentes al principio activo, lo que garantizará un resultado confiable y de alta precisión.

Métodos espectrofotométricos

Los métodos espectrofotométricos son métodos indirectos utilizados para cuantificar el número de colonias presentes en una muestra líquida de un microorganismo y estimar la concentración de la población microbiana. Este método es utilizado para estimar concentraciones de hongos y bacterias (Hernández & Acebo, 2013). La metodología se basa en la transmitancia de la luz a través de la suspensión y en el hecho de que el porcentaje de luz transmitida disminuirá en proporción a la turbidez. Sin embargo, las lecturas de absorbancia (turbidez) deben estandarizarse mediante la

comparación de las unidades formadoras de colonia por unidad de volumen o por la cantidad de principio activo utilizando un hemocitómetro. Aunque el método turbidimétrico es relativamente simple y rápido, está sujeto a errores debido a la variación en tamaño, forma y aglomeración de los principios activos evaluados (Caligiore-Gei & Valdez, 2015).

El sistema de medición de turbidez cuenta con una lámpara, la muestra a analizar y el fotodetector (figura 1.4). La fuente de emisión (lámpara) tiene la capacidad de emitir una longitud de onda la cual se establece de acuerdo con el tipo de muestra; el fotodetector es el receptor de los fotones y actúa como un sensor óptico. Este sensor permite amplificar las señales en forma de impulsos eléctricos, lo cual genera un valor de turbidez expresado como absorbancia (figura 1.4) (Hernández & Acebo, 2013).

Generalmente, esta metodología es utilizada como control de calidad en el proceso, es decir, durante los procesos de fermentación, ya que se requiere una estimación rápida del crecimiento microbiano (Hernández & Acebo, 2013). Para esto, se mide la absorbancia de una muestra del caldo de fermentación mediante un espectrofotómetro (Hernández & Acebo, 2013). Sin embargo, esta metodología tiene una gran desventaja, ya que no permite diferenciar las células viables de las no viables, porque los dos tipos de células absorben a una longitud de onda específica. Por esta razón, la absorbancia no se puede definir como una medida directa de la viabilidad.

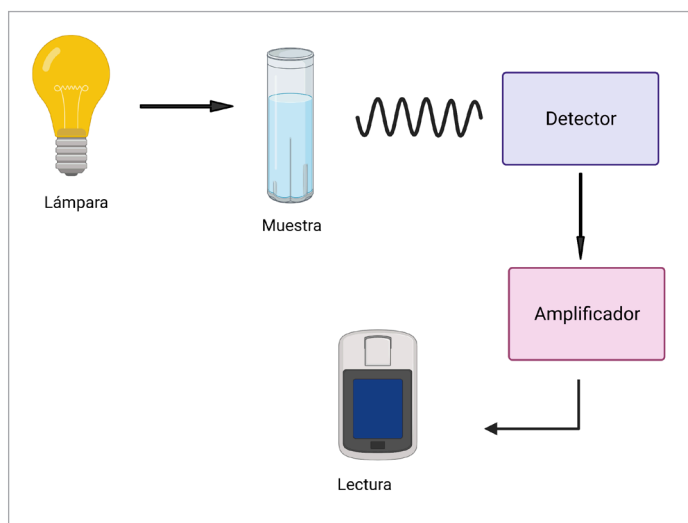


Figura 1.4. Esquema general de un sistema de turbidez (espectrofotometría).

Fuente: Elaboración propia

Varios autores han implementado el uso de métodos espectrofotométricos en la cuantificación rutinaria de principios activos de bioplaguicidas. Por ejemplo, Schütz et al. (2020) establecieron una metodología para la preparación rápida y confiable de inóculos de *Trichoderma reesei* y *T. atroviride*, evaluando el efecto del tamaño, la forma y la pigmentación de los conidios a diferentes longitudes de onda. Los autores establecieron que una absorbancia entre 550 nm y 700 nm está directamente relacionada con el recuento de conidios para las cepas de *Trichoderma* spp. y, por lo tanto, las curvas de calibración se pueden usar como una herramienta válida y rápida para estimar la concentración de conidios en una solución.

En el caso de levaduras, el proceso de cuantificación por espectrofotometría es utilizado, principalmente, para la preparación del inóculo en el montaje de pruebas de control de calidad de actividad biológica. Por ejemplo, Magoye et al. (2020), utilizaron esta metodología en la estandarización del inóculo de *Aureobasidium pullulans* para ser evaluado frente hongos como *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp.

Con respecto a bioplaguicidas a base de bacterias, esta metodología es utilizada como control de calidad en el proceso (fermentación) y se han realizado aproximaciones en su uso para la estimación del recuento del producto final. Para bacterias esporoformadoras, la cuantificación de esporas viables se puede realizar mediante la lectura de la absorbancia, debido a que estas tienen un índice de refracción más alto que las células vegetativas y la refractividad está sujeta a disminuir durante el proceso de germinación. De acuerdo con lo mencionado este método es más sensible, rápido y sencillo en comparación con la metodología de recuento en placa (Zhang et al., 2015). De igual manera, en el proceso de germinación de esporas de *Bacillus subtilis*, Gorsuch & Woodruff (2019) utilizaron las lecturas de absorbancia a 600 nm como un método altamente confiable para comparar los resultados con la implementación de un protocolo de cuantificación mediante qPCR en el producto terminado.

Para los virus entomopatógenos, la técnica de espectrofotometría tiene una baja sensibilidad y especificidad, además, no permite cuantificar el principio activo en muestras compuestas, tales como productos de formulación o de suelo (Graham et al., 2015).

Cuantificación por PCR

La cuantificación por medio de PCR es ampliamente utilizada en el control de calidad en el proceso de fabricación y en las formulaciones de bioplaguicidas a base de virus. Su amplia utilización se debe a que es altamente específica y sensible. Este método

requiere el conocimiento de al menos alguna parte del genoma del virus para generar cebadores específicos que se unan únicamente a la secuencia de interés (Miele et al., 2011). Algunos de los protocolos utilizan “agentes intercaladores fluorescentes” de doble cadena de ADN, sin embargo, se pueden producir falsos positivos si aparecen productos de PCR inespecíficos (Barrera et al., 2016). Las sondas marcadas con fluorescencia son oligonucleótidos que se unen específicamente a la secuencia de interés y permiten la cuantificación por fluorescencia. Se aplican principalmente tres tipos de sondas: TagMan (Barrera et al., 2016), balizas moleculares (Tyagi & Kramer, 1996) y sondas de hibridación (Eberle et al., 2012).

Esta metodología se ha implementado durante las etapas de producción del principio activo (cría de insectos) y en la cuantificación del principio activo en el producto formulado.

- a. **Cría de insectos para la producción de baculovirus:** las crías de insectos se realizan en condiciones controladas de laboratorio o de invernadero. En general, los individuos que se utilizan como pie de cría provienen de campo y se mantienen en cuarentena para garantizar la introducción de individuos libres de infección o enfermedades. Sin embargo, este proceso consume tiempo crítico, por lo que la implementación de la cuantificación por PCR permite detectar la infección por baculovirus presente en una larva, con una alta sensibilidad y especificidad (Barrera et al., 2016).
- b. **Cuantificación de principio activo en producto formulado:** esta técnica es especialmente utilizada para virus de tamaño (densovirus, iridovirus o virus de ARN) que no son cuantificables por medio de técnicas de microscopía óptica. Puede ocurrir un problema si el genoma del virus está segmentado (nodavirus, cypovirus o tetravirus). Aunque la cuantificación de virus mediante qPCR requiere alguna optimización, la cuantificación de genomas de virus mediante técnicas de qPCR es un método estandarizado y de una alta precisión (Eberle et al., 2012). Un ejemplo de la utilización de esta técnica es el trabajo realizado por Barrera et al. (2016), quienes utilizaron la técnica de qPCR para establecer la concentración de granulovirus en un bioplaguicida formulado como un concentrado emulsionable.

Viabilidad de principio activo

La cuantificación de microorganismos es un elemento crítico en la caracterización y el control de calidad de bioplaguicidas. No solo es importante identificar y cuantificar al microorganismo, también es fundamental conocer el número de microorganismos viables. De esta manera se podrá establecer si los mismos serán capaces de desarrollar y causar el efecto biocontrolador deseado.

Se han diseñado distintas estrategias para cuantificar el principio activo de bioplaguicidas a base de hongos y bacterias (tabla 1.1). En el caso de productos a base de hongos filamentosos, la determinación de la viabilidad se puede realizar por el método de recuento en placa y por el método de germinación de conidios. Para productos a base de levaduras, la viabilidad se determina por medio de recuento en placa con diferentes modificaciones. Para productos a base de bacterias, se pueden utilizar varias metodologías, tales como recuento en placa, goteo en placa y el método del Número Más Probable (NMP) (Corral-Lugo et al., 2012).

Tabla 1.1. Metodologías utilizadas para la determinación de la viabilidad del principio activo de bioplaguicidas a base de hongos filamentosos, levaduras y bacterias

Metodología	Principio activo de bioplaguicidas		
	Hongos filamentosos	Levaduras	Bacterias
Recuento en placa	x	x	x
Goteo en placa		x	x
Germinación de conidios	x		
Número más probable			x

Fuente: Elaboración propia

Si bien las metodologías para la determinación de la viabilidad aumentan la precisión de la cuantificación y proporcionan información sobre la distribución espacial del microorganismo, estos métodos requieren de mucha mano de obra en comparación con los métodos de recuento indirectos (por ejemplo: recuento en cámara de Neubauer o espectrofotometría) (Ingliš et al., 2012). Además, es importante establecer la metodología ideal de acuerdo con el principio activo, el tipo de formulación (por ejemplo: granulado, polvo o concentrado emulsionable) y la cantidad de contaminantes, ya que este último factor puede afectar el resultado de la cuantificación del principio activo.

Recuento en placa

La metodología de recuento en placa es una técnica ampliamente utilizada que permite cuantificar la población en una muestra o cultivo (puro o mixto) mediante diluciones seriadas (por ejemplo: 1:10) para, posteriormente, realizar el recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC) (Sieuwerts et al., 2008). Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección, sin embargo, requiere una gran cantidad de material y más tiempo durante el procesamiento y la lectura de la muestra.

Para esta técnica, dependiendo del principio activo a cuantificar, se utilizan medios de cultivo específicos, selectivos o diferenciales (tabla 1.2). Las técnicas más utilizadas en el control de calidad de bioplaguicidas para el recuento de células viables son el recuento en superficie y el recuento en profundidad. Tanto el método de superficie como el de profundidad consisten en diluir la muestra original en un factor 1:10 hasta la dilución en la cual se pueda realizar un recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) (figura 1.6).

Tabla 1.2. Medios de cultivo y método de siembra más utilizados para el recuento del principio activo de bioplaguicidas a base de bacterias, hongos filamentosos y levaduras

Microorganismos principio activo	Medio de cultivo	Suplemento del medio de cultivo	Método de siembra
<i>Pseudomonas</i> spp.	Agar nutritivo	NA	Siembra en superficie / Siembra en profundidad
<i>Paenibacillus</i> spp.	Agar Luria Bertani (LB)	NA	
<i>Serratia</i> spp.			
Bacilos esporoformadores, (incluyendo <i>Bacillus thuringiensis</i>)	Agar LB	NA	Siembra en superficie / Siembra en profundidad
	Agar brain heart infusion (BHI)	NA	
<i>Trichoderma</i> spp.	Agar papa dextrosa (PDA)	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
	Agar Sabouraud dextrosa	NA	
	<i>Trichoderma</i> selective media (TSM)	NA	
	Agar rosa de bengala	NA	
<i>Beauveria</i> sp.	Agar PDA	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
	Agar avena	NA	

(Continuación tabla 1.2)

Microorganismos principio activo	Medio de cultivo	Suplemento del medio de cultivo	Método de siembra
<i>Metarhizium</i> sp., <i>Isaria</i> sp., <i>Lecanicillium</i> sp.	Agar PDA	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
<i>Metarhizium rileyi</i>	Agar extracto de malta y levadura (YM)	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Agar PDA	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
Levaduras (e.g. <i>Pichia onychis</i>)	Agar extracto de malta y levadura (YM)	Cloranfenicol	Siembra en superficie
	Agar levadura, peptona, dextrosa (YPD)	Cloranfenicol	
	Agar Sabouraud dextrosa	Cloranfenicol	

*NA: No aplica.

Fuente: Elaboración propia

Para la cuantificación y determinación de la viabilidad de bioplaguicidas a base de bacterias, hongos filamentosos y levaduras, el método más utilizado es el recuento en superficie. Este método consiste en la colocación de 100 µl de cada una de las diluciones en cajas de Petri independientes que contengan el medio de cultivo gelificado. Los 100 µl en cada caja de Petri son extendidos (plaqueada) con ayuda de un rastrillo o con esferas de vidrio —en ambos casos el material debe estar estéril y a temperatura ambiente (figura 1.5)—. Una vez se hayan sembrado los 100 µl, las cajas de Petri se deben poner a incubar durante 3 a 7 días teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento que requiera el microorganismo a ser cuantificado (tabla 1.3).

Tabla 1.3. Condiciones de temperatura y tiempo de crecimiento de acuerdo con el principio activo del bioplaguicida, para su recuento en placa

Microorganismos principio activo*	Temperatura de crecimiento	Tiempo de incubación
Bacterias	30 °C ± 2 °C	24-48 horas
Hongos filamentosos	25 °C ± 2 °C	3-7 días

(Continúa)

(Continuación tabla 1.3)

Microorganismos principio activo*	Temperatura de crecimiento	Tiempo de incubación
Levaduras (por ejemplo: <i>Pichia onychis</i>)	28 °C ± 2 °C	48 horas

*Grupos de microorganismos más utilizados como principio activo de bioplaguicidas. Pueden existir excepciones a las condiciones descritas.

Fuente: Elaboración propia

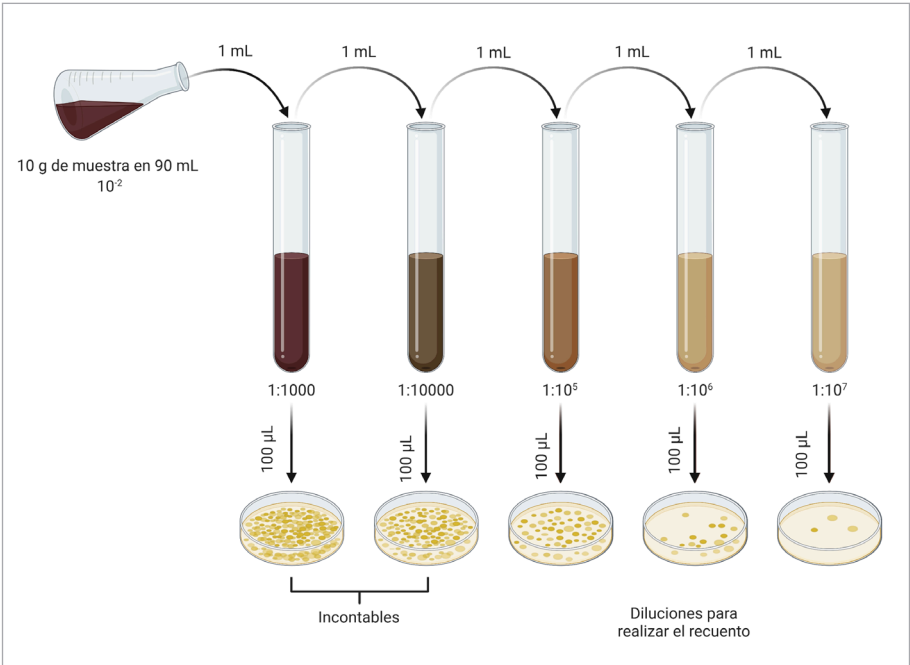


Figura 1.5. Viabilidad de principio activo (hongos y bacterias) de bioplaguicidas. Método de recuento en placa y siembra en superficie mediante diluciones en base 10.

Fuente: Elaboración propia

Con el fin de obtener una desviación estándar inferior al 10 %, se recomienda sembrar mínimo tres cajas de Petri por dilución. Después de que las colonias hayan crecido, se debe seleccionar la dilución en la cual las cajas de Petri contengan los rangos establecidos para cada tipo de principio, por ejemplo, entre 30 a 300 UFC para productos a base de bacterias (Inglis et al., 2012; Muñoz-Rojas et al., 2016). Para calcular el número de UFC presentes en la muestra, se multiplica por 10 el número de colonias presentes en la caja de Petri seleccionada para realizar el recuento. El resultado obtenido es multiplicado por el factor de dilución para obtener el número

de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml o UFC/g), como se describe en la ecuación 1.8.

$$\frac{UFC}{ml} \text{ o } \frac{UFC}{g} = \frac{\left(\frac{\text{Número de colonias contadas} \times 1}{\text{factor de dilución}} \right)}{\text{volumen sembrado}}$$

Ecuación 1.8. Cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC) por medio de método de recuento en placa - siembra en superficie (ISO 4833-1:2013).

Caso de estudio II

Se realizó el recuento en placa de un bioplaguicida a base de *Trichoderma* spp. Para dicho fin se utilizó el método de siembra en superficie en Agar PDA suplementado con Tritón X-100 al 1 %. En la dilución 10^{-6} se obtuvo un recuento de 156 UFC y en la dilución 10^{-7} se obtuvo un recuento de 34 UFC.

Dilución 1:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\left(\frac{156 \times 1}{10^{-6}} \right)}{0,1 ml} = 1,56 * 10^9$$

Dilución 2:

$$\frac{UFC}{ml} \text{ o } \frac{UFC}{g} = \frac{\left(\frac{34 \times 1}{10^{-7}} \right)}{0,1 ml} = 3,40 * 10^9$$

Consolidado:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{1,56 * 10^9 + 3,40 * 10^9}{2} = 2,48 * 10^9 \approx 25 * 10^8$$

Para algunos productos a base de bacterias se utiliza el método de siembra en profundidad. Para esto, se agrega 1 ml de cada dilución en las cajas de Petri sin medio de cultivo, se adiciona una cantidad de medio de cultivo fundido (aproximadamente 20 ml) y se agita con suavidad, así se garantiza la homogenización de la muestra. Este método posibilita el crecimiento de bacterias microaerófilas, ya que permite el crecimiento de colonias a bajas concentraciones de oxígeno. El cálculo de las UFC se

realiza de la misma forma que el recuento en superficie; se realiza la corrección con el volumen de siembra (ecuación 1.8).

Goteo en placa

La metodología de goteo en placa se utiliza en la determinación de la viabilidad de bioplaguicidas a base de bacterias y levaduras. El goteo en placa consiste en colocar 5 gotas de un volumen de 20 μl de cada una de las diluciones seriadas en cajas de Petri con el medio de cultivo. Posteriormente, estas cajas se incuban bajo las condiciones establecidas para cada microorganismo y después del tiempo de incubación se realiza el recuento de las UFC. En general, para esta metodología se requiere el uso de 2 cajas de Petri para garantizar la correcta siembra de las diluciones seriadas, lo que permite aumentar el número de repeticiones y del tamaño de las muestras (figura 1.6) (Muñoz-Rojas et al., 2016). Con el fin de estimar el número de UFC /ml en cada una de las muestras, se debe cuantificar el número de colonias de acuerdo con la dilución seleccionada. Posteriormente, se correlaciona el volumen de 20 μl con 1 ml con el fin de expresar el resultado en UFC /ml (Corral-Lugo et al., 2012).

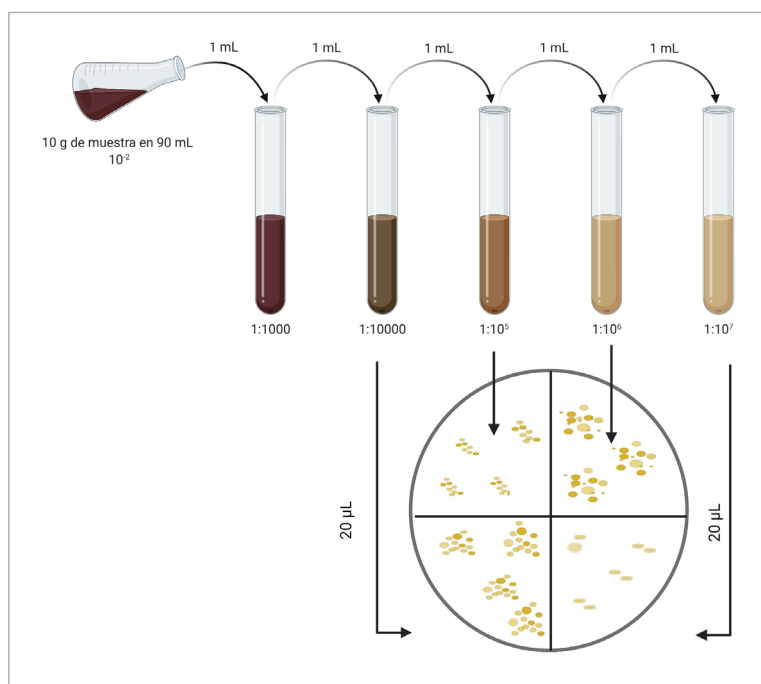


Figura 1.6. Viabilidad del principio activo (hongos y bacterias) de bioplaguicidas. Método de goteo en placa.

Fuente: Elaboración propia

En el caso de hongos, el método de goteo en placa ha sido utilizado para la cuantificación de hongos dimórficos en su fase levaduriforme, ya que permite disminuir el tiempo y es igual de eficiente que el método de recuento en placa. Por ejemplo, Morales-García et al. (2016) seleccionaron la metodología de goteo en placa para ser utilizada como control de calidad en proceso para el hongo *Penicillium* spp., ya que no se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre esta metodología en comparación con el método de siembra en superficie. Como recomendación para el proceso de implementación de este método, es importante definir el tiempo correcto de lectura con el fin de obtener resultados confiables y seguros.

Recomendaciones para la evaluación de la viabilidad de bioplaguicidas a base de hongos filamentosos, levaduras y bacterias, mediante la metodología de recuento en placa en superficie o goteo en placa:

- Para bioplaguicidas formulados como granulados (WG), polvo mojable (WP), polvo para espolvoreo y concentrados emulsionables (CE), la suspensión inicial se debe homogeneizar de manera adecuada. Se puede utilizar una licuadora de inmersión durante máximo 20 segundos o se puede dejar la suspensión inicial en agitación a $1500 \text{ rpm} \pm 25 \text{ rpm}$ durante máximo 30 minutos.
- Para productos a base de bacterias esporoformadoras, el número de células vegetativas y esporas puede evaluarse realizando un choque térmico de 15 minutos a $80^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Se cuantifica el número de células (antes del choque térmico) y el número de esporas (después del tratamiento térmico).
- Las diluciones seriadas se deben homogeneizar en vórtex durante aproximadamente 10 segundos.
- Para productos a base de hongos se recomienda utilizar un diluyente a base de un tensoactivo como Tween 80 o Tween 20 entre el 0,1 % y el 1 % v/v.
- Para productos a base de bacterias se recomienda utilizar solución salina como diluyente (0,9 % NaCl) o agua peptonada (0,1 %).
- Para expresar el resultado como UFC/g se debe realizar la corrección con la cantidad de muestra (gramos) utilizada en la suspensión inicial.

Para el recuento de unidades formadoras de colonia UFC:

- Cuando tres cajas de Petri de una misma dilución contienen un número de unidades de colonia características del microorganismo a evaluar, se promedian los números y se multiplica por el inverso de la dilución.
- Cuando haya una caja de Petri con crecimiento extendido, ni esta ni su triplicado son considerados.
- Cuando hay cajas de Petri representativas en 2 diluciones seguidas, se promedia cada una con su triplicado, se aplica el factor de dilución a cada una y luego se promedia nuevamente.
- Si en las cajas de Petri no hay crecimiento de UFC (o no corresponden a las características del microorganismo), se debe reportar el resultado como: 10^{-x} (dilución más baja utilizada) y se debe informar como valor estimado.
- El rango de recuento para bioplaguicidas a base de bacterias es de 30 a 300 UFC.
- El rango de recuento para bioplaguicidas a base de hongos es de 10 a 150 UFC.
- Cuando el número de colonias por caja de Petri exceda el rango establecido, se deben cuantificar las colonias en aquellas porciones de la caja de Petri que sean representativas de la distribución de colonias e informar como valor estimado.

Germinación de conidios

Para productos a base de hongos filamentosos, la determinación de la germinación de conidios es el parámetro de viabilidad más utilizado dentro del control de calidad en el proceso y el producto terminado (Jenkins & Grzywacz, 2000). La germinación es el mecanismo mediante el cual una espora o conidio inactivo o en proceso de dormancia crece vegetativamente y es capaz de reproducirse de forma sexual o asexual (Sephton-Clark & Voelz, 2018).

Este proceso se da bajo condiciones ambientales favorables de oxígeno y disponibilidad de agua y se caracteriza por un rápido hinchamiento del conidio como resultado del proceso de hidratación. La infiltración de agua en los conidios por ósmosis aumenta su presión hidrostática interna y es seguida por la formación de un tubo germinal de paredes delgadas (Lacey, 2017). Generalmente, este proceso ocurre en cuatro etapas: crecimiento isotrópico o hinchazón, polarización celular, aparición

de hifas y elongación de hifas (Sephton-Clark & Voelz, 2018) (figura 1.7). En la etapa de crecimiento isotrópico se observa el proceso de hinchazón, ya que las esporas aumentan su contenido interno y, por lo tanto, reorganizan las paredes celulares. Las esporas también aumentan su actividad metabólica y pueden utilizar fuentes de energía externas o internas para iniciar procesos de transcripción y traducción de información genética. La polarización de la pared celular después de la hinchazón determina dónde emergerá el tubo germinal. En esta etapa, la pared celular requiere un proceso de ajuste ya que debe permitir el crecimiento de las hifas. Cuando las hifas emergen, crecen hasta formar lo que puede verse como una estera hifal o matriz en la cual las hifas pueden solaparse e incluso crecer hacia fuentes de luz o nutritivas (Sephton-Clark & Voelz, 2018).

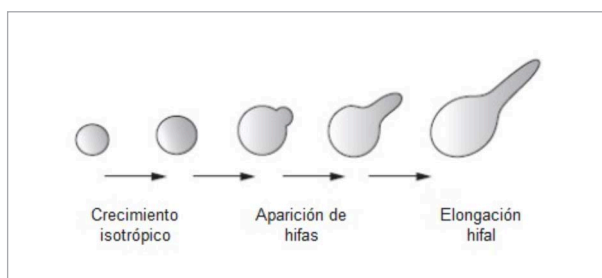


Figura 1.7. Proceso de germinación de conidios.

Fuente: Elaboración propia con base en Sephton-Clark & Voelz (2018)

En la actualidad, los conidios son el principio activo de casi el 75 % de los bioplaguicidas disponibles en el mercado (Zaki et al., 2020). Debido a esto, el protocolo para evaluar la germinación de los conidios es habitualmente la técnica más utilizada en el proceso de control de calidad de productos a base de hongos filamentosos. Sin embargo, existen diferencias y variaciones entre los protocolos descritos y, en general, no hay un método estandarizado en el mundo para evaluar esta característica. Algunos de los factores que influyen en la germinación de conidios son el pH y la composición de los medios de cultivo, la disponibilidad de agua, la temperatura de incubación, el proceso de hidratación de la célula y hasta la temperatura del diluyente utilizado (Lopes et al., 2013). Por esta razón, es importante establecer estos parámetros para el montaje de la prueba.

Para la evaluación de la germinación, la muestra a evaluar se diluye en diluciones seriadas en base 10 (1:10). Posteriormente, de las diluciones seleccionadas (una concentración aproximada de 10^6 conidios/ml) se siembran 100 μ l por medio de la técnica de superficie en el medio de cultivo elegido; las cajas de Petri inoculadas se

incubaban aproximadamente durante 18 a 24 horas y trascurrido el tiempo de incubación, los conidios germinados y no germinados se cuantifican mediante observación en microscopio (Inglis et al., 2012). Se considera como conidio germinado cuando el tubo germinal es igual o más largo que el conidio no germinado (figura 1.8) (Faria et al., 2015; Oliveira et al., 2015).

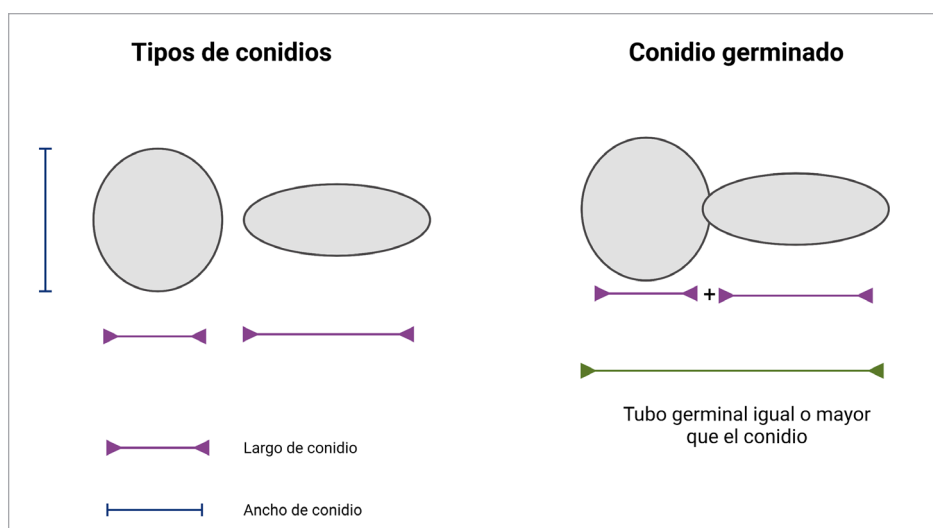


Figura 1.8. Esquema representativo de tipos de conidios y de un conidio germinado con el respectivo tubo germinal. Dimensiones morfológicas (largo y ancho) de acuerdo con cada tipo de conidio.

Fuente: Elaboración propia

A continuación se describe la metodología implementada para la determinación del porcentaje de germinación en el control de calidad de bioplaguicidas a base de *Trichoderma* spp. (concentración teórica de 10^9 conidios/g) (Santos et al., 2012).

1. En primer lugar, hay que preparar una suspensión inicial adicionando 1 g o 1 ml de la muestra de conidios o del bioplaguicida a evaluar en una solución de 99 ml de Tween 80 al 0,1%.
2. En segundo lugar, hay que homogeneizar la suspensión anterior (dilución 10^{-2}) con una licuadora de inmersión o dejarla en agitación hasta que la dilución esté homogénea.
3. En tercer lugar, hay que realizar diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución 10^{-3} . Es fundamental evitar el contacto entre la micropipeta y el diluyente.

4. En cuarto lugar, hay que sembrar por triplicado 100 µl de las tres últimas diluciones en las cajas de Petri con agar agua suplementado con benomil (0,0003 %). Además, hay que distribuir el contenido de manera homogénea sobre el medio de cultivo.
5. En quinto lugar, hay que incubar las cajas de Petri inoculadas a una temperatura de 25 °C durante 24 horas en un ambiente oscuro y ubicarlas dentro de la incubadora de manera invertida.
6. En sexto lugar, hay que cortar con un bisturí un trozo del medio de cultivo inoculado de aproximadamente 1 cm² y colocarlo sobre una lámina portaobjetos. Si se requiere, se debe adicionar una gota del reactivo azul de lactofenol y cubrir con una laminilla (figura 1.9).
7. En séptimo lugar, se procede a cuantificar los conidios germinados y no germinados en microscopio de luz (objetivo 40×). Como mínimo se deben contar 100 conidios (germinados y no germinados) por cada caja de Petri a evaluar.
8. Para el conteo de conidios germinados y no germinados se debe partir del extremo superior izquierdo del cuadrado (1 cm²) del medio de cultivo y avanzar en forma de zigzag, para evitar el doble conteo de conidios.
9. Finalmente, se puede determinar el porcentaje de germinación de conidios mediante la siguiente fórmula (ecuación 1.9):

$$\text{Germinación(\%)} = \left(\frac{\sum \text{conidios germinados}}{\sum \text{conidios germinados} + \sum \text{conidios no germinados}} \right) \times 100$$

Ecuación 1.9. Cálculo del porcentaje de germinación de conidios.

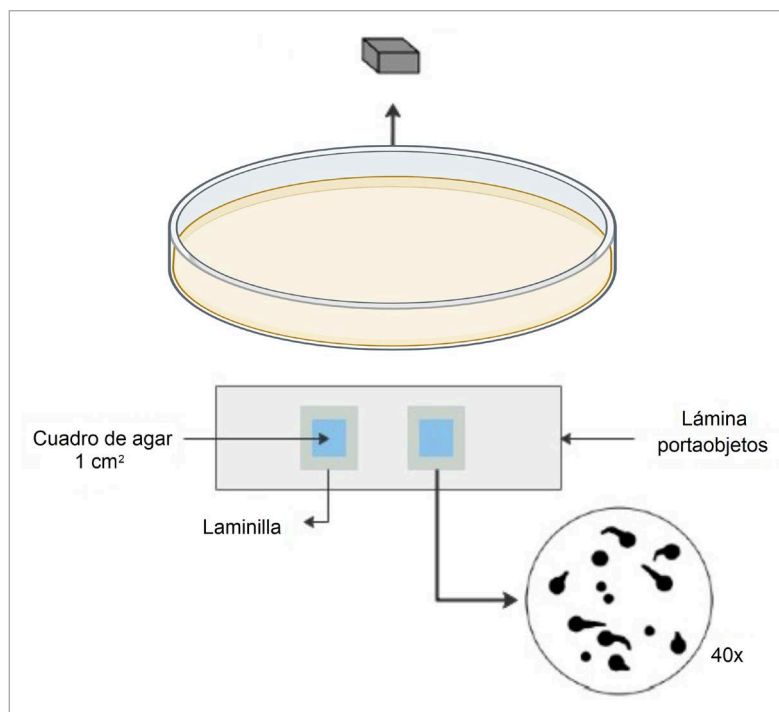


Figura 1.9. Montaje de la prueba de germinación para el proceso de cuantificación de conidios germinados y no germinados.

Fuente: Elaboración propia

Recomendaciones para la determinación del porcentaje de germinación de conidios:

- Una densidad adecuada para la cuantificación de conidios está en el rango de 10^6 conidios. Idealmente, la caja de Petri a utilizar debe ser de un diámetro de 9 cm (referencia 90 mm * 16 mm).
- Las condiciones de incubación (temperatura y tiempo) dependerán del microorganismo a evaluar.
- El medio de cultivo debe ser seleccionado para cada microorganismo. Se sugiere un medio de cultivo basal (agar agua); sin embargo, algunos hongos tienen requerimientos nutricionales especiales. Por ejemplo, para el proceso de germinación, *Metarhizium rileyi* requiere una fuente nutricional de nitrógeno y el medio de cultivo que se utiliza es agar extracto de malta (tabla 1.4).

Tabla 1.4. Medios de cultivo comúnmente utilizados para evaluar la germinación de conidios de hongos biocontroladores

Microorganismo principio activo	Medio de cultivo	Referencia
<i>Trichoderma</i> spp.	Agar agua + benomil (0,0003 %)	Santos et al. (2012)
	Agar agua	Kobori et al. (2014)
	Agar PDA	Sanogo et al. (2002)
	Caldo papa dextrosa	Hjeljord (2000)
	Caldo peptona (1 %)	Jackson et al. (1991)
<i>Beauveria</i> spp.	Agar PDA	Alves et al. (1996)
	Agar PDA + benomil (10 µl/l)	Oliveira et al. (2015)
	Agar PDA + carbendazima (10 µl/l).	Oliveira et al. (2015)
	Agar PDA + extracto de levadura (1g /l)	Fernandes et al. (2007)
	Medio de cultivo esporulación	Alves et al. (2002)
	Agar agua (2 % p/v)	
	Agar Czapeck Dox	Petlamul & Prasertsan (2012)
	Agar Sabouraud dextrosa + levadura (1 %)	Talaei-Hassanloui et al. (2007)
	Agar glucosa (1 %) + peptona (0,5 %) + Extracto de levadura (0,5 %)	Horaczek & Viernstein (2004)
	Agar Sabouraud dextrosa	Kim et al. (2019)
<i>Metarhizium</i> spp.	Agar extracto de levadura + benomil (0,005 g/l)	Faria et al. (2010)
	Agar PDA + extracto de levadura (1 g/L)	Rangel et al. (2005)
	Agar PDA + benomil (10 µl/L)	Oliveira et al. (2015)
	Agar PDA + carbendazima (10 µl/l).	Oliveira et al. (2015)
	Agar Sabouraud dextrosa	Ibrahim et al. (2015)
	Caldo medio mínimo (MM)	Lazzarini et al. (2006)
	Agar Czapeck Dox	Petlamul & Prasertsan (2012)
	Agar glucosa (1 %) + peptona (0,5 %) + extracto de levadura (0,5 %)	Horaczek & Viernstein (2004)
	Agar extracto de malta y levadura	Santos et al. (2017)

(Continúa)

(Continuación tabla 1.4)

Microorganismo principio activo	Medio de cultivo	Referencia
<i>Metarhizium</i> spp.	Agar extracto de malta y levadura + benomil (0,00008 %)	Grijalba et al. (2018)
<i>Lecanicillium</i> spp.	Agar Sabouraud	Grijalba et al. (2018)
	Agar agua	Rivas et al. (2014)
	Agar Sabouraud, maltosa, extracto de levadura y neopeptona (SMAY)	Feng et al. (2002)
	Agar glucosa (2 %)	Shi et al. (2006)

Fuente: Elaboración propia

- Los medios de cultivo enriquecidos, como el agar papa dextrosa, contienen todos los nutrientes necesarios y las condiciones ideales para el proceso de germinación, lo que puede generar una sobrevaloración del porcentaje de germinación. En el caso contrario, cuando se utilizan medios de cultivo basales como el agar agua, las condiciones son mínimas y similares a las que se pueden presentar en condiciones de campo.
- El medio de cultivo a utilizar debe ser de un color traslúcido y debe ser agar de capa delgada (10 ml por caja de Petri), de manera tal que facilite la visualización de los conidios.
- Diferentes autores han sugerido la adición de fungicidas al medio de cultivo debido a que a bajas concentraciones generan una sincronización en el proceso de germinación y permiten realizar un recuento uniforme y en diferentes tiempos de lectura. Además, permiten la formación de tubos germinales, aunque previenen el desarrollo de hifas y evitan el crecimiento excesivo (Milner et al., 1991; Oliveira et al., 2015). El fungicida más utilizado es el benomilo y las concentraciones de uso generalmente son inferiores a 0,001 %. Sin embargo, este producto ya no tiene aprobación en varios países. Por lo tanto, es necesario seleccionar un fungicida registrado y disponible comercialmente que presente un efecto similar cuando se mezcle con el medio de cultivo. Por ejemplo, Oliveira et al. (2015) demostraron que el fungicida carbendazima (también del grupo químico benzimidazol) a una concentración de 10 µl por litro de medio de cultivo (0,005 g de ingrediente activo por litro de medio) puede usarse para evaluar la germinación de productos a base de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.
- Se recomienda la adición de antibióticos al medio de cultivo, ya que evita el crecimiento de contaminantes bacterianos y facilita el recuento. Dentro de los antibió-

ticos más utilizados se destacan los de amplio espectro como el cloranfenicol, la tetraciclina, la estreptomycin y la eritromicina.

- Para facilitar el recuento de conidios, se utiliza como colorante el azul de lactofenol pero se debe utilizar de forma moderada ya que puede causar una sobreesitimación de los recuentos, pues elimina los conidios no germinados de las zonas de inoculación (Lopes et al., 2013).
- La laminilla o el cubreobjetos sobre el cuadro de agar seleccionado para el recuento debe colocarse de manera que no haya presión hidráulica sobre el medio de cultivo y no afecte la distribución de los conidios.

Además de la prueba de germinación, en algunas ocasiones es necesario evaluar el parámetro definido como vigor, el cual se relaciona con la velocidad de germinación de los conidios y el crecimiento de los tubos germinales (Faria et al., 2015). Esta metodología es útil en estudios de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento o en pruebas donde se evalúen condiciones de estrés. Los conidios con un alto nivel de vigor germinan entre las 18 y las 24 horas posteriores a la inoculación, mientras que la germinación de conidios estresados se puede retrasar y volver asincrónica, por lo cual puede tener lugar entre las 24 y las 72 horas (Faria et al., 2015). Sin embargo, la implementación de este parámetro depende de las características del producto y del interés de complementar la información y las recomendaciones del bioproducto.

La germinación de conidios se considera un indicador de la capacidad del hongo para producir un tubo germinal y, por lo tanto, generar un efecto biocontrolador. Una germinación rápida se relaciona con una mayor probabilidad de éxito en condiciones de campo, sin embargo, la alta germinación no garantiza altos valores de eficacia, por esta razón, las metodologías de viabilidad y actividad biológica son complementarias (Miranda-Hernández et al., 2016).

Contenido de contaminantes: pureza

Las especificaciones en un bioplaguicida para determinar el nivel aceptable de contaminantes dependen del método de producción masiva, formulación y empaque. La producción masiva es el proceso más susceptible de verse perjudicado por una posible contaminación debido a que los contaminantes (bacterias u hongos), pueden crecer sin ningún tipo de restricción (Jenkins & Grzywacz, 2000). Todas las fermentaciones microbianas tienen un alto riesgo de contaminación debido a la alta

disponibilidad nutricional del sustrato y a las condiciones ambientales. La contaminación en los sistemas de fermentaciones, tanto líquidas como sólidas, afectará el rendimiento debido a la competencia por nutrientes y, en algunos casos, al efecto inhibidor de los metabolitos secundarios (Jenkins & Grzywacz, 2000). Además, los contaminantes bacterianos o fúngicos pueden afectar la concentración del principio activo en el producto final, en especial si la contaminación no ha sido monitoreada y cuantificada.

Para el caso de bioplaguicidas a base de virus, la contaminación microbiana puede ser el resultado del proceso de producción del principio activo. Teniendo en cuenta que su producción se realiza en condiciones *in vivo*, puede presentar una carga alta de microorganismos contaminantes presentes en las dietas utilizadas y en el insecto mismo (Caballero et al., 2001; Santos et al., 2014).

La metodología más utilizada para la cuantificación de contaminantes microbianos es la técnica de recuento en placa en superficie (numeral 1.3) y el resultado se expresa como UFC/g o UFC /ml de producto. Para cuantificar el total de contaminantes microbianos se deben cuantificar individualmente las bacterias, las levaduras y los hongos contaminantes. Posteriormente se realiza la sumatoria aplicando la ecuación 1.10. Este parámetro también se puede expresar en términos de porcentaje de pureza (ecuación 1.11).

$$\frac{UFC}{g} o \frac{UFC}{ml} de bacterias = \frac{UFC * inverso de la dilución * 10}{peso de la muestra}$$

$$\frac{UFC}{g} o \frac{UFC}{ml} de levaduras = \frac{UFC * inverso de la dilución * 10}{peso de la muestra}$$

$$\frac{UFC}{g} o \frac{UFC}{ml} de hongos = \frac{UFC * inverso de la dilución * 10}{peso de la muestra}$$

Ecuación 1.10. Cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC) de contaminantes microbianos.

$$Pureza(\%) = \frac{UFC de contaminantes}{UFC de principio activo + UFC de contaminantes} * 100$$

Ecuación 1.11. Cálculo del porcentaje de pureza para productos a base de agentes de control biológico.

El efecto de la contaminación microbiana en un bioplaguicida fue descrito por Meikle et al. (2012). Los autores evidenciaron que un bioplaguicida formulado a base de *B. bassiana* para el control de ácaros en colonias de abejas presentó resultados contradictorios en condiciones de campo. Las colmenas de abejas tratadas con el bioplaguicida murieron a un ritmo elevado, perdieron más peso y tuvieron una densidad de ácaros más alta en comparación con las colmenas utilizadas como control. Los autores identificaron que el bioplaguicida estaba contaminado con bacterias del grupo de *Pseudomona fluorescens*. En condiciones de laboratorio se demostró que la cepa de *P. fluorescens* ralentiza o suprime el crecimiento de *B. bassiana*, comportamiento que se evidenció en condiciones de campo.

Por otro lado, patógenos para humanos como *Salmonella* spp. o *Escherichia coli* se pueden cuantificar por medio de las metodologías usadas para el análisis de alimentos o materias primas. Los niveles de presencia de estos patógenos deben ser estrictos y en algunos casos se exige que estén ausentes. Este parámetro en la actualidad no es obligatorio dentro de un programa de control de calidad rutinario pero se recomienda realizarlo en el proceso de desarrollo del producto y en el proceso de registro del mismo. Jenkins & Grzywacz (2000) recomiendan realizar un análisis de riesgo para determinar las posibles entradas en el sistema de este tipo de contaminante con el fin de garantizar la seguridad del producto cuando se aplique en condiciones de campo.

Para productos a base de virus, en algunos países solicitan la evaluación de especies de *Bacillus* spp., ya que puede ser un contaminante muy común en virus producidos *in vivo*, en especial cuando los insectos muertos se recolectan después de la muerte. Todas estas especies forman esporas, que son mucho más resistentes a la destrucción tanto por calor como por medios químicos que las células bacterianas vegetativas. Una de las bacterias más comúnmente encontrada en productos a base de NPV es *Bacillus cereus*, la cual puede ser aislada en agar nutritivo. Sin embargo, si otras especies son abundantes, la detección de pequeñas cantidades (10^{-1} a 10^{-2} por ml) de *B. cereus* puede resultar difícil. Para estas situaciones, se recomienda utilizar medios de cultivo específicos para *B. cereus*. La identificación y confirmación se puede realizar mediante tinción o utilizando un perfil bioquímico.

Para establecer un nivel aceptable de contaminantes, se deben determinar niveles de referencia durante el proceso de fermentación, formulación y empaque del producto. A partir de esta carta control se generan los límites de aceptación para el producto final. Por esta razón y con base en los requisitos específicos para el registro comer-

cial, el productor es quien establece el límite y la pureza del producto. Sin embargo, en el ámbito internacional se reconoce un nivel máximo de 0,1 % de contaminantes en comparación con la concentración del principio activo (Ravensberg, 2011).

Perspectivas

El aspecto central para lograr un buen control de calidad de un bioinsumo se centra en el establecimiento y estricto cumplimiento de los procedimientos o protocolos de control de calidad. Para el caso de las características microbiológicas, el elemento central consiste en que, una vez elegidos y establecidos los protocolos, estos se deben seguir de manera estricta sin importar las presiones externas ni internas en el desarrollo del producto. Si no se hace un estricto cumplimiento de estas metodologías, el sistema de control de calidad dejará de funcionar y los resultados no podrán garantizarse.

A pesar del uso y la proyección en el mercado que tienen los productos biológicos a base de agentes de control biológico, existe una gran variedad de protocolos para determinar las características microbiológicas. Por lo tanto, se requiere de un trabajo en conjunto entre los productores de bioinsumos, los investigadores y los entes reguladores en el establecimiento de requerimientos mínimos para los productos. Asimismo, es imperativa la generación de lineamientos y metodologías estandarizadas que sean aplicables en condiciones ambientales similares, de manera que sean repetibles y reproducibles. Otro de los desafíos está relacionado con que las metodologías implementadas sean prácticas, precisas, económicas y estén siempre basadas en desarrollos metodológicos que cumplan con los requerimientos científicos.

Referencias

- Alves, S. B, Pereira, R. M., & Stimac, J. L. (1996). Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. *Biocontrol Science and Technology*, 6(1), 575-582. <https://doi.org/10.1080/09583159631217>
- Alves, S. B, Rossi, L. S, Lopes, R. B., Tamai, M. A, & Pereira, R. M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81(2), 70-77. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00147-7)

- Barrera, G. P., Murcia, J., Cerón, J. L., Cuartas, P. E., Guzmán, C. A., & Villamizar, L. F. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 24-31. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61514>
- Bioscience. (2018). *Identifying and resolving the sources of hemacytometer counting error through automation*. Bioscience.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Burges, H. D. (1998). *Formulation of microbial biopesticides*. Kluwer Academic Publishers.
- Caballero, P., Williams, T., & López-Ferber, M. (2001). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma.
- Caligiore-Gei, P. F., & Valdez, J. G. (2015). Ajuste de un método rápido para la cuantificación de suspensiones de esporas de *Fusarium* spp. en fitopatología. *Revista Argentina de Microbiología*, 47, 152-154. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.002>
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y., Pazos-Rojas, L., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147-156.
- Cotes, A. M., Fargetton, X. & Köhl, J. (2018). Diseño conceptual, selección y prueba de concepto de microorganismos biocontroladores. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 594-628). AGROSAVIA.
- Díaz, A., Gómez, M., Grijalba, E., Santos, A., Cruz, F., León, D., Alarcón, E., & Cotes, A. (2018). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 628-692). AGROSAVIA.
- Eberle, K. E., Wennmann, J. T., Kleespies, R. G., & Jehle J. A. (2012). Basic techniques in insect virology. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 15-74). Elsevier.

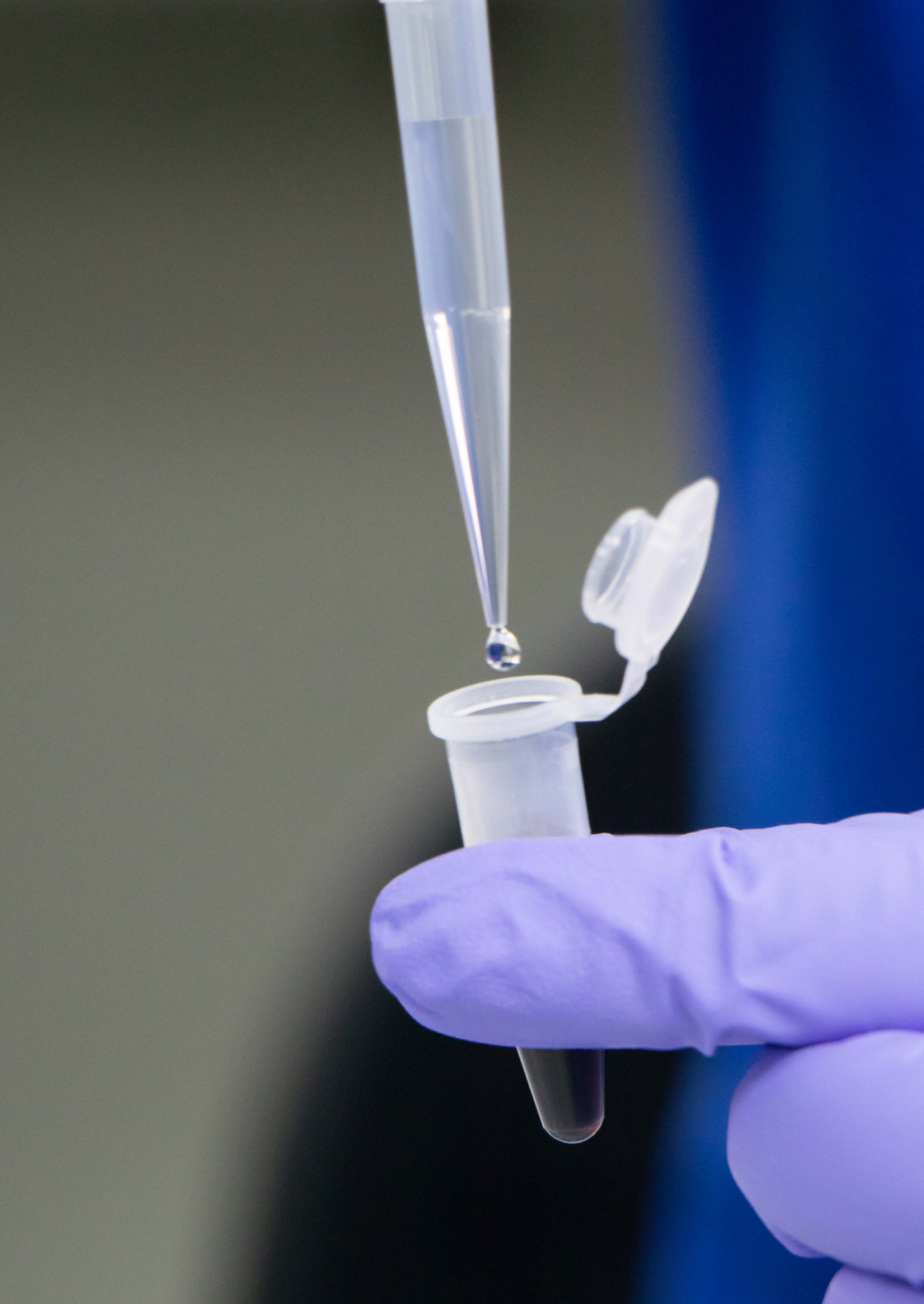
- Faria, M., Hotchkiss, J. H., Hajek, A. E., & Wraight S. P. (2010). Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(1), 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.011>
- Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., & Wraight, S. P. (2015). Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 125(1), 68-72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>
- Feng, K. C., Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2002). Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 18(1), 217-224. <https://doi.org/10.1023/A:1014933229314>
- Fernandes, E. K., Rangel, D. E. N., Moraes, A. M. L., Bittencourt, V., & Roberts, D. W. (2007). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(1), 237-243.
- Glare, T., & Moran, M. (2016). *Microbial-based Biopesticides: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Gorsuch, J. P. & Woodruff, P. (2019). Nutrient germination improves DNA recovery from industrial *Bacillus subtilis* endospores during qPCR enumeration assays. *Heliyon*, 5(12), e02917. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02917>
- Graham, R. I., Tummala, Y., Rhodes, G., Cory, J. S., Shirras, A., Grzywacz, D., & Wilson, K. (2015). Development of a real-time qPCR assay for quantification of covert baculovirus infections in a major african crop pest. *Insects*, 6(3), 746-759. <https://doi.org/10.3390/insects6030746>
- Grijalba, E. P., Espinel, C., Cuartas, P. E., Chaparro, M. L., & Villamizar, L. F. (2018). *Metarhizium rileyi* biopesticide to control *Spodoptera frugiperda*: Stability and insecticidal activity under glasshouse conditions. *Fungal Biology*, 122(11), 1069-1076. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.08.010>
- Hernández, D., & Acebo, A. (2013). Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista Cenic Ciencias Biológicas*, 44(1), 1-18.
- Hjeljord, L. (2000). Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biological Control*, 19(2), 149-160. <https://doi.org/10.1006/bcon.2000.0859>

- Horaczek, A., & Viernstein, H. (2004). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control* 31(1), 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.04.016>
- Ibrahim, L., Laham, L., Touma, A., & Ibrahim, S. (2015). Mass production, yield, quality, formulation and efficacy of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* conidia. *British Journal of Applied Science & Technology*, 9(5), 427-440. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4339.2484>
- Inglis, G., Enkerli, J., & Goettel, M. S. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi. Hypocreales. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 189-253). Elsevier.
- Jackson, A., Whipps, J. M., Lynch, J. M., & Bazin, M. (1991). Effects of some carbon and nitrogen sources on spore germination, production of biomass and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* antagonistic to *Sclerotium cepivorum*. *Biocontrol Science and Technology*, 1(1), 43-51. <https://doi.org/10.1080/09583159109355184>
- Jenkins, N., & Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents assurance of products performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 753-777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- Jenkins, N., & Grzywacz, D. (2003). Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures. En J. C. van Lenteren (Ed.), *Quality control and production of biological control agents: Theory and Testing Procedures*. CABI Publishing.
- Kim, J. C., Lee, M. R., Kim, S., Lee, S. J., Park, S. E., Baek, S., Gasmi, L., Shin, T. Y., & Kim, J. S. (2019). Long-term storage stability of *Beauveria bassiana* ERL836 granules as fungal biopesticide. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(2), 537-542. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.04.001>
- Kobori, N. N., Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Schisler, D. A., & Money, N. (2014). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 119(4), 179-190. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>
- Lacey, A. L. (2017). *Microbial control of insect and mite pests*. Elsevier.

- Lazzarini, G., Rocha, L., & Luz, C. (2006). Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycological Research*, 110(4), 485-492. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.12.001>
- Lopes, R. B., Martins, I., Souza, D. A., & Faria, M. (2013). Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *Journal of Invertebrate Pathology* 112(3), 236-242. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.010>
- Magoye, E., Pfister, M., Hilber-Bodmer, M., & Freimoser, F. M. (2020). Competition assays to quantify the effect of biocontrol yeasts against plant pathogenic fungi on Fruits. *Bio-Protocol*, 10(3), e3518. <https://doi.org/10.21769/BioProtocol.3518>
- Meikle, W. G., Mercadier, G., Guermache, F., & Bon, M. C. (2012). *Pseudomonas* contamination of a fungus-based biopesticide: Implications for honey bee (Hymenoptera: Apidae) health and *Varroa mite* (Acari: Varroidae) control. *Biol Control*, 60(3), 312-320. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.004>
- Miele, S. A., Belaich, M. N., Garavaglia, M. J., & Ghiringhelli, P. (2011). Quality control of baculoviral bioinsecticide production. En I. Akyar (Ed), *Wide spectra of quality control* (pp. 411-428). IntechOpen.
- Milner, R. J., Huppatz, R. J., Swaris, S. C. (1991). A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(1), 121-123.
- Miranda-Hernández, F., Angel-Cuapio, A., & Loera-Corral, O. (2016). Production of fungal spores for biological control. En A. Pandey, S. Negi & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (pp. 757-779). Elsevier.
- Morales-García, Y. E., Hernández-Canseco, J., Ramos-Castillo, G., Pérez-Terrón, R., & Muñoz-Rojas, J. (2016). Cuantificación de *Penicillium* sp. Por el método de goteo en placa. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(1), 12-19.
- Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E., Baez-Rogelio, A., Quintero-Hernández, V., Rivera-Urbalejo, A. P. & Pérez-Terrón, R. (2016). Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. En G. Chavira (Ed.), *Instituciones de educación superior la labor investigadora e innovadora en México* (pp. 67-84). Science Associated Editors.

- Oliveira, D., Pauli, G., Mascarín, G. M., & Delalibera, I. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *Journal of Microbiological Methods*, 119(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.021>
- Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2012). Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology*, 40(2), 111-116. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.2.111>
- Rangel, D., Braga, G., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2005). Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(1), 55-58. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.05.005>
- Ravensberg, W. (2011). Quality control. En J. Grould, K. Hoelmer, & J. Goolshy (Eds.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods* (pp. 129-197). Springer.
- Rivas, F., Núñez, P., Jackson, T., & Altier, N. (2014). Effect of temperature and water activity on mycelia radial growth, conidial production and germination of *Lecanicillium* spp. isolates and their virulence against *Trialeurodes vaporariorum* on tomato plants. *BioControl*, 59(1), 99-109. <https://doi.org/10.1007/s10526-013-9542-y>
- Sanogo, S., Pomella, A., Hebbar, P. K., Bailey, B., Costa, J. C. B., Samuels, G. J., & Lumsden, R. D. (2002). Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis perniciosus* on cacao. *Phytopathology*, 92(10), 1032-1037. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.10.1032>
- Santos, A., Brandão, P., & Villamizar, L. (2017). Efecto de estrés térmico y de irradiación con luz ultravioleta (UV-B) sobre características de *Nomuraea rileyi* Nm006. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 81-91. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.55943>
- Santos, A., García, M., Cotes, A. M., Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3), 150-156.

- Santos, A., Grijalba, E., Zuluaga, M., Gómez, M., & Villamizar, L. (2013). Compatibilidad in vitro de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae) con agroquímicos empleados en los cultivos de algodón y berenjena. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 132-142. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.38025>
- Schütz, G., Haltrich, D., & Atanasova, L. (2020). Influence of spore morphology on spectrophotometric quantification of *Trichoderma* inocula. *Biotechnique*, 68(5), 2-5. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0152>
- Sephton-Clark, P. C. S., & Voelz, K. (2018). Spore germination of pathogenic filamentous fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 112(1), 117-157. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.10.002>
- Sharga, B. M., & Feketa, V. (2018). *The estimation of the number of cells in suspension or culture using hemocytometer*.
- Shi, Z., Li, M., & Zhang, L. (2006). Effects of nutrients on germination of *Verticillium lecanii* (=Lecanicillium sp.) conidia and infection of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *Biocontrol Science Technology*, 16(1), 599-606. <https://doi.org/10.1080/09583150500532832>
- Sieuwerts, S., De Bok, F. A. M., Mols, E., De Vos, W. M., & Van Hylckama Vlieg, J. (2008). A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), 275-278. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x>
- Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M. S., Little, S., & Mozaffari, J. (2007). Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(2), 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.09.009>
- Tyagi, S. , & Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14, 303-308. <https://doi.org/10.1038/nbt0396-303>
- Zaki, O., Weekers, F., Thonart, P., Tesch, E., Kuenemann, P., Jacques, P. (2020). *Limiting factors of mycopesticide development*. *Biological Control*, 144(1), 104220. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104220>



Capítulo II

Control de calidad fisicoquímico de bioplaguicidas microbianos

Erika Paola Grijalba Bernal

Un bioplaguicida microbiano tiene dos componentes: un ingrediente activo que corresponde al microorganismo que ejerce la acción biológica y los excipientes o sustancias inertes que, además de servir de vehículo para el activo, tienen una función de protección, ya sea durante el almacenamiento o cuando el producto es aplicado en campo. Adicionalmente, ayudan a formar un sistema de entrega que permite una fácil aplicación.

Con el fin de garantizar que el bioplaguicida elaborado cumpla con el objetivo para el cual fue desarrollado y mantenga su viabilidad, actividad biológica y características fisicoquímicas, es importante llevar a cabo el control de las variables que pueden ser un indicativo de su calidad microbiológica, biológica y fisicoquímica mediante el establecimiento de los límites bajo los que se deben conservar. Generalmente, se le da mayor importancia al control de calidad microbiológico y biológico, ya que proporciona información respecto del estado del microorganismo, lo cual incide directamente en la eficacia del producto. De acuerdo con esto, suele prestársele menos atención al control de calidad fisicoquímico a pesar de que este

también tiene un efecto indirecto sobre la eficacia del producto y puede aportar un valor agregado o diferencial a un mismo tipo de bioplaguicida. Por ejemplo, pueden existir dos granulados con el mismo ingrediente activo o microorganismo, pero uno de ellos puede ser más eficaz por presentar una completa y más rápida desintegración del gránulo, lo cual posibilita la liberación total del ingrediente activo y garantiza su aplicación en la dosis establecida.

En este sentido, el objetivo de este capítulo es identificar las variables fisicoquímicas más importantes de acuerdo con el sistema de entrega o tipo de formulación del bioplaguicida y las metodologías existentes que suelen emplearse para su determinación.

Bioplaguicidas microbianos sólidos

Los sistemas de entrega sólidos que suelen emplearse para la formulación de agentes de control biológico son los polvos y granulados. En la tabla 2.1 se presentan sus características y lo que se espera de acuerdo con el tipo de formulación en el momento de su aplicación.



Foto: Erika Grijalva B.

Figura 2.1. Granulado dispersable a base de *Rhodotorula mucilaginosa* (Basidiomycota: Sporidiobolales).

Tabla 2.1. Sistemas de entrega de bioplaguicidas microbianos sólidos

Bioplaguicidas sólidos	Descripción	Características en la aplicación
Polvos mojables (WP)	Mezcla del microorganismo con un polvo que se humecta y suspende en agua en el momento de su aplicación.	Tiempo corto de humectabilidad, formación de una suspensión homogénea en la que no se formen aglomerados, poca formación de sedimento.
Polvos de aplicación directa (DP)	Corresponden a la mezcla de un microorganismo con un polvo mineral fino, de un tamaño que varía de 50 a 100 micras, que se aplican directamente sobre el blanco.	Facilidad de aplicación por tener buena fluidez y no presentar formación de aglomerados.
Polvos para tratamiento de semilla (DS)	Mezcla de un ingrediente activo y un polvo empleado como vehículo (diluyente) para facilitar el recubrimiento de la semilla.	Buena adherencia cuando se logra una cobertura total de la semilla.
Granulados dispersables (WG)	Formulaciones sólidas con un rango de tamaño de 100 a 1.000 micras, de flujo libre, diseñadas para ser suspendidas en agua y liberar el microorganismo de forma homogénea en el momento en el que el gránulo se desintegra.	Buena humectabilidad y tiempo corto para lograr una completa desintegración.
Cápsulas	Sistemas de liberación controlada o sostenida en los que el ingrediente activo se encuentra en el interior de una partícula, generalmente un polímero, que puede o no estar hidratado.	Mayor estabilidad del ingrediente activo al protegerlo de factores bióticos y abióticos del medio brindándole un microambiente benéfico. Este factor puede aumentar su vida útil y mantener la actividad metabólica por periodos prolongados de tiempo, no solo durante el almacenamiento, sino después de su aplicación, lo cual resulta en la reducción del número de aplicaciones o de la dosis del producto.

Fuente: elaboración propia con base en Faria & Wraight (2007); Gansic & Brankica (2013); Vemmer & Patel (2013)

Teniendo en cuenta los principales sistemas de entrega sólidos, a continuación se describen las pruebas fisicoquímicas más relevantes para cada tipo de formulación (tabla 2.2) y algunas de las metodologías empleadas para su evaluación (tabla 2.3).

Tabla 2.2. Variables fisicoquímicas para evaluar en bioplaguicidas microbianos sólidos

Tipo de Formulación	Variable para evaluar					
	pH	Humectabilidad	Suspendibilidad	Desintegración	Tamaño de partícula	Humedad
Polvos mojables	X	X	X		X	X
Polvos de aplicación directa	X				X	X
Polvos para tratamiento de semillas	X				X	X
Granulados	X	X		X	X	X
Cápsulas ¹	X				X	X

¹Otras variables fisicoquímicas importantes a evaluar en este tipo de formulaciones son la solubilidad, la hidrofobicidad, la higroscopicidad, el potencial zeta, la superficie y la morfología (Zhang et al., 2020; Sung-II et al., 2019; Gray et al., 2016; Chan et al., 2011).

Fuente: Elaboración propia

Humectabilidad: de acuerdo con Freudig et al. (1999), esta característica se describe como la “facilidad que tiene un polvo de empaparse por un líquido por efecto de las fuerzas capilares que controlan la velocidad de este” (p. 525). La velocidad con la que un material sólido se humecta depende del tamaño de las partículas y del tamaño de sus poros, de la cantidad de poros que tiene y del valor del ángulo de contacto formado entre el agua y el material (Schubert, 1978; Freudig et al., 1999). Esta característica se puede medir expresándola como el tiempo en que el material tarda en humectarse o como el ángulo de contacto entre el agua y el material evaluado. El primer caso se conoce como humectabilidad estática o test de Freudig modificado (Freudig et al., 1999; Kim et al., 2000) y consiste en la determinación del tiempo requerido para que se sumerja hasta la última partícula de polvo de la superficie. Para dicho fin, una cantidad conocida del material a evaluar se coloca sobre un volumen de agua. En el segundo caso, como lo describe Yang et al. (2003), “una gota de líquido con gran tensión superficial descansando sobre una superficie sólida con baja tensión superficial, origina una gota de forma esférica, es decir, un ángulo

de contacto elevado y viceversa” (p. 199). De acuerdo con esto, para que el sólido se humecte se necesita que la tensión superficial del sólido sea mayor a la del líquido o que la tensión superficial del líquido sea menor a la del sólido (Gil et al., 2008). Cuanto menor sea el ángulo de contacto, mayor será la humectabilidad del material. Para el caso de los polvos y granulados, esta característica generalmente se expresa como el tiempo que una cantidad conocida del material a evaluar en un volumen de agua preestablecido tarda en humedecerse completamente.

Suspendibilidad: esta característica hace referencia a la formación de una suspensión homogénea cuando el producto es reconstituido en agua. Se pueden evaluar dos tipos de suspendibilidad de una formulación. El primero corresponde a la suspendibilidad del ingrediente activo (conidios, esporas, células, cuerpos de inclusión), es decir, la cantidad de ingrediente activo suspendido después de un tiempo dado en una columna de líquido de altura conocida. Esta es expresada como el porcentaje de la cantidad de ingrediente activo en la suspensión original, por lo cual este método es adecuado para suspensiones que contienen hasta 1 % de ingrediente activo pero no para suspensiones con una concentración mayor de ingrediente activo (Collaborative International Pesticides Analytical Council [Cipac], 1995). El segundo corresponde a la suspendibilidad del producto total, es decir, la suspendibilidad del producto (ingrediente activo y sólidos en suspensión) suspendido después de un tiempo dado en una columna de líquido de altura conocida. Esta es expresada como un porcentaje del peso con respecto al peso en la suspensión original (Lisansky et al., 1993).

Desintegración: es un proceso en el cual una forma sólida, generalmente granulado o tableta, se rompe en partículas más pequeñas y finalmente en sus componentes, con lo cual libera el ingrediente activo y asegura su biodisponibilidad (Markl & Zeitler, 2017). Esta característica tiene un efecto directo en la eficacia del producto. Uno de los mecanismos de desintegración más conocidos involucra varias etapas, la primera corresponde a la penetración del líquido en el material poroso compacto (Nogami et al., 1967), la segunda al hinchamiento, en el cual se agrandan las partículas que acumulan presión y se separan en partículas adyacentes (List & Muazam, 1979) y, la tercera, a la fuerza del líquido en el que se encuentra disperso el granulado, fuerza que es pequeña, pero que con la presencia de un agente desintegrante se vuelve tan apreciable como para romper las partículas compactas (Peppas & Colombo, 1989). La evaluación de esta característica para granulados y tabletas consiste en la medición del tiempo de desintegración, es decir, el tiempo que una cantidad conocida del material a evaluar tarda en romperse completamente y formar una suspensión homogénea cuando se agita en un volumen determinado de agua.

Tamaño de partícula: en el caso de los polvos es una característica esencial, ya que el porcentaje de finos (con un tamaño inferior a 5 μm) puede causar problemas en la salud de quienes aplican este tipo de productos. Las partículas con un rango de tamaño de 1 a 5 μm se depositan en las regiones alveolares y bronquiales por sedimentación (Crowder et al., 2002). Además, esta característica puede afectar otras propiedades de los materiales sólidos como la fluidez (Kudo et al., 2020). La determinación del tamaño de las partículas generalmente se expresa como distribución del tamaño de partícula y puede realizarse por granulometría, por medio de una batería de tamices con diferente tamaño de malla, donde el material es retenido de acuerdo con su tamaño y, posteriormente, pesado para calcular el porcentaje que queda en cada tamiz (lo anterior también puede hacerse por observación directa con ayuda de un microscopio y un micrómetro). Otros métodos incluyen el uso de analizadores de difracción de rayos láser.

pH: desde el punto de vista operacional, el pH es la medida de la acidez o alcalinidad de un medio acuoso (Skoog et al., 1997) y es definido como el logaritmo negativo de la actividad de los iones hidronio (Carstensen, 1998) (generalmente se toma como concentración, ya que en soluciones diluidas son casi iguales). Juega un papel fundamental en la regulación de diferentes procesos fisiológicos de los microorganismos, por lo que su control en un bioplaguicida es crítico para asegurar la viabilidad y actividad biológica del ingrediente activo.

Humedad: es una característica muy importante en los bioplaguicidas sólidos pues incide en la viabilidad del microorganismo durante el almacenamiento. Productos con humedades superiores al 10 % mantienen más activo su metabolismo (Zarate et al., 2010), lo que puede reducir su estabilidad microbiológica, además de representar un riesgo en el aumento de contaminantes. Por otra parte, en términos de la formulación, la humedad influye en características como la fluidez y la compactación. A mayor humedad menor fluidez y mayor formación de aglomerados en los granulados (Cueva, 2018). La humedad es determinada tomando como base la pérdida de peso de una muestra cuando el contenido de agua presente se evapora por el calor al que se somete, el resultado obtenido se expresa como porcentaje de humedad.

Tabla 2.3. Metodologías y descripción de las variables evaluadas en bioplaguicidas microbianos sólidos

Variable	Metodología	Descripción
Humectabilidad	NTC 439. Plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos. Ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación	En un vaso de precipitado de 250 ml con un diámetro interno de $6,5 \pm 0,5$ cm y una altura de $9 \pm 0,5$ cm se adicionan 100 ml de agua a 30 ± 1 °C. Sobre el agua se dejan caer en un mismo punto 5 g del producto a evaluar, no compactado, y se determina el tiempo que tarda en humectarse completamente el material. No se debe tener en cuenta una película fina de partículas que pueden permanecer sobre la superficie. Un producto se considera aceptable si el tiempo que tarda en humedecerse es igual o inferior a 1 minuto.
	Cipac, MT 53	Un peso conocido de un material se deja caer desde una altura preestablecida, en la superficie del agua que se encuentra en un vaso de precipitado y se determina el tiempo que tarda en humedecerse completamente.
Suspendibilidad	NTC 439. Plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos. Ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación	Consiste en preparar una suspensión del producto y al cabo de cierto tiempo determinar la cantidad del principio activo que queda en suspensión. Tomar una cantidad suficiente de muestra para preparar 250 ml de suspensión en agua de acuerdo con la concentración recomendada en las instrucciones del producto. La suspendibilidad activa promedio no debe ser inferior al 60 % ni superior al 105 %.
	Cipac, MT 15 para polvos mojables, MT 168 para gránulos dispersables y MT 177 para polvos dispersables	Una suspensión de concentración conocida es preparada en agua destilada, se adiciona a una probeta o cilindro a temperatura constante y se deja en reposo durante un tiempo preestablecido. Se toma de la parte inferior 1/10 de la suspensión. Se requiere que al menos el 60 % del ingrediente activo permanezca en suspensión.
	AGROSAVIA (2019)	Se reconstituye 1 g del producto en 1 l de agua destilada y se distribuye en 4 probetas (250 ml en cada una) que representan un tiempo de lectura de 0, 1, 2 y 3 horas. En cada tiempo de evaluación se toma una muestra de 1 ml de la superficie, el medio y el fondo de la probeta y se determina la concentración del ingrediente activo mediante recuento en cámara de Neubauer.

(Continúa)

(Continuación tabla 2.3)

Variable	Metodología	Descripción
Suspendibilidad	Lisansky et al. (1993). Este método no evalúa solamente el ingrediente activo sino la homogeneidad del producto total. Es utilizado por Aroonrat et al. (2003), Xiangkun et al. (2015) y Hong-Ku et al. (2018) para determinar la suspendibilidad de bioplaguicidas correspondientes a polvos	Una muestra de 3 g se adiciona a 97 ml de agua destilada en una probeta de 100 ml, la cual se invierte 30 veces y se toma una muestra de 5 ml a partir de la marca de graduación de 10 ml. Este volumen se seca a 105 °C hasta peso constante y se calcula el porcentaje al cual corresponde dicho peso. Este tratamiento se toma como control y corresponde al producto completamente suspendido. Por otra parte, el tratamiento a evaluar se suspende de la misma manera, pero se deja en reposo durante 1 hora, pasado este tiempo se toma la muestra y se seca. La suspendibilidad se informa como porcentaje del peso del tratamiento con respecto al tratamiento control.
Desintegración	AGROSAVIA (2019)	Un vaso de precipitado de 250 ml con 100 ml de agua destilada y una barra magnética de 3 cm por 0,5 cm de diámetro se colocan en agitación a 500 rpm. Se adicionan 5 g del producto a evaluar y se toma el tiempo que tarda en desintegrarse completamente desde el momento en que se humecta.
	Método descrito en la Farmacopea USP. Aplica para tabletas	Mediante un equipo especial para la prueba de desintegración USP, a una temperatura de 37 °C y utilizando agua como medio de desintegración, se determina el tiempo necesario para que todas las partículas pasen a través de una malla (Takasaki et al., 2019).
	Hong-Ku et al. (2018)	Una muestra de 0,5 g con un tamaño de partícula en el rango de 250 µm a 1.414 µm, se adiciona a un cilindro de medición de 100 ml con 90 ml de agua destilada a 25 °C y se sella con un tapón. Se agita a 8 rpm hasta su completa desintegración. Es considerado aceptable un tiempo inferior a 3 minutos.

(Continúa)

(Continuación tabla 2.3)

Variable	Metodología	Descripción
Tamaño de partícula	NTC 326. Abonos o fertilizantes. Método de ensayo de granulometría en seco	Se elige una serie de tamices sobre los que se adicionan 200 g del producto a evaluar. Se deja en vibración durante 5 minutos, tiempo después del cual se pesa el material retenido en cada tamiz.
Tamaño de partícula	Cipac MT 187	Análisis por difracción láser. Una muestra representativa del material a evaluar se dispersa en un líquido o gas y se pasa a través de un haz de luz emitido por una fuente monocromática (láser). La luz dispersada por las partículas en varios ángulos es medida por un detector. Los valores obtenidos son transformados usando un modelo óptico y matemático apropiado que permite obtener el volumen total para un discreto número de rangos de tamaños de partícula, de manera que se forma una distribución de tamaño de partícula volumétrica.
	Cipac MT 170	Consiste en la separación cuantitativa de un polvo o granulado en fracciones con diferentes rangos de tamaño de partícula mediante el uso de tamices. Quizás este es el método más conocido y empleado gracias a su bajo costo y facilidad de aplicación (Harris, 2018).
	AGROSAVIA (2019)	Se utiliza una columna de tamices cuya malla sea de 1.000, 500, 200, 100 y 45 micras; los tamices se organizan en orden descendente. Posteriormente, se disponen 50 g de la muestra sobre el tamiz superior y se inicia un proceso de vibración con una amplitud de movimiento de 2 durante 10 minutos, tiempo después del cual se pesa el material retenido en cada tamiz.
pH	Farmacopea	Para establecer el pH de una solución se utiliza un medidor o potenciómetro previamente calibrado.
	Cipac MT 175	El valor de pH de un líquido o dispersión es determinado por medio de un potenciómetro y un electrodo que es introducido en el tratamiento a valorar, generalmente a una concentración del 1 %.

(Continúa)

(Continuación tabla 2.3)

Variable	Metodología	Descripción
pH	AGROSAVIA (2019)	Se reconstituye 1 g de la muestra en 50 ml de agua destilada y se determina el pH mediante un potenciómetro calibrado. La muestra debe estar a una temperatura de 20 °C ± 2 °C.
Humedad	Takasaki et al. (2019)	En un analizador de humedad se colocan aproximadamente 5 g del producto a 105 °C por 10 minutos o hasta que no haya cambio en el peso de la muestra durante 5 minutos.
	Cipac MT 17	La pérdida de peso de una muestra que es calentada a una temperatura específica por un tiempo preestablecido es determinada. Puede ser realizada en una estufa o en un analizador de humedad.
	AGROSAVIA (2019)	Se toman 0,2 g de muestra y se disponen en una balanza halógena de humedad para su secado hasta obtener un peso constante.

Fuente: Elaboración propia

Bioplaguicidas microbianos líquidos



Foto: Erika Grijalba B.

Figura 2.2. Bioplaguicidas microbianos líquidos. a. Concentrado emulsionable a base de *Metarhizium rileyi*; b. Emulsión de *M. rileyi* formada a partir de la reconstitución del concentrado emulsionable en agua.

Los sistemas de entrega líquidos empleados comúnmente para la formulación de microorganismos corresponden a suspensiones, concentrados emulsionables y, en menor medida, emulsiones. En la tabla 2.4 se presentan sus características y lo que se espera de acuerdo con el tipo de formulación en el momento su aplicación.

Tabla 2.4. Sistemas de entrega de bioplaguicidas microbianos líquidos

Bioplaguicidas líquidos	Descripción	Características en la aplicación
Suspensiones líquidas (SL)	Partículas de pequeño tamaño que se encuentran en un sistema líquido, generalmente de tipo acuoso.	Suspensión homogénea, fácilmente redispersable con agitación manual.
Emulsiones	Sistemas dispersos formados por dos líquidos inmiscibles.	Sistema homogéneo, no hay formación de flóculos.
Concentrado emulsionable (CE)	Suspensiones oleosas que al ser mezcladas con el agua producen emulsiones de aceite en agua de forma espontánea o con agitación suave.	Suspensión homogénea o que se redispersa fácilmente con agitación manual.
Suspoemulsiones (SE)	Sistema de tres fases: partículas sólidas dispersas, gotas de aceite y la fase continua, usualmente agua. Se considera una mezcla de suspensión concentrada y emulsión aceite en agua.	En el momento de aplicar debe ser un sistema homogéneo.

Fuente: Gansic & Brankica (2013); Knowles (2008)

Teniendo en cuenta los principales sistemas de entrega líquidos, a continuación se describen las pruebas fisicoquímicas más relevantes para cada tipo de formulación (tabla 2.5) y algunas de las metodologías empleadas para su evaluación (tabla 2.6).

pH: esta variable fue mencionada anteriormente en la descripción de variables fisicoquímicas de los bioplaguicidas sólidos y lo descrito en esa sección aplica también para los bioplaguicidas líquidos.

Viscosidad: se define como la resistencia a fluir que presenta un líquido y está relacionada con la facilidad de moverse de las moléculas individuales con respecto a las otras moléculas. Esto depende de la fuerza de atracción entre las mismas (Brown et al., 1997). La viscosidad es un atributo de calidad crítico que influye en la estabilidad física y la facilidad de aplicación y de liberación del ingrediente activo (Vo et al., 2020). Su evaluación se puede hacer básicamente bajo tres principios: primero, el tiempo que una cantidad de líquido tarda en fluir a través de un tubo delgado bajo

la fuerza gravitacional (a mayor viscosidad mayor tiempo). Segundo, determinando la velocidad con la cual unas esferas caen a través del líquido, ya que estas caerán más lentamente cuando se incrementa la viscosidad (Brown et al., 1997). Tercero, midiendo la tracción viscosa ejercida sobre un disco que rota en el líquido contenido en un vaso de precipitación. El disco es impulsado por un motor sincrónico por medio de un resorte de torsión. El grado en el cual es enrollado el resorte a una determinada velocidad (en rpm) es indicado por un señalador sobre un dial calibrado en unidades de fuerza de rotación. Al multiplicar la lectura del dial por la constante apropiada para el disco y la velocidad se obtiene la viscosidad aparente del líquido en centipoises para esa velocidad (Brookfield Engineering Labs, 2000).

Tabla 2.5. Variables fisicoquímicas para evaluar en bioplaguicidas microbianos líquidos

Tipo de Formulación	Variable para evaluar				
	pH	Viscosidad	Densidad	Sedimentación	Tamaño de diámetro de gota
Suspensión líquida	X	X	X	X	
Emulsiones	X	X			X
Concentrado emulsionable	X	X			X
Suspoemulsión	X		X		X

Fuente: Elaboración propia

Densidad: es definida como la cantidad de masa contenida en una unidad de volumen de una sustancia. Generalmente se expresa en unidades de g/cm³ (Brown et al., 1997). Esta variable permite garantizar que la suspensión o emulsión posea las mismas características en cada lote de producción.

Sedimentación: esta característica es importante en productos líquidos, tales como suspensiones y concentrados, ya que garantiza que no se forme una torta en el fondo del recipiente que contiene el producto. Si no se puede reconstituir con agitación manual, esta torta o apelmazamiento de los sólidos que forman parte de la formulación (excipientes o ingrediente activo), afecta completamente la calidad del producto ya que indica que la concentración y las características fisicoquímicas no son las mismas a las establecidas cuando se diseñó la formulación. La velocidad de sedimentación de una partícula depende de la viscosidad del fluido, el radio de la partícula, la velocidad de la caída y la fuerza de resistencia a esta, factores que se resumen en la ley de Stokes (Salager, 1999).

Tamaño de diámetro de gota: esta característica es útil de evaluar en las emulsiones, ya sea porque el bioplaguicida sea formulado de esta manera o porque se forme la emulsión al reconstituir el bioplaguicida en agua, como es el caso de los concentrados emulsionables. El tamaño promedio de gota puede calcularse de diferentes formas dependiendo de que se quiera establecer la relación con la superficie o el volumen. La distribución del diámetro de las gotas que forman la fase interna de la emulsión se determina con el fin de caracterizar la emulsión como macro o microemulsión. Además, es una variable importante para evaluar en las pruebas de estabilidad en almacenamiento (Particle Sciences, 2011). Para determinar esta variable, la observación directa o la fotografía con microscopía óptica son los métodos más simples; aunque son extremadamente tediosos y el límite inferior de la microscopía óptica es de 1 μm (Salager, 1999), sin embargo otros autores reportan como ideal un mínimo de 3 μm (Shekunov et al., 2007). Para partículas con un rango de tamaño entre 0,5 a 1000 μm la difracción láser es una buena opción que relaciona el diámetro promedio con el volumen de la gota; su tiempo de análisis es corto, los resultados obtenidos son robustos, precisos y reproducibles (Shekunov et al., 2007).

Tabla 2.6. Metodologías y descripción de las variables evaluadas en bioplaguicidas microbianos líquidos

Variable	Metodología	Descripción
Viscosidad	Bali et al. (2010) Shakeel et al. (2014)	La viscosidad se determina utilizando un viscosímetro o reómetro u otro equipo.
Sedimentación	Bostijn et al. (2018)	En una probeta graduada de 10 ml se coloca el producto a evaluar durante un periodo de 30 días. El volumen de sedimentación se calcula como el radio entre el volumen del sedimento y el volumen total de la suspensión. Un valor de 1 indica que no hay formación de sedimento.
	Deveswaran (2010)	Se toman 10 ml de muestra y se colocan en un recipiente cilíndrico, se mide la altura de los 10 ml del producto y la altura del sedimento formado después del tiempo de reposo. El índice de sedimentación es el radio entre la altura del sedimento formado sobre la altura inicial del producto total.

(Continúa)

(Continuación tabla 2.6)

Variable	Metodología	Descripción
Densidad	Cipac, MT 3.2 Método del picnómetro	Este método se utiliza para productos cuyo peso es similar al volumen, o cuando se compara el producto con el agua. Para esto, en un picnómetro limpio y seco se coloca la muestra a evaluar llenándolo completamente. El picnómetro se tapa y se deja subir el líquido por el capilar y se pesa. Previamente debe haberse pesado el picnómetro vacío. Para calcular la densidad se utiliza la siguiente fórmula: $\rho = (Pm - Ps) \div V$ Donde <i>Pm</i> es el peso del picnómetro con la muestra, <i>Ps</i> es el peso del picnómetro vacío y <i>V</i> es el volumen del picnómetro.
	AGROSAVIA (2019)	Se determina la densidad mediante un picnómetro y se toma como base la metodología Cipac.
Tamaño de diámetro de gota	Macedo et al. (2006)	Para determinar esta característica se sigue el método de Ferret's mediante un microscopio óptico equipado con un micrómetro calibrado.
	Zhang et al. (2019); Vo et al. (2020)	Este método evalúa la distribución de tamaño de partículas de una muestra, a partir de la dispersión dinámica de la luz, mediante difracción láser

Fuente: Gansic & Brankica (2013); Knowles (2008)

La caracterización fisicoquímica que se presenta en los siguientes casos de estudio corresponde a resultados de investigación propios del autor y fue tomada del informe técnico final del proyecto “Prototipos de formulación optimizados para el control de *Cerotoma tingomariana*” llevado a cabo por AGROSAVIA. Para cada caso, la caracterización fisicoquímica se llevó a cabo con 3 lotes de producto y 3 réplicas por tratamiento.

Caso de estudio I: granulado dispersable

Se tiene un granulado dispersable a base de los conidios del hongo *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) aislamiento Bv060. Se analizarán diferentes variables fisicoquímicas (tabla 2.7).

Tabla 2.7. Caracterización fisicoquímica de un granulado a base de *B. bassiana* Bv060

Variable	Metodología	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Desviación estándar (<i>sd</i>)
pH	Cipac MT 175	8,04	8,15	7,93	0,11
Humedad	Cipac MT 17	3,37	2,80	3,06	0,28
Humectabilidad (minutos)	Cipac MT 53	2,20	2,17	2,15	0,025
Desintegración (minutos)	AGROSAVIA (2014)	1,42	1,38	1,35	0,035

Fuente: Elaboración propia

A continuación, se describe el procedimiento mediante el cual se evaluó cada variable:

- 1. Determinación del pH:** se tomaron tres muestras de 1 g de cada lote y se colocaron en un vaso de precipitado de 250 ml con 99 ml de agua destilada. Cada muestra se agitó vigorosamente hasta su completa desintegración y formación de la suspensión. Con un potenciómetro Consort C931 (Consort BVBA, Turnhout, Bélgica) previamente calibrado se realizó la lectura de pH.

El pH es un parámetro importante porque puede afectar la permeabilidad de la membrana celular o la actividad de las enzimas fúngicas (Moore, 1996). El valor de pH obtenido debe ser comparado con el rango óptimo para el microorganismo formulado. En este caso el rango óptimo para *B. bassiana* se había establecido entre 5 y 9 en estudios previos (AGROSAVIA, 2014).

- 2. Determinación de la humedad:** de cada lote se pesaron tres muestras de 0,5 g, cada una se colocó en una balanza halógena de humedad Kern MLS 50-3 y se dejó a una temperatura de 110 °C hasta que no se presentó variación en el peso de las muestras. Se registró el porcentaje de pérdida de agua de cada muestra, el cual corresponde a su contenido de humedad.

La humedad establecida para los tres lotes estuvo por debajo del 5 %, lo que, posiblemente, reducirá el metabolismo de Bv060 y permitirá obtener una mayor estabilidad en el almacenamiento (Costa et al., 2002).

3. **Determinación de la humectabilidad:** en un vaso de precipitado de 250 ml con 100 ml de agua se pusieron 5 g del granulado a evaluar (tres muestras por lote) sobre la superficie y con un cronómetro se registró el tiempo que este tardó en humedecerse completamente.

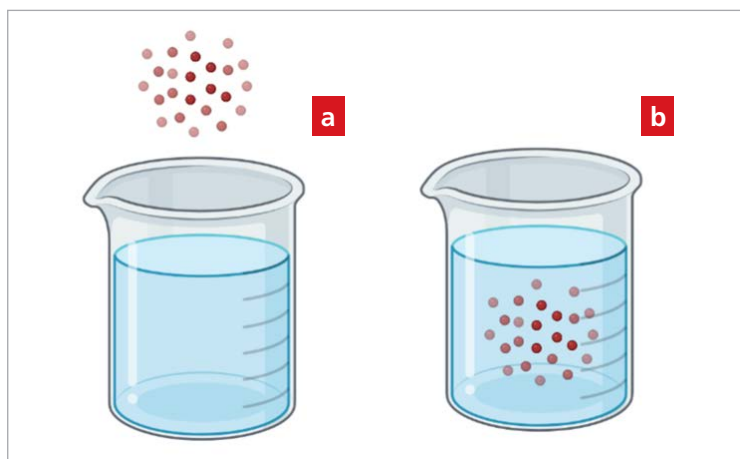


Figura 2.3. Evaluación del tiempo de humectabilidad; a. Granulado antes de suspender en el agua; b. Granulado completamente humectado.

Fuente: Elaboración propia

Esta variable se encuentra por encima de lo recomendado en la literatura, a saber, 1 minuto (Norma Técnica Colombiana [NTC 439], 2015). Con este resultado se evidenció la necesidad de mejorar esta variable fisicoquímica. Aunque este resultado no tiene un efecto directo sobre la eficacia del bioplaguicida, puede representar un efecto desfavorable en la percepción del usuario del producto si se compara con productos similares que se encuentran en el mercado y tienen un menor tiempo de humectabilidad.

4. **Determinación del tiempo de desintegración:** a un vaso de precipitado de 250 ml con 100 ml de agua se adicionaron 5 g del granulado (tres muestras por lote) y tan pronto este se humectó, la suspensión se puso en agitación constante a 500 rpm y se registró el tiempo en que se desintegró completamente.

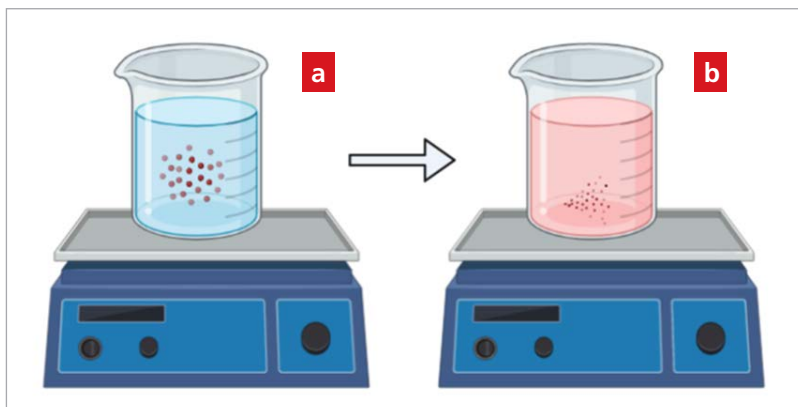


Figura 2.4. Tiempo de desintegración de un granulado; a. Tiempo inicial, granulado en agua completamente humectado; b. Desintegración total del granulado, formación de la suspensión.

Fuente: Elaboración propia

La desintegración tuvo lugar en un tiempo inferior a 2 minutos, valor que está en el límite de aceptación establecido por algunos autores (Hong-Ku et al., 2018). Sin embargo, sería conveniente establecer si el valor obtenido es aceptable o se debe intentar reducir (con respecto a productos similares en el mercado).

5. **Tamaño de partícula:** una batería de tamices fue armada en orden descendente con los tamaños de malla de 2.000 micras, 1.000 micras, 850 micras, 500 micras, 150 micras y el colector; previamente se pesó cada tamiz.

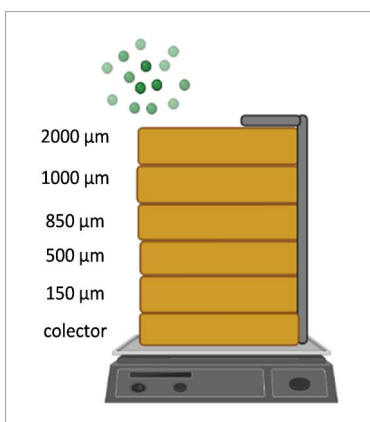


Figura 2.5. Determinación del tamaño de partícula por granulometría. Batería de tamices ordenada de acuerdo con el tamaño de la abertura de malla en orden descendente.

Fuente: Elaboración propia

En el tamiz de 2.000 micras se colocaron 100 g del granulado y se dejó vibrando a una amplitud de 2 por 10 minutos, tiempo después del cual se pesó el material retenido en cada tamiz y se calculó el porcentaje correspondiente. Los datos fueron utilizados para hacer un histograma de distribución de frecuencias con 6 rangos de clase (figura 2.6).

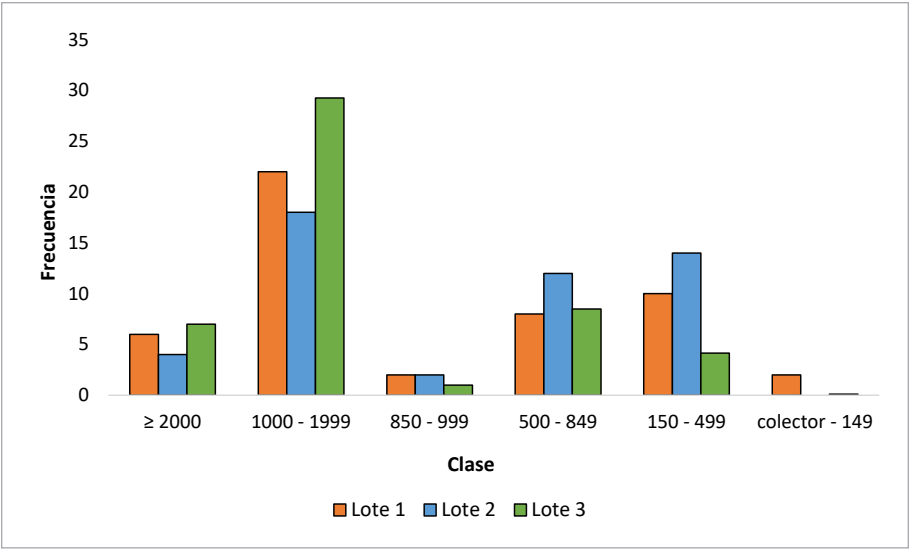


Figura 2.6. Distribución de tamaño de partícula de un granulado a base de *B. bassiana* Bv060.
Fuente: Elaboración propia

Caso de estudio II: concentrado emulsionable

Esta formulación fue elaborada con los conidios del hongo *B. Bassiana*. Este tipo de formulación corresponde a una suspensión oleosa. En la tabla 2.8 se presentan los promedios correspondientes a las variables fisicoquímicas evaluadas. Además, se determinó el tamaño de diámetro medio de gota, como se mencionará posteriormente.

Tabla 2.8. Caracterización fisicoquímica de un concentrado emulsionable a base de *B. bassiana* Bv060

Variable	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Desviación estándar (sd)
pH	7,89	7,79	7,84	0,05
Sedimentación	0,72	0,67	0,70	0,02
Viscosidad	1,21	1,34	1,21	0,12

Fuente: Elaboración propia

A continuación, se menciona el procedimiento mediante el cual se analizó cada variable:

1. **Determinación del pH:** se tomaron tres muestras de cada lote, cada una de 1 ml y se reconstituyeron en 99 ml de agua destilada para formar la emulsión. Este volumen se colocó en un vaso de precipitado de 250 ml y con un potenciómetro previamente calibrado se tomó la lectura de pH.

Como se mencionó anteriormente, en el caso de estudio I, esta es una variable fisicoquímica importante ya que puede afectar la permeabilidad de la membrana del microorganismo y su actividad enzimática (Moore, 1996). Por este motivo debe ser considerada para todos los tipos de formulaciones. En este caso el valor obtenido se encuentra dentro del rango óptimo establecido en estudios anteriores (AGROSAVIA, 2014).

2. **Evaluación del índice de sedimentación:** un volumen de 10 ml del concentrado emulsionable se colocó en una probeta graduada y se dejó en reposo a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 días. El primer día se tomó la altura del volumen del concentrado emulsionable y después del tiempo de almacenamiento se determinó el volumen del sedimento formado. El cociente entre el volumen inicial y final correspondió al índice de sedimentación.

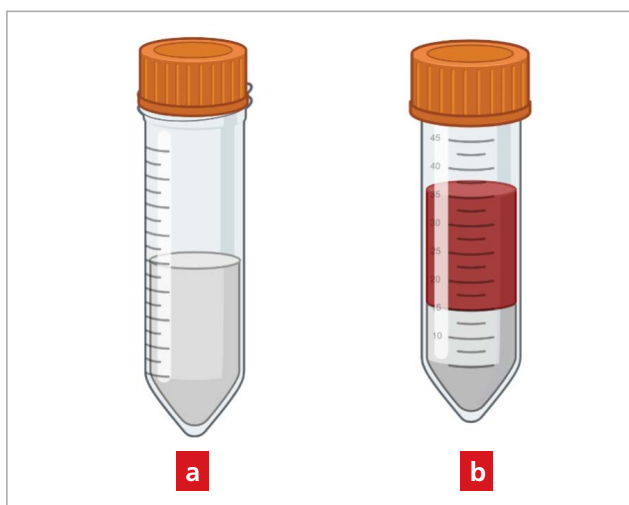


Figura 2.7. Determinación del índice de sedimentación a partir de la altura del sedimento formado; a. Suspensión inicial; b. Sedimento formado después de un tiempo de almacenamiento en reposo.

Fuente: Elaboración propia

Los valores obtenidos en el índice de sedimentación indican que se formó sedimento en el concentrado emulsionable durante el tiempo de almacenamiento, por el contrario, valores cercanos a 1 indican que hay una menor formación de sedimento (Bostijn et al., 2018). Sin embargo, en este tipo de productos biológicos, además del cálculo del índice de sedimentación, es importante establecer la facilidad de redispersión del producto mediante agitación manual. Esto indica que en el momento de su aplicación el sedimento formado en el producto se va a homogenizar completamente, lo cual garantiza la aplicación de la dosis con la que fue diseñado.

3. **Determinación de la viscosidad:** la viscosidad se determinó mediante un viscosímetro de bola utilizando una bola de acero inoxidable (SS 316) y determinando el tiempo en que esta tardó en caer. La viscosidad se calculó mediante la ecuación 2.1 (Gilmont, 1961):

$$k = \mu \div (pt - p) \times t$$

Donde $\mu = k (pt - p)$

μ = viscosidad en centipoises (cps)

pt = densidad de la bola (g/ml); 2,53 para el vidrio; 8,03 para el acero inoxidable y 16,6 para el tantalum

p = densidad del líquido (g/ml)

t = tiempo de descenso (minutos)

k = constante del viscosímetro, la cual es obtenida por la medida de la viscosidad de un líquido estándar

4. **Tamaño de diámetro interno de gota:** un volumen de 20 μ l se depositó sobre una lámina portaobjetos y se cubrió con una laminilla. Mediante un microscopio colocado en el objetivo de un microscopio óptico con el objetivo 40 $\times$, se realizó la lectura del diámetro de 100 gotas por réplica. Se utilizó un total de tres réplicas por lote (figura 2.4).

Mediante la observación a través del microscopio óptico se evidenció la formación de gotas esféricas correspondientes a la fase interna (oleosa). Estas se encontraron

dispersas en la fase externa (agua). Para los tres lotes se observó una tendencia similar, de acuerdo con la cual el mayor número de gotas se encontraron en el rango de tamaño de 7,5 a 19,5 micras y de 19,6 a 31,5 micras. Una menor proporción de gotas se encontró en el rango de 55,6 a 67,5 micras. El tamaño del diámetro de las gotas de la fase interna de la emulsión evidenció que al reconstituir en agua el concentrado emulsionable se formó una macroemulsión en el que las gotas tuvieron un tamaño mayor a 0,1 micras (Salager et al., 2001). Además, la amplia variación en el diámetro de las gotas sugiere que con el tiempo la emulsión puede mostrar signos de inestabilidad (Salager, 1999), tales como cremado o formación de coágulos.

Perspectivas

El incremento en la demanda de productos para el control de plagas agrícolas que tengan un menor impacto sobre la salud y el medio ambiente es un reto para los productores de plaguicidas biológicos. Así pues, el objetivo es ofrecer productos que mantengan la estabilidad y la eficacia con la cual fueron diseñados en cada lote de producción y que sean competitivos por presentar características que los diferencien. Estas características solo pueden lograrse si se les asigna la importancia requerida a las variables fisicoquímicas de acuerdo con el tipo de formulación durante la etapa de desarrollo y de producto terminado.

Por lo tanto, constituye un desafío para los fabricantes y los laboratorios de plaguicidas biológicos incluir como parte fundamental del control de calidad las variables fisicoquímicas mas allá del pH y la humedad, que son las que generalmente se tienen en cuenta pero no son suficientes para valorar el comportamiento del producto en las diferentes etapas de elaboración, distribución y aplicación.

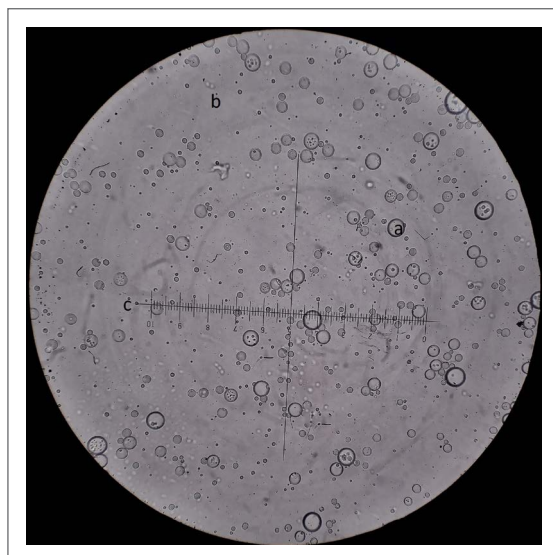


Foto: Erika Grijalba B.

Figura 2.8. Vista al microscopio óptico de una emulsión aceite agua con un objetivo de 40x; a. Gota de aceite fase interna; b. Fase externa, agua; c. Escala del micrómetro.

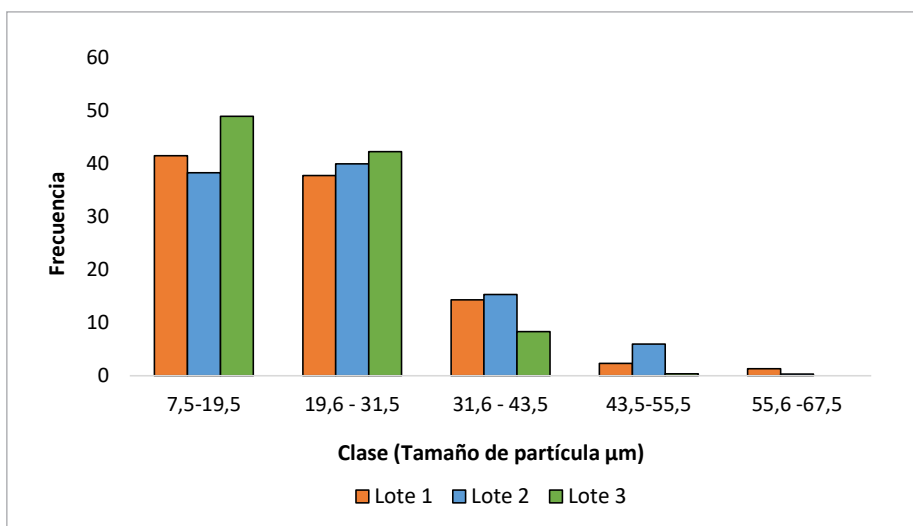


Figura 2.9. Distribución de tamaño de partícula de una emulsión formada a partir de la reconstitución de un concentrado emulsionable a base de *B. bassiana* Bv060.

Fuente: Elaboración propia

Referencias

- Aroonrat, T. A., Supphantharika, M., & Ketunuti, U. (2003). Preparation of spray-dried wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis* based-biopesticides. *Journal of economic entomology*, 96(2), 292-299. <https://doi.org/10.1093/jee/96.2.292>
- Bali, V., Ali, M., & Ali, J. (2010). Novel nanoemulsions for minimizing variations in bioavailability of ezetimibe. *Journal of Drug Targeting*, 18(7), 506-519. <https://doi.org/10.3109/1061186090354836>
- Bostijn, N., Renterghem, J. V., Dhondt, W., Vervaet, C., & De Beer, T. (2018). A continuous manufacturing concept for a pharmaceutical oral suspension. *European Journal of pharmaceutical sciences*, 123(1), 576-583. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.015>
- Brookfield Engineering Labs. (2000). *More solutions to sticky problems*. Brookfield Engineering Labs.
- Brown, T. L., Lemay, H. E., Bursten, B. E., Murphy, C. J., Woodward, P. M., & Stoltzfus, M. W. (1997). *Chemistry: The central science*. Pearson.
- Carstensen, J. T. (1998). *Pharmaceutical preformulation*. CRC Press.
- Chan, E. S., Wong, S. L., Leen, P. P., Lee, J. S., Ti, T. B., Zhang, Z. B., Poncelet, D., Ravindra, P., Phan, S. H., & Yim, Z. H. (2011). Effects of starch filler of the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. *Carbohydrate polymers*, 83(1), 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.044>
- Collaborative International Pesticides Analytical Council [Cipac]. (1995). *Handbook volumen F: Physico chemical methods for technical and formulated pesticides*. Editores Dobrat & Martijn.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]. (2014). Un bioplaguicida para el control de crisomélidos en soya [Informe técnico final]. AGROSAVIA.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]. (2019). *Análisis fisicoquímico de bioplaguicidas sólidos*. AGROSAVIA.
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., & Viñas, I. (2002). 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*, 92(5), 873-878. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01596.x>
- Crowder, T. M., Rosati, J. A., Schroeter, J. D., Hichey, A. J., & Martonen, T. B. (2002). Fundamental effects of particle morphology on lung delivery: prediction of Stokes' law and the particular relevance to dry powder inhaler formulation and development. *Pharmaceutical Research*, 19(3), 239-245. <https://doi.org/10.1023/a:1014426530935>
- Cueva, R. (2018). Evaluación de dos atributos de calidad críticos en la producción de formas farmacéuticas sólidas utilizando la espectroscopía de infrarojo cercano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(4), 465-476
- Deveswaran, R., Bharath, S., Furtado, S., Abraaham, S., Basavaraj, B. V., & Madhavan, V. (2010). Isolation and evaluation of tamarind seed polysaccharide as a natural suspending agent. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 1(4), 360-363.
- Faria, M., & Wraight, S. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43(3), 237-256. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.08.001>
- Freudig, B., Hogenkamp, S., & Schubert, H. (1999). Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. *Chemical engineering and processing*, 38(1), 525-532. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(99\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(99)00049-5)
- Gansic, S., & Brankica, T. (2013). Biopesticide formulations, possibility of applications and future trends. *Pesticidi i Fitomedicina*, 28(2), 97-102. <https://doi.org/10.2298/pif1302097g>
- Gil, J., Vargas, L., Flórez, O., & Tobón, G. (2008). Efecto del solvente de recristalización y del tamaño de partícula sobre la humectabilidad del ibuprofeno. *Vitae*, 16(1), 49-54.
- Gilmont, R., & Maurer, P. W. (1961). A generalized equation for rotameters with spherical floats. *Instruments and control systems*, 34(11), 2071.
- Gray, A., Egan, S., Bakalis, S., & Zhang, Z. (2016). Determination of microcapsule physicochemical structural, and mechanical properties. *Particuology*, 24(1), 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2015.06.002>
- Harris, D. (2018). Particulates in semi-solid pharmaceutical products. En Merkus, H., Meesters, G., Oostra, W. (Eds), *Particles and nanoparticles in pharmaceu-*

- tical products. AAPS advances in the pharmaceutical sciences* (pp. 399-428). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94174-5_1
- Hong-Ku, W., Li-Li, S., Fang, L., Zhi-Ying, W., & Chuan-Wang, C. (2018). Preparation of dry flowable formulations of *Clonostachys rosea* by spray drying and application for *Sclerotinia sclerotiorum* control. *Journal of integrative agriculture*, 17(3), 613-620. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61811-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61811-2)
- Kim, E. H. J., Chen, X. D., & Pearce, D. (2000). Surface characterization of four industrial spray-dried dairy powders in relation to chemical composition, structure and wetting property. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 26(3), 197-212. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(01\)00334-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(01)00334-4)
- Knowles, A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Environmentalis*, 28(1), 35-44. <https://doi.org/10.1007/s10669-007-9045-4>
- Kudo, Y., Yasuda, M., & Matsusaka, M. (2020). Effect of particle size distribution on flowability of granulated lactose. *Advanced Powder Technology*, 31(1), 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2019.10.004>
- Lisansky, S. G., Quinlan, R. J., & Tassoni, G. (1993). The *Bacillus thuringiensis* production handbook. CPL Press.
- List, P. H., & Muazzam, U. A. (1979). Quellung-die treibende Kraft beim tablettenzerfall. 1 Mitteilung. *Pharmazeutische industrie*, 41(5), 459-464.
- Macedo, J., Fernandes, L., Formiga, F., Reis, M., Nagashima, T., Soares, L., Socrates, E., & Egito, T. (2006). Micro-emultocrit technique: A valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. *AAPS PharmSciTech*, 7(1), E1-E7 <https://doi.org/10.1208/pt070121>
- Markl, D., & Zeitler, J. A. (2017). A review of disintegration mechanisms and measurement techniques. *Pharmaceutical Research*, 34(5), 890-917. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2129-z>
- Nogami, H., Hasegawa, J., Miyamoto, M. (1967). Studies of powdered Preparations XX disintegration of the aspirin tablets containing starches as disintegrating agent. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 15(3), 179-89.
- Norma Técnica Colombiana [NTC 439]. (2015). Plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos. Ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación.
- Particle Sciences. (2011). *Drug development services. Technical brief. Volume 2*. Particle Sciences.

- Peppas, N. A., & Colombo, P. (1989). Development of disintegration forces during water penetration in porous pharmaceutical systems. *Journal of Controlled Release*, 10(3), 245-250. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(89\)90074-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(89)90074-6)
- Rosen, M. J. & Kunjappu, J. T. (2012). *Surfactants and interfacial phenomena*. Wiley Online Library.
- Salager, J. L. (1999). Formulación, composición y fabricación de emulsiones para obtener las propiedades deseadas. Estado del Arte. Parte B. Cuaderno FIRP 747-B. Propiedades de las emulsiones y su medición. Laboratorio de formulación, interfases, reología y procesos. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Salager, J. L., Antón, R., Anderrez, J., & Aubry, J. M. (2001). Formulación de microemulsiones por el método del HLD. *Techniques de l'Ingénieur*, Vol. Génie des Procédés, artículo J2: 157, 1-20.
- Schubert, H. (1978). Optimierung der Größe und Porosität von Instantagglomeraten in bezug auf eine schnelle Durchfeuchtung. *Verfahrenstechnik*, 12(1), 296-301.
- Shakeel, F., Haq, N., Alanazi, F. K., & Alsarra, I. A. (2014). Effects of oils and surfactants on physicochemicals characterization and *in vitro* dissolution of glibenclamide from self-emulsifying formulations. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 24(1), 78-85. [https://doi.org/10.1016/S1773-2247\(14\)50011-1](https://doi.org/10.1016/S1773-2247(14)50011-1)
- Shekunov, B., Chatopadhyay, P, Tong, H., & Chow, A. (2007). Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications. *Pharmaceutical research*, 24(2), 203-227. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9146-7>
- Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (1997). Métodos potenciométricos. En *Fundamentos de química analítica*. Reverte.
- Sunk-II, A., Yung-Kyung, L., & Hae-Soo, K. (2019). Physicochemical and sensory properties of milk supplemented with lactase microcapsules coated with enteric coating materials. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 6959-6970. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15865>
- Takasaki, H., Sakurai, A., Katayama, T., Matsuura, Y., Ohyagi, N., Mizoguchi, M., Takano, J., Wada, K., Matsui, K., Nagato, T., Ishikawa, A., & Yonemochi, E. (2019). Importance of free water in controlling granule and tablet properties in a novel granulation method, green fluidized bed granulation (GFGB). *International Journal of pharmaceuticals*, 570(1), 118647. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118647>

- Vemmer, M., & Patel, A. (2013). Review of encapsulation methods for microbial biological control agents. *Biological control*, 67(3), 380-389. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>
- Vo, A., Feng, X., Patel, D., Mohammad, A., Kozak, D., Choi, S., Ashraf, M., & Xu, X. (2020). Factors affecting the particle size distribution and rheology of brinzolamide ophthalmic suspensions. *International Journal of Pharmaceutics*, 586(1), 119495. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119495>
- Xiangkun, M., Junjie, Y., Mina, Y., Xiaole, Y., Yongfeng, L. (2015). Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain 29 by spray drying to control rice blast disease. *Biological control*, 85(1), 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.004>
- Yang, M. W., & Lin, S. Y. (2003). A method for correcting the contact angle from the $\theta/2$ method. *Colloids Surfaces A*, 222(1-3), 199-210. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(03\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(03)00064-5)
- Zárate, C. A., Cotes, A. M., Villamizar, L. (2010). Estudio de la estabilidad en almacenamiento de tres formulaciones oleosas a base de *Nomuraea rileyi*. En V. Coria, B. Lara, G. Orozco, J. Muñoz, R. Sánchez (Eds.), *XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Inifap, Cirpac, Uruapan* (pp. 399e403). Michoacán, México.
- Zhang, S., Wan, Q., Xu, X., Xing, Y., Ding, J., Yang, S., Sun, W., Lu, M., Pan, B. (2019). A novel oil-based suspension of a micro-environmental, pH-modifying solid dispersion for parenteral delivery: Formulation and stability evaluation. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 179(1), 382-392. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.001>
- Zhang, Z. H., Peng, H., P., Woo, M., Zeng, Z., Brennan, M., Brennan, C. (2020). Preparation and characterization of whey protein isolate-chlorophyll microcapsules by spray drying: Effect of WPI ratios on the physicochemicals and antioxidant properties. *Journal of Food Engineering*, 267(1), 109729. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.109729>



Capítulo III

Control de calidad de bioinsumos recomendados para el manejo de fitopatógenos (bacterias y hongos)

Liz Alejandra Uribe Gutiérrez

Los bioinsumos agrícolas son productos biológicos elaborados a partir de organismos o sus derivados, desarrollados para la protección de los cultivos y el medio ambiente (Parada & Muñoz, 2015). Garantizar la eficacia de los bioinsumos que se comercializan es un parámetro crucial para que los productores los adopten y para el control de enfermedades tanto en campo como durante la postcosecha. En ese sentido, el control de calidad hace referencia al conjunto de acciones destinadas a garantizar la producción uniforme de lotes de productos terminados que satisfagan los parámetros de identidad, pureza y actividad biológica (eficacia) establecidos por cada casa comercial. La evaluación de la actividad biológica se logra mediante la elaboración de pruebas experimentales en laboratorio o invernadero, donde el diseño, la selección y la estandarización de protocolos son pasos esenciales para asegurar la calidad de los resultados. A continuación, se proponen una serie de metodologías *in vitro* que pueden ser empleadas para la evaluación de la actividad biológica de diferentes agentes de control seleccionados como principios activos de bioinsumos y recomendados para el manejo de hongos o bacterias fitopatógenas.



Criterios biológicos

Con el fin de lograr una evaluación acertada y evitar falsos positivos o falsos negativos, los aspectos relacionados con el microorganismo patógeno, el agente de control biológico y el tipo de formulación son criterios biológicos que se deben tener en cuenta al evaluar la efectividad de un bioplaguicida.

Microorganismos patógenos

El planeta tierra abarca alrededor de 10^{12} de especies de microorganismos pertenecientes a diferentes órdenes y con capacidad de vivir en una amplia diversidad de hábitats, incluidos ambientes extremos (Locey & Lennon, 2016). Varios de ellos están involucrados en procesos importantes como, por ejemplo, los ciclos biogeoquímicos, los procesos de biorremediación, la producción de antibióticos y la producción de alimentos, entre otros (Caplice & Fitzgerald, 1999; Falkowski et al., 2008; Harekrushna & Kumar, 2012; Rokem et al., 2007). Sin embargo, varios de ellos son clasificados como patógenos dado que, para sobrevivir, parasitan o consumen tejidos vegetales, asunto que constituye uno de los principales problemas para la producción agrícola (Cotes, 2018).

Dentro de los diferentes grupos de microorganismos patógenos, los hongos son los que causan el mayor número de enfermedades, con alrededor de 8.000 especies reportadas dentro de las que se incluyen: *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, varias especies de *Puccinia* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. y *Rhizoctonia solani*, entre otras (Dean et al., 2012; Ellis et al., 2008). También se reportan microorganismos fitopatógenos del grupo de los Oomycetes, principalmente varias especies del género *Phytophthora* spp. Finalmente, también se reportan bacterias como *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens* y varias especies del género *Xanthomonas* spp., entre otras (Dean et al., 2012; Kamoun et al., 2015; Mansfield et al., 2012).

En la tabla 3.1 se relacionan los principales patógenos reportados con mayor prevalencia en algunos de los cultivos más importantes de Colombia durante el año 2019 (Montes, 2019). En primera instancia, *Colletotrichum* spp., *Phytophthora* spp. y *Fusarium* sp. son los de mayor incidencia, seguidos de *Botrytis* sp., *Sclerotinia* spp. y, finalmente, *Erwinia* sp., *Oidium* sp., *Alternaria* sp. y *Cercospora* sp., entre otros.

Tabla 3.1. Principales patógenos que afectan algunos de los cultivos más importantes en Colombia en 2019

Patógeno	Enfermedad	Cultivo	Referencia
<i>Ralstonia solanacearum</i> Raza 2	Moko o madurabiche	Banano	Alarcón & Jiménez (2012)
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Pudrición acuosa del pseudotallo o bacteriosis	Banano	Alarcón & Jiménez (2012)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cubense</i>	Mal de Panamá	Banano	Alarcón & Jiménez (2012)
<i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet var. <i>Difformis</i>	Sigatoka negra	Banano	Alarcón & Jiménez (2012)
<i>Phytophthora cinnamomi</i> var <i>cinnamomi</i> Rands	Pudrición radical	Aguacate	Castaño & Leal (2018); Gil et al., (2015)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Aguacate	Granada et al. (2018)
<i>Phytophthora</i> spp.	Gomosis	Cítricos: lima y naranja	Alarcón & Jiménez 2012
<i>C. gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum. Acutatum</i>	Antracnosis	Cítricos: lima y naranja	Alarcón & Jiménez (2012)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Pudrición acuosa	Piña	Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo [Aecid] & Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda [Earth] (s. f.)
<i>Phytophthora parasitica</i>	Pudrición del corazón	Piña	Aecid & Earth (s. f.)
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Pudrición de la raíz	Piña	Aecid & Earth (s. f.)
<i>Fusarium</i> sp.	Fusariosis – Pudrición	Piña	Ríos et al. (2019)
<i>Dyckeya</i> sp.	Pudrición bacterial	Piña	Ríos et al. (2019)
<i>Thielaviopsis</i> sp.	Pudrición negra	Piña	Ríos et al. (2019)

(Continúa)

(Continuación tabla 3.1)

Patógeno	Enfermedad	Cultivo	Referencia
<i>C. gloeosporioides</i>	Antracnosis	Mango	Asociación Hortifruticola de Colombia [Asohofrucol] & Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [Corpoica] (2013)
<i>Fusarium subglutinans</i>	Malformación	Mango	Asohofrucol & Corpoica (2013)
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Secamiento o muerte	Mango	Asohofrucol & Corpoica (2013)
<i>C. gloeosporioides</i>	Antracnosis	Tomate de árbol	Cámara de Comercio de Bogotá [CCB] (2015a)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Moho blanco	Tomate de árbol	CCB (2015a)
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Tomate de árbol	CCB (2015a)
<i>Oidium</i> sp.	Mildeo polvos	Tomate de árbol	CCB (2015a)
<i>Alternaria</i> sp.	Tizón foliar	Tomate de árbol	CCB (2015a)
<i>Erwinia</i> sp.	Marchitamiento y la necrosis	Papaya	EncuRed (s. f.)
<i>Phytophthora palmivora</i>	Damping off	Papaya	EncuRed (s. f.)
<i>Cercospora papayae</i> Hansford	Mancha negra	Papaya	EncuRed (s. f.)
<i>C. gloeosporioides</i>	Antracosis	Papaya	EncuRed (s. f.)
<i>Colletotrichum fragariae</i>	Antracnosis	Fresa	Ventura et al. (2018)
<i>Phytophthora cactorum</i>	Pudrición de la corona	Fresa	Cano (2013)
<i>B. cinerea</i>	Moho gris	Fresa	Cano (2013)
<i>Dothiorella</i> sp.	Pudrición apical del fruto	Guayaba	Castellano et al. (2003)
<i>Pestalotia versicolor</i>	Roña o clavo	Guayaba	Leiva et al. (2018)
<i>Colletotrichum</i> sp.	Antracnosis	Guayaba	Leiva et al. (2018)
<i>Phytophthora</i> sp.	Pudriciones radicales	Guayaba	Leiva et al. (2018)

(Continúa)

(Continuación tabla 3.1)

Patógeno	Enfermedad	Cultivo	Referencia
<i>Phytophthora infestans</i>	Tizón del lulo o gota	Lulo	CCB (2015b); Tamayo (2001)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Moho blanco, lama blanca, pudrición algodonosa	Lulo	CCB (2015b); Tamayo (2001)
<i>C. gloeosporioides</i>	Antracnosis	Lulo	CCB (2015b); Tamayo (2001)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Pudrición del tallo	Lulo	CCB (2015b); Tamayo (2001)
<i>F. oxysporum</i>	Marchitez vascular	Lulo	CCB (2015b); Tamayo (2001)
<i>B. cinerea</i>	Moho gris	Mora	Arévalo et al. (2011)
<i>C. gloeosporioides</i>	Antracnosis	Mora	Arévalo et al. (2011)
<i>Oidium</i> sp.	Mildeo polvoso	Mora	Arévalo et al. (2011)
<i>Peronospora sparsa</i> Berk.	Mildeo vellosa	Mora	Arévalo et al. (2011)

Fuente: Elaboración propia

Los microorganismos patógenos se pueden clasificar en cuatro categorías: la primera, saprófitos obligados, correspondientes a aquellos organismos que solo pueden colonizar y sobrevivir en materia orgánica muerta o en descomposición; la segunda, parásitos obligados, que incluye a todos los microorganismos que solo pueden vivir en un huésped vivo como, por ejemplo, mildeo polvoso, mildeo vellosa, royas, entre otros; la tercera, parásitos facultativos, los cuales generalmente viven como saprófitos, pero tienen la habilidad de parasitar y causar enfermedad bajo condiciones favorables como, por ejemplo, *Pythium* spp. y varias especies de bacterias fitopatógenas y, por último, la cuarta, los saprófitos facultativos, que corresponden a aquellos microorganismos que generalmente viven como parásitos pero tienen la capacidad de utilizar la materia orgánica muerta o en descomposición bajo ciertas condiciones como, por ejemplo, microorganismos del género *Phytophthora* spp. y *Botrytis* spp. (Ellis et al., 2008).

Los microorganismos patógenos pueden infectar diversos tipos de plantas en diferentes estados de desarrollo. Se pueden clasificar en patógenos foliares, patógenos del suelo o endófitos según el tejido que infectan como, por ejemplo, los que afectan la filósfera, la rizosfera, tejidos vasculares, semillas, etc. Pueden causar afectaciones tanto en campo como durante la postcosecha y causar pérdidas económicas consi-

derables además de la pérdida del alimento en sí. Se estima que más de la mitad de los alimentos producidos en el mundo se pierden a causa de la dispersión de dichos patógenos (Ellis & Boehm, 2008; Cotes, 2018).

Agentes de control biológico

Como se mencionó anteriormente, también existen microorganismos que están involucrados en un número considerable de procesos benéficos para las plantas hospederas. Gracias a su participación aumenta la disponibilidad de nutrientes esenciales para su crecimiento, la producción de fitohormonas se ve favorecida y la resistencia a enfermedades también incrementa (Qu et al., 2020). Varios microorganismos benéficos han sido reportados por su capacidad para producir compuestos volátiles y no volátiles o de desarrollar mecanismos de acción que contrarrestan el aumento de otros microorganismos clasificados como patógenos (Abd-Elgawad, 2020; Fira et al., 2018; Junior et al., 2020; Liu et al., 2013). Los microorganismos empleados para tal fin son denominados agentes de control biológico y han sido identificados y empleados para el desarrollo de bioproductos (bioinsumos) que puedan ser integrados dentro de estrategias de manejo más amigables con el medio ambiente para disminuir el uso de productos de síntesis química.

En Colombia, hasta diciembre de 2019, se encontraban registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) 326 bioinsumos clasificados en: inoculantes de uso agrícola (96), agentes de control biológico de plagas y enfermedades (226) y un bioinsumo registrado con los dos modos de acción. Dentro de los principales agentes de control biológico empleados se registran varias especies de *Bacillus* spp., *Pseudomona aureofaciens*, *Streptomyces racemochromogenes*, *Burkholderia cepacia* y diversas especies de *Trichoderma* spp. Los agentes de control biológico mencionados están recomendados para el control de *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* y *Pseudomonas syringae*, entre otros (tabla 3.2) (ICA, 2019).

Tabla 3.2. Principales agentes de control biológico de bioinsumos registrados ante el ICA hasta diciembre de 2019 para el control de fitopatógenos

Agente de control biológico	Patógeno / Cultivo
<i>Bacillus subtilis</i> Reino: Bacteria Filum: Firmicutes Clase: Bacilli Orden: Bacillales Familia: Bacillaceae Género: <i>Bacillus</i> Especie: <i>B. subtilis</i> (Ehrenberg 1835) Cohn (1872)	<i>B. cinerea</i> / Rosa <i>R. solani</i> / Arroz <i>solani</i> / Tomate <i>P. syringae</i> / Tomate <i>Ramularia areola</i> / Algodón <i>M. fijiensis</i> / Banano <i>F. oxysporum</i> / Piña <i>P. cinnamomi</i> / Piña <i>P. cinnamomi</i> / Piña <i>C. gloeosporioides</i> / Aguacate <i>C. acutatum</i> / Aguacate
<i>Burkholderia cepacia</i> Reino: Bacteria Filum: Proteobacteria Clase: Betaproteobacteria Orden: Burkholderiales Familia: Burkholderiaceae Género: <i>Burkholderia</i> Especie: <i>B. cepacia</i> complex (Palleroni & Holmes 1981) Yabuuchi et al. (1993)	<i>B. cinerea</i> / Pompón
<i>Trichoderma harzianum</i> Reino: Hongo División: Ascomycota Subdivisión: Pezizomycotina Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Género: <i>Trichoderma</i> Especie: <i>T. harzianum</i> Rifai (1969)	<i>Fusarium</i> sp. / Clavel, tomate <i>Fusarium roseum</i> / Clavel <i>F. oxysporum</i> / Clavel, hortalizas y aromáticas <i>R. solani</i> / Arroz, Pompom, soya, tomate, crisantemo, café <i>R. areola</i> / Algodón <i>B. cinerea</i> / Tomate, pepino, uva, cítricos, haba, rosa, fresa, tomillo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> / Pompón, clavel <i>Phytophthora</i> spp. / Aguacate, tomillo, romero, vainilla, estragón, oregano, café, gulupa, tomate, uchuva, lulo, tomate de árbol, ají, pimentón, berenjena <i>A. solani</i> / Tomate

(Continuación tabla 3.2)

Agente de control biológico	Patógeno / Cultivo
<i>Trichoderma lignorum</i> Reino: Hongo División: Ascomycota Subdivisión: Pezizomycotina Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Género: <i>Trichoderma</i> Especie: <i>T. lignorum</i> (Tode) Harz (1871)	<i>F. oxysporum</i> / Clavel <i>Fusarium oxysporum</i> sp. Lycopersici / Tomate <i>R. solani</i> / Arroz
<i>Trichoderma koningii</i> Reino: Hongo División: Ascomycota Subdivisión: Pezizomycotina Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Género: <i>Trichoderma</i> Especie: <i>T. koningi</i> Oudem (1902)	<i>R. solani</i> / Pompon, arroz, café <i>Phytophthora</i> spp. / Aguacate, tomillo, romero, vainilla, estragon, oregano, café, gulupa, tomate, uchuva, lulo, tomate de árbol, ají, pimentón, berenjena
<i>Trichoderma koningiopsis</i> Reino: Hongo División: Ascomycota Subdivisión: Pezizomycotina Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Género: <i>Trichoderma</i> Especie: <i>T. koningiopsis</i> Samuels, Suárez & Evans (2006)	<i>F. oxysporum</i> / Tomate

(Continúa)

(Continuación tabla 3.2)

Agente de control biológico	Patógeno / Cultivo
<i>Trichoderma atroviride</i> Reino: Hongo División: Ascomycota Subdivisión: Pezizomycotina Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Género: <i>Trichoderma</i> Especie: <i>T. atroviride</i> P. Karst. (1892)	Fitopatógenos sin especificar <i>R. solani</i> / Crisantemo
<i>Trichoderma viride</i> Reino: Hongo División: Ascomycota Subdivisión: Pezizomycotina Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Género: <i>Trichoderma</i> Especie: <i>T. viride</i> Pers. (1794)	<i>R. solani</i> / Pompón, arroz <i>Phytophthora</i> spp. / Aguacate, tomillo, romero, vainilla, estragon, oregano, café, gulupa, tomate, uchuva, lulo, tomate de árbol, ají, pimentón, berenjena <i>Sclerotinia sclerotium</i> / Lechuga <i>B. cinerea</i> / Lechuga <i>Bipolaris oryzae</i> / Arroz <i>Sarocladium oryzae</i> / Arroz <i>Gaeumannomyces graminis</i> / Arroz <i>Helminthosporium oryzae</i> / Arroz
<i>Trichoderma asperellum</i> Reino: Hongo División: Ascomycota Subdivisión: Pezizomycotina Clase: Sordariomycetes Orden: Hypocreales Familia: Hypocreaceae Género: <i>Trichoderma</i> Especie: <i>T. asperellum</i> Samuels, Lieckf & Nirenberg (1999)	<i>R. solani</i> / Crisantemo

(Continúa)

(Continuación tabla 3.2)

Agente de control biológico	Patógeno / Cultivo
<i>Streptomyces racemochromogenes</i> Reino: Bacteria Filum: Actinobacteria Clase: Actinobacteria Orden: Actinomycetales Familia: <i>Streptomycetaceae</i> Género: <i>Streptomyces</i> Especie: <i>S. racemochromogenes</i> Sugai (1956)	<i>Burkholderia glumae</i> / Arroz <i>Pseudomonas fuscavaginae</i> / Arroz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Reino: Hongo División: Ascomycota Clase: Saccharomycetes Orden: Saccharomycetales Familia: Saccharomycetaceae Género: Saccharomyces Especie: <i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C. Hansen	<i>Alternaria</i> sp. / Cebolla

Fuente: Elaboración propia

Tipos de formulaciones

La formulación de los microorganismos es un paso esencial durante el desarrollo de un bioinsumo viable y efectivo, así como la producción y obtención de las estructuras que van a ser empleadas como ingredientes activos (Glare & Moran, 2016). En cuanto a los bioinsumos registrados ante el ICA como agentes de control, en su mayoría corresponden a formulaciones tipo polvo mojable (WP), seguidas de suspensiones o soluciones concentradas (SC) y concentrado soluble (SL), entre otros (figura 3.1). Los principales ingredientes activos corresponden a: esporas o conidios, seguidos de clamidosporas y en menor cantidad células. Es importante tener en cuenta esta información para realizar una adecuada reconstitución de los bioinsumos y garantizar una mayor recuperación de dichas estructuras viables.

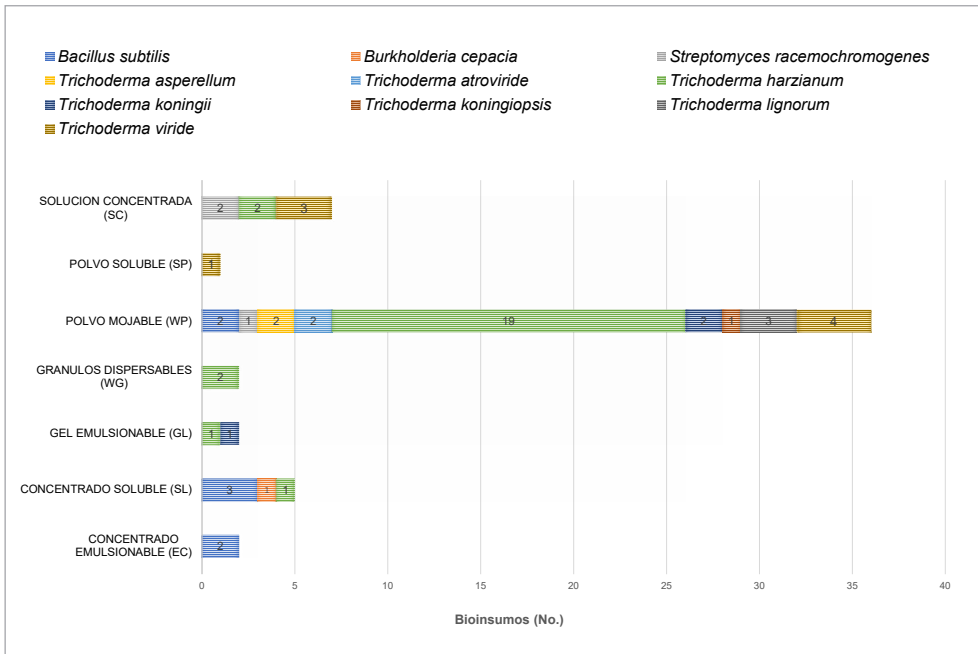


Figura 3.1. Principales tipos de formulación e ingredientes activos de bioinsumos registrados ante el ICA hasta diciembre de 2019 para el control de fitopatógenos.

Fuente: Elaboración propia

Criterios para la elaboración de los controles de calidad y evaluación de la eficacia

Saber qué criterios seguir para determinar si un bioinsumo cumple con los requisitos establecidos para la obtención del registro de productor y su comercialización es un paso clave dentro del proceso de evaluación. A continuación, se presentan algunos aspectos que se deben tener en cuenta para llevar a cabo un correcto control de calidad.

Reconstitución de los bioproductos

La rehidratación es un factor crítico que se debe tener en cuenta para la evaluación de la eficacia de los bioproductos formulados como polvos mojables, gránulos dispersables o los inmovilizados en matrices poliméricas. El proceso de reconstitución consta de 4 pasos: humectación, inmersión, dispersión y disolución (si es soluble). Dependiendo de la manera en que se realice la reconstitución, se garantiza la viabilidad y reactivación de las células o estructuras formuladas (Freudig, 1999;

Morgan et al., 2006; Muller et al., 2010). Adicionalmente, durante este paso también se deben tener en cuenta dos aspectos importantes, a saber: el vehículo de hidratación —el cual podría facilitar la reparación de posibles daños causados durante la formulación, la restauración de las funciones fisiológicas y garantizar su actividad biológica— y el efecto de la temperatura, el pH, la osmolaridad, el volumen y el tiempo de rehidratación (Carbó et al., 2017; Muller et al., 2010). Dentro de las soluciones empleadas para la rehidratación de productos se recomiendan las siguientes (Aguirre et al., 2018; Carbó et al., 2017; Morgan et al., 2006):

- Agua destilada
- Solución salina 0,9 %
- Glucosa anhidrida
- Leche descremada (100 g/L)
- Tween 80

Según estudios realizados por Carbó et al. (2017), se sugiere que el tiempo de hidratación sea de 10 minutos como mínimo y de 2 horas como máximo. Sin embargo, cabe aclarar que el tiempo de hidratación puede aumentar según el tipo de formulación desarrollada, que puede establecer cada productor mediante procesos de caracterización del producto.

Características y mecanismos de acción de los agentes de control biológico

Como se mencionó anteriormente en este apartado, para evaluar la actividad biológica de un bioinsumo sobre un patógeno determinado es necesario tener en cuenta las características de los diferentes tipos de microorganismos: el microorganismo antagonista, el microorganismo patógeno y las condiciones requeridas para su desarrollo e interacción. Dado que la mayoría de estas evaluaciones se realizan bajo condiciones controladas en un laboratorio (*in vitro*), es indispensable conocer las características macroscópicas y microscópicas de los microorganismos evaluados en diferentes medios de cultivo o sustratos empelados para su evaluación.

Otro parámetro importante para la correcta evaluación de los bioinsumos es conocer los mecanismos de control biológico empleados por los agentes de control. Los meca-

nismos de acción ejercidos por parte del biocontrolador sobre el patógeno de la planta se dividen en directos e indirectos (figura 3.2). Dentro de los mecanismos directos encontramos: la competencia por nutrientes y espacio, la producción de antibióticos, la producción de enzimas líticas, la inactivación de enzimas producidas por el patógeno y el parasitismo. Dentro de los mecanismos indirectos se incluyen todos aquellos que tienen la capacidad de causar un cambio morfológico o bioquímico en la planta hospedera como, por ejemplo, el desarrollo de tolerancia por parte de la planta hospedera, la solubilización o captura de nutrientes inorgánicos o la activación del sistema de resistencia inducida (De Almeida et al., 2015; Viterbo et al., 2002).

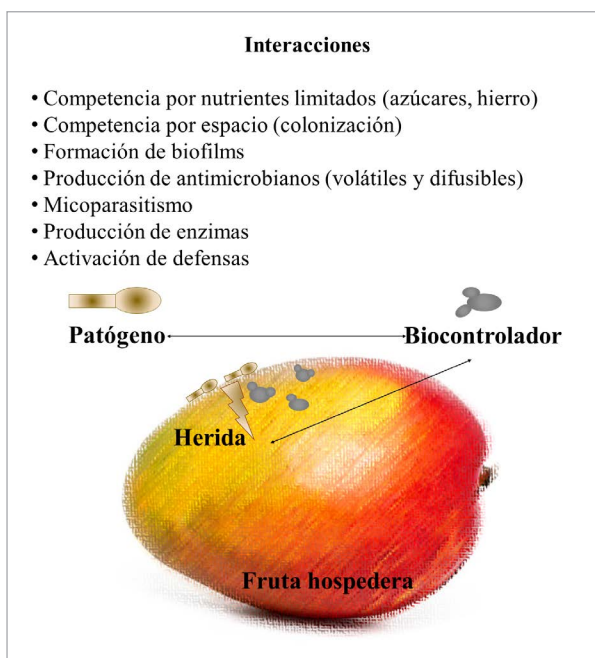


Figura 3.2. Interacciones entre microorganismos patógenos y agentes biocontroladores (mecanismos de acción).

Fuente: Elaboración propia

Aplicación de los bioinsumos y microorganismos patógenos

Garantizar que el patógeno esté activo para evaluar la actividad biológica de un biocontrolador es un paso indispensable que se debe garantizar al momento de realizar el ensayo. El patógeno debe estar activo y debe evidenciar signos o características típicas de su crecimiento para su uso. Se debe emplear una dosis de inoculación que garantice la producción de la enfermedad como, por ejemplo, cuando la

evaluación se realiza sobre frutos. La aplicación del bioinsumo y del patógeno se puede realizar de las siguientes maneras:

- **Aspersión:** la inoculación por aspersión consiste, como su nombre lo indica, en rociar el ingrediente activo (conidios o células) de manera homogénea sobre el sustrato empleado para la evaluación; ya sea en el medio de cultivo o en los frutos. Se debe tener en cuenta el volumen a inocular, la concentración final del inóculo y verificar que la totalidad de la superficie donde se va a realizar la evaluación quede cubierta con la muestra.
- **Inoculación por gota:** para que sea más precisa, la inoculación por gota se puede realizar mediante una micropipeta. En su defecto, se puede emplear una pipeta Pasteur. Al igual que con la inoculación por aspersión, se debe tener en cuenta el volumen, la concentración y que la gota no se vaya a regar o expandir.
- **Inmersión:** la mayoría de los ensayos *in vivo* emplean frutos para determinar la actividad antagonica de un biocontrolador. En estos casos la inoculación del patógeno o el biocontrolador se realiza mediante la inmersión de los frutos durante unos segundos en la suspensión realizada del patógeno o en la suspensión reconstituida del bioproducto. Una vez se deja secar la muestra sobre el fruto se incuban a las condiciones respectivas.

Parámetros de evaluación de la actividad biológica

La capacidad de un patógeno para desarrollar la enfermedad depende de la cepa empleada; las condiciones del cultivo; la edad del cultivo; las dosis seleccionada o recomendada; el sustrato de evaluación; la uniformidad de la forma de inoculación y las condiciones ambientales como humedad, pH, temperatura, entre otras (French, 1982). La separación de los propágulos o células patogénicas a partir de un medio sólido se puede realizar mecánicamente a partir del crecimiento superficial. Para el caso de los hongos, si se requieren solo los conidios, se puede pasar la suspensión del patógeno a través de muselina estéril para retener partes de micelio y dejar pasar solo los conidios. Posteriormente, la concentración de conidios (ya filtrados) se ajusta por recuento en cámara de Neubauer en un microscopio óptico (objetivo 40×). En muchas ocasiones, para el caso de células bacterianas, se puede ajustar la suspensión empleando una escala de referencia de McFarland o haciendo una lectura de la absorbancia en una longitud de onda de recomendada (según el tamaño del microorganismo) (Tan et al., 2013).

En las evaluaciones que implican el uso de un patosistema (frutos, hojas, tallos o pétalos), es indispensable saber cómo diagnosticar y distinguir adecuadamente un signo de un síntoma, así como entre incidencia y severidad. Los signos indican enfermedad por observación directa de un patógeno o sus partes (hifa, conidio, cuerpos fructíferos, entre otros), mientras que los síntomas indican enfermedad por reacción del huésped, que se evidencia por la coloración anormal de los tejidos o por pudrición (Ellis & Boehm, 2008).

En cuanto a la incidencia y severidad; la incidencia hace referencia a la proporción o número de unidades de una muestra u otra población definida (plantas, frutos, hojas) en las que está presente una plaga o fitopatógeno (Convención Internacional de Protección Fitosanitaria [CIPF], 2016). En la mayoría de las evaluaciones la incidencia es expresada como un porcentaje del total del número de muestras infectadas, por lo cual es una variable mucho más fácil y rápida de medir comparada con la severidad. Por otro lado, la severidad es un término utilizado para caracterizar el impacto que tiene el proceso de la enfermedad sobre los tejidos de un individuo (fruto u hoja, por ejemplo). En otras palabras, la severidad hace referencia al área o volumen de tejido afectado y se determina empelando escalas de clasificación del avance de la enfermedad (Seem, 1984).

Aceptación o rechazo de bioinsumo

Si tras una evaluación bajo las indicaciones descritas por la casa comercial o las metodologías estandarizadas por el laboratorio encargado el bioinsumo no cumple con las especificaciones establecidas, el producto se debe rechazar. En caso de existir discrepancias, se debe repetir el ensayo con las muestras reservadas para tal fin (contramuestras).

Material de referencia

Las cepas de referencia son microorganismos viables obtenidos de una colección nacional o internacional. Si las cepas control corresponden a aislamientos propios del investigador, estas deben estar caracterizadas morfológicamente, por pruebas bioquímicas y debidamente identificadas molecularmente. La conservación de estos microorganismos debe garantizar su pureza y estabilidad microbiológica porque son los que se emplean como tratamientos control o de contraste en los ensayos de eficacia. Es indispensable que las cepas empleadas como cepas control cuenten con el certificado de procedencia e identidad.

Metodologías

La evaluación de la actividad antagónica de un microorganismo empleado como ingrediente activo de un bioinsumo tiene como fin proporcionar información confiable acerca de su eficacia. En consecuencia, la elección de un método de ensayo adecuado es crucial, así como la selección de los materiales, los medios de cultivo, el tipo de ensayo, las variables a evaluar y las condiciones ambientales del área donde se va a realizar el ensayo. Se recomienda que la selección del método de evaluación y el análisis estadístico se realice según el microorganismo en estudio.

Para la evaluación de la actividad antagónica se pueden emplear métodos nacionales o internacionales normalizados o métodos internos desarrollados y estandarizados por el laboratorio. Estos deben garantizar resultados confiables en cuanto a equivalencia (unidades de medición) y trazabilidad.

A continuación se describen 13 metodologías —en su mayoría tomadas de bibliografía especializada— que se pueden emplear como modelo para la estandarización de protocolos de evaluación de la actividad antagónica de diferentes agentes de control biológico (bacterias y hongos). Las metodologías descritas a continuación, se seleccionaron para que puedan ser llevadas a cabo bajo condiciones *in vitro*; haciendo uso de cajas de Petri, tubos de ensayo o montaje de patosistemas de evaluación, seleccionando frutos susceptibles (todos bajo condiciones controladas).

Metodología I

Patógeno modelo: *Colletotrichum gloeosporioides*

Biocontrolador: *Levadura* (ej: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Pichia onichys*)

Técnica: *Enfrentamiento*

Se inocula un volumen de 0,5 ml del bioproducto reconstituido en agua y ajustado a una concentración de 1×10^7 células/ml de la levadura en el centro de una caja de Petri que contiene un medio de papa dextrosa agar PDA. Se homogeneiza sobre la superficie del medio con ayuda de un rastrillo estéril. La muestra se deja secar durante aproximadamente 1 hora dentro de una cabina de flujo laminar. El patógeno *C. gloeosporioides* se inocula en el centro de la caja de Petri, para lo cual se toman 0,5 ml de la suspensión ajustada a una concentración de 1×10^5 esporas/ml. Las cajas se incuban a 25 ± 1 °C durante 8 días, periodo después del cual se toman dos

medidas perpendiculares del diámetro de la colonia, las cuales se promedian para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento diametral mediante la ecuación 3.1 (figura 3.3) (Aguirre et al., 2019).

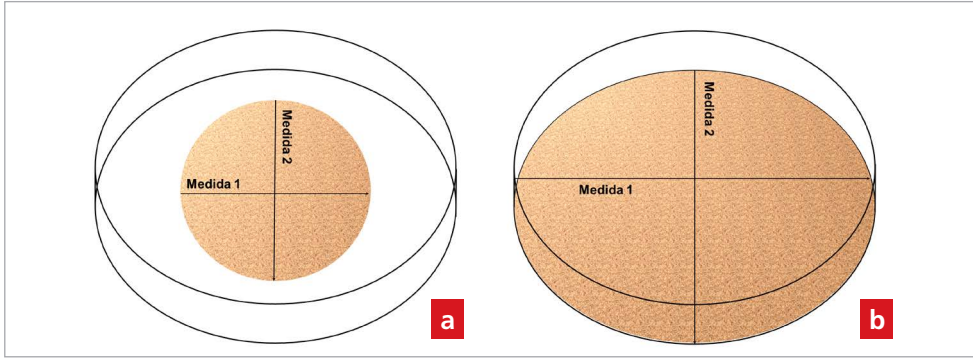


Figura 3.3. Medidas perpendiculares del diámetro de la colonia. a. Enfrentamiento entre el agente biocontrolador y el fitopatógeno; b. Crecimiento del fitopatógeno sin presencia del agente biocontrolador.

Fuente: Elaboración propia

$$\text{Inhibición}(\%) = \left(\frac{DCP - DCE}{DCP} \right) \times 100$$

Ecuación 3.1. Inhibición de crecimiento diametral (%). Elaboración propia.

Donde:

DCP: Diámetro de la colonia del testigo patógeno (mm)

DCE: Diámetro de la colonia del ensayo (mm)

El diseño experimental es completamente al azar. Se debe contar con un tratamiento control que consiste en la inoculación del patógeno sin presencia del bioproducto (levadura) y la inoculación del bioproducto sin inoculación del patógeno *C. gloeosporioides*.

Metodología II

Patógeno modelo: *Thielaviopsis* sp.

Biocontrolador: *Trichoderma asperellum*

Técnica: *Enfrenamiento en suelo*

Para evaluar la eficacia de un bioproducto formulado a base de un hongo como *Trichoderma* spp., se puede emplear la metodología descrita por Wijesinghe et al.

(2011). Para la evaluación se emplean tubos de ensayo estériles de 25 mm de diámetro por 145 mm de longitud y suelo previamente tamizado a través de una malla de 25 cm², seco y con un pH ajustado a 4,6 (el pH puede variar según el patógeno a evaluar y el cultivo al cual va dirigido el producto). Una muestra de 20 g de suelo se introduce dentro de cada tubo de ensayo y se esteriliza por 2 horas seguidas a 15 psi y 120 °C. Finalizado el proceso, el suelo se deja secar a temperatura ambiente.

Para la evaluación de la eficacia, el suelo estéril debe ser inoculado con 2 ml de una suspensión de 1×10^5 conidios/ml de *Thielaviopsis* sp., que se incuban durante 7 días a $28 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$. Se debe verificar la presencia del patógeno en el suelo inoculado mediante la selección de algunos tubos al azar, la evaluación de la viabilidad y la determinación de la concentración mediante la técnica de recuento en placa. Una vez confirmada la presencia del patógeno en el suelo, se adicionan a cada tubo del experimento 10 ml del bioproducto reconstituido siguiendo las indicaciones del fabricante; al final debe verificarse la concentración final del principio activo. Los tubos inoculados se incuban durante 8 semanas a temperatura ambiente (19 °C a 20 °C) y una vez por semana (cada 8 días) se deben adicionar 5 ml de agua destilada estéril a cada uno de los tubos bajo condiciones de esterilidad para mantener la humedad del suelo. La eficacia del producto debe ser evaluada cada semana y expresada como disminución de las UFC del patógeno.

El ensayo debe contar con un control absoluto (suelo inoculado solo con agua), un control del patógeno (suelo inoculado con el patógeno y con 10 ml de agua estéril) y un control del biocontrolador (suelo inoculado solo con el bioproducto, se debe mantener la proporción de los volúmenes finales).

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental constará de un tubo con 3 réplicas y todo el ensayo se repetirá 3 veces en el tiempo.

Metodología III

Patógeno modelo: *Ralstonia solanacearum*

Biocontrolador: *Bacillus* spp. o *Pseudomonas* spp.

Técnica: Spot Test

No son muchas las metodologías empleadas para la evaluación de la eficacia de productos a base de bacterias bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, a continuación se proponen dos metodologías de *Spot Test* para determinar la eficacia de los bioinsumos frente a patógenos como, por ejemplo, *R. solanacearum* u otros (Ge et al., 2017; Ryan et al., 2004; Tan et al., 2013).

En la metodología descrita por Tan et al. (2013), la evaluación se realiza en un medio de agar Luria Bertani (LB) y King B (KB). El bioinsumo, cuyo principio activo es una bacteria, se debe reconstituir siguiendo la metodología descrita por el fabricante; asimismo, el bioinsumo se debe ajustar a una concentración de 1,0 ($OD_{600}=1,0$) empleando una escala de McFarland o un espectrofotómetro (600 – 630 nm). A partir de la muestra reconstituida, se inoculan 2 μ l en el centro de las cajas de Petri que contengan el agar (LB y KB). Las cajas inoculadas con el biocontrolador se incuban durante 36 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalizado el periodo de incubación, se debe evidenciar el crecimiento característico de la bacteria a evaluar sobre las cajas de Petri. Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad se adicionan 2 ml de una suspensión de 1×10^8 células/ml del patógeno, que en este caso corresponde a *R. solanacearum*. Las cajas inoculadas se dejan secar y se incuban nuevamente durante 48 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 3.4).

El ensayo debe contar con un control patógeno (el cual corresponde a las cajas inoculadas solo con la suspensión de *R. solanacearum* sin presencia del agente biocontrolador) y un control positivo (que corresponde a las cajas inoculadas solo con el bioinsumo). Mediante un calibrador digital, la actividad antimicrobiana se determina midiendo el halo de inhibición (mm) formado alrededor de la colonia del agente biocontrolador. La unidad experimental del ensayo corresponde a una caja de Petri. Debe contar con 3 réplicas por tratamiento y 3 repeticiones en el tiempo.

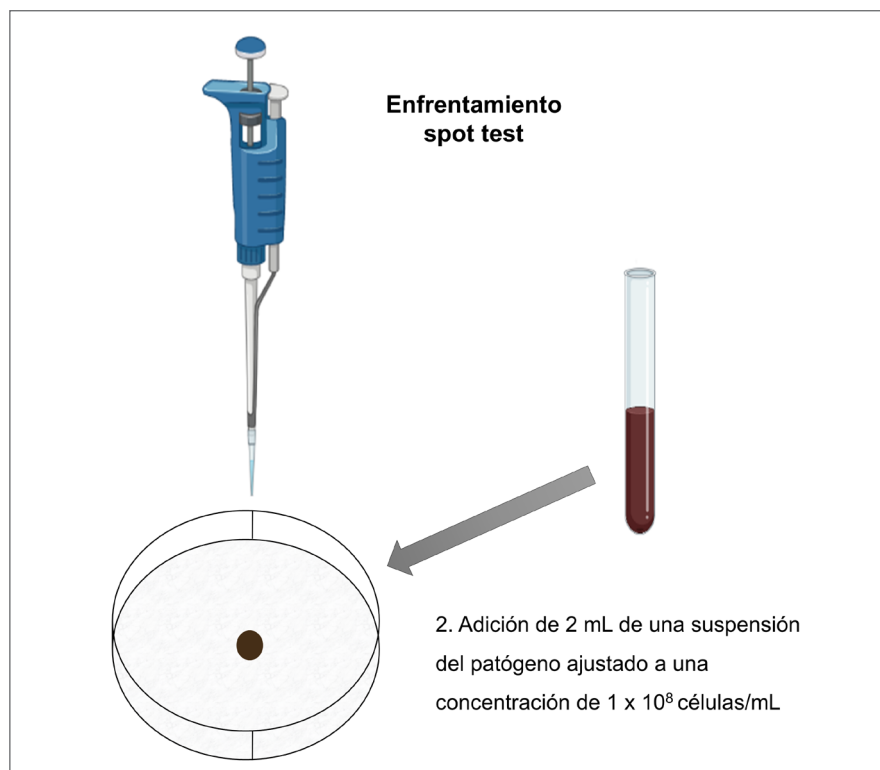


Figura 3.4. Técnica de enfrentamiento entre el agente biocontrolador y la bacteria fitopatógena.

Fuente: Elaboración propia

Otra metodología propuesta para evaluar la eficacia del principio activo de un bioinsumo a base de bacterias es la descrita por Ge et al. (2017), con algunas modificaciones. Al igual que en las metodologías anteriores, el producto debe reconstituirse siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Para este caso, se toman 10 μ l del bioinsumo reconstituido y se inoculan en el centro de una caja de Petri con agar LB. Las cajas inoculadas se incuban durante 24 horas a 30 °C. Finalizado el periodo de incubación se debe verificar el crecimiento característico del agente biocontrolador y, bajo condiciones de esterilidad, se debe adicionar una suspensión del patógeno ajustado a una concentración de 1×10^2 células/ml (menor concentración en comparación con la metodología anterior). Las cajas se incuban nuevamente durante 24 horas a 30 °C $\pm$ 1 °C. El efecto antagonista se determina midiendo el halo de inhibición formado alrededor de la colonia del agente biocontrolador con ayuda de un calibrador digital (figura 3.5).

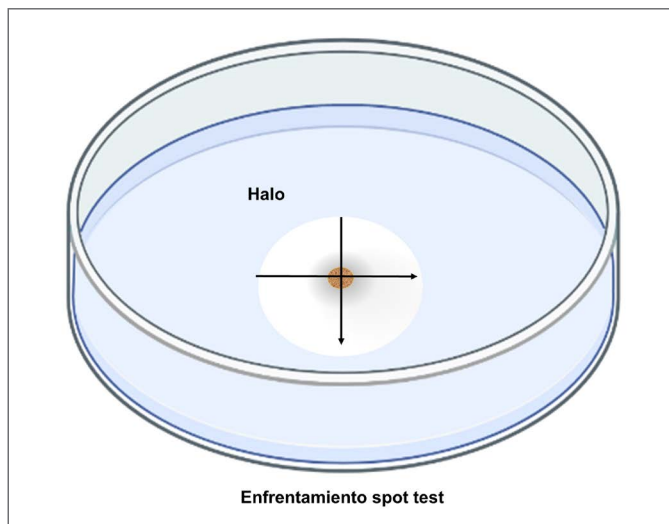


Figura 3.5. Medición del halo de inhibición causado por el enfrentamiento del agente biocontrolador y la bacteria fitopatógena. Se pueden tomar dos medidas perpendiculares y promediarlas.

Fuente: Elaboración propia

La unidad experimental es una caja de Petri. El ensayo cuenta con 3 réplicas y se realiza 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se inocula *R. solanacearum* sin presencia del biocontrolador. Como control positivo se inocula el biocontrolador sin presencia del patógeno.

En la metodología descrita por Ryan et al. (2004) se propone una modificación en la forma de inocular el microorganismo patógeno. Una vez se haya reconstituido el bioinsumo, 10 µl de la muestra se inoculan en el centro de una caja de Petri con Agar LB. Las cajas inoculadas se deben incubar durante 24 o 48 horas (según el agente biocontrolador) a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, y a diferencia de las metodologías descritas anteriormente en este apartado, se deben adicionar sobre el medio LB 15 ml de agar agua semisólido (AASS) de manera tal que cubra la totalidad de la superficie. Una vez se haya gelificado el AASS, se inocula el patógeno sobre toda la superficie del medio mediante la aspersión de una suspensión de 1×10^6 células por ml. Las cajas se incuban nuevamente durante 24 o 48 horas (según corresponda) a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalizado el periodo de incubación, se debe determinar el efecto antagonista midiendo el halo de inhibición formado alrededor de la colonia del agente biocontrolador. El patógeno también se puede inocular mediante el ajuste de la concentración de manera directa en el AASS para, posteriormente, adicionarlo sobre el medio LB inoculado con el biocontrolador.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. Igualmente, se debe contar con controles que validen el crecimiento del microorganismo patógeno, así como el del agente biocontrolador.



Foto: Liz Alejandra Uribe

Figura 3.6. Halo de inhibición causado por el enfrentamiento entre el agente biocontrolador y la bacteria fitopatógena inoculada mediante la adición de agar semisólido.

Metodología IV

Patógeno modelo: *Ralstonia solanacearum*

Biocontrolador: *Pseudomonas aeruginosa*

Técnica: *Difusión en agar*

La metodología de difusión en agar también puede ser empleada para la evaluación de la actividad biológica de un agente de control biológico. En la metodología descrita por Lemessa & Zeller (2007), 100 μl de la suspensión del patógeno, que en este caso es *R. solanacearum* ajustado a 1×10^8 células/ml, se aplican sobre la superficie del medio de cultivo LB. Una vez la muestra esté seca, se abren 4 pozos de 9 mm cada uno sobre la superficie del medio evitando llegar hasta el fondo (se puede servir una capa de medio que sirva como base). En cada pozo se adicionan 30 μl del bioinsumo reconstituido. Las cajas inoculadas se incuban durante 48 horas a 28 °C. La actividad antimicrobiana se evalúa midiendo los halos de inhibición formados

alrededor de las colonias del agente biocontrolador empleando un calibrador digital (Lemessa & Zeller, 2007).

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se debe inocular *R. solanacearum* sin presencia del biocontrolador. Como control positivo se debe inocular el biocontrolador sin presencia del patógeno.

Metodología V

Patógeno modelo: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

Biocontrolador: *Pseudomonas aeruginosa*

Técnica: Inhibición del crecimiento micelial mediante la determinación de peso seco (g)

Con la siguiente metodología se puede evaluar la eficacia de un bioinsumo a base de bacterias para inhibir el crecimiento de un patógeno como *Fusarium* spp. En este caso, en la metodología descrita por Trivedi et al. (2008), se emplea la técnica de enfrentamiento y la eficacia se determina mediante la capacidad de la bacteria de inhibir el crecimiento del patógeno, tomando la medida del peso seco (g) después de un proceso de fermentación en medio líquido. Para esto, se realiza la reconstitución del bioinsumo siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se ajusta a la concentración recomendada. Erlenmeyers de 250 ml que contienen 50 ml de PDA (o el medio recomendado) son inoculados con 1 ml del bioproducto reconstituido (ajustado a la concentración a evaluar) y un disco de agar de PDA de 5 mm con el patógeno crecido. Los Erlenmeyer inoculados son incubados durante 72 horas a 28 °C con agitación continua de 80 rpm. Finalizado el periodo de incubación, el caldo fermentado se pasa a través de papel filtro (No. 1 figura 3.3). Cada papel filtro es secado durante 24 horas a 70 °C y, posteriormente, se toma el dato del peso (g) en una balanza analítica. El porcentaje de inhibición del crecimiento del patógeno se determina empleando la ecuación 3.2.

$$\text{Inhibición(\%)} = \left(\frac{(W1 - Wc) - (W2 - Wc)}{(W1 - Wc)} \right) \times 100$$

Ecuación 3.2. Inhibición (%) para la metodología de crecimiento micelial por peso seco (Trivedi et al., 2008).

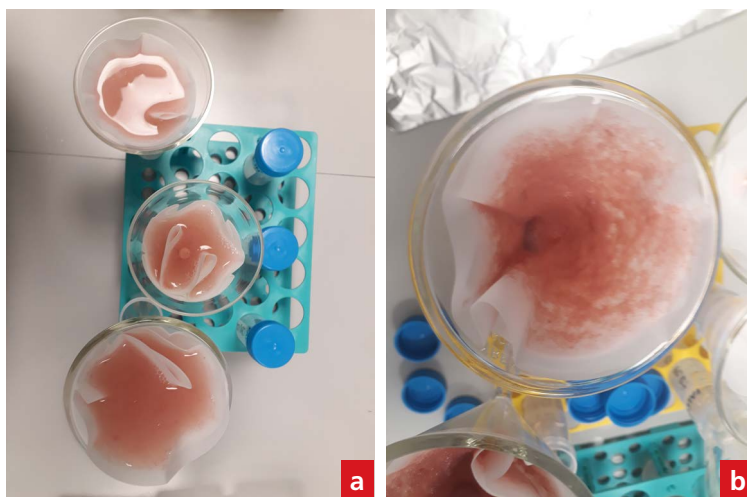
Donde:

W1: Peso seco (g) de tratamientos testigo patógeno

W2: Peso seco (g) del tratamiento inoculado con bacterias

Wc: Peso seco (g) del testigo (agua estéril)

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental consiste en un Erlenmeyer que contiene 50 ml de PDA. El ensayo debe contar con 3 réplicas y debe realizarse 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se debe inocular *Fusarium* spp. (W1) sin presencia del biocontrolador. Como control positivo se debe inocular el biocontrolador sin presencia del patógeno (para verificar viabilidad). Como testigo absoluto (Wc) se debe emplear agua destilada estéril (sin inocular).



Fotos: Liz Alejandra Uribe Gutiérrez

Figura 3.7. Inhibición del crecimiento micelial mediante la determinación de peso seco (g). a. Filtración del medio de fermentación a través de papel Whatman No. 1; b. Obtención de biomasa húmeda.

Metodología VI

Patógeno modelo: *Geotrichum* sp. – *M. fructicola*

Biocontrolador: *Metschnikowia citriensis* – *Pichia membranaefaciens* – *Kloeckera apiculata*

Técnica: *Enfrentamiento*

Para evaluar la eficacia bajo condiciones *in vitro* de un bioinsumo cuyo ingrediente activo sea una levadura, se pueden emplear las metodologías descritas por Wang et al. (2020) y Zhang et al. (2017). Se debe realizar la reconstitución del bioinsumo siguiendo las metodologías descritas por la casa comercial y ajustando la concentración final a 1×10^6 células/ml. Un volumen de 100 μ l de la suspensión de levaduras es asperjado sobre la superficie del medio PDA. La muestra se deja secar durante 1 hora y, posteriormente, un disco de agar de 5 mm de diámetro que evidencie crecimiento micelial del patógeno se ubica en el centro de la caja. Se debe tener en cuenta que el lado que evidencie el crecimiento debe quedar en contacto con el medio de cultivo. Las cajas inoculadas se incuban durante 10 días a 25 °C o 28 °C (según el patógeno a evaluar) y cada dos días se toman dos medidas perpendiculares del diámetro de la colonia. Las dos medidas se promedian y se determina el dato de crecimiento radial en el tiempo (mm/días). El porcentaje de inhibición del crecimiento diametral se determina empleando la ecuación 3.1.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri con Agar PDA. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se inocula *Geotrichum* sp. en medio PDA asperjado con agua destilada estéril (sin presencia del agente biocontrolador). Como control positivo se inocula el biocontrolador sin presencia del patógeno.

Metodología VII

Patógeno modelo: *Monilinia fructicola*

Biocontrolador: *Pichia membranaefaciens* – *Kloeckera apiculata*

Técnica: *Inhibición de la germinación*

Zhang et al. (2017) describe una metodología con modificaciones (Ren et al., 2012) que permite determinar la eficacia de un bioinsumo a base de una levadura para inhibir la germinación de un microorganismo patógeno como, por ejemplo, *M. fructicola*. Para esto, se debe realizar la reconstitución del bioinsumo siguiendo las metodologías descritas por la casa comercial y se debe ajustar a la concentración indicada. Un volumen de 1 ml de la suspensión debe ser inoculado en un Erlenmeyer de 50 ml que contenga 8 ml de caldo papa dextrosa (PDB). Asimismo, un volumen de 1 ml de la suspensión del patógeno ajustado a 5×10^6 conidios/ml debe ser inoculado en el medio que contenga la levadura. Los Erlenmeyer inoculados deben ser incubados durante 72 horas a $25 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ a 80 rpm y cada 24 horas se debe realizar el recuento de 100 conidios germinados y no germinados (por campo óptico) mediante un microscopio óptico con el objetivo 40 $\times$.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental corresponde a un Erlenmeyer que contiene 50 ml de PDB. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. Como testigo patógeno se inocula *Monilia* sp. en medio PDA (sin presencia del agente biocontrolador). Como control positivo se inocula el biocontrolador sin presencia del patógeno.

La eficacia del producto para inhibir la germinación del patógeno se determinará comparando el porcentaje de germinación obtenido en el testigo patógeno con el obtenido en el tratamiento empleando las ecuaciones 3.3 y 3.4 (Ren et al., 2012):

$$\text{Germinación}(\%) = \left(\frac{\text{Conidios germinados}}{\text{Conidios germinados} + \text{Conidios no germinados}} \right) \times 100 \%$$

Ecuación 3.3. Germinación (%) de conidios de hongos filamentosos.

$$\text{Inhibición}(\%) = \left(\frac{\text{GTP}(\%) - \text{GT}(\%)}{\text{GTP}(\%)} \right) \times 100$$

Ecuación 3.4. Germinación (%) de conidios de hongos filamentosos.

Donde:

GTP (%): Germinación en el tratamiento del testigo patógeno (%)

GTC (%): Germinación en el tratamiento (%)

Metodología VIII

Patógeno modelo: *Sclerotinia sclerotiorum*

Biocontrolador: *Trichoderma koningiopsis*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma asperellum*

Técnica: Antagonismo

Para determinar la actividad biocontroladora de agentes microbianos a base de *T. koningiopsis*, *T. harzianum* y *T. asperellum* sobre *S. sclerotiorum* en condiciones *in vitro*, se describe la siguiente metodología estandarizada por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioinsumos de AGROSAVIA. La metodología se fundamenta en la infección de esclerocios de *S. sclerotiorum* para evaluar el efecto biocontrolador a través del micoparasitismo interno y externo de las estructuras del patógeno. Al igual que en los procedimientos descritos en este apartado, todo el procedimiento se realiza bajo condiciones de esterilidad.

Previo al montaje, se debe cultivar el patógeno para la obtención de esclerocios mediante la inoculación de bandejas que contienen cebada estéril. Después de 10 a 15 días de incubación a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ se cosechan los esclerocios y se desinfectan con alcohol al 70 % durante 1 minuto seguido de dos lavados sucesivos con agua destilada estéril y, posteriormente, con hipoclorito de sodio al 2 % durante 20 segundos, seguido de tres lavados sucesivos con agua destilada estéril. Finalmente, los esclerocios se dejan secar sobre toallas de papel y se dejan listos para su uso. Simultáneamente, se humedece suelo previamente tamizado a capacidad de campo y se distribuye en cajas de Petri con 35 g en cada una sin compactar el suelo. Las cajas con suelo deben ser esterilizadas a una temperatura de $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 20 psi durante 15 minutos y, posteriormente, se debe verificar que la humedad del suelo estéril se encuentre entre el 15 % y el 40 % mediante una balanza de humedad.

Para la evaluación antagónica del agente biocontrolador se reconstituye el producto siguiendo las indicaciones de la casa comercial y se ajusta a la concentración recomendada. Un total de 5 esclerocios se ubican sobre el suelo estéril de manera equidistante con ayuda de una pinza. Sobre cada esclerocio se adicionan 550 μl de la suspensión del agente microbial y se le coloca la tapa a la caja de Petri. Las cajas se almacenan durante 8 días a $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalizado el periodo de incubación se determina el número de esclerocios parasitados.

Para validar que los esclerocios hayan sido parasitados por el agente biológico, se determina la viabilidad de los esclerocios del tratamiento control (sin inocular) y los inoculados con el bioinsumo. Para esto, se toman los esclerocios de cada réplica (tres por tratamiento), se desinfectan de la manera descrita anteriormente y se ubican sobre agar agua de manera equidistante. Las cajas con los esclerocios se incuban durante 8 días a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, con ayuda de un estereoscopio se observa el micoparasitismo producido por el agente biocontrolador y se determina el porcentaje de parasitismo empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Parasitismo}(\%) = \left(\frac{a}{b} \right) \times 100$$

Ecuación 3.5. Cálculo de parasitismo expresado en porcentaje (%) (AGROSAVIA, 2019a).

Donde:

a: es el número de esclerocios parasitados por la réplica.

b: es el número total de esclerocios por réplica.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri que contiene suelo. El ensayo debe contar con 3 réplicas y realizarse 3 veces en el tiempo. El testigo patógeno corresponde a los esclerocios desinfectados pero sin inocular con el bioinsumo. Como control positivo se inocula el biocontrolador con una cepa de referencia.

Metodología IX

Patógeno modelo: *Fusarium oxysporum*

Biocontrolador: *Bacillus amyloliquefaciens*

Técnica: Antagonismo

La siguiente metodología permite determinar la actividad biocontroladora de un bioinsumo a base de bacterias como *B. amyloliquefaciens* para el control de hongos patógenos como *Fusarium* spp. El bioinsumo debe reconstituirse siguiendo las indicaciones de la casa comercial y ajustarse a la concentración deseada. Posteriormente, un volumen de 100 µl de la muestra se inocula sobre medio PDA y con ayuda de un rastrillo estéril, la muestra se distribuye sobre toda la superficie del medio y se deja secar bajo condiciones de esterilidad. Un disco de agar de 5 mm o 6 mm con crecimiento del hongo de 8 a 10 días de edad se ubica en el centro de la caja. Las cajas inoculadas se incuban durante 7 a 10 días a 25 °C ± 1 °C y finalizado el periodo de incubación, se toman dos medidas del diámetro de la colonia perpendicularmente con ayuda de un calibrador digital. Para calcular el porcentaje de inhibición se emplea la ecuación 3.6.

$$\text{Inhibición(\%)} = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

Ecuación 3.6. Cálculo de inhibición expresado en porcentaje (%)

Donde:

A es el promedio del crecimiento del tratamiento del testigo patógeno.

B es el promedio de crecimiento del patógeno en interacción con el agente biocontrolador.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es una caja de Petri con agar papa dextrosa. El ensayo debe contar con 3 réplicas y debe realizarse 3 veces en el tiempo. El testigo patógeno corresponde a la inoculación solo

del microorganismo patógeno sin inocular con el bioinsumo. Como control positivo se inocula el biocontrolador con una cepa de referencia.

Metodología X

Patógeno: *Colletotrichum gloeosporioides*

Biocontrolador: *Meyerozyma caribbica*

Patosistema: *Frutos de mango*

Para evaluar la eficacia de bioproductos a base de levaduras, se puede emplear la metodología descrita por Aguirre et al. (2018). Para la evaluación *in vivo* se emplean mangos sanos de tamaño y grado de madurez similar (pulpa firme y cáscara verde con superficie amarilla). Los mangos deben desinfectarse durante 2 minutos sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1,5 %. Posteriormente, se lavan con agua estéril, se retiran residuos de hipoclorito de la superficie de la fruta y se dejan secar a temperatura ambiente. Una vez secos, a cada mango se le realizan dos heridas de 2,5 mm de profundidad y 3 mm de ancho con ayuda de un instrumento cortopunzante estéril. Los frutos con heridas son sumergidos durante 10 minutos en el bioproducto reconstituido en agua destilada estéril y se ajusta a la concentración recomendada por la casa comercial.

Los mangos del tratamiento control son sumergidos únicamente en agua estéril. Todos los mangos se dejan secar durante una hora y, posteriormente, son inoculados adicionado 25 µl de una suspensión de *C. gloeosporioides* en cada herida.

Los mangos inoculados son almacenados durante 15 días dentro de cámaras húmedas a 25 °C ± 1 °C y 80 % de humedad. Cada 3 días se mide la incidencia y severidad de la enfermedad. Para dicho fin se toma la medida del diámetro de la colonia y se define utilizando la ecuación 3.7.

$$\text{Incidencia de la enfermedad (\%)} = \left(\frac{\text{No. de frutos con signos y síntomas}}{\text{Total de frutos evaluados}} \right) \times 100$$

Ecuación 3.7. Incidencia de *C. gloeosporioides*. (Aguirre et al., 2018).

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental es 1 mango con 10 réplicas (10 mangos) y 3 repeticiones en el tiempo. Los tratamientos para evaluar deben incluir: primero, los mangos inoculados con el bioproducto y el patógeno; segundo, los mangos inoculados con el patógeno únicamente; tercero, los

mangos inoculados solo con agua destilada (testigo) y cuarto, los mangos tratados solo con el bioproducto. Si se cuenta con la cepa de referencia se podría incluir en el diseño experimental.

Metodología XI

Patógeno: *Penicillium digitatum*

Biocontrolador: *Pichia guilliermondii* y *Candida oleophila*

Patosistema: Frutos de naranja o limón

Otros procedimientos que permiten evaluar la eficacia de bioproductos a base de levaduras son los descritos por De Corato et al. (2018) y Wang et al. (2020). Estos consisten en seleccionar frutos sanos de tamaño y madurez similar (preferiblemente no tratados con fungicidas). Los frutos seleccionados deben ser lavados con agua de la llave para retirar la suciedad o los residuos de agroquímicos (si han sido tratados). Los frutos se desinfectan sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) ajustado al 0,3 % durante 3 minutos, seguido de tres lavados sucesivos con agua estéril y se dejan secar a temperatura ambiente (19 °C a 20 °C). A los frutos desinfectados se les deben realizar dos heridas opuestas (a cada lado del fruto) de 2 mm de profundidad y 3 mm de longitud sobre el epicarpo con un instrumento cortopunzante estéril. Los frutos secos correspondientes al tratamiento a evaluar se sumergen durante 5 minutos en el bioproducto reconstituido y ajustado a la concentración a evaluar siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Los frutos tratados con el bioproducto se incuban durante 72 horas a 25 °C ± 1 °C y a una humedad de 90 % ± 5 % en un cuarto climatizado o cuarto designado para la elaboración del bioensayo. Posteriormente, cada una de las heridas se inocula con 20 µl de una suspensión de 1 x 10⁵ conidios/ml del patógeno a evaluar, que en este caso corresponde a *P. digitatum*.

Los frutos inoculados se almacenan durante 6 días bajo condiciones controladas, ya sea en el cuarto climático o el cuarto de bioensayos. Finalizado el periodo de incubación se evalúa la presencia de signos o síntomas característicos del patógeno evaluado y se determina el porcentaje de inhibición empleando la ecuación 3.8:

$$\text{Inhibición(\%)} = \left(\frac{\bar{X}_{HIC} - \bar{X}_{HIT}}{\bar{X}_{HIC}} \right) \times 100$$

Ecuación 3.8. Inhibición (%).

Donde:

$\bar{X}$ HIC: Promedio del número de heridas infectadas en los frutos tratados con el patógeno solo.

$\bar{X}$ HIT: Promedio del número de heridas infectadas en los frutos tratados con el bioproducto.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental consta de un fruto con 10 réplicas (10 frutos) y 3 repeticiones en el tiempo. Los tratamientos para evaluar deben incluir: primero, frutos inoculados con el bioproducto y el patógeno; segundo, frutos inoculados con el patógeno únicamente; tercero, frutos inoculados solo con agua destilada (testigo) y cuarto, frutos tratados solo con el bioproducto. Si se cuenta con la cepa de referencia se debe incluir en el diseño experimental.

Metodología XII

Patógeno modelo: *Botrytis cinerea*

Biocontrolador: *Trichoderma harzianum*

Patosistema: *Frutos de manzana*

Batta (2004) describe una metodología para evaluar la eficacia de un producto a base de *T. harzianum* sobre *B. cinerea* mediante frutos de manzana Golden. Con esta metodología, se puede evaluar el efecto preventivo o curativo del bioproducto variando los tiempos de inoculación del microorganismo patógeno.

Para emplear este patosistema, al igual que los anteriores, se seleccionan frutos sanos de tamaño y madurez similar (preferiblemente manzanas maduras). A cada manzana desinfectada se le realizan dos heridas de 2 mm de diámetro y 2 mm de profundidad a cada lado con una herramienta cortopunzante estéril. Las heridas se inoculan con 25 μ l de los tratamientos a evaluar, que en este caso corresponderían a: 25 μ l del bioinsumo reconstituido y ajustado a la concentración indicada según las indicaciones de la etiqueta, 25 μ l de agua destilada estéril (tratamiento control absoluto), 25 μ l del patógeno *B. cinerea* a partir de una concentración de 1×10^6 conidios/ml y 25 μ l del biocontrolador (si se cuenta con la cepa de referencia del principio activo). Se debe tener en cuenta que en la aplicación del biocontrolador y del patógeno se ajustan las concentraciones de 1×10^7 conidios/ml y 1×10^6 conidios/ml respectivamente, pero al inocular las heridas con 25 μ l la concentración baja

2 exponentes, lo cual resulta en un valor de 1×10^5 conidios/ml de *T. harzianum* y 1×10^4 conidios/ml de *B. cinerea*.

Para la evaluación del efecto curativo, la inoculación del patógeno y del bioproducto se realiza al mismo tiempo, mientras que para la evaluación del efecto preventivo, la inoculación del bioproducto se realiza 36 horas antes de la inoculación del patógeno. Las manzanas inoculadas son introducidas dentro de cámaras húmedas tapadas y se ubican en un cuarto de incubación durante 32 días a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ o se organizan dentro de un cuarto de ensayos con temperatura y humedad controlada ($>80\%$) (figura 3.8). Cada 8 días se toma la medida del diámetro de la lesión característica causada por el patógeno, formada alrededor del sitio de inoculación, y 10 días después de la inoculación se observa la producción de esporas sobre la superficie de la fruta.



Foto: Liz Alejandra Uribe Gutiérrez

Figura 3.8. Cámara húmeda de bioensayo. Patosistema: Manzanas inoculadas con *B. cinerea*. Los frutos no están en contacto con la servilleta humedecida con agua estéril.

La eficacia del bioproducto se evalúa determinando el diámetro de la colonia a través del tiempo y el número de conidióforos por lesión, los cuales pueden ser observados empleando un microscópico óptico con un objetivo 40×.

Tabla 3.3. Determinación cualitativa de patogenicidad con base en el número de conidióforos por lesión

Densidad Conidióforos / lesión	Determinación cualitativa	
> 200	Alta	+++
> 50-99	Media	++
< 49	Baja	+
0	No esporulación (Inhibición)	-

Fuente: Elaboración propia

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental del experimento se organiza de la siguiente manera: una manzana con dos heridas. Es decir, el ensayo cuenta con 8 réplicas correspondientes a 8 heridas (4 manzanas) y debe repetirse 3 veces en el tiempo.

Metodología XIII

Patógeno modelo: *Botrytis cinerea*

Biocontrolador: *Trichoderma harzianum*

Patosistema: *Frutos de manzana*

Para evaluar la eficacia de un bioproducto a base de *Trichoderma* spp., Batta (2004) reporta una metodología que permite simular las condiciones naturales de la infección. Para esto emplea el patosistema de frutos de manzana con micro-heridas hechas con ayuda de una aguja estéril (puede ser de jeringa). En esta metodología se seleccionan manzanas de tamaño y madurez similar (manzanas maduras). A cada una de las frutas se les realizan 8 pinchazos distribuidos sobre toda la superficie con ayuda de una aguja estéril. Las frutas heridas son sumergidas durante 30 segundos en los diferentes tratamientos a evaluar correspondientes a: el bioinsumo reconstituido y ajustado a la concentración indicada según las indicaciones de la etiqueta, agua destilada estéril (tratamiento control absoluto) y suspensión del biocontrolador (si se cuenta con la cepa de referencia del principio activo ajustado a 1×10^7 células/ml). Las frutas inoculadas se dejan secar durante 4 horas y, posteriormente, se realiza la inoculación del patógeno *B. cinerea* mediante aspersión sobre la superficie del fruto

de 1,5 ml de una suspensión de 1×10^6 conidios/ml (aproximadamente 3 aspersiones para un volumen final de 1,5 ml).

Las manzanas inoculadas son introducidas dentro de cámaras húmedas tapadas y se ubican en un cuarto de incubación durante 32 días a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ o se organizan dentro de un cuarto de ensayos con temperatura y humedad controlada ($>80\%$). Cada 8 días se toma la medida del diámetro de la lesión característica causada por el patógeno, formada alrededor del sitio de inoculación, y 16 días después de la inoculación se observa la producción de esporas sobre la superficie de la fruta.

La eficacia del bioproducto se evalúa determinando el diámetro de la colonia a través del tiempo y el número de conidióforos por lesión, los cuales pueden ser observados empleando un microscópico óptico con un objetivo 40 $\times$.

El diseño experimental es completamente al azar. La unidad experimental del experimento se organiza de la siguiente manera: una manzana con 8 heridas o pinchazos. Es decir, el ensayo cuenta con 32 réplicas correspondientes a 8 heridas (4 manzanas) y debe repetirse 2 veces en el tiempo.

Caso de estudio

El siguiente caso de estudio corresponde a un ensayo realizado por AGROSAVIA (2019b). En este se estandarizó una metodología para determinar la actividad biocontroladora de un bioinsumo a base de bacilos esporulados mediante la técnica de antagonismo. Los parámetros seleccionados para establecer la validez de la metodología propuesta son el de repetibilidad y reproducibilidad. Se analizaron 5 muestras.

Para esto y de manera independiente, se preparó una suspensión del bioplaguicida a la concentración de 1×10^8 células/ml en una solución de agua suplementada con Tween 80 al 0,1 %. Cada muestra se homogeneizó con un vórtex durante un minuto y, posteriormente, se sembraron por triplicado 100 μl de la suspensión en una caja de Petri con medio PDA. Posteriormente, un fragmento de 0,7 cm de diámetro de *Fusarium* sp. previamente crecido en PDA se ubicó en el centro de cada caja inoculada con el agente biocontrolador teniendo en cuenta que el lado que evidenciara el crecimiento quedara en contacto con el medio de cultivo. Como testigo, se utilizaron cajas de Petri con PDA sin inoculación del agente biocontrolador, a las cuales se les sembró un fragmento de 0,7 cm de diámetro con el hongo.

El tratamiento y el testigo se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 6 días debido a la rapidez de crecimiento del hongo fitopatógeno. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro vertical y horizontal de cada colonia. Posteriormente, se promedió el diámetro de crecimiento y se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la ecuación 3.9:

$$\text{Inhibición}(\%) = \left(\frac{A - B}{B} \right) \times 100$$

Ecuación 3.9. Inhibición (%).

Donde: A corresponde al diámetro de crecimiento del tratamiento control y B al diámetro de crecimiento del hongo en interacción con el agente biocontrolador.

Resultados del caso estudio

A continuación, se describirán los resultados obtenidos empleando la técnica propuesta con dos analistas.

Analista 1

Tabla 3.4. Datos brutos del diámetro de colonia (mm) obtenidos con el analista 1

Tratamientos réplica		Diámetro vertical (mm)	Diámetro horizontal (mm)	Promedio (mm)
Muestra 1	1	15,29	13,97	7,63
	2	13,72	12,86	6,29
	3	12,18	12,56	5,37
Testigo 1	1	67,81	73,04	63,43
	2	56,27	60,78	51,53
	3	57,97	53,18	48,58
Muestra 2	1	13,17	12,52	5,85
	2	14,96	15,49	8,23
	3	12,89	13,48	6,19
Testigo 2	1	60,98	60,26	53,62
	2	62,66	61,28	54,97
	3	51,87	53,95	45,91
Muestra 3	1	13,45	13,56	6,51
	2	12,92	12,73	5,83
	3	12,91	12,89	5,9

(Continuación tabla 3.4)

Tratamientos réplica		Diámetro vertical (mm)	Diámetro horizontal (mm)	Promedio (mm)
Testigo 3	1	54,91	59,17	50,04
	2	57,56	56,48	50,02
	3	63,65	60,43	55,04
Muestra 4	1	11,37	11,56	4,47
	2	12,03	12,02	5,03
	3	11,86	11,91	4,89
Testigo 4	1	60,76	59,42	53,09
	2	60,85	61,84	54,35
	3	51,57	48,19	42,88
Muestra 5	1	11,5	12,6	5,05
	2	15,93	16,69	9,31
	3	13,54	12,92	6,23
Testigo 5	1	64,27	62,02	56,15
	2	60,67	60,84	53,76
	3	60,33	62,89	54,61

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.5. Determinación del porcentaje de inhibición obtenido con el analista 1

Muestra	Réplica	Inhibición
Muestra 1	1	87,97
	2	87,79
	3	88,94
Muestra 2	1	89,09
	2	85,03
	3	86,52
Muestra 3	1	87,00
	2	88,35
	3	89,28
Muestra 4	1	90,48
	2	90,75
	3	88,60
Muestra 5	1	91,00
	2	82,68
	3	88,59

(Continúa)

(Continuación tabla 3.5)

Muestra	Réplica	Inhibición
	Promedio	88,14
	Desviación estándar	2,19
	Coficiente de variación	2,49

Fuente: Elaboración propia

Analista 2

Tabla 3.6. Datos brutos del diámetro de colonia (mm) obtenidos con el analista 2

Tratamientos réplica		Diámetro vertical (mm)	Diámetro horizontal (mm)	Promedio (mm)
Muestra 1	1	11,95	8,31	3,13
	2	9,1	8,61	1,86
	3	11,02	7,96	2,49
Testigo 1	1	53,11	58,77	48,94
	2	61,94	63,77	55,86
	3	44,55	32,97	31,76
Muestra 2	1	10,72	11,73	4,23
	2	11,37	10,71	4,04
	3	11,9	12,02	4,96
Testigo 2	1	61,28	61,27	54,28
	2	63,82	61,97	55,90
	3	57,3	53,17	48,24
Muestra 3	1	11,41	12,28	4,85
	2	10,22	10,84	3,53
	3	15,27	14,12	7,70
Testigo 3	1	64,32	64,11	57,22
	2	64,11	65,1	57,61
	3	46,81	46,83	39,82
Muestra 4	1	12,29	10,85	4,57
	2	12,43	12,09	5,26
	3	13,53	13,91	6,72
Testigo 4	1	69,21	63,24	59,23
	2	63,27	65,98	57,63
	3	64,21	65,32	57,77

(Continúa)

(Continuación tabla 3.6)

Tratamientos réplica		Diámetro vertical (mm)	Diámetro horizontal (mm)	Promedio (mm)
Muestra 5	1	11,48	11,19	4,34
	2	14,39	13,62	7,01
	3	12,56	12,1	5,33
Testigo 5	1	61,74	71,65	59,70
	2	61,66	71,28	59,47
	3	64,23	68,28	59,26

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.7. Determinación del porcentaje de inhibición obtenido con el analista 2

Muestra	Réplica	Inhibición
Muestra 1	1	93,6
	2	96,67
	3	92,15
Muestra 2	1	92,77
	2	92,77
	3	89,71
Muestra 3	1	91,53
	2	93,87
	3	80,67
Muestra 4	1	92,06
	2	90,87
	3	88,36
Muestra 5	1	92,73
	2	88,22
	3	91
	Promedio	91,13
	Desviación estándar	3,61
	Coficiente de variación	3,96

Fuente: Elaboración propia



Fotos: Lisette Torres Torres

Figura 3.9. Inhibición producida por *B. amyloqueliciens* sobre *Fusarium* sp.

Análisis

Los resultados mostraron que en los datos obtenidos con el analista 1 hubo una variabilidad de 2,49 %, mientras que en los datos obtenidos con el analista 2 se registró una variabilidad de 3,96 %, lo que indica que la técnica presenta una alta repetibilidad.

Con respecto a la reproducibilidad, se obtuvo un coeficiente de variación global de 2,11 %, resultado que demuestra la reproducibilidad de la técnica entre los dos analistas y con diferente tiempo de análisis (tabla 3.8).

Tabla 3.8. Determinación del coeficiente de reproducibilidad

Analistas	Promedio Inhibición (%)	Desviación (S / σ)
1	88,14	2,19
2	91,13	3,61
Desviación Sr (repetibilidad)		2,9
Desviación SR (reproducibilidad)	2,11	

Fuente: Elaboración propia

Límite de aceptación: como límite de aceptación se establece para el bioplaguicida a base de *Bacillus amyloqueliciens* un porcentaje de inhibición mayor al 80 %.

En conclusión, las diferentes repeticiones de la técnica presentaron valores similares con coeficientes de variación inferiores al 10 % (límite máximo de aceptación) con

todas las muestras. Por tal razón, se puede concluir que la metodología analítica para determinar la actividad biocontroladora de bioinsumos a base de bacilos esporulados mediante el método de antagonismo es repetible y reproducible en el tiempo.

Perspectivas

- Los criterios biológicos y las consideraciones descritas en este capítulo constituyen una herramienta para la definición, la estandarización y el registro de procedimientos que pueden ser incorporados en la evaluación rutinaria de la eficacia de bioinsumos de uso agrícola para el control de fitopatógenos.
- La selección de las metodologías recopiladas en este capítulo pretende ser una línea base para la normalización de procedimientos que garanticen la correcta evaluación de los bioinsumos que se comercializan en Colombia y el mundo.
- Los resultados obtenidos en cuanto a la eficacia de bioinsumos de uso agrícola para el control de fitopatógenos con las metodologías descritas están alineados con las consideraciones dadas sobre la obtención de resultados confiables y la trazabilidad de estos.

Referencias

- Abd-Elgawad, M. M. (2020). Optimizing biological control agents for controlling nematodes of tomato in Egypt. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(58), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00252-x>
- Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo [Aecid] & Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda [Earth]. (s. f.). *Manejo de plagas y enfermedades*. <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/DocTecnicos/Promes/Pina7.pdf>
- Aguirre, L., Calderón, M., Bautista, P., & Ragazzo, J. (2018). Application of powder formulation of *Meyerozyma caribbica* for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (*Mangifera indica* L.). *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 113(1), 108-271. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108271>
- Alarcón, J., & Jiménez, Y. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (Musa spp.) Medidas para la temporada invernal*. ICA.

- Amaya, C., Biotina, B., Jiménez, S., Uribe, L., Tibasosa, G., Jiménez, H., Nisbet, H., Hume, M., & Rodríguez, F. (2019). *Actividad antimicrobiana de bacteria del Banco de Germoplasma de Microorganismos de AGROSAVIA*. [Póster]. V Bogotá Microbial Meeting BoMM, Bogotá, Colombia.
- Arévalo, E., Díaz, A., Galindo, J., & Rivero, M. (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo de mora (Rubus glaucus Benth) Medidas para la temporada invernal*. ICA.
- Asociación Hortifruticola de Colombia [Asohofrucol] & Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [Corpoica]. (2013). Modelo tecnológico para el cultivo del mango en el Valle del alto Magdalena en el Departamento del Tolima.
- Batta, Y. (2004). Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection*, 23(1), 19-26. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00163-7)
- Cámara de Comercio de Bogotá [CCB]. (2015a). *Manual de tomate de árbol* [Manual]. <https://www.ccb.org.co/content/download/13726/175108/version/1/file/Tomate+de+%C3%A1rbol.pdf>
- Cámara de Comercio de Bogotá [CCB]. (2015b). *Manual Lulo* [Manual]. <http://hdl.handle.net/11520/14317>
- Cano, M. (2013). Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria* spp.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(2), 263-276.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Carbó, A., Torres, R., Usall, J., Fons, E. & Teixidó, N. (2017). Dry formulations of the biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 using fluidised bed drying to control the main postharvest diseases on fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3691-3698. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8229>
- Castaño, J., & Leal, J. (2018). Manejo integrado de la pudrición de raíces del aguacate (*Persea americana* Miller), causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Temas Agrarios*, 23(2), 131-143. <https://doi.org/10.21897/rta.v23i2.1297>
- Castellano, G., Quijada, O., Guanipa, N., Camacho, R., & Fonseca, Y. (2003). Control de la pudrición apical del fruto y secamiento del árbol mediante manejo integral del cultivo del guayabo (*Psidium guajava* L.). *Bioagro*, 15(2), 135-142.

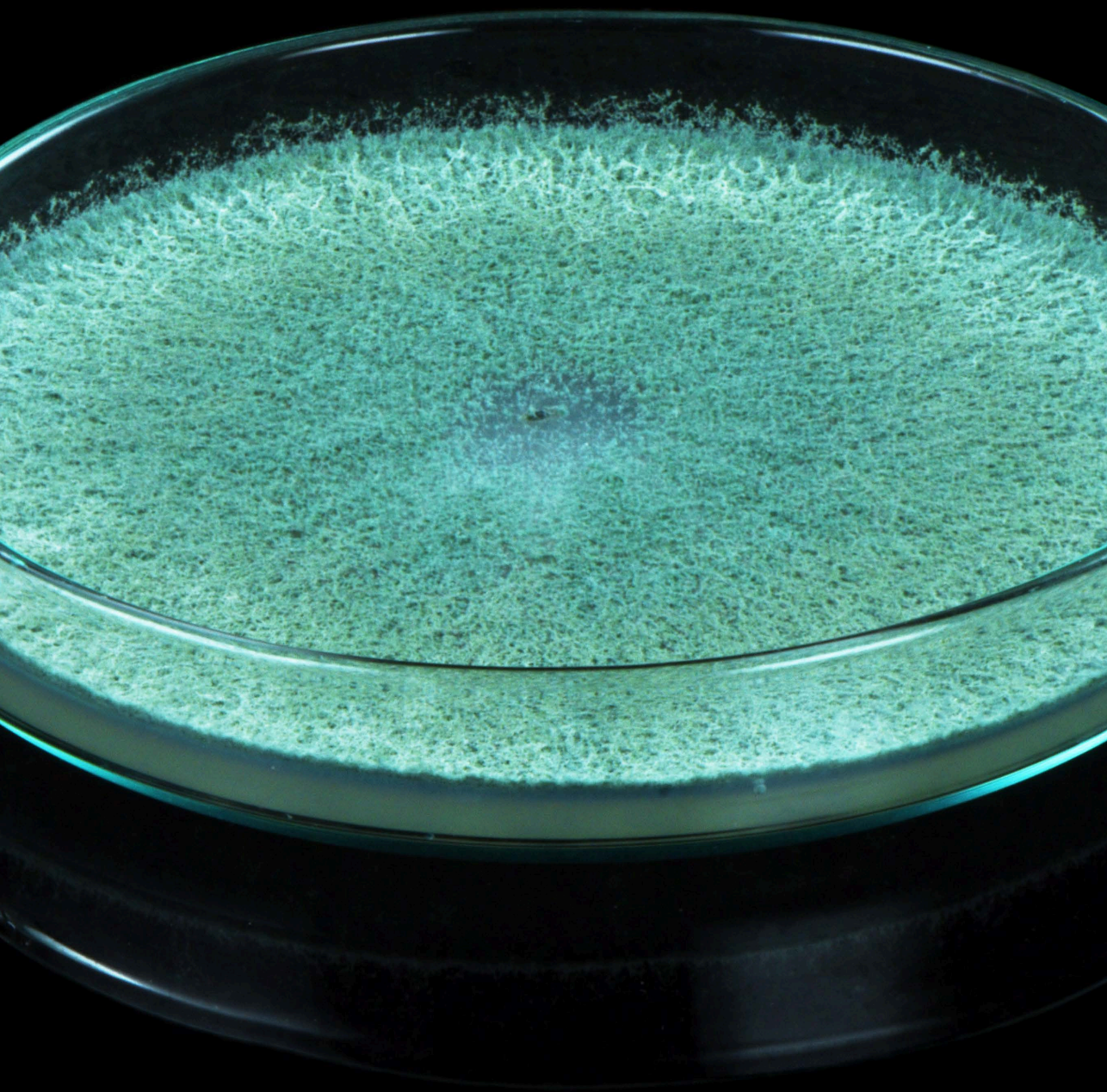
- Convención Internacional de Protección Fitosanitaria [CIPF]. (2016). *Glosario de términos fitosanitarios*. https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/06/ISPM_05_2016_Es_2017-04-24_PostCPM12_InkAmLRG.pdf
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]. (2019a). *Evaluación del antagonismo de agentes microbiales a base de Trichoderma konin-giopsis, Trichoderma harzianum y Trichoderma asperellum contra Sclerotinia sclerotiorum en condiciones “in vitro” - Código GA-R-157*. AGROSAVIA.
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA]. (2019b). *Vinculación de Conocimiento y Tecnología. Determinación de la actividad biocontroladora de bioinsumos a base de bacilos esporulados (método de antagonismo). Formato de Informe de Estandarización - Código VC-F-178*.
- Cotes, A. (2018). El concepto de control biológico y sus premisas fundamentales. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico* (pp. 1-16). AGROSAVIA.
- De Almeida, B., Da Silva, W., Schurt, D., Ishida, A., De Souza, G., & De Lima, K. (2015). Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. *Biological Control* 80(1), 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.011>
- Dean, R., Van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond, K., Di Pietro, A., Spanu, P., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- De Corato, U., Salimbeni, R., De Pretis, A., Avella, N., & Patruno, G. (2018). Use of alginate for extending shelf life in a lyophilized yeast-based formulate in controlling green mould disease on citrus fruit under postharvest condition. *Food Packaging and Shelf Life*, 15(1), 76-86. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.11.006>
- EcuRed. (s. f.). *Enfermedades del cultivo de la papaya*. https://www.ecured.cu/Enfermedades_del_cultivo_de_la_papaya.
- Ellis, S., & Boehm, M. (2008). *Plants get sick too! An introduction to plant diseases. Agriculture and natural resources*. The Ohio State University.
- Ellis, S., Boehm, M., & Mitchell, T. (2008). *Fungal and fungal-like diseases of plants. Fact Sheet (PP401. 07) Agriculture and natural resources*. The Ohio State University.

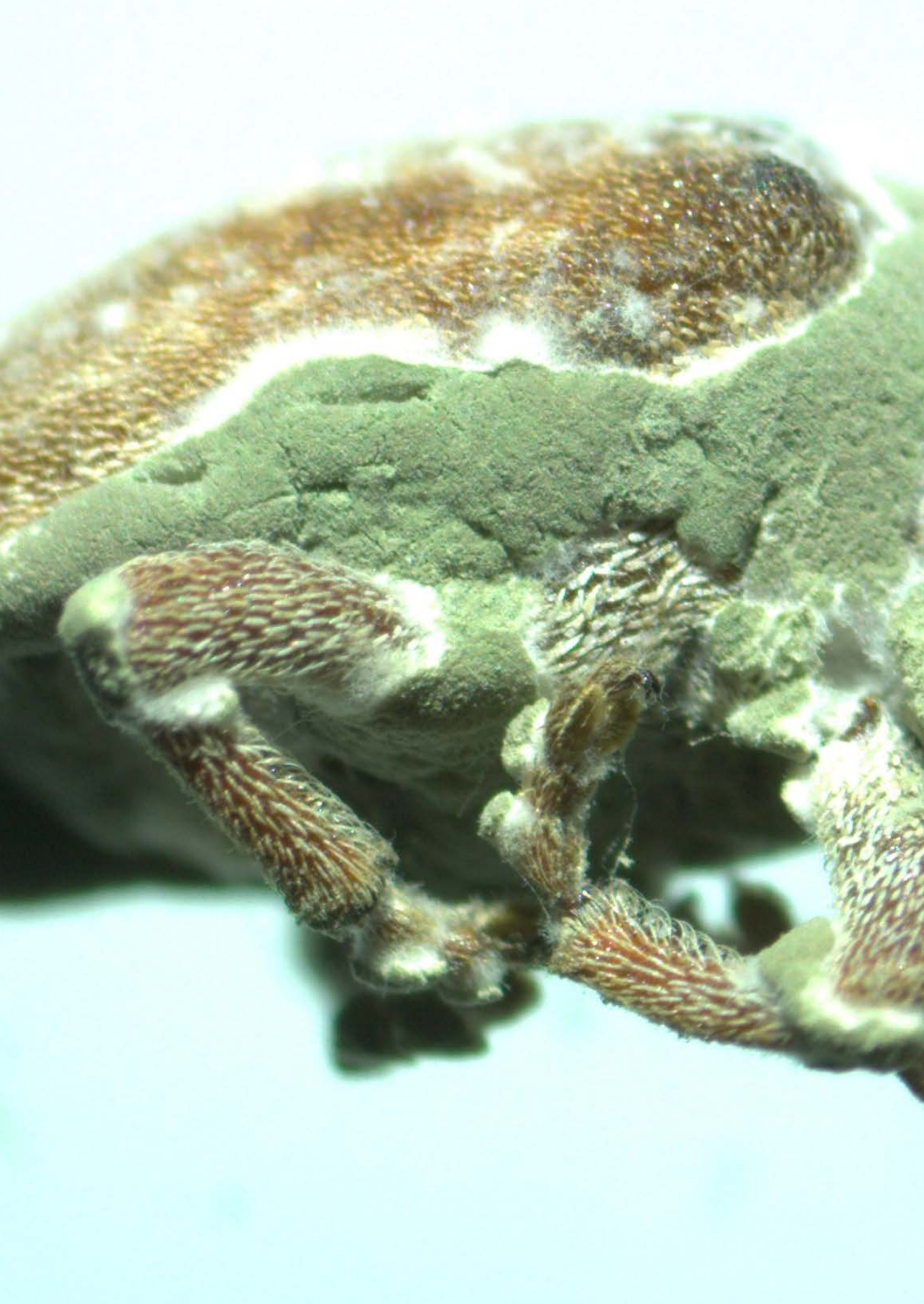
- Falkowski, P., Fenchel, T., & Delong, E. (2008). The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034-1039. <https://doi.org/10.1126/science.1153213>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 285(1), 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- French, E. R. (1982). *Métodos de investigación fitopatológica*. ICA.
- Freudig, B., Hogekamp, S., & Schubert, H. (1999). Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. *Chemical engineering and processing*, 38(1), 525-532. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(99\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(99)00049-5)
- Ge, X., Wei, W., Li, G., Sun, M., Li, H., Wu, J. & Hu, F. (2017). Isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain VIH2 and antagonistic properties against *Ralstonia solanacearum*. *Microbial pathogenesis*, 111(1), 519-526. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.020>
- Gil, J., Sánchez, D., & Osorio, J. (2015). Estudios etiológicos da murcha-do-abacateiro em Antioquia, Colômbia. *Ceres*, 61(1), 50-61. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Glare, T., & Moran, M. (2016). *Microbial-based Biopesticides: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Harekrushna, S., & Kumar, D. (2012). A review on bioremediation. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, 2(1), 13-21.
- Instituto Colombiano Agropecuario [ICA]. (2019). *Productos bioinsumos registrados*. <https://www.ica.gov.co/getdoc/2ad9e987-8f69-4358-b8a9-e6ee6dcc8132/productos-bioinsumos-mayo-13-de-2008.aspx>
- Junior, W., Binati, R., Felis, G., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Torriani, S. (2020). Volatile organic compounds from *Starmerella bacillaris* to control gray mold on apples and modulate cider aroma profile. *Food Microbiology*, 89(1), 103446. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103446>
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J., Judelson, H., Ali, G., Dalio, R. J., Guha, S., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B., Grünwald, N, Shahid, M., Tomé, D., Tör, M., Van Den Ackerveken, G., McDowell, J., Daayf, F., E Fry, W., Lindqvist-Kreuze, H., J. G. Meijer, H., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., R J Birch, P., & Govers, F. (2015). The Top 10 oomycete patho-

- gens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413-434. <https://doi.org/10.1111/mpp.12190>
- Leiva, L. (2018). *Manejo fitosanitario del cultivo de la guayaba (Psidium guajava, L.): medidas para la temporada invernal*. ICA.
- Lemessa, F., & Zeller, W. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological control*, 42(3), 336-344. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.05.014>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153-160. <https://10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Locey, K., & Lennon, J. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5970-5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521291113>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., & Toth, I. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614-629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Montes, S. (2019). Los cultivos que fueron más rentables en 2019 y a los que se apostará en 2020. <https://www.agronegocios.co/agricultura/los-cultivos-que-fueron-mas-rentables-en-2019-y-a-los-que-se-apostara-en-2020-2945365>
- Morgan, C., Herman, N., White, P., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying, a review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Muller, J. A., Stanton, C., Sybesma, W., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. (2010). Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1369-1379. [doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04533.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04533.x)
- Parada, M., & Muñoz, C. (2015). *Bioinsumo de uso agrícola: Potencialidades y Desafío*. <https://agricultureros.com/bioinsumos-de-uso-agricola-potencialidades-y-desafios/>
- Pérez, J. (2018). Screening of a biological control bacterium to fight avocado diseases: from agroecosystem to bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14(1), 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.02.005>

- Ren, X., Kong, Q., Wang, H., Yu, T., Zhou, W., & Zheng, X. (2012). Biocontrol of fungal decay of citrus fruit by *Pichia pastoris* recombinant strains expressing cecropin A. *Food Chemistry*, 131(3), 796-801. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.046>
- Ríos, L., Puentes, Carol., Carabalí, A., Gómez, Y., Becerra, C., & Chávez, L. F. (2019). *Prácticas de manejo sostenible para el cultivo de piña*. AGROSAVIA.
- Rokem, J., Lantz, A., & Nielsen, J. (2007). Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural product reports*, 24(6), 1262-1287. <https://doi.org/10.1039/b617765b>
- Ryan, A., Kinkel, L., & Schottel, J. (2004). Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. *Biocontrol Science and Technology*, 14(3), 301-311. <https://doi.org/10.1080/09583150410001665187>
- Seem, R. (1984). Disease incidence and severity relationships. *Annual Review of Phytopathology*, 22(1), 133-150. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.22.090184.001025>
- Tamayo, P. (2001). *Enfermedades del cultivo del lulo en Colombia: guía de diagnóstico y control*. AGROSAVIA.
- Tan, S., Jiang, Y., Song, S., Huang, J., Ling, N., XU, Y., & Shen, Q. (2013). Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. *Crop Protection*, 43(1), 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.08.003>
- Trivedi, P., Pandey, A., & Palni, L. M. S. (2008). *In vitro* evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research*, 163(3), 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.007>
- Ventura, R., Bautista, S., Flores, G., & Zavaleta, L. (2018). Impact of chitosan based edible coatings functionalized with natural compounds on *Colletotrichum fragariae* development and the quality of strawberries. *Food chemistry*, 262(1), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.063>
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L., & Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 549-556. <https://doi.org/10.1023/A:1020553421740>

- Wang, S., Ruan, C., Yi, L., Deng, L., Yao, S., & Zeng, K. (2020). Biocontrol ability and action mechanism of *Metschnikowia citriensis* against *Geotrichum citri-aurantii* causing sour rot of postharvest citrus fruit. *Food Microbiology*, 87(1), 103375. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103375>
- Wijesinghe, C. J., Wijeratnam, R. W., Samarasekara, J., & Wijesundera, R. (2011). Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). *Crop Protection*, 30(3), 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.11.020>
- Zhang, J., Xie, J., Zhou, Y., Deng, L., Yao, S., & Zeng, K. (2017). Inhibitory effect of *Pichia membranaefaciens* and *Kloeckera apiculata* against *Monilinia fructicola* and their biocontrol ability of brown rot in postharvest plum. *Biological Control*, 114(1), 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.013>





Capítulo IV

Control de calidad de la actividad biológica contra insectos

Lisette Torres Torres

La evaluación de la actividad biológica es, quizá, la herramienta más importante en el control de calidad durante el desarrollo y la producción de un bioplaguicida, la cual involucra la estandarización de bioensayos para determinar su eficacia en condiciones controladas teniendo en cuenta la definición de ciertos criterios.

Además de los controles de calidad microbiológicos y fisicoquímicos que se deben realizar durante las diferentes etapas de desarrollo de un bioplaguicida (incluidos los del producto terminado), se debe evaluar su actividad biológica en condiciones controladas mediante el montaje de bioensayos. Debido al gran número de especies de insectos susceptibles a varios agentes biológicos de control, las metodologías de evaluación de su actividad varían considerablemente (Lacey, 2017). Por tal razón, estas se deben diseñar y estandarizar teniendo en cuenta varios criterios que aseguran la precisión de cada prueba. Estos incluyen los biológicos (Rasenberg, 2011), de evaluación, estadísticos y de aseguramiento de los resultados.

Criterios biológicos

Dentro de los criterios biológicos que se deben tener en cuenta en el control de calidad de un bioplaguicida se encuentran varios aspectos relacionados con el insecto plaga y con el agente de control biológico.

Con relación al insecto plaga

Los insectos constituyen el grupo más dominante de la tierra y han establecido una relación estrecha con el hombre. En algunos casos le han aportado importantes beneficios al ser humano e, incluso, han ocasionado afecciones en su salud y grandes pérdidas económicas, como es el caso de las plagas con importancia agrícola (Borrór et al., 1992).

Ante esta gran diversidad es necesario conocer los hábitos de los insectos plaga, los cuales se relacionan y se determinan por las características de su aparato bucal en diferentes etapas de desarrollo. Es así como existen insectos con comportamiento barrenador, los cuales penetran el ápice de la planta y desarrollan su ciclo dentro de esta de forma total o parcial. Tal es el caso de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), la plaga de mayor importancia económica en el cultivo de la caña de azúcar. En estado larval, este insecto se alimenta dentro de los tallos y construye galerías (Vargas & Gómez, 2005). También existen los insectos de hábitos cortadores en estado larval, como el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (López-Ávila, 1981) y el insecto polífago *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae), conocido comúnmente como “gusano cachón” (Bellotti et al., 1989). Asimismo, se destacan insectos como *Cerotoma tingomariana* (Coleoptera: Chrysomelidae), cuyos adultos se alimentan del follaje y vainas de la soya y sus larvas de hábitos rizófagos afectan las raíces y su nodulación (León & Guevara, 2006). Dentro de las plagas con hábito perforador y minador, se destaca el gusano cogollero del tomate *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Las larvas son capaces de comer todo el mesófilo de la hoja, dejan solo su epidermis; las galerías son superficies más o menos amplias donde a contraluz se puede observar la larva. Adicionalmente, es capaz de perforar el tallo y generar daños en brotes, sobre todo en las inserciones de las hojas o pedúnculos y en aquellos más tiernos. Los frutos pueden ser afectados desde el momento en que comienza el cuajado, antes de la maduración (Hurtado, 2012). Algunos ejemplos de insectos con hábito chupador son las moscas blancas *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Estos insectos fitófagos afectan diferentes especies de plantas, entre

ellas, herbáceas, arbustos, árboles, plantas silvestres y cultivos de importancia económica. En ocasiones estos insectos se convierten en un serio problema debido a daños directos que ocasionan cuando sus ninfas succionan la savia y se convierten en transmisores de virus. También causan daños indirectos por la excreción de sustancias azucaradas, que ocasiona la formación de fumagina en las hojas (Carapia-Ruiz & Castillo-Gutiérrez, 2013) (figura 4.1).

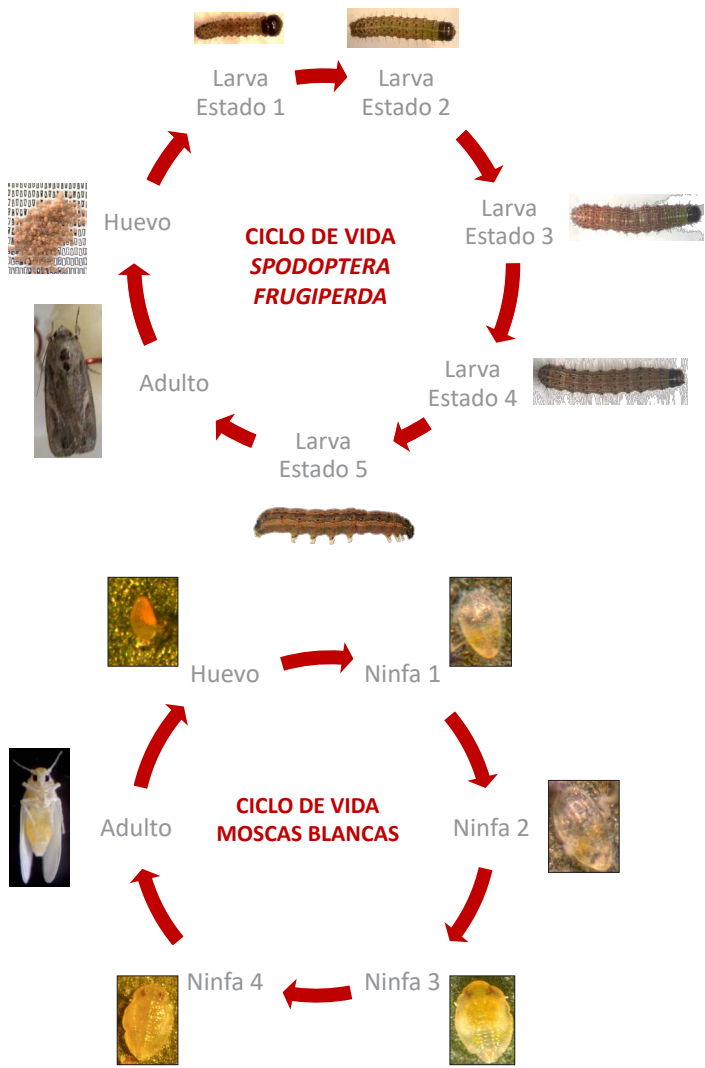


Fotos: Carlos Espinel Correia y Lissette Torres Torres

Figura 4.1. Hábitos de insectos plaga. a. *S. frugiperda*, insecto cortador; b. *Tuta absoluta*, insecto perforador y minador; c. *T. vaporariorum*, insecto chupador.

Además de la identificación de los hábitos del insecto a controlar, es necesario conocer su ciclo de vida, identificar cada estado de desarrollo, su duración y las condiciones medioambientales requeridas. La metamorfosis es un proceso de transformación que ocurre en los insectos durante su desarrollo hasta llegar al estado adulto. Existen insectos que tienen una metamorfosis completa (holometábolos), los cuales pasan por los estados de larva, pupa y adulto. Las larvas de diferente estadio usualmente son iguales en forma, pero difieren en tamaño; no tienen ojos, pueden o no tener patas torácicas y presentan apéndices bucales masticadores. Las alas, cuando están presentes en los adultos, se desarrollan internamente durante el estado

larval y no emergen sino hasta el final de este estado para transformarse en pupa, donde el insecto no se alimenta y permanece inactivo hasta convertirse en adulto. Algunos ejemplos de esta clase de insectos son los lepidópteros y los coleópteros. Por otra parte, existen los insectos con metamorfosis incompleta (hemimetábolos), cuyos estados juveniles o iniciales se denominan ninfas y usualmente son muy similares a los adultos, como es el caso de las moscas blancas y de los ortópteros (Borrór et al., 1992) (figura 4.2).



Fotos: Carlos Espinel Correal

Figura 4.2. Ciclos de vida de los insectos de acuerdo al tipo de metamorfosis. a. Ciclo de vida de un insecto holometábolo; b. Ciclo de vida de un insecto hemimetábolo.

Fuente: Elaboración propia

Una vez se conozca el ciclo de vida del insecto plaga a controlar, sus estados de desarrollo y su impacto en un cultivo específico, es necesario identificar y definir aquel o aquellos más susceptibles al agente biológico de control (hongos, bacterias o virus) a evaluar. Para ello es necesario tener en cuenta los reportes bibliográficos, así como las observaciones que se hagan en campo o durante el proceso experimental.

Los grupos de hongos más importantes usados para el control de plagas son los pertenecientes a la división Entomophthoromycota y al orden Hypocreales. A este último grupo pertenecen los géneros *Lecanicillium*, *Aschersonia*, *Beauveria*, *Isaria* y *Metarhizium*. Dichos géneros afectan diferentes insectos como hemípteros, coleópteros, lepidópteros, ortópteros, formícidos y dípteros en diferentes estados de desarrollo (Lacey, 2017; Marín-Cruz et al., 2017; Malarvannan et al., 2010). Dentro de las bacterias entomopatógenas se destacan el bacilo grampositivo formador de esporas *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae), utilizado para el control de lepidópteros y dípteros y el bacilo gramnegativo no formador de esporas *Serratia entomophila* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae), utilizado para el control del coleóptero *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Lacey, 2017). Con respecto a los virus entomopatógenos, se encuentran las familias Ascoviridae, Iridoviridae y Baculoviridae. Esta última es la más numerosa y ampliamente estudiada, con casos exitosos en el control de lepidópteros, dípteros e himenópteros (Robernann, 2011, citado por Villamizar et al., 2018).

Otro aspecto muy importante que se debe tener en cuenta para la evaluación de la actividad biológica de agentes de control, es la facilidad en la consecución de los insectos blanco en los estados de desarrollo, tiempos, cantidades y frecuencias requeridas. Estos pueden provenir directamente de campo o de crías masivas mantenidas bajo condiciones controladas. En el primer caso, es necesario mantener a los insectos recolectados bajo condiciones de cuarentena mínimo una semana antes del montaje de los bioensayos. De esta manera se garantiza en cierta medida que estos estén libres de patógenos y enfermedades, con lo cual se reduce el riesgo de obtener resultados poco confiables. Por otra parte, la cría masiva de insectos ofrece grandes ventajas, no solo garantiza que estos estén sanos, sino que presenten homogeneidad en sus características morfológicas, fisiológicas y nutricionales; lo cual es ideal en procesos de investigación y análisis rutinarios de control de calidad (Jenkins & Grzywacz, 2000). Sin embargo, cuando la consecución de los insectos blanco es una limitante debido a la dificultad en su recolección en campo o en el establecimiento de crías, se deben diseñar y estandarizar metodologías que incluyan el uso de insectos alternos. Estos deben tener ciclos cortos de desarrollo (Cohen, 2004), deben ser de fácil colecta, se

deben desarrollar en dietas artificiales y las condiciones ambientales para su desarrollo y reproducción deben ser manejables (Portilla & Street, 2006; Cohen, 2004). Adicionalmente, deben ser susceptibles al agente biocontrolador en cuestión (Sewify et al., 2014).

Por citar un ejemplo, *Cerotoma tingomariana* es un insecto plaga de gran impacto económico en el cultivo de soya. Ante esta problemática, el hongo *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) se ha convertido en un candidato promisorio para su control. Sin embargo, debido a que esta plaga está muy asociada al cultivo de soya, el cual es de carácter rotacional (Valencia & Ligarreto, 2010), no se puede garantizar su consecución permanente y suficiente en los momentos requeridos. Además, debido a que no hay una dieta artificial disponible para esta especie de crisomélido que permita su establecimiento en condiciones controladas, para AGROSAVIA surgió la necesidad de evaluar este agente de control sobre insectos alternos, por lo cual se seleccionó a *Chloridea virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) (Torres et al., 2020).

Con relación al agente de control

Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción del agente de control dependen de su naturaleza, es así como los hongos entomopatógenos actúan por contacto con su hospedero, mientras que los virus y las bacterias actúan luego de su ingestión.

La infección natural de un hongo entomopatógeno comienza cuando este entra en contacto con el insecto al transitar por sustratos colonizados. Posteriormente, las unidades infectivas (conidios) se adhieren a la superficie de la cutícula del insecto. Estas germinan y producen el tubo germinal, en cuyo extremo se forma el apresorio. Mediante presión física y producción de enzimas, este penetra la cutícula del insecto a través de sus orificios naturales como las partes bucales, las membranas intersegmentales, los espiráculos o los sitios donde exista una alta humedad (Ferron, 1978). Una vez el hongo llega a la hemolinfa del insecto, los cuerpos hifales producen blastosporas para colonizar al hospedero y aprovechar sus nutrientes. Adicionalmente, secretan proteínas y metabolitos secundarios para evadir la respuesta inmune del insecto, hasta que este muere por la combinación de tres factores: el daño mecánico, la desnutrición y la acción de metabolitos secundarios o toxinas (Gillespie & Claydon, 1989). El hongo termina por colonizar el insecto, posteriormente las hifas emergen de este y se forman células conidiógenas que producen la esporulación

sobre el hospedero si las condiciones son favorables. De esta manera, el hongo se disemina y permite la posterior infección de otros individuos (Alatorre-Rosas, 2007; Kachatourians, 1991) (figura 4.3).

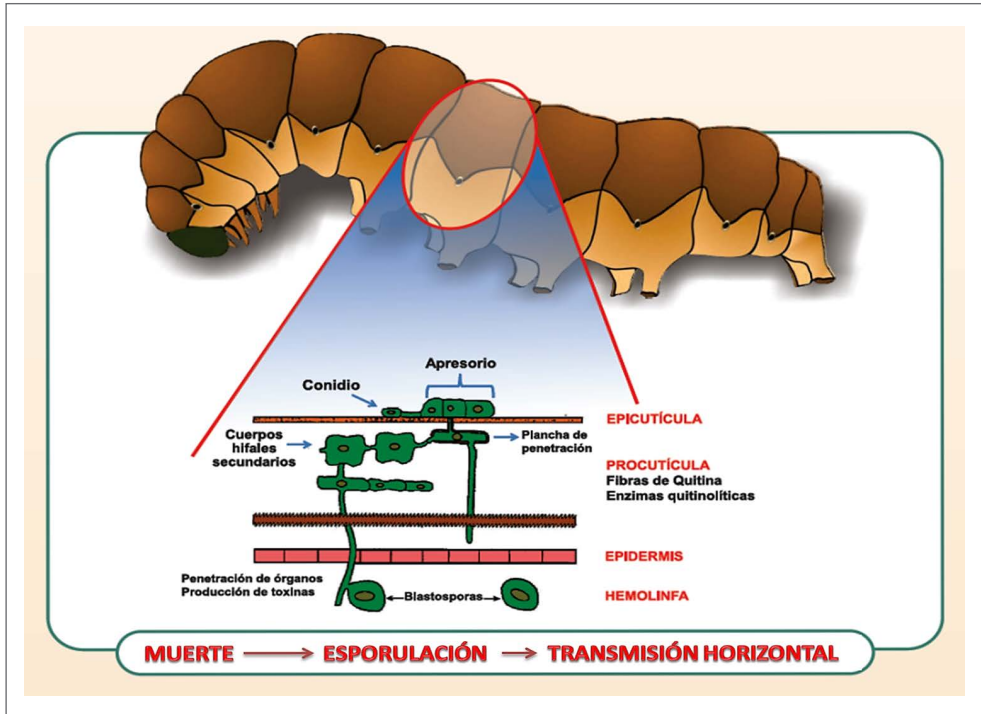
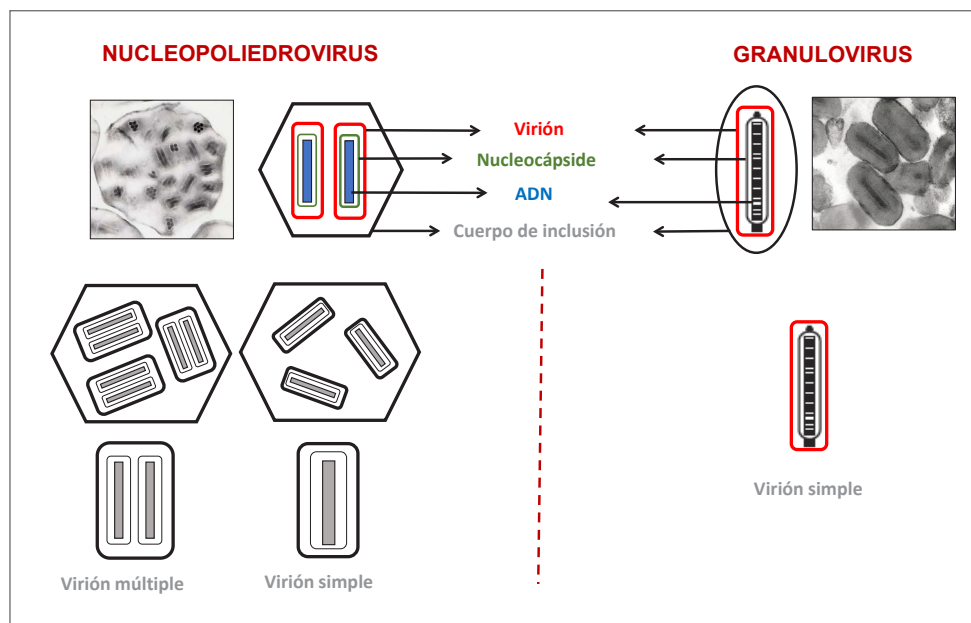


Figura 4.3. Esquema del mecanismo de acción de un hongo entomopatógeno.

Fuente: Grupo de Control Biológico de Insectos de AGROSAVIA

Dentro de los virus patógenos de insectos se destaca la familia Baculoviridae, que se caracteriza por tener una molécula de ADN circular envuelta en una capa de proteínas llamada nucleocápside, que junto con otros componentes proteicos forman el virión (partícula infectiva). Los viriones tienen forma de bastón y están inmersos en una matriz proteica que forma el cuerpo de inclusión (CI) (Erlandson, 2009). Estos últimos pueden ser de forma poliédrica o irregular y están constituidos por una matriz proteica de poliedrina, principalmente. Asimismo, poseen múltiples viriones que, a su vez, pueden contener una o varias nucleocápsides como los Nucleopoliedrovirus. Por otra parte, los Granulovirus se caracterizan por su forma granular y los cuerpos de inclusión pequeños, constituidos por una proteína mayoritaria denominada granulina (Caballero et al., 2001) (figura 4.4).



Fotos: Gloria Barrera Cubillos

Figura 4.4. Estructura de un nucleopoliedrovirus y un granulovirus.

Fuente: Elaboración propia con base en Barrera (2013)

El ciclo de infección de los baculovirus inicia cuando los cuerpos de inclusión son consumidos por las larvas del insecto blanco. Posteriormente, estos se disuelven en el intestino medio del insecto debido a su pH alcalino, donde se solubilizan las proteínas y se liberan los viriones que atraviesan la membrana peritrófica del intestino. Estos se fusionan con las microvellosidades de las células epiteliales e ingresan posteriormente a las células, donde liberan sus nucleocápsides (infección primaria), las cuales se dirigen hacia el núcleo donde se produce la transcripción genética y originan una nueva progenie viral (Rohrmann, 2013; Caballero et al., 2001). Las nuevas nucleocápsides atraviesan la membrana celular y adquieren de esta una envoltura, para luego brotar al exterior de la célula en forma de viriones brotados (infección secundaria). Estos viriones circulan por la hemolinfa e infectan otros tejidos y órganos. Hacia el final de la infección, se da la oclusión o encapsulación de las nucleocápsides en una matriz proteica de poliedrina o granulina para formar nuevamente los cuerpos de inclusión. Finalmente, la larva muere y se puede presentar la ruptura de su tegumento, con lo cual se liberan los cuerpos de inclusión e inicia un nuevo ciclo de infección (Rohrmann, 2013; Villamizar, 2018) (figura 4.5).

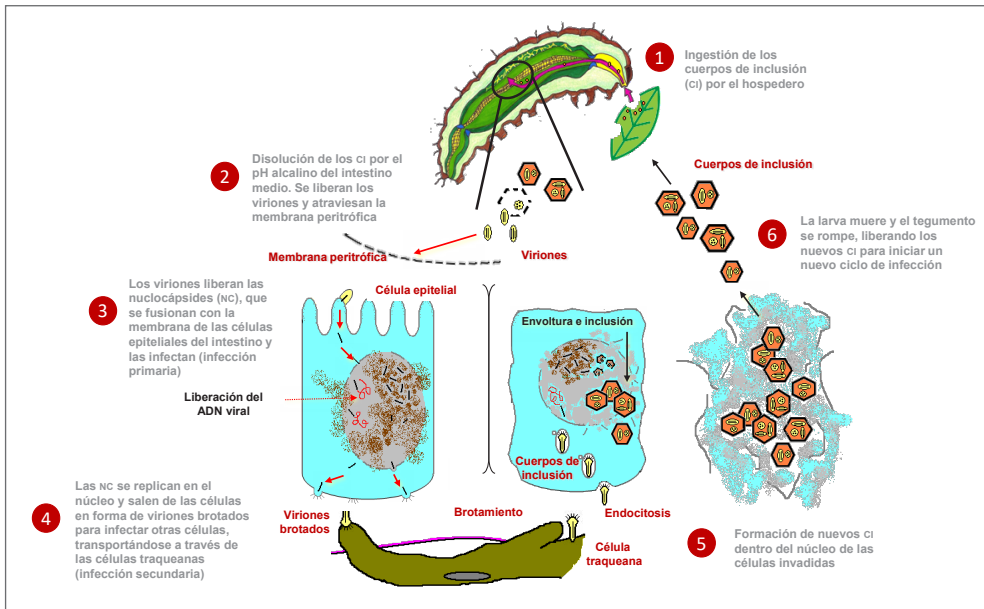


Figura 4.5. Ciclo de infección de los baculovirus.

Fuente: Elaboración propia con base en Espinel-Correal (2010)

Dentro de las bacterias entomopatógenas, se destacan las grampositivas, las cuales tienen la capacidad de formar esporas de resistencia frente a condiciones adversas. Adicionalmente, son capaces de producir toxinas que destruyen el epitelio intestinal para favorecer el paso de la bacteria a la hemolinfa, donde se divide y esporula, lo cual provoca septicemia y la muerte del insecto. Tal es el caso de *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae: Bacillus), cuyas cepas, en su gran mayoría, son capaces de producir cristales proteicos parasporales. Estos están compuestos por una o varias toxinas (δ endotoxinas como las toxinas *Cry* y las *Cyt*) que tienen efecto letal sobre lepidópteros, dípteros y coleópteros, así como sobre ácaros, nematodos y protozoos (Jisha et al., 2013).

El mecanismo de acción inicia cuando el insecto ingiere el cristal, cuyas toxinas *Cry* se expresan como protoxinas. Posteriormente, estas se someten a un proceso proteolítico en el intestino del insecto debido a sus condiciones alcalinas, lo cual produce la liberación de la toxina activada. Se ha reportado que tanto las protoxinas como las toxinas activas, son capaces de interactuar con los receptores intestinales de la membrana apical del epitelio del intestino medio, asunto que favorece el proceso de oligomerización y la formación de poros (Soberon et al., 2016). Finalmente, se genera la muerte celular por una interacción entre el flujo de iones de la toxina *Cry* y el agua (impacto osmótico) (Endo et al., citado por Grijalba et al., 2018). La muerte

de las células del intestino produce una desintegración del epitelio, lo cual permite la entrada de las bacterias a la hemolinfa y causa la muerte del insecto por septicemia (Raymond et al., citado por Grijalba, 2018) (figura 4.6).

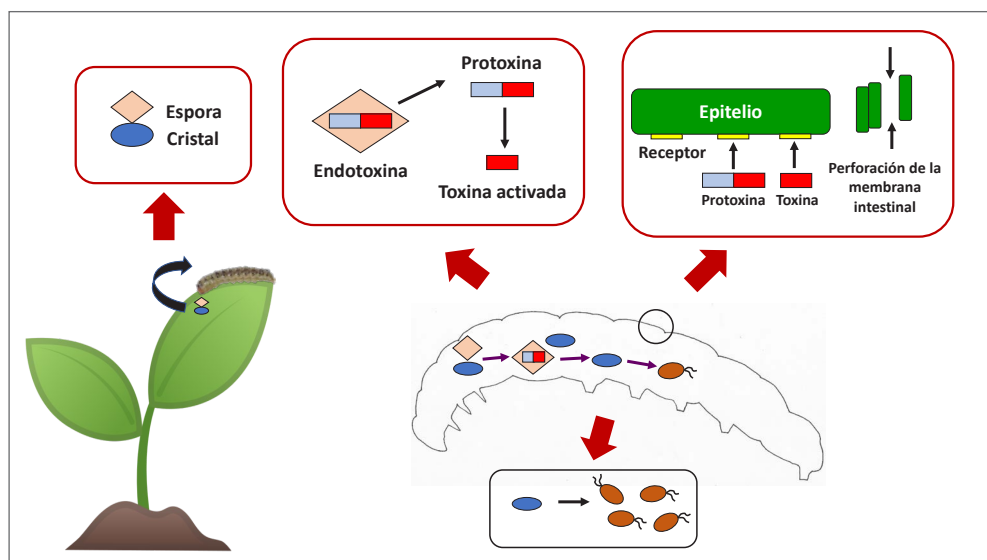


Figura 4.6. Ciclo de infección de *Bacillus thuringiensis*.

Fuente: Elaboración propia

Estructuras de infección y su formulación

El desarrollo de un micoplaguicida involucra la producción masiva y la formulación de propágulos infectivos que pueden incluir conidios, blastosporas, micelio y microesclerocios, cuya selección debe tener en cuenta diferentes factores. Estos involucran el uso que se tiene proyectado del inóculo en cuestión, su virulencia, su tolerancia a la desecación, su tolerancia térmica, su velocidad de germinación e infección, su estabilidad a las condiciones ambientales, su reproducción y tolerancia a los rayos UV, así como otros factores inherentes al hongo seleccionado que lo produce, como es el caso de su estabilidad genética (Lacey, 2017).

Los conidios aéreos son producidos principalmente en sustratos sólidos de fermentación, donde se da una colonización fúngica sobre un sustrato nutritivo sólido y estéril (López-Pérez et al., 2015). Este, generalmente, está constituido por granos de cereales (arroz, cebada, centeno, trigo, maíz) que favorecen el crecimiento vegetativo y la esporulación del hongo. Otro tipo de fermentación es la líquida, la cual incluye dos categorías: la fermentación líquida sumergida, en la cual el hongo se sumerge en

un medio líquido aireado con agitación constante para la obtención de blastosporas, conidos sumergidos (formados por conidiación microcíclica a partir de blastosporas) y microesclerocios. Por otra parte, está la fermentación líquida estacionaria, de la cual se obtienen el micelio y los conidios aéreos (Lacey, 2017).

Las formulaciones de bioplaguicidas deben cumplir con una serie de requisitos que garanticen su eficacia. Los propágulos infectivos deben mantenerse inactivos pero vivos durante su almacenamiento antes de su uso y luego de su aplicación sobre el sustrato tratado (suelo, material vegetal e infraestructura). Estos deben suspenderse fácilmente en un vehículo principalmente acuoso y su comportamiento y actividad no deben afectarse por los adyuvantes (excipientes de formulación) ni por las condiciones ambientales a las cuales están expuestos (Lacey, 2017).

Los propágulos fúngicos deben ser incorporados dentro de la formulación con agentes humectantes y de suspensión, dispersantes, antiespumantes, emulsificantes y asperjantes. Teniendo en cuenta el uso del bioplaguicida, se pueden desarrollar formulaciones acuosas, oleosas como las suspensiones emulsificables (OD) o sólidas que incluyen granulados (G), granulados dispersables en agua (WDG), polvos de contacto (CP), polvos humectables (WP), cebos y espumas (Lacey, 2017) (ver capítulo 2).

La producción masiva de baculovirus se realiza *in vivo*, principalmente, infectando de manera artificial el insecto blanco y posteriormente aislando y purificando los cuerpos de inclusión para su formulación. Otra metodología alterna de producción es el uso de líneas celulares específicas de insectos, la cual es costosa, riesgosa y no siempre exitosa (Lacey, 2012). La mayoría de los bioplaguicidas a base de baculovirus son formulaciones líquidas constituidas como suspensiones concentradas. Sin embargo, las formulaciones sólidas pueden ser aplicadas en seco como polvos o pueden ser asperjadas en agua como polvos humectables o granulados. La aplicación de polvo es poco común y se usa, generalmente, para la aplicación en postcosecha o en productos almacenados; tal es el caso del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV para el control de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Lacey, 2017; Gómez et al., 2009).

Asimismo, la producción de bacterias entomopatógenas también puede realizarse *in vivo*, mediante la inoculación de insectos sanos. Tal es el caso del bacilo *Paenibacillus popilliae* (Bacillales: Paenibacillaceae) para el control del escarabajo japonés *Popillia japonica* (Coleoptera: Ritelidae), en el cual larvas sanas son inyectadas con una suspensión del patógeno para la posterior obtención de esporas (Fleming, 1968;

citado por Lacey, 2017). Adicionalmente, también se pueden obtener propágulos bacterianos (expresados como número de UFC o concentración de esporas o cristales) mediante su producción sobre sustratos sólidos de fermentación o fermentación líquida. Este último es el método de producción masiva más común de bacterias para el desarrollo de bioplaguicidas (Lacey, 2017).

Concentración de aplicación

Para el control de calidad de la actividad biológica de un agente microbiano (mortalidad), es necesario tener en cuenta la concentración de la aplicación recomendada por el fabricante. Esta se determina con antelación mediante estudios de la concentración y el tiempo letal medio, principalmente (CL_{50} y TL_{50}).

Las concentraciones de los bioplaguicidas, generalmente, se expresan como estructuras de infección (conidos, esporas, blastosporas, células, cuerpos de inclusión, entre otros) por unidad de masa (gramo o kilogramo) o de volumen (mililitro o litro). Es así como a partir de la concentración del producto se debe ajustar la concentración de la aplicación recomendada mediante la realización de diluciones seriadas utilizando diferentes diluyentes como agua, fosfato tampón, solución salina o Tween (Lacey, 2012).

Generalmente, se realizan diluciones decimales (1/10). Para ello se añade 1 ml o 1 g de la muestra (bioplaguicida) a 9 ml de diluyente (ecuación 4.1) (ver capítulo 1).

$$\text{Dilución } \frac{1}{10} = \frac{1 \text{ ml o g de la muestra}}{1 \text{ ml o g de la muestra} + 9 \text{ ml de diluyente}} \quad 10 \text{ ml de dilución } \frac{1}{10} \text{ o } 10^{-1}$$

Ecuación 4.1. Cálculo de la dilución 1/10 (Arana et al., s. f.)

Criterios de evaluación

Una vez reconocidos los criterios biológicos mencionados anteriormente, es necesario definir las condiciones en las cuales se va a realizar el bioensayo de evaluación de la actividad biológica del bioplaguicida, las cuales incluyen las condiciones físicas y ambientales, los sistemas de aplicación, el montaje de la unidad experimental, la identificación de los síntomas y signos de infección y los materiales de referencia.

Condiciones físicas y ambientales

Dependiendo de las características del ensayo, así como de los componentes a evaluar en el control de calidad del bioplaguicida en cuestión, este se puede realizar en condiciones de laboratorio o bajo condiciones de invernadero. En ambos casos, se deben controlar las condiciones que puedan influir negativamente en los resultados e identificar con antelación los riesgos potenciales.

Dentro de las condiciones que requieren especial control están la temperatura, la humedad o el fotoperiodo, las cuales se deben ajustar de manera previa al montaje del bioensayo. Posteriormente, se debe hacer su seguimiento durante todo el tiempo que dure la evaluación mediante el registro diario mínimo en la mañana y en la tarde de tales condiciones.

La definición de los rangos para cada una de las condiciones ambientales requeridas dependerá de lo reportado en la literatura y de las observaciones experimentales realizadas durante el proceso de estandarización de la metodología. Adicionalmente, el cumplimiento de los rangos establecidos determinará la aceptación o el rechazo de la evaluación, en caso de considerarse críticos.

Sistemas de aplicación

Existen dos sistemas de aplicación del agente de control sobre el insecto blanco: el directo y el indirecto. En el primero, la aplicación se realiza sobre o dentro del insecto y en el segundo sobre el sustrato de alimentación.

La aplicación directa se puede realizar mediante la aspersión de una suspensión del agente de control sobre el insecto a la concentración indicada, mediante un atomizador, aerógrafo o nebulizador. En este caso es necesario establecer con antelación la distancia, la presión (si aplica), el volumen y la cobertura de la aplicación para garantizar que esta sea suficiente, homogénea y no afecte negativamente al insecto o incluso su alimento (figura 4.7).



Fotos: Lissette Torres Torres

Figura 4.7. Aplicación directa por aspersión del agente de control sobre el insecto blanco. a. Aspersión con atomizador de *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Cordycipitaceae) sobre adultos de *Cerotoma tingo-mariana* (Coleoptera: Chrysomelidae); b. Aspersión con aerógrafo de *Lecanicillium lecanii* (Ascomycota: Cordycipitaceae) sobre ninfas de *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae).

Por otra parte, está la aplicación por inmersión, en la cual y, como su nombre lo indica, el insecto se sumerge en un volumen específico de la suspensión del agente de control por un tiempo determinado, de tal manera que se garantice la adherencia de los propágulos infectivos al cuerpo del insecto tratado, así como la supervivencia de éste luego de su inmersión. En este tipo de aplicación, se debe definir con precisión el estado de desarrollo indicado, de tal forma que sea susceptible al agente de control pero no al método de aplicación (figura 4.8).

Otra forma de aplicación directa es la que se hace de manera tópica sobre una parte específica del cuerpo del insecto. Tal es el caso de la metodología reportada por Espinel-Correal et al. (1998) para evaluar la actividad biocontroladora de *M. anisopliae* sobre ninfas y adultos de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn) (Orthoptera: Acrididae), en la cual se aplican 20 μ l de una suspensión del hongo entomopatógeno sobre el pronoto del insecto con una micropipeta (figura 4.9).



Fotos: Fotos: Lisette Torres Torres

Figura 4.8. Aplicación directa por inmersión de larvas de *Diatraea saccharalis* de seis días de edad en una suspensión de conidios de *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae).



Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.9. Aplicación *M. anisopliae* sobre el pronoto de una ninfa de *R. schistocercoides*.

Una forma directa de evaluar la actividad biológica de virus entomopatógenos es mediante su ingestión. Según reportes de diferentes autores, una suspensión viral se puede mezclar con una solución de sacarosa y colorante azul de alimentos; de esta manera es posible evidenciar de manera visual la ingestión del virus debido a la pigmentación que adquiere la larva luego de beberla. Un ejemplo de esta metodología es la reportada por Hughes & Wood (1980), cuando evaluaron tres aislamientos del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* y uno del nucleopoliedrovirus de *Heliothis zea* sobre larvas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Por otra parte, Gómez et al. (2010) utilizaron esta misma metodología para evaluar el nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (SfNPV) sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (figura 4.10).



Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.10. Ingestión de la suspensión viral de una larva neonata de *S. frugiperda*.

La inyección directa del agente de control dentro del cuerpo del insecto es otra forma de aplicación que, si bien no es muy usada en el control de calidad rutinario de agentes biológicos de control, se lleva a cabo en la producción masiva, especialmente de bacterias entomopatógenas. Dutky (1942) citado por Koppenhöfer et al. (2012), reportó un método en el cual una suspensión de esporas del bacilo *P. popilliae* de concentración conocida, es inyectada en larvas de *P. japonica*. Para ello se usa una jeringa hipodérmica con una aguja de calibre 27-30, acoplada a un sistema de microinyección manual o motorizado, que inyecta la suspensión en la región dorsal del insecto entre el segundo y tercer segmento abdominal posterior. Se debe prestar especial atención a que la aguja entre horizontalmente para evitar perforar el intestino (figura 4.11).

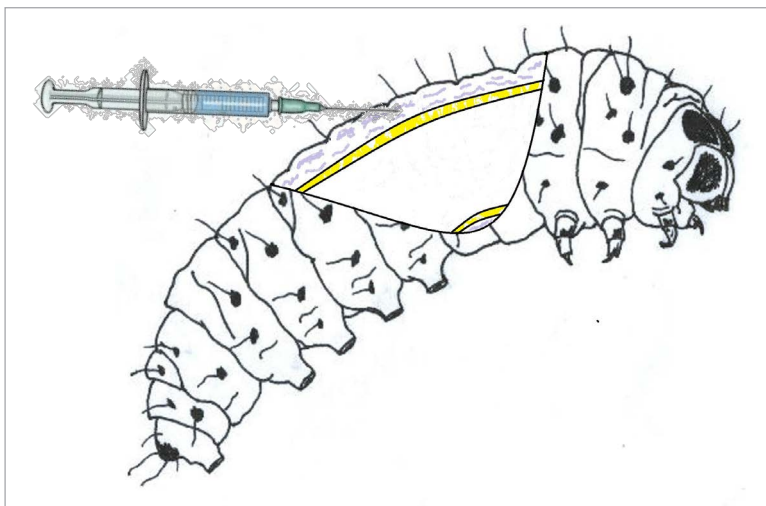


Figura 4.11. Aplicación del agente de control por inyección directa.

Fuente: Elaboración propia

Por otra parte, esta misma metodología de aplicación se ha utilizado como alternativa a los cultivos celulares de insectos en biorreactores para producir proteínas recombinantes a partir de larvas infectadas con vectores derivados de nucleopoliedrovirus múltiples. Tal es el caso del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) sobre *Trichoplusia ni*, cuyas larvas pueden ser inyectadas con vectores de baculovirus negativos a la poliedrina (Polh -) debido a la falta de la infectividad oral de estos virus (Guijarro-Pardo et al., 2017).

La aplicación indirecta del agente de control generalmente se hace asperjando una suspensión o espolvoreando una formulación sólida (especialmente polvos) de este sobre el sustrato de alimentación, que puede ser dieta natural o artificial. Por citar algunos casos, está la aspersión con atomizador de suspensiones virales sobre hojas de yuca para evaluar la actividad biocontroladora de un granulovirus sobre larvas del gusano cachón *E. ello* (Barrera et al. 2014). Así como también la aspersión con nebulizador del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) sobre hojas de tomate *Solanum lycopersicum* (Solanales: Solanaceae) para evaluar su actividad biológica sobre larvas de *T. absoluta* (Gómez et al., 2017) (figura 4.12).

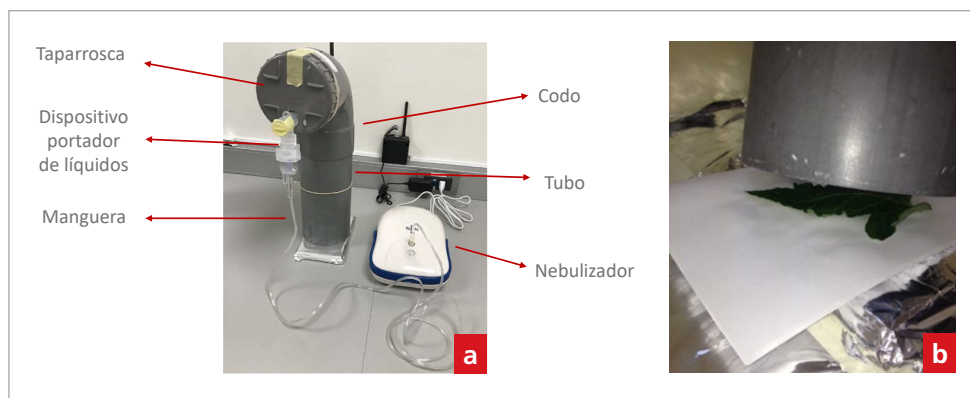


Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.12. Aplicación por aspersión de un agente biológico. a. Equipo de nebulización para la aplicación suspensiones a base de baculovirus; b. Aspersión del Granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV sobre hojas de tomate.

Un método para pulverizaciones de precisión de suspensiones de agentes de control consiste en la utilización de la torre de Potter, la cual garantiza una aplicación homogénea y constante por intervalos específicos de tiempo. Este mismo método también se usa en la aplicación directa sobre el insecto o sobre lotes de estos (Paramasivam & Selvi, 2017).

Por otra parte, la aplicación de productos sólidos sobre el sustrato de alimentación usualmente se realiza de manera directa, a través del espolvoreo y la posterior mezcla hasta evidenciar su adherencia al sustrato. Un ejemplo, es la aplicación del bioplaguicida formulado como polvo a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) para el control de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora*. El bioplaguicida se aplica sobre tubérculos de papa almacenados como semilla (figura 4.13). Según la metodología reportada por Cuartas et al. (2009), se pesaron tres tubérculos de papa criolla, *Solanum phureja* (Solanales: Solanaceae) y se ubicaron en una bolsa plástica que contenía el producto formulado según la dosis comercial (5 g de bioplguicida/kg de papa; producto a base de baculovirus con Registro ICA No. 5416). Posteriormente, las bolsas se cerraron y se agitaron hasta que los tubérculos quedaron cubiertos con el producto. Cada tubérculo se ubicó de manera individual dentro de un recipiente y se infestó con 15 larvas neonatas de *T. solanivora*. Transcurridos 20 días se determinó su mortalidad.



Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.13. Tubérculos de papa - semilla. a. Tubérculos de papa sin inocular; b. Tubérculos de papa inoculados con el producto a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) para el control de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora*.

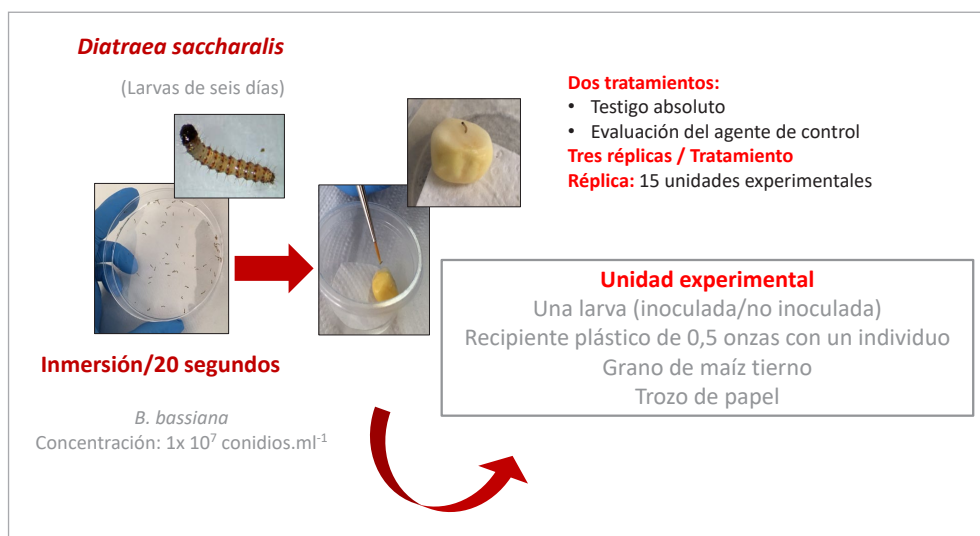
Montaje de la unidad experimental

La unidad experimental es la unidad sobre la cual se aplica un tratamiento (Lacey, 2012). En el caso particular de los bioensayos en los cuales se pretende determinar la actividad biológica de un agente de control, la unidad experimental corresponde al individuo o grupo de individuos sometidos o no (en el caso del tratamiento correspondiente al testigo absoluto) a una intervención de manera planeada para evaluar posteriormente su respuesta.

En el momento de establecer la unidad experimental en la realización de un bioensayo, se deben definir con antelación los tratamientos a evaluar, el número de réplicas e individuos, el sistema de confinamiento (recipientes, materas, jaulas, entre otros), así como el sustrato de alimentación y demás requerimientos para garantizar la supervivencia de los individuos del testigo absoluto durante el tiempo que dure la evaluación (ejemplos 1 y 2).

Ejemplo 1

En un bioensayo para determinar la actividad biocontroladora de un producto a base de *B. bassiana* sobre *D. saccharalis*, se inoculan larvas de seis días de edad mediante inmersión durante 20 segundos en una suspensión del hongo a la concentración de 1×10^7 conidios. ml^{-1} . Posteriormente, estas se ubican de manera individual en recipientes plásticos de 0,5 oz con tapa, los cuales contienen un trozo de papel y un grano de maíz tierno para su alimentación (unidad experimental). Se evalúan tres réplicas por tratamiento, incluido un tratamiento control (testigo absoluto) en el cual las larvas no se someten a ninguna inmersión. Cada réplica está conformada por 15 unidades experimentales (figura 4.14).



Fotos: Lissette Torres Torres

Figura 4.14. Montaje de la unidad experimental de un ensayo de evaluación de la actividad biocontroladora de *B. bassiana* sobre *D. saccharalis*.

Fuente: Elaboración propia

Ejemplo 2

En un bioensayo para determinar la actividad biocontroladora de un producto a base de *Metarhizium anisopliae* sobre *Rhammatocerus schistocercoides*, se inoculan ninfas mediante aplicación tópica de 20 μl de una suspensión del hongo a la concentración de 1×10^7 conidios. ml^{-1} entre el pronoto y el primer tergo. Posteriormente, se ubican 15 insectos inoculados dentro de una jaula, la cual dispone de un plato plástico con 30 g de algodón humedecido con agua y dos vasos plásticos, cada uno con 165 g de pasto kikuyo y agua para mantenerlo fresco (unidad experimental).

Se evalúan tres réplicas por tratamiento, incluido un tratamiento control (testigo absoluto). Cada réplica o unidad experimental, en este caso, está conformada por 15 individuos (figura 4.15).

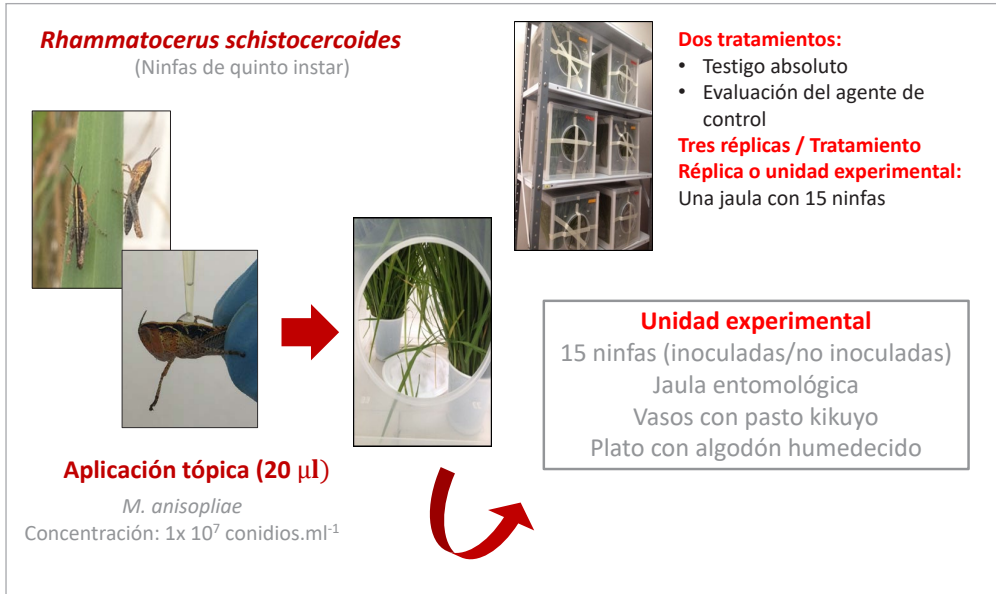
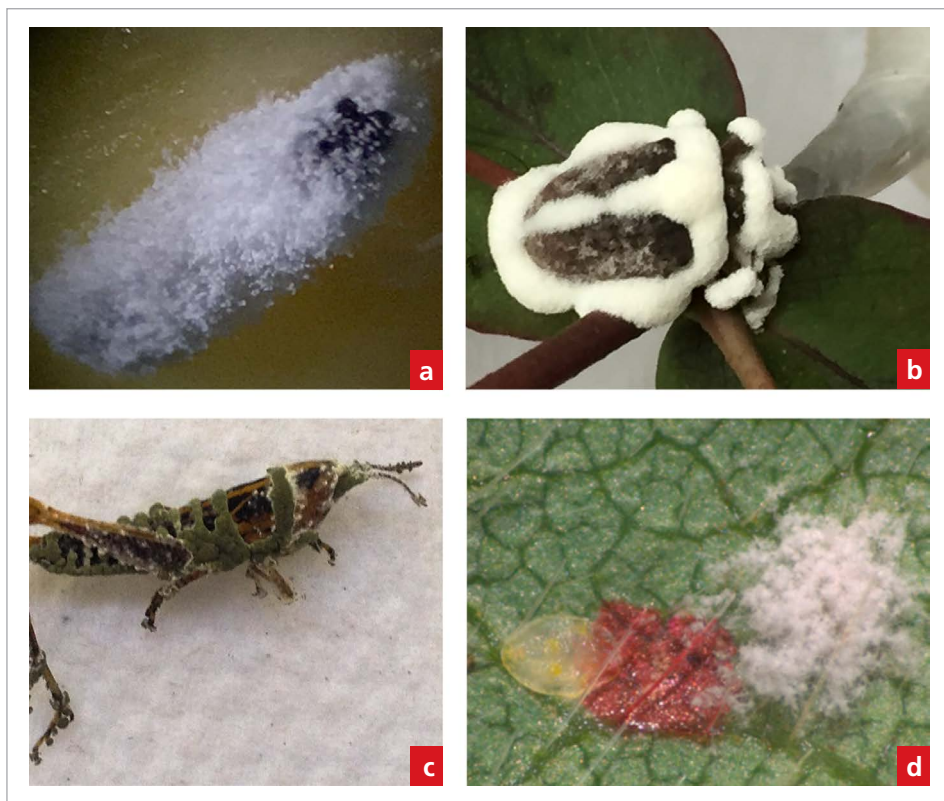


Figura 4.15. Montaje de la unidad experimental de un ensayo de evaluación de la actividad biocontroladora de *M. anisopliae* sobre *R. schistocercoides*.

Fuente: Elaboración propia

Identificación de síntomas y signos de infección

De manera general, los síntomas ocasionados por la infección de hongos, bacterias y virus entomopatógenos son similares y están asociados con el cese de la ingestión, disminución en el tamaño y peso de los insectos infectados con respecto a los sanos, disfunción en el intestino y el tejido muscular generando vómito y diarrea, parálisis celular que puede ser general en todo el cuerpo y la muerte (Aronson et al., 1986; Caballero et al., 2001; Kachaturians, 1991; Lacey, 2012). Sin embargo, los signos pueden cambiar dependiendo del agente de control, por ejemplo, los insectos muertos por hongos entomopatógenos pueden presentar crecimiento micelial y esporulación si las condiciones ambientales son favorables. Las hifas emergen del insecto y ocurre la esporulación sobre su superficie, lo cual contribuye a la diseminación del hongo y a la posterior infección de otros individuos (Alatorre-Rosas, 2007) (figura 4.16).



Fotos: Carlos Espinel Correal y Lissette Torres

Figura 4.16. Infecciones características de hongos entomopatógenos. a. *B. bassiana* sobre larva de *D. saccharalis*; b. *B. bassiana* sobre *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae); c. *M. anisopliae* sobre ninfa de *R. schistocercoides*; d. *L. lecanii* sobre ninfa de *T. vaporariorum*.

En el caso de *B. thuringiensis*, es posible observar la melanización defensiva a nivel del mesenterón, que aparece ahí para tratar de contrarrestar la invasión de las bacterias presentes en el intestino del insecto. Este es el caso del gusano cuerno del tabaco *Manduca sexta* (Lepidoptera: Bombycoidea) (en larvas de primer estadio de desarrollo) (Grijalba et al., 2018). Por otra parte, cadáveres de insectos infectados con la bacteria gramnegativa *Serratia marcescens* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae), se caracterizan por presentar una coloración rojiza debido a la producción del pigmento denominado prodigiosina (Ruiz-Sánchez et al., 2003). Precisamente, los primeros registros de *Serratia* sp. como patógeno de insectos se realizaron a partir de cadáveres de gusanos de seda *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) que tenían una coloración de estas características (Steinhaus, 1941; citado por Grijalba et al., 2018).

Con respecto a los insectos infectados con baculovirus, se evidencian cambios en la coloración del tegumento y licuefacción de los tejidos, cuyos cuerpos se convierten en bolsas llenas de virus. Tal es el caso del granulovirus de las larvas del gusano cachón de yuca, *Erinnyis ello* (EeGV), plaga con amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales. Esta plaga afecta a plantas con importancia económica como el tomate, el caucho, la yuca, el tabaco, la papaya y el algodón (Pratissoli et al., 2002 citado por Villamizar et al., 2018) (figura 4.17).

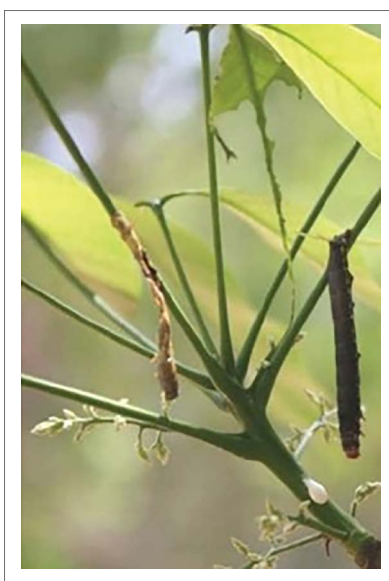


Foto: Grupo de Investigación Control Biológico de AGROSAVIA

Figura 4.17. Larva de *E. ello* infectada por el granulovirus de *Erinnyis ello* EeGV.

Larvas de *T. solanivora* infectadas con el granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) presentan una coloración blanca y pérdida de turgencia corporal debido a la desintegración de tejidos y órganos (Caballero et al., 2001; Quiroga et al., 2011) (figura 4.18).



Foto: Carlos Espinel Correal

Figura 4.18. Larvas de *T. solanivora* de tercer ínstar, sana e infectadas con el granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV).

Por otra parte, larvas de *T. absoluta* infectadas con el granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) presentan cambio en el color del tegumento de verde a blanco brillante o amarillo, con marcación de los segmentos corporales. Las pupas presentan deformaciones y pérdida de turgencia (Gómez et al., 2017) (figura 4.19).



Fotos: Carlos Espinel Correal y Lisette Torres Torres

Figura 4.19. Diferencias entre larvas de *T. absoluta* sanas e infectadas por baculovirus. a y b. Sintomatología de larvas infectadas; c. Larva sana.

Material de referencia

Una estrategia para el aseguramiento en la calidad de los bioensayos es la evaluación adicional de un material de referencia. Este corresponde al agente de control biológico con el cual se establece y estandariza el protocolo de evaluación de su actividad contra un insecto blanco o un insecto alterno. Cuando se requiere analizar una muestra (bioplaguicida o principio activo sin formular) es necesario evaluar como control positivo el material de referencia, al mismo tiempo y en las mismas condiciones. De esta manera su comportamiento y los datos de mortalidad obtenidos se convierten en un parámetro de aceptación o rechazo del bioensayo de evaluación.

El material de referencia debe estar debidamente identificado y caracterizado, incluidos los aspectos de tipo morfológico, biológico, bioquímico, genético y molecular. Por otra parte y para garantizar la preservación de todas estas características en el tiempo (incluso su potencial biocontrolador), se debe mantener una colección suficiente y debidamente conservada. Para ello se pueden implementar métodos de conservación a largo plazo como la crioconservación a ultrabajas temperaturas y la liofilización (Lacey, 2012). Una vez el material biológico sea conservado, se debe definir la metodología necesaria para su reactivación, ya sea en medios de cultivo específicos o sobre el mismo insecto. Así se garantiza que su actividad biológica sea similar a la obtenida en el proceso de estandarización de la metodología de evaluación.

Por citar un ejemplo, el aislamiento Bv060 de *B. bassiana* es utilizado como principio activo de un bioplaguicida desarrollado como suspensión oleosa para el control de adultos de *Cerotoma tingomariana*. Para la estandarización de la metodología relacionada con la evaluación de su actividad biológica, se hizo un estudio de repetibilidad (r), reproducibilidad (R) y la relación entre estos dos parámetros (r&R) usando el aislamiento sin formular (ver capítulo 5). La metodología resultó ser repetible y reproducible y permitió definir entre los parámetros de aceptación (bioensayo válido) un porcentaje de eficacia superior al 80 %. De esta forma, al evaluar otro agente de control dentro de un análisis de calidad sobre este insecto y bajo el mismo protocolo y condiciones de estandarización, se incluye el aislamiento Bv060 como material de referencia. Es decir, el bioensayo debe incluir tres tratamientos: un testigo absoluto, la muestra por analizar y el correspondiente a la evaluación del material de referencia (figura 4.20).

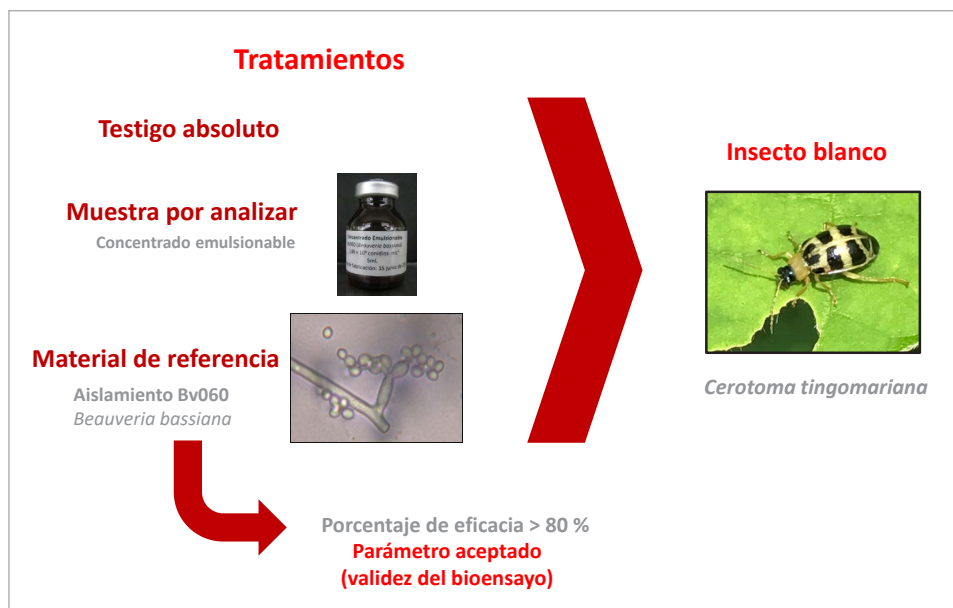


Foto: Carlos Espinel Correal, Lorena García Riaño, Lissette Torres Torres

Figura 4.20. Evaluación del material de referencia en el control de calidad de una muestra a base de *B. bassiana* para el control de adultos de *C. tingomariana*.

Fuente: Elaboración propia

Caso de estudio

El siguiente caso de estudio corresponde a los resultados del control de calidad obtenidos de una muestra analizada por AGROSAVIA en el Centro de Investigación Tibaitatá. Para ello y siguiendo lo establecido en un protocolo previamente estandarizado, se determinó la actividad biológica (mortalidad) de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* sobre ninfas en segundo estadio de *T. vaporariorum* mediante la realización de un bioensayo bajo condiciones de invernadero con un diseño experimental completamente al azar. En dicho bioensayo se evaluaron tres tratamientos: uno correspondiente a un testigo absoluto y los otros dos relativos a la aplicación del agente microbiano (material de referencia y la muestra por evaluar) sobre ninfas en segundo estadio mantenidas en folíolos de frijol *Phaseolus vulgaris* (Fabales: Fabaceae). Las ninfas se infectaron al estar en contacto con el hongo entomopatógeno; presentaron síntomas relacionados con una coloración amarilla y una pérdida de turgencia o aplastamiento.

Para la evaluación de la actividad biológica se definieron los siguientes criterios:

Criterios biológicos

- **Insecto plaga:** ninfas en segundo estadio de mosca blanca (Hemiptera: Aleyrodidae), *Trialeurodes vaporariorum* y plantas de fríjol bola roja provenientes de la Unidad de Crías del Laboratorio de Entomología de AGROSAVIA del Centro de Investigación Tibaitatá.
- **Agente de control:** hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (Ascomycota: Cordycipitaceae) (muestra por analizar y material de referencia).

Criterios de evaluación

- **Condiciones físicas y ambientales:** bioensayo montado en condiciones de invernadero con una temperatura entre 15 °C y 35 °C y una humedad relativa entre el 16 % y el 85 %.
- **Sistema de aplicación:** directa, mediante aspersión con aerógrafo sobre ninfas de segundo estadio.
- **Montaje de la unidad experimental:** un foliolo de fríjol variedad bola roja infestado con ninfas de segundo estadio.
- **Síntomas y signos de la infección:** se evidencian por una coloración amarilla de las ninfas, por una pérdida de turgencia o aplastamiento y por el crecimiento micelial y esporulación del hongo sobre el cuerpo del insecto de coloración blanca.
- **Material de referencia:** aislamiento V1026 de *L. lecanii*.

Criterios para el aseguramiento de los resultados

- **Parámetros de aceptación:** la mortalidad en el testigo absoluto no debe ser mayor al 20 %. El coeficiente de variación entre las réplicas de un mismo tratamiento debe ser menor al 30 %. El material de referencia (aislamiento V1026) de *L. lecanii* debe alcanzar un porcentaje de eficacia superior al 80 %. El bioensayo se debe realizar bajo las condiciones de temperatura y humedad establecidas y descritas anteriormente.

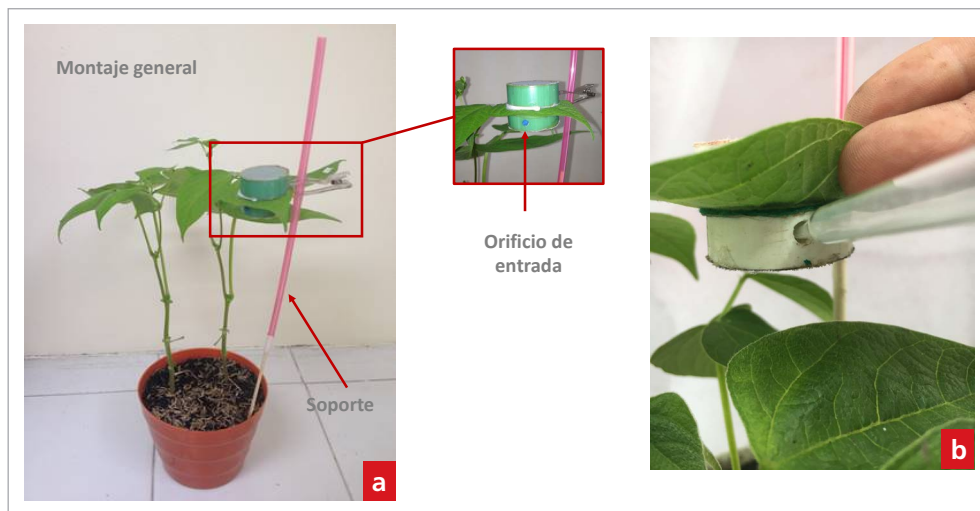
Criterios estadísticos

- **Tratamientos:** la muestra por analizar (producto comercial), el material de referencia como control positivo (aislamiento V1026) y un testigo absoluto.
- **Número de réplicas:** se evalúan tres réplicas por tratamiento y cada foliolo infestado corresponde a una réplica.
- **Unidades experimentales:** un foliolo de frijol infestado con ninfas en segundo estadio. El número de individuos no fue el mismo por cada unidad experimental, este se cuantificó dentro de un área determinada por el diámetro de la jaula pinza (4cm^2), según la metodología establecida.
- **Diseño experimental:** diseño experimental completamente al azar (DCA).
- **Variable respuesta:** porcentaje de eficacia.

La metodología desarrollada se describe a continuación:

Semillas de frijol de la variedad ICA-Calima se sembraron en materas No. 20. Una vez emergieron las plantas y estas tuvieron mínimo dos trifolios formados, se llevó a cabo su infestación con adultos de *T. vaporariorum*. Para ello, 30 insectos se ubicaron dentro de una jaula pinza dispuesta en un foliolo para favorecer su oviposición (figura 4.21) y transcurridas 48 horas se llevó a cabo su desinfestación mediante la recolección de los adultos con un aspirador bucal.

Una vez se observó la presencia de ninfas de segundo instar, se realizó su conteo en cada foliolo infestado y se llevó cabo su identificación (tres foliolos por tratamiento). Posteriormente, se aplicó una suspensión del agente de control (muestra y material de referencia) ajustada a la concentración de 1×10^7 conidios. ml^{-1} en Tween 80 al 0,1 %. Para ello, se hicieron aspersiones sobre el envés de cada foliolo infestado haciendo dos disparos (600 μl) a 30 psi con ayuda de un aerógrafo a una distancia aproximada de 20 cm. Adicionalmente, se evaluó un testigo absoluto.



Fotos: Carlos Espinel Correal y Lissette Torres Torre

Figura 4.21. Evaluación biológica de *Lecanicillium lecanii* sobre mosca blanca. a. Montaje general de la jaula pinza en la maceta, para la infestación con los adultos de *T. vaporariorum*; b. Infestación de folíolos de frijol con adultos de mosca blanca.

Las ninfas se revisaron cada tres días hasta que estas alcanzaron el cuarto instar o hasta que se evidenció la presencia de exuvias en el testigo absoluto (indicador de la emergencia de adultos). Se realizó el conteo de estas, así como el de los insectos vivos y muertos sobre cada folíolo de cada tratamiento. Posteriormente se calculó el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider-Orelli:

$$Eficacia(\%) = \left(\frac{(b - k)}{(100 - k)} \right) * 100$$

Ecuación 4.2. Cálculo del porcentaje de eficacia (Zar, 1999).

Donde:

b = % de individuos muertos en el tratamiento donde se aplicó el agente de control

k = % de individuos muertos en el testigo absoluto

Los resultados del control de calidad relacionados con la evaluación de la actividad biológica de un bioplaguicida a base de *L. lecanii* se presentan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Porcentaje de eficacia de un bioplaguicida a base de *L. lecanii* sobre ninfas de *T. vaporariorum*

Tratamientos		Conteo inicial (I)*	Conteo final (F)**	I - F	Mortalidad (%)	Eficacia (%)
Testigo absoluto	R 1	120	113	7	5,83	
	R 2	105	96	9	8,57	
	R 3	110	103	7	6,36	
Promedio					6,92	
Desviación estándar					1,45	
cv (%)					20,98	
Material de referencia	R 1	129	5	124	96,12	95,84
	R 2	167	13	154	92,22	91,64
	R 3	208	17	191	91,83	91,22
Promedio					93,39	92,90
Desviación estándar					2,38	2,55
cv (%)					2,54	2,75
Bioplaguicida	R 1	78	12	66	84,62	83,47
	R 2	106	5	101	95,28	94,93
	R 3	81	9	72	88,89	88,06
Promedio					89,60	88,82
Desviación estándar					5,37	5,77
cv (%)					5,99	6,49

* Conteo inicial de ninfas. ** Conteo final de ninfas o exuvias

Fuente: Elaboración propia

El promedio de mortalidad en el testigo absoluto fue inferior al 20 %, el coeficiente de variación (cv) entre las réplicas de un mismo tratamiento fue inferior al 30 % y el porcentaje de eficacia del material de referencia fue superior al 80 %. Adicionalmente, las condiciones ambientales (temperatura y humedad) durante el tiempo de la evaluación estuvieron entre los rangos establecidos. De esta manera se cumplieron con todos los parámetros de aceptación, por lo cual los resultados obtenidos son aceptados y correctos.

Los insectos encontrados en el tratamiento correspondiente a la suspensión del bioplaguicida y del material de referencia (aislamiento V1026) presentaron signos de infección relacionados con una coloración amarilla, pérdida de turgencia y aplastamiento de las ninfas. También se evidenció un crecimiento micelial típico de *L. lecanii* sobre ninfas y adultos que alcanzaron a emerger pero que no sobrevivieron.

En contraste, en el testigo absoluto se evidenciaron ninfas vivas turgentes y exuvias que indicaron la emergencia de adultos (figura 4.22).

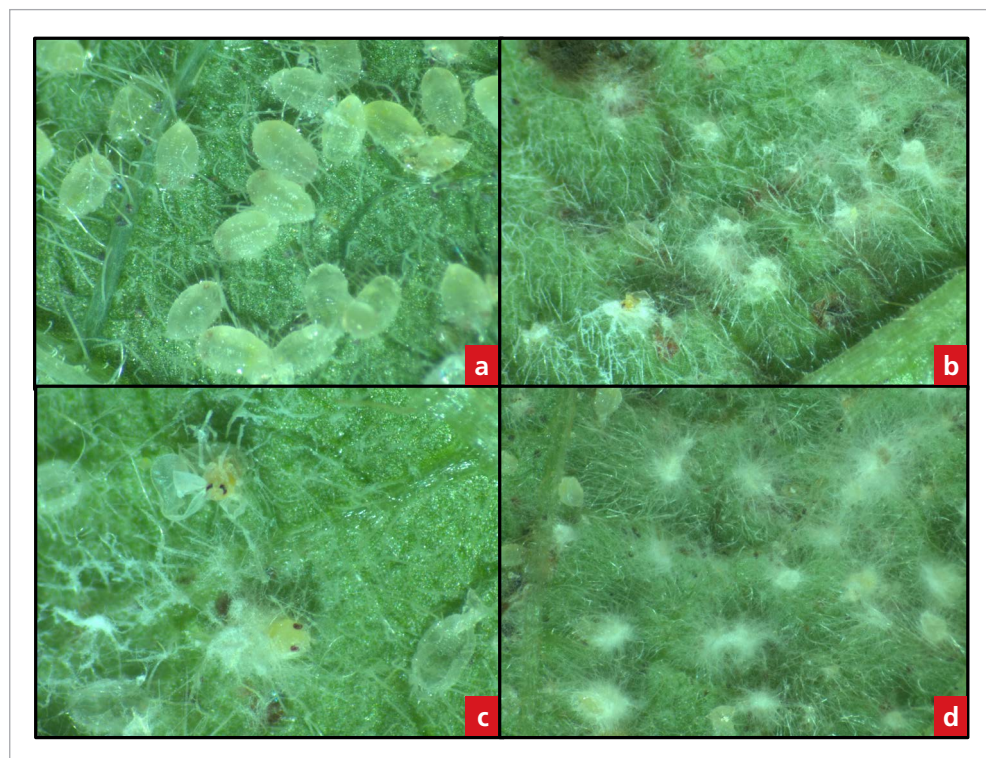


Foto: Carlos Espinel Correal y Lissette Torres Torres

Figura 4.22. Individuos de *T. vaporariorum*. a. Testigo absoluto, ninfas sanas de *T. vaporariorum* en cuarto estadio; b. Ninfas de *T. vaporariorum* en cuarto estadio, infectadas y con crecimiento micelial del bioplaguicida a base *L. lecanii*; c. Adultos de *T. vaporariorum* con crecimiento micelial del bioplaguicida a base *L. lecanii*; d. Ninfas de *T. vaporariorum* de cuarto estadio, infectadas y con crecimiento micelial del material de referencia (aislamiento VI026).

Adicionalmente, se confirmaron las características macroscópicas y microscópicas del hongo entomopatógeno. El aislamiento VI026 (material de referencia) y el principio activo del bioplaguicida analizado a base de *L. lecanii* se caracterizaron por presentar micelio aéreo de aspecto algodonoso y color blanco, con fiálides alargadas y estrechas organizadas de manera verticilar, a partir de las cuales se forman los conidios, los cuales son pequeños, hialinos y cilíndricos. Estas características concordaron con las descritas por Barnett & Hunter (1998) para esta misma especie (figura 4.23).



Figura 4.23. Fotografías de *L. lecanii*. a. Características microscópicas del aislamiento V1026 de *L. lecanii* (material de referencia); b. Características microscópicas del principio activo del bioplaguicida analizado a base de *L. lecanii*.

Perspectivas

- Los criterios biológicos y de evaluación expuestos en el presente capítulo constituyen una herramienta importante para la definición y estandarización de metodologías encaminadas a la evaluación de la actividad biológica de agentes de control de insectos en condiciones controladas.
- Los criterios expuestos, aplicados en el control de calidad rutinario de agentes de control de insectos, permiten diseñar metodologías sencillas que, acompañadas de criterios estadísticos y de aceptación, garantizan la generación de resultados confiables.
- Los resultados de la actividad biológica de un agente de control deben complementarse con análisis microbiológicos y fisicoquímicos para su interpretación integral.

Referencias

Alatorre-Rosas, R. (2007). Hongos entomopatógenos. En L. A. Rodríguez-Del-Bosque, & H. Arredondo-Bernal (Eds.), *Teoría y aplicación del control biológico* (pp.127- 143). Sociedad Mexicana de Control Biológico.

- Arana, I., Maite, O., & Barcina, I. (s. f.). *Cómo abordar y resolver aspectos prácticos de microbiología. Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.*
- Aronson, A. I., Beckman, W., & Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological reviews*, 50(1) 1-24. <https://doi.org/10.1128/mr.50.1.1-24.1986>
- Barnett, H. L. & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera on Imperfect Fungi*. The American Phytopathological Society.
- Barrera, G. P. (2013). *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus the basis for a biopesticide product in Colombia [Tesis de doctorado, Universidad Pública de Navarra]. <https://academica-e.unavarra.es/xmlui/handle/2454/16983/Tesis-Barrera.pdf?sequence=4>
- Barrera, G. P., Gómez, J. A., Cuartas, P. E., León, G., & Villamizar, L. (2014). Caracterización morfológica, biológica y genética de un aislamiento colombiano de granulovirus de *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 129-140.
- Bellotti, A., Arias, B., & Reyes, J. (1989). *Manejo Integrado de Erinnyis ello (L) (gusano cachón de la yuca)*. CIAT.
- Borror, D. J., Triplehorn, C. A., & Johnson, N. F. (1992). *Study of Insects*. Harcourt Brace College Publishers.
- Caballero, P., Williams, T., & López-Ferber, M. (2001). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma.
- Carapia-Ruiz, V., & Castillo-Gutiérrez, A. (2013). Estudio comparativo sobre la morfología de *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *Bemisia tabaci* (Genadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Acta Zoológica Mexicana*, 29(1), 178-193.
- Cohen, A. (2004). *Insects diets. Science and Technology*. CRC Press.
- Cuartas, P., Villamizar, L., Espinel, C., & Cotes, A. (2009). Infección de granulovirus nativos sobre *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 122-129.
- Díaz, A., Gómez, M., Grijalba, E., Santos, A., Cruz, F., León, D., Alarcón, E., & Cotes, A. (2018). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 628-692). AGROSAVIA.

- Erlandson, M. A. (2009). Genetic variation in field populations of baculoviruses: mechanisms for generating variation and its potential role in baculovirus epizootiology. *Virologica Sinica*, 24(5), 458-469. <https://doi.org/10.1007/s12250-009-3052-1>
- Espinel-Correal, C. (2010). *Analyse de l'évolution des populations du granulovirus PhopGV en contact avec des hôtes alternatifs Phthorimaea operculella et Tecia solanivora (Lepidoptera: Gelechiidae)* [Tesis de doctorado, École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne].
- Espinel-Correal, C., Ebratt, E., & Cotes, A. (1998). Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera: Acrididae). *Revista Colombiana de Entomología* 24(1-2), 1-5.
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pest by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23(1), 409-442. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>
- Guijarro-Pardo, E., Gómez-Sebatán, S., & Escribano, J. M. (2017). *In vivo* production of recombinant proteins using occluded recombinant AcMNPV-derived baculovirus vectors. *Journal Virological Methods*, 250(1), 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.017>
- Gillespie, A. T., & Claydon, N. (1989). The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pest Management Science*, 27(2), 123-130. <https://doi.org/10.1002/PS.2780270210>
- Gómez, H. (1997). *Estadística experimental*. Universidad Nacional de Colombia.
- Gómez, J. A., Barrera, G., López-Ferber, M., Belaich, M., Ghiringhelli, P. D., & Villamizar, L. (2017). Potential of betabaculoviruses to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick). *Journal of Applied Entomology*, 142(1-2), 1-11. <https://doi.org/10.1111/jen.12406>
- Gómez, J., Guevara, E., Barrera, G., Cotes, A., & Villamizar, L. (2010). Aislamiento, identificación y caracterización de Nucleopoliedrovirus nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5511-5520.
- Gómez, J., Villamizar, L., Espinel, C., & Cotes, A. M. (2009). Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(2), 152-158.

- Grijalba, E. P., Hurst, M., Ibarra, J., Jurat-Fuentes, J., & Jackson, T. (2018). Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico* (pp. 296-334). AGROSAVIA.
- Hughes, P., & Wood, H. A. (1981). A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 37(2), 154-159. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90069-0)
- Hurtado, M. (2012). *Tuta absoluta*. Guía visual del daño causado por el minador del tomate en frutas y hojas [Plegable informativo]. Animal and Plant Health Inspection Service. USDA.
- Instituto Colombiano Agropecuario [ICA]. (2011). Resolución 000698 de 2011 “Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones”. <https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx>
- Jenkins, N., & Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents assurance of products performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 753-777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- Jisha, V. N., Smitha, R. B., & Benjamin, S. (2013). An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Microbiology*, 3(1), 462-472. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.35062>
- Johnson, P. D., & Besselsen, D. G. (2002). Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR Journal*, 43(4), 223-232. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.202>
- Kachatourians, G. (1991). Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En D. K. Arora, L. Ajello, K. G. Mukerji (Eds.), *Handbook of Applied Micology: Humans, animals and insects* (pp. 548-611). CRC Press.
- Koppenhöfer, A. M., Jackson, T. A., & Klein, M. G. (2012). Bacteria for use against soil-inhabiting insects. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 129-149). Elsevier.
- Lacey, A. L. (2012). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Elsevier.
- Lacey, A. L. (2017). *Microbial control of insect and mite pests*. Elsevier.
- León, G., & Guevara, J. (2006). Manejo integrado de insectos plagas en soya para los Llanos Orientales. En Soya (*Glicine max (L.) Merrill*) *Alternativa para*

- los sistemas de producción de la Orinoquía colombiana. Plan estratégico de investigación y desarrollo tecnológico de soya (pp. 174-205). AGROSAVIA.
- López-Ávila, A. (1981). *Estudios básicos para la cría de Meteorus laphygmae Viereck parásito de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith)* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].
- López-Pérez, M., Rodríguez-Gómez, D., & Loera, O. (2015). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. *Critical Reviews Biotechnology*, 35(3), 334-341. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.857293>
- Malarvannan, S., Murali, P. H., Shanthakumar, S. P., Prabavathy, V. R., & Nair, S. (2010). Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* against the Tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae: Lepidoptera). *Journal of Biopesticides*, 3(1), 126-131.
- Marín-Cruz, V. H., Rodríguez-Navarro, S., Barranco-Flórido, J. E., & Cibrián-Tovar, D. (2017). Insectistatic and insecticide activity of *Beauveria bassiana* in *Bradysia impatiens* (Diptera: Sciaridae). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23(3), 329-340.
- Paramasivam, M., & Selvi, C. (2017). Laboratory bioassay methods to assess the insecticide toxicity against insect pest-A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 1441-1445.
- Patel, J. K., Patel, N. M., & Shyani, R. L. (2001). Coefficient of variation in field experiments and yardstick thereof - An empirical study. *Current Science*, 81(9,10), 1163-1164.
- Portilla, M., & Street, D. (2006). Nuevas técnicas de producción masiva automatizada de *Hypothenemus hampei* sobre la dieta artificial Cenibroca modificada. *Revista Cenicafé*, 57(1), 31-50.
- Quiroga, G., Gómez, M., & Villamizar, L. (2011). Estabilidad de formulaciones a base de granilovirus para controlar *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. *Revista Colombiana de Entomología*, 37(1), 27-35.
- Ravensberg, W. (2011). Quality control. En J. Grould, K. Hoelmer, & J. Goolshy (Eds.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods* (pp. 129-197). Springer.

- Rey, A., Garea, M., & Lago, J. C. (2017). *Glosario micológico y acepciones complementarias o afines*. Agrupación Micótica A. Zarrota.
- Rohrmann, G. F. (2013). *Baculovirus Molecular Biology*. National Library of Medicine, National Centre for Biotechnology Information.
- Ruiz-Sánchez, A., Cruz-Camarillo, R., Salcedo-Hernández, R., & Berbozaz-Corona, J. (2003). *Serratia marcescens*: De patógeno oportunista al control de insectos que afectan cultivos agrícolas. *Biotecnología*, 8(2), 31-37.
- Sewify, G. H., El Shabrawy, H. A., Eweis, M. E., & Naroz, M. H. (2014). Efficacy of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for controlling certain stored product insects. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 24(1), 191-196.
- Sistema Potosino de Vigilancia Epidemiológica [Sipove]. (s. f.). *Ficha Técnica: Barrenador de la Caña de Azúcar Diatraea saccharalis*. Sipove.
- Soberón, M., Monnerat, R., & Bravo, A. (2016). Mode of action of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. En *Microbial Toxins* (pp. 1-13). Springer.
- Torres, L., Espinel, C., & Santos, A. (2020). Hospederos alternativos y estandarización de métodos para evaluar la actividad biocontroladora de micoinsecticias. *Revista Colombiana de Entomología*, 46(2), e7678. <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i2.7678>
- United States Environmental Protection Agency [US EPA]. (2017). What are biopesticides. <https://www.epa.gov/pesticide-registration/biopesticide-registration#what>
- Valencia, R., & Ligarreto, G. (2010). Mejoramiento genético de la soya (*Glycine max* [L.] Merrill) para su cultivo en la altillanura colombiana: una visión conceptual prospectiva. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 155-163.
- Vargas, G., & Gómez, L. (2005). *Evaluación del daño causado por Diatraea spp. En caña de azúcar y su manejo en el valle del río Cauca*. Serie Divulgativa. Cenicaña.
- Villamizar, L., Cuartas, P., Gómez, J., Barrera, G., Espinel, C., & López-Ferber, M. (2018). Virus entomopatógenos en el control biológico de insectos. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico* (pp. 368-409). AGROSAVIA.
- Zar, J.H. (1999). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall.



Capítulo V

Aseguramiento de resultados aplicables a metodologías de control de calidad de bioplaguicidas

Adriana Marcela Santos
Lisette Torres Torres
Liz Alejandra Uribe
Erika Paola Grijalba

Debido a los cambios que ha traído consigo la agricultura verde, en la actualidad las empresas productoras de bioinsumos están en proceso de expansión, ya que buscan implementar estrategias para mejorar la producción agrícola. Dichos procesos incluyen la expansión a nuevas tierras, el incremento de la producción por hectárea gracias a la utilización de insumos adecuados, el aumento del rendimiento del cultivo y el control de plagas y enfermedades con productos biológicos (Altieri et al., 2012). Por esta razón, uno de los objetivos principales de la adopción y el uso de bioinsumos es asegurar sus resultados en condiciones de campo.

El control de calidad de un bioproducto es una parte esencial durante el proceso de producción comercial y es vital para la satisfacción del cliente (Ravensberg, 2011). En los capítulos anteriores se presentó la diversidad de metodologías que existen y pueden

desarrollarse, sin embargo, su implementación requiere un sistema de gestión de calidad y de aseguramiento de resultados.

La regulación en algunos países se enfoca en que los laboratorios de control de calidad implementen un sistema de gestión de calidad con base en las directrices internacionales como las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) o la norma técnica NTC-ISO/IEC 17025:2017 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”. Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, el control de calidad (QC, por sus siglas en inglés) son todos los mecanismos, acciones y herramientas que se realizan con el fin de detectar la presencia de errores en los procedimientos utilizados para cualquier producto o servicio que se preste. Debido a la fuerte competencia en la industria, la calidad se ha convertido en el diferenciador de casi todos los bienes y servicios. Además, la gestión de la calidad es fundamental para construir una organización productiva que conduzca a productos que satisfagan o superen las necesidades del consumidor. Lo anterior también forma la base para un negocio productivo, pues reduce el desperdicio y fomenta los altos niveles de productividad (Hrvat et al., 2020).

Con el fin de implementar un sistema de aseguramiento de calidad, se debe garantizar un sistema de medición confiable. En general, las mediciones y los ensayos, especialmente de actividad biológica, requieren de un material de referencia que sea reproducible y confiable. Además, estos resultados están sujetos a la incertidumbre propia del ensayo (Paisan & Moret, 2010). Teniendo en cuenta que existen muchas fuentes de error en una metodología, es indispensable reducir aquellos que estén relacionados con las variables a medir y, de esta manera, aumentar la confianza de los resultados (Manterola et al., 2018).

En el desarrollo de las metodologías, la precisión depende de la persona que realiza la medición (el analista), el equipo o instrumento mediante el cual se realiza la medición y el objeto de estudio o la muestra a evaluar (Manterola et al., 2018). Con el fin de disminuir y evitar errores y sesgos en el proceso de medición, el analista debe tener en cuenta la variabilidad de los componentes que hacen parte del sistema de medición. Esta variabilidad se debe establecer al momento de planificar el proceso de estandarización y ejecución de la metodología. Asimismo, es fundamental establecer la confiabilidad del analista (Paisan & Moret, 2010).

Con respecto al equipo o instrumento, se debe garantizar que genere los mismos resultados en diferentes tiempos, muestras y escenarios si se aplica bajo las mismas

condiciones ambientales (Manterola et al., 2018). Sin embargo, el concepto de precisión se combina con el concepto de la exactitud. Su combinación puede generar diferentes clasificaciones de mediciones, las cuales se encuentran descritas en la figura 5.1.

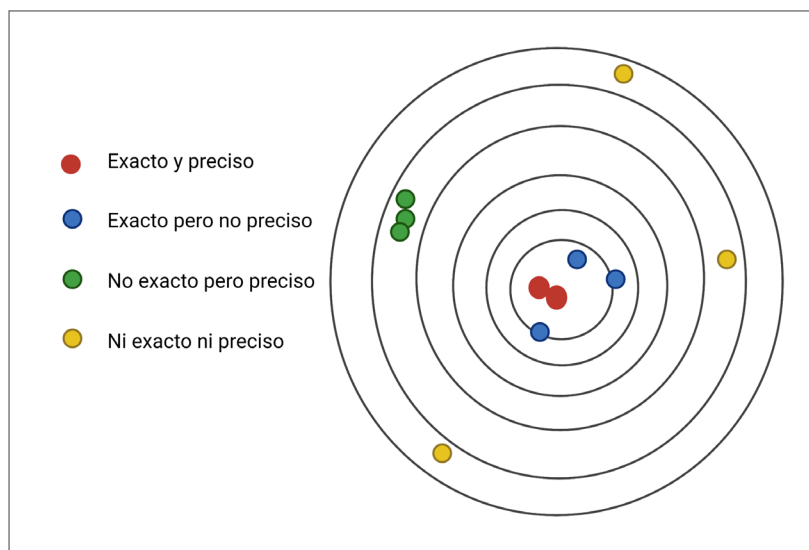


Figura 5.1. Posibles escenarios de precisión y exactitud de resultados.

Fuente: Elaboración propia

Para mejorar la precisión y la exactitud, se han diseñado diversas estrategias cuya finalidad es disminuir las fuentes potenciales de error. Entre las más utilizadas se encuentran los procesos de estandarización y validación de métodos; el entrenamiento de los analistas; el mantenimiento y la calibración de los equipos; los procesos de supervisión y verificación y la implementación de controles como materiales de referencia y repeticiones.

Estandarización de métodos

Los procesos de estandarización involucran actividades de adopción de una metodología a las “condiciones reales” con el objetivo de establecer que la metodología cumpla con las condiciones iniciales en las cuales se desarrolló (Riera et al., 2008). Ya que no existen parámetros oficiales establecidos por organismos internacionales para hacerle seguimiento a las metodologías de control de calidad de bioinsumos, el proceso que se debe implementar es este. Las ventajas de la estandarización incluyen la optimización de recursos, el establecimiento de criterios de aceptación y el estable-

cimiento de límites de cuantificación, lo que se traduce en la estabilidad del sistema de medición y en la calidad del resultado.

Las metodologías de control de calidad en el proceso y el producto terminado se realizan con base en un resultado conocido o típico, además, el sistema de medición (analista, equipo y muestra) debe ser estable durante un tiempo determinado. Esta estabilidad debe garantizar que la utilización de la misma metodología, los mismos analistas y los mismos equipos en el mismo intervalo de tiempo genere medidas en los rangos establecidos inicialmente (González & Falcón, 2015). Cuando una metodología no alcanza los controles de calidad y los resultados en los rangos de medición, es necesario que las causas que generan estas desviaciones sean estudiadas y determinadas. La estabilidad del sistema de medición es determinada a través de indicadores de repetibilidad y reproducibilidad, mediante los cuales se puede determinar a qué se debe la variación presentada en el proceso de medición utilizado (Paisan & Moret, 2010).

Según González & Falcón (2015), la repetitividad y reproducibilidad (r&R) son términos estandarizados adoptados por la Organización Internacional de Normalización (ISO, por sus siglas en inglés) y están relacionados con la precisión y estabilidad en el tiempo de las mediciones realizadas con un conjunto de instrumentos que cuantifican la misma magnitud (González & Falcón, 2015).

La repetibilidad (r) puede ser expresada cuantitativamente en términos de la dispersión característica de los resultados. Según el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), esta se define como “la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición” (VIM, 2012) (tabla 5.1), donde:

1. Estas condiciones son llamadas condiciones de repetibilidad.
2. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento de medición, el mismo observador u operador, el mismo instrumento de medición utilizado bajo las mismas condiciones, el mismo lugar, mediciones repetidas del mismo objeto u otro similar en un período corto de tiempo.

Tabla 5.1. Condiciones de evaluación de estudios de repetibilidad y reproducibilidad

Análisis	Condiciones de evaluación
Repetibilidad (r)	Mismo analista Mismo instrumento de medición Mismas condiciones Mismo lugar Repetición de la medición en un periodo de tiempo corto
Reproducibilidad (R)	Entre analistas Entre lugares o condiciones Instrumento de medición Evaluación del principio de método Tiempo de evaluación variable

Fuente: Elaboración propia con base en Betancourt & García (2018)

Por otra parte, la reproducibilidad (R) se define como “la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo condiciones de medición que cambian” (VIM, 2012) (tabla 5.1), donde:

1. Se debe especificar la condición que cambia.
2. Las condiciones que cambian pueden incluir: principio de medición, método de medición, observador u operador, instrumento de medición, patrón de referencia, lugar, condiciones de uso, mediciones repetidas del mismo objeto u otro similar en un periodo amplio de tiempo.

La reproducibilidad también puede ser expresada cuantitativamente teniendo en cuenta la dispersión característica de los resultados.

En la década de 1960, se desarrollaron diferentes metodologías para determinar y evaluar la repetitividad y reproducibilidad en sistemas de medición de la industria manufacturera (González & Falcón, 2015). En la actualidad, no solamente se aplica en la estandarización de procesos, sino también en procesos de ajuste y estandarización de metodologías en condiciones de laboratorio.

Estos estudios de repetibilidad y reproducibilidad (r&R) son la combinación de los estudios de repetibilidad (r) y los estudios de reproducibilidad (R), cuyo fundamento es la evaluación de las dispersiones de los resultados a través de la estadística, ya sea mediante la determinación de máximos y mínimos, varianzas o desviaciones

estándar (Paisan & Moret, 2010). El estudio tradicional de r&R emplea un diseño combinado de dos factores como, por ejemplo, muestras y analistas. De acuerdo con el procedimiento recomendado por ISO, se deben elegir y numerar las repeticiones que representen el rango real o esperado de variación del proceso de manera que los números no sean visibles para los analistas. Por lo general, en el estudio se supone que participan entre dos o tres analistas; en el primer ciclo (bloque) el analista A mide todas las muestras en un orden aleatorio y, posteriormente, el analista B. Los ciclos se repiten entre dos o tres veces y se aleatorizan las mediciones. Por lo general, no se espera que los efectos de bloqueo sean significativos. El objetivo del estudio no es expresar la diferencia entre las muestras y los analistas, sino medir la variación entre diferentes unidades y diferentes operadores en general (Jarosova, 2020).

Según Betancourt & García (2018), los pasos para la realización de estudio de r&R son los siguientes:

1. La calibración de instrumentos involucrados en la medición (sistemas de apoyo)
2. La selección de una muestra que cubra un rango de variación
3. El establecimiento de la metodología (paso a paso)
4. La selección de 2 o 3 analistas que realicen mínimo 10 análisis
5. Los cálculos correspondientes mediante el método seleccionado de análisis
6. La generación del informe de estandarización y el protocolo ajustado de la técnica (documentación)

Según Paisan & Moret (2010), los métodos estadísticos más utilizados para determinar el r&R son:

- Métodos de los rangos
- Método de ANOVA (análisis de varianza)
- Métodos de los promedios y rangos

Método de los rangos

Este método permite una aproximación rápida al establecimiento de la variabilidad de las mediciones, ya que ofrece un dato global de la variabilidad total del sistema y no descompone de forma individual los valores de repetibilidad y reproducibilidad (Jarosova, 2020). Debido a esta particularidad, el método en cuestión permite establecer y verificar que el porcentaje de r&R no haya variado en el tiempo y que se encuentra dentro de lo establecido inicialmente. En general, dos analistas evalúan 5 muestras; posteriormente, se calcula el promedio de los cinco rangos y se calcula variación total (VT) teniendo en cuenta un porcentaje de confianza del 99,73 %.

La aplicación de este método tiene la desventaja de no diferenciar la variabilidad de los componentes del sistema de medición, por lo que establecer mejoras en el proceso se dificulta. Sin embargo, tiene como ventaja la aplicación directa de los analistas y los pocos recursos que se requieren para su procesamiento (Jarosova, 2020).

Método de ANOVA

Este método se diferencia del método de promedio y rangos por la forma en la cual se procesan los datos, ya que mediante un análisis estadístico se requiere establecer la varianza (ANOVA). En este tipo de método la varianza se puede establecer en cuatro componentes: analistas; muestras; interacción entre muestra y analistas y el error de repetibilidad (Botero-Arbeláez et al., 2007). Este método tiene la ventaja de estimar el error experimental y las varianzas de forma más exacta. Además, permite manejar un ensayo experimental con un alto número de repeticiones y establecer de forma individual los efectos de cada componente (Botero-Arbeláez et al., 2007).

Tabla 5.2. Tabla de ANOVA para un sistema de medición con dos factores

Fuente variación	Suma cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
Analista	SSA	$a - 1$	$MSA = \frac{SSA}{a - 1}$
Muestra	SSB	$b - 1$	$MSB = \frac{SSB}{b - 1}$
Interacción	SSAB	$(a - 1)(b - 1)$	$MSAB = \frac{SSAB}{(a - 1)(b - 1)}$
Error	SSE	$ab(n - 1)$	$MSE = \frac{SSE}{ab(n - 1)}$
Total	SST	$N - 1$	

Fuente: Elaboración propia con base en Botero-Arbeláez et al. (2007)

Donde:

a es el número de analistas

b es el número de muestras

n es el número de medidas por cada muestra por cada analista

N es el número total de datos

Método de promedios y rangos

El método del promedio y el rango permite realizar de forma separada el análisis de la repetibilidad y la reproducibilidad de un sistema de medición. Este método consiste en que varios analistas realicen la misma medición sobre varias muestras (González & Falcón, 2015). Con los resultados obtenidos se pueden determinar la repetibilidad, la reproducibilidad y la interacción ente el analista y las muestras.

En general, los estudios de r&R se pueden clasificar como “cortos” y “largos”. Los estudios cortos corresponden al caso en que dos analistas realizan la medición de cinco muestras. Los estudios largos corresponden al caso en que participan tres analistas y realizan tres veces la medición en 10 muestras diferentes. La selección de la cantidad de analistas y muestras depende del criterio del implementador, sin embargo, en la medida en que se aumente el número de repeticiones, de muestras y de analistas, se obtendrán mejores datos. Con los datos obtenidos se pueden estimar los porcentajes de repetibilidad, reproducibilidad y la relación entre estos. Para dicho fin se deben seguir las ecuaciones descritas a continuación:

El porcentaje de repetibilidad (r) se puede calcular de la siguiente manera:

$$Repetibilidad(\%) = \frac{K_1 * R}{T} * 100$$

Donde:

K_1 = Constante que depende del número de mediciones realizadas por cada operador y proporciona un intervalo de confianza del 99 % para estas características (tabla 5.1).

R = Rango promedio de todos los rangos.

T = Tolerancia de la característica medida (dada por el parámetro de aceptación).

Ecuación 5.1. Cálculo para determinar el porcentaje de repetibilidad (Paisan & Moret, 2010).

El rango promedio de todos los rangos (R) se calcula según la ecuación 5.2.

$$R = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m r_i$$

m = Número de operadores.

r_i = Rango promedio de cada operador, el cual a su vez está dado por:

$$r_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r$$

Donde r es el rango de medición corresponde a la diferencia entre el promedio mayor y el promedio menor de los operadores por medio de la ecuación:

$$\text{Reproducibilidad (\%)}: \frac{\sqrt{(K_1 * xD)^2 - \frac{(K_2 * R)^2}{nr}}}{T} * 100$$

Ecuación 5.2. Cálculo para determinar el rango promedio de todos los rangos (Paisan & Moret, 2010).

El porcentaje de reproducibilidad se calcula mediante la ecuación 5.3.

Donde:

K_2 = Constante que depende del número de operadores y proporcional un intervalo de confianza del 99% para estas características (tabla 5.1).

xD = Diferencia entre el promedio mayor y promedio menor de los operadores.

R = Rango promedio de todos los rangos.

n = Número de ensayos por operador.

r = número de partes medidas.

T = Tolerancia de la característica medida (dada por el parámetro de aceptación).

$$Reproducibilidad(\%): \frac{\sqrt{(K_1 * xD)^2 - \frac{(K_2 * R)^2}{nr}}}{T} * 100$$

Ecuación 5.3. Cálculo para determinar el porcentaje de reproducibilidad (Paisan & Moret, 2010).

Tabla 5.3. Valores de las constantes K_1 y K_2 .

Número de ensayos	2	3	4	5
K_1	4,56	3,05	2,50	2,21
Número de operadores	2	3	4	5
K_2	3,65	2,70	2,30	2,08

Nota: Si el valor de K_2 dentro de la raíz es un número negativo, el valor de la reproducibilidad se considera 0.

Fuente: Elaboración propia

El porcentaje de la relación entre la repetibilidad y la reproducibilidad se calcula según la ecuación 5.4.

$$r \& R(\%) = \sqrt{(\%Repetibilidad)^2 + (\%Reproducibilidad)^2}$$

Ecuación 5.4. Cálculo para determinar el porcentaje de la relación entre la repetibilidad y reproducibilidad ($r\&R\%$) (Paisan & Moret, 2010).

Para garantizar la exactitud de los resultados se requiere que las mediciones sean realizadas bajo las mismas condiciones, es decir, utilizando el mismo instrumento o equipo y ejecutado por el mismo analista. Lo anterior, para que no se altere la estabilidad del sistema de medición (González & Falcón, 2015).

Interpretación de resultados: pruebas r&R

Según Gutiérrez & De la Vara (2004), en todos los estudios de $r\&R$ se espera siempre tener un porcentaje de repetibilidad y reproducibilidad lo más cercano posible a 0, ya que esto indica que existe menor variación entre los datos obtenidos. Sin embargo, se

han establecido los siguientes criterios (Llamosa et al., 2007; Paisan & Moret, 2010; Arango et al., 2013):

- Si $r\&R$ (%) < 10 %, la metodología se aprueba.
- Si $10 \% \leq r\&R$ (%) < 30 %, puede ser aceptable según su uso y aplicación.
- Si $r\&R$ (%) > 30 % la metodología no se acepta y requiere mejoras en cuanto al analista, equipo, método, condiciones ambientales, entre otros.

En cuanto a la repetibilidad y la reproducibilidad analizadas de forma independiente (Mosquera & López, 2007):

- a. Si la repetibilidad es mayor en comparación con la reproducibilidad, se puede deber a las siguientes situaciones:
 - El sistema de medición (instrumento o equipo) requiere mantenimiento.
 - Se debe revisar y establecer si las condiciones ambientales son las adecuadas según el método.
 - Existe mucha variación entre los analistas, las muestras y el equipo utilizado.
- b. Si la reproducibilidad es mayor comparada con la repetibilidad, las causas posibles son:
 - El analista necesita entrenamiento en el uso de la metodología.
 - Pueden existir errores de apreciación en la lectura.
 - Las condiciones de reproducibilidad no se han mantenido, por lo tanto, se han modificado.

Criterios de calidad de resultados

Un componente esencial durante la evaluación de un parámetro de control de calidad es el establecimiento de criterios que aseguren la confiabilidad y calidad de los resultados. Estos están relacionados con la definición de parámetros de aceptación, coeficientes de variación, entre otros. A continuación, se encuentra un análisis de este tipo de criterios.

Coeficiente de variación

Según Górdon-Mendoza & Camargo (2015), el coeficiente de variación de Pearson se considera fundamental como indicador de la calidad de experimentos. En general, se utiliza el coeficiente de variación (cv) para aceptar o rechazar la validez de los experimentos (Bowman & Rawlings, 1995).

Por definición, el coeficiente de variación es “la desviación estándar expresada como porcentaje de la media aritmética” (Wayne, 2006). Lo anterior permite establecer este coeficiente como adimensional y reflejar diferentes características de la población (Vásquez & Caballero, 2011).

En general, los datos experimentales proveen información tanto de la variación controlada (efecto de un tratamiento específico) como de la no controlada. Esta última se expresa como un error experimental, el cual puede ser cuantificado como un estimado llamado coeficiente de variación (cv). Estadísticamente el cv indica qué tan grande es la desviación estándar en relación con la media. Este se calcula de la siguiente forma (Patel et al., 2001) (ecuación 5.5).

$$CV = \frac{S}{X} * 100$$

Ecuación 5.5. Determinación del coeficiente de variación (Patel et al., 2001).

El rango aceptable del cv se debe determinar con base en reportes teóricos pero principalmente con la evaluación de un número determinado de ensayos, con los cuales se puede definir a su vez un valor crítico. Lo anterior debido a que los cv varían considerablemente de acuerdo con el tipo de experimento (Patel et al., 2001).

Gómez & Gómez (1984) y Patel et al. (2001) son más específicos al indicar que los cv varían considerablemente de acuerdo con el tipo de experimento. En el caso particular de las técnicas microbiológicas y fisicoquímicas, se ha definido que un valor inferior al 10 % es aceptable. En el caso de los ensayos biológicos, el coeficiente de variación aceptado debe ser inferior al 30 % entre réplicas de un mismo tratamiento (Gómez & Gómez, 1984; Patel et al., 2001). Una gran cantidad de investigadores (Gómez & Gómez, 1984; Patel et al., 2001) indican que, si el valor del cv supera el 30 %, los datos deben ser descartados por su baja precisión (Gordon-Mendoza & Camargo 2015; Schmildt et al., 2017).

Sin embargo, Schmildt et al. (2017) sugieren que los rangos de clasificación de los valores de cv dependen de la variabilidad de las técnicas y los experimentos, del número de repeticiones por tratamiento y de la forma de recolección de los datos. Por lo tanto, los criterios de aceptación dependerán directamente del diseño experimental y de la precisión de este. En algunos casos es necesario establecer dicho rango de aceptación.

Parámetros de aceptación para la metodología

Los parámetros de aceptación son un conjunto de requisitos que se deben cumplir durante la realización de un ensayo y determinan que este sea válido y confiable. Estos hacen referencia a los aspectos que se enuncian a continuación.

Evaluación de testigo absoluto: para ciertas metodologías, por ejemplo las actividades biológicas, se debe evaluar un testigo absoluto (sin aplicación). En general, la variable respuesta en este tratamiento debe estar entre el 5 % y el 10 % y nunca superior al 20 %, de lo contrario el ensayo se debe repetir (Lacey, 2012).

Material de referencia o cepa de referencia: el material o cepa de referencia corresponde a los agentes de control biológico que se han caracterizado o de los cuales se cuenta con el conocimiento de su respuesta en las diferentes evaluaciones. La cepa de referencia se debe evaluar en metodologías microbiológicas y biológicas y es un tratamiento adicional en el análisis de calidad de una muestra de bioplaguicida.

Condiciones físicas y ambientales: los ensayos se deben realizar bajo las condiciones físicas y ambientales (temperatura, humedad o fotoperiodo) previamente establecidas. En caso de evidenciarse alguna modificación en estas condiciones, así como una eventualidad que ponga en riesgo los tratamientos o algunas de sus réplicas, se debe repetir el ensayo.

Criterios estadísticos

Los criterios estadísticos que se deben tener en cuenta en la estandarización de una metodología o en el control de calidad de un bioplaguicida, incluyen la definición de tratamientos, número de réplicas, unidad experimental, diseño experimental, variables de respuesta y análisis estadístico:

Tratamientos

Los tratamientos son las condiciones experimentales que se desean comparar en un ensayo (Johnson & Besselsen, 2002). En cada prueba se debe incluir un control positivo (a una concentración cercana al agente biológico a evaluar) y un control negativo (para conocer el porcentaje del efecto máximo) (Cuevas et al., 2012). En caso de ser necesario, se debe incluir además un control del vehículo empleado, por ejemplo, los excipientes de formulación.

Por ejemplo, si se desea evaluar la actividad de un bioplaguicida sobre una población determinada de insectos es necesario evaluar mínimo dos tratamientos, uno correspondiente a un testigo absoluto (insectos sin ninguna aplicación del agente de control) y el otro a la aplicación del agente de control. Algunas veces, es necesario evaluar un tratamiento adicional cuando se quiere determinar el efecto de otras condiciones en ausencia del principio activo sobre la población tratada. Tal es el caso de los excipientes de formulación, el diluyente del agente de control con el cual se ajusta la concentración requerida o, incluso, el mismo método de aplicación (testigo tratado). Al final del ensayo se determina la variable respuesta definida y mediante la comparación entre los tratamientos, se determina el efecto de las condiciones experimentales evaluadas.

Número de réplicas

Las réplicas son las unidades experimentales que reciben el mismo tratamiento (Gómez, 1997), por lo cual también hacen referencia a la cantidad de observaciones (mediciones) repetidas e independientes que se hacen a las condiciones experimentales que se evalúan (Milliken & Johnson, 1992). Las réplicas permiten estimar el error experimental y determinar una respuesta precisa al efecto que se está evaluando. Entre mayor sea el número de réplicas, mayor es la precisión en la estimación de las medias de los tratamientos; esto se debe a que se disminuye la varianza de las medias de los tratamientos (Gómez, 1997; Gutiérrez & De la Vara, 2004). Para todos los ensayos, tanto microbiológicos como biológicos, se recomienda la evaluación de mínimo tres replicas por cada tratamiento (Cuevas et al., 2012).

Unidad experimental

Barros & Tavares (1995) definen la unidad experimental como la unidad básica que provee la información en la cual se basa la experimentación. Es necesario tener en

cuenta la importancia de la unidad experimental, ya que es la fuente de resultado del ensayo y, por lo tanto, su comportamiento está fuertemente relacionado con todos los factores que son fuente de error de las metodologías (Vargas & Navarro, 2019).

Al momento de evaluar varios tratamientos, las unidades experimentales deben ser homogéneas, de esta forma se garantiza que la diferencia en los resultados es generada por el efecto de los tratamientos y no por factores externos, a los cuales se les conoce como “ruido” (Vargas & Navarro, 2019). Sin embargo, especialmente para ensayos con microorganismos e insectos, establecer un conjunto de unidades experimentales homogéneas es casi imposible debido a las características propias de la unidad experimental. Esta situación se puede corregir mediante tratamientos testigo o control, a los cuales no se les aplica ningún tratamiento. Por ende, sus resultados permiten establecer el comportamiento “real” de la unidad experimental (Vargas et al., 2020).

Por ejemplo, el número de unidades experimentales en un bioensayo de control de calidad de agentes entomopatógenos depende de su definición y establecimiento, como se mencionó en el capítulo 4. Cuando la unidad experimental incluye un solo insecto, se recomienda que el número de unidades experimentales sea de 10 a 15 por réplica. Por otra parte, existen ensayos en los cuales varios insectos están confinados en una misma unidad experimental, en este caso el número de insectos debe estar entre 10 y 15 por unidad, la cual, a su vez, corresponde a una réplica.

En general se ha comprobado que, al aumentar el tamaño de las unidades experimentales, el coeficiente de variación disminuye con respecto al error experimental (Gómez, 1997). Sin embargo, es importante estimar de manera óptima la cantidad de las unidades experimentales, no solo para reducir el error experimental, sino también con base en aspectos económicos y prácticos, incluidos el espacio y la mano de obra (Vargas & Navarro, 2019).

Diseño experimental

El diseño experimental es la forma en que se organizan las unidades experimentales con el fin de uniformizar, en lo posible, los tratamientos a evaluar (Milliken & Johnson, 1992). Cuando todas las unidades experimentales son homogéneas, solo existe un grupo o bloque de observaciones y las unidades experimentales pueden ser asignadas a los tratamientos de manera aleatoria, se denomina Diseño Completamente al Azar (DCA) (Milliken & Johnson, 1992; Gómez, 1997). El DCA

tiene varias ventajas sobresalientes y es el más usado en ensayos de control de calidad de bioplaguicidas. Dichas ventajas se relacionan con su flexibilidad, la cual permite usar cualquier número de tratamientos y réplicas durante la experimentación. Los tratamientos pueden tener diferente número de réplicas, sin embargo, se obtienen comparaciones más precisas cuando se evalúa un mismo número. En este tipo de bioensayos, es necesario contemplar la posibilidad de que exista pérdida de unidades experimentales, sobre todo cuando se manipulan larvas en estado temprano de desarrollo. Asimismo, este diseño tiene la ventaja de proporcionar el mayor número de grados de libertad para el error.

Tabla 5.4. Ejemplo de la asignación aleatoria de réplicas en un Diseño Experimental Completamente al Azar

Tratamientos	Números
A	15,4,9,11
B	3,1,10,12
C	8,6,13,16
D	14,2,5,7

Fuente: Elaboración propia

En el DCA, la distribución de los tratamientos en las unidades experimentales se puede realizar mediante tablas de números aleatorios o con otro método que permita sortear los tratamientos de forma aleatoria (Martínez & Martínez, 1997). Tal es el caso del uso de tarjetas o fichas numéricas que se extraen al azar de una caja o bolsa. Por ejemplo, para la distribución de cuatro tratamientos a las unidades experimentales en un DCA, cada uno con cuatro réplicas, se realiza un sorteo con 16 fichas enumeradas que se extraen al azar sin reemplazo (Gómez, 1997). En la tabla 5.4 se presenta un ejemplo de cómo pueden quedar asignados.

Otro diseño menos usado en el control de calidad de bioplaguicidas, especialmente para ensayos biológicos bajo condiciones de laboratorio o de invernadero pero que resulta recomendable cuando las unidades experimentales pueden agruparse de acuerdo con una fuente de variación, es el uso de bloques (Gómez, 1997).

Los bloques deben contener el mismo número de unidades experimentales y los tratamientos se deben distribuir al azar dentro de cada bloque. Si el bloqueo es correcto, la variabilidad entre las unidades de diferentes bloques debe ser mayor al promedio de la variabilidad entre las unidades de un mismo bloque (Gómez, 1997). Así se eliminan las diferencias del error experimental entre bloques, con lo cual

aumenta la precisión del experimento. La estructura más sencilla en bloques es el diseño de bloques completamente aleatorizados (BCA), en el cual los tratamientos se distribuyen aleatoriamente en las unidades experimentales dentro de cada bloque, con una aleatorización diferente en cada uno de ellos. Para esto se recomienda usar una tabla de números aleatorios (Martínez & Martínez, 1997). Por ejemplo, en un ensayo con seis tratamientos y tres réplicas, la distribución de los tratamientos en tres bloques puede darse como se muestra en la figura 5.2.

Bloque 1						Bloque 2					
F	B	E	C	A	D	C	A	F	D	E	B
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bloque 3											
E	C	F	B	D	A						
13	14	15	16	17	18						

Figura 5.2. Ejemplo de la distribución de seis tratamientos en tres bloques organizados completamente al azar.

Fuente: Elaboración propia

Dentro de las ventajas del diseño BCA están:

- El agrupamiento de las unidades experimentales en bloques homogéneos para controlar una fuente importante de variación (la de bloques), con lo que se obtiene una reducción del error experimental.
- Es posible aumentar el número de réplicas dentro de cada bloque para aquellos tratamientos que requieren más cuidado y atención.
- Si se pierden unidades experimentales, es posible estimar sus valores teniendo en cuenta las restantes.

A pesar de sus ventajas, el diseño BCA no es apropiado para un número elevado de tratamientos (no mayor de 24) debido a que se aumenta el tamaño del bloque, lo cual implica un aumento en la variabilidad dentro de cada bloque y, por lo tanto, un aumento en el error experimental. Por otra parte, si los bloques se arreglan sin una

justificación clara con base en una importante fuente de variación, puede haber una pérdida en la eficiencia al disminuirse los grados de libertad del error (Gómez, 1997).

Variable respuesta

La variable respuesta (variable de interés) es el factor a través del cual se conoce el efecto o los resultados de cada prueba experimental (Gutiérrez & De La Vara, 2004). Es decir, los datos que se recogen en un experimento son las medidas de dicha variable, la cual se debe definir con antelación dependiendo de los objetivos, así como sus unidades.

Para el caso de metodologías microbiológicas se utilizan las expuestas en el capítulo 1. Estas son definidas como parámetros establecidos de acuerdo con el microorganismo. En general, todos los datos o resultados de las unidades experimentales se denominan parte de la variable respuesta. Para ensayos microbiológicos, la variable respuesta puede ser expresada en términos de viabilidad o recuento. En la mayoría de las pruebas de actividad biológica, la respuesta se puede medir como mortalidad, parasitismo, crecimiento, o ciertos efectos subletales (Cuevas et al., 2012).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos relacionados con el control de calidad rutinario de un agente de control incluye la determinación de la desviación estándar (S) y del coeficiente de variación (CV) entre las réplicas de un mismo tratamiento. Posteriormente, se determina su validez dependiendo de los parámetros de aceptación establecidos para cada técnica.

Por otra parte, los datos resultantes de un proceso de estandarización incluyen un análisis más riguroso. Como primera medida se debe calcular el coeficiente de variación para cada uno de los analistas involucrados, el cual debe ser inferior al 10 % para que la metodología se considere repetible. Asimismo, se debe realizar una prueba de T pareada para determinar si hay diferencias significativas en los datos obtenidos. De esta manera, se contempla una hipótesis nula (H_0) que establece que no hay diferencias entre los datos obtenidos por los analistas y una hipótesis alternativa (H_1) que establece que sí las hay.

Con el fin de determinar si existe diferencia significativa entre los analistas se deben realizar pruebas estadísticas en las que se compare el valor p con el nivel de significancia. Un nivel de significancia de 0.05 permite establecer las siguientes relaciones:

- **Si el valor $p \leq \alpha$:** La diferencia entre las medias es estadísticamente significativa (Rechazar H_0).
- **Si el valor $p > \alpha$:** La diferencia entre las medias no es estadísticamente significativa (No se puede rechazar H_0).

De esta forma la prueba de T pareada ayuda a determinar si la metodología evaluada es reproducible.

Una vez se determine de manera preliminar que la metodología es repetible y reproducible, se debe llevar a cabo su confirmación mediante los métodos mencionados anteriormente, previa transformación de los datos según la variable respuesta. Por ejemplo, variables de respuesta expresadas en porcentaje o variables de respuesta expresadas como exponentes se transforman en arcosenos o logaritmos en base 10. De esta manera, los datos que siguen una distribución binomial, al ser transformados, se normalizan y sus varianzas se estabilizan. Se alargan los extremos de la distribución y se angosta la parte central y se pueden realizar los análisis estadísticos respectivos (Gómez, 1997; Segnini, 2004).

Casos de estudio

Los siguientes casos de estudio corresponden a ensayos de estandarización realizados por AGROSAVIA, en el Centro de Investigación Tibaitatá.

Caso de estudio I

En el presente caso de estudio se estandarizaron los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y de actividad biológica para las metodologías de control de calidad de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiospsis* cepa Th003 (Ascomycota: Hypocreaceae) formulado como un granulado dispersable (wg).

Los parámetros de estandarización seleccionados fueron el de repetibilidad, reproducibilidad y el porcentaje de relación entre estos dos (r&R); asimismo, se utilizó el método de promedios y rangos (Llamosa et al., 2007; Paisan et al., 2010). Para ello se

contó con dos analistas, quienes evaluaron la metodología tres veces con la misma muestra bajo las mismas condiciones, con los mismos instrumentos, en el mismo laboratorio y durante el mismo día.

Como criterios de aceptación, se tuvo en cuenta que el coeficiente de variación de los datos obtenidos por cada analista (repetibilidad, r) fueran inferiores al 10 %; que la prueba T pareada no presentara diferencias significativas en los datos obtenidos entre los dos analistas (reproducibilidad, R) y la relación entre r y R (%) obtenida al aplicar el método de promedios y rangos fuera: r y R (%) < 10 % (se aprueba) o $10 \% \leq r$ y R (%) < 30 % (puede ser aceptable según su uso y aplicación).

A continuación, se describe el proceso de estandarización para cada metodología:

Estandarización de la metodología para la determinación de la germinación del principio activo

La metodología estandarizada se describe a continuación:

1. Se pesó $1 \text{ g} \pm 0,01\text{g}$ del agente microbial a base de *Trichoderma koningiopsis*, aislamiento Th003.
2. Se preparó la suspensión inicial y se adicionó la muestra anterior a un vaso de precipitado plástico de 250 ml de capacidad, con 99 ml de polisorbato 80 al 0,1 %.
3. La suspensión anterior se homogenizó (dilución 10^{-2}) con la licuadora de inmersión por 20 segundos.
4. Por medio de una micropipeta, se traspasaron 0,1 ml de la dilución 10^{-2} a un tubo Eppendorf con 0,9 ml de polisorbato 80 al 0,1 %. Se evitó el contacto entre la micropipeta y el diluyente. De esta manera se obtuvo la dilución 10^{-3} .
5. Las diluciones (10^{-2} y 10^{-3}) se homogenizaron en un agitador vórtex por 10 segundos.
6. Se sembraron 0,1 ml de las tres últimas diluciones en cajas de Petri (agar agua suplementado con benomil al 0,0003 %). Cada dilución se sembró por triplicado y se utilizó un rastrillo para distribuir el contenido sobre el medio de cultivo.
7. Las cajas se incubaron a una temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas y se ubicaron dentro de la incubadora de manera invertida.

8. Transcurrido el tiempo de incubación, se cortó un trozo de medio de cultivo inoculado de aproximadamente 1 cm² con un bisturí estéril y se colocó sobre una lámina portaobjetos. Posteriormente, se adicionó una gota de azul de lacto-fenol sobre el trozo de medio de cultivo y se cubrió con una laminilla.
9. Se cuantificaron los conidios germinados y no germinados mediante microscopio óptico (40×). Se contaron mínimo 100 conidios (germinados y no germinados) por cada réplica.
10. El porcentaje de germinación se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$Germinacion\ (\%) = \frac{Conidios\ germinados}{Conidios\ totales} * 100$$

Los resultados correspondientes a la determinación del porcentaje de germinación del principio activo para cada uno de los analistas están relacionados en la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Resultados de la determinación del porcentaje de germinación del agente microbioal a base de *T. koningiopsis* obtenidos por cada analista

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
Analista 1	1	72,17	71,07	75,21	72,82	x	74,66
	2	74,77	74,31	74,79	74,62	SD	1,85
	3	78,00	77,57	74,00	76,52	CV (%)	2,48
Analista 2	1	74,51	70,19	71,15	71,95	x	74,20
	2	75,25	75,73	74,58	75,19	SD	1,95
	3	80,58	72,55	73,27	75,47	CV (%)	2,63

Fuente: Elaboración propia

Para el analista 1 se obtuvieron porcentajes de germinación del 71,07 % al 78,00 % con una media del 74,66 % ± 1,85 % y un coeficiente de variación del 2,48 %. Para el analista 2 se obtuvieron porcentajes de germinación del 70,19 % al 80,58 % con una media de 74,20 % ± 1,95 % y un coeficiente de variación del 2,63 %. Estos resultados establecen que la variabilidad de las evaluaciones para cada analista fue pequeña, lo cual se refleja en el valor de coeficiente de variación obtenido (2,48 % y 2,63 %, respectivamente). Los coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 10 %, lo cual corrobora la repetibilidad de las evaluaciones siguiendo la metodología establecida.

Al realizar la prueba T pareada se obtuvo un valor de p del 0,5635 el cual, al ser mayor a 0,05, permitió la aceptación de la hipótesis nula, lo que indica que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de germinación obtenidos por los dos analistas (tabla 5.6).

Tabla 5.6. Resultados de la prueba T pareada

Media	0,52
Error Estándar	0,8631
Media H_0	0,52
Lower 95 % CI	-1,470
Upper 95 % CI	2,510
T	0,60
DF	8
Valor p	0,5635

Fuente: Elaboración propia

H_0 : Hipótesis nula: No hay diferencias significativas entre los porcentajes de germinación obtenidos por los dos analistas

H_1 : Hipótesis alterna: Hay diferencias significativas entre los porcentajes de germinación obtenidos por los dos analistas

Luego de transformar los porcentajes de germinación mediante la función de arco-seno, se determinó la reproducibilidad, la repetibilidad y el porcentaje de r&R (%) mediante la metodología de promedios y rangos (tabla 5.7 y 5.8).

Tabla 5.7. Porcentajes de germinación del agente microbiano a base de *T. koningiopsis* transformados mediante la función arcoseno

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3
Analista 1	1	0,85	0,84	0,87
	2	0,86	0,86	0,86
	3	0,88	0,88	0,86
Analista 2	1	0,86	0,84	0,84
	2	0,87	0,87	0,86
	3	0,90	0,85	0,86

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5.8. Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad, reproducibilidad y de r&R (%) para la determinación del porcentaje de germinación del agente microbiano a base de *T. koningiopsis*

	Analista 1	Analista 2
Rango por medición	0,03	0,03
	0,04	0,03
	0,01	0,02
Repetibilidad (%)	9,44	
Reproducibilidad (%)	1,04	
r&R (%)	9,50	

Fuente: Elaboración propia

La metodología para determinar la germinación de los conidios del agente microbiano a base de *T. koningiopsis* presentó una repetibilidad del 9,44 %, una reproducibilidad del 1,04 % y un porcentaje de relación entre estos dos parámetros (r&R %) del 9,50 % (≤ 10 %). Lo anterior sugiere que la metodología analítica es repetible y reproducible en el tiempo y se aprueba para su uso y aplicación.

Estandarización de la metodología para la determinación de pH

La metodología estandarizada fue la siguiente:

1. Se pesó 1 g de la muestra y se dispuso en 50 ml de agua destilada estéril contenida en un vaso de precipitado. Se agitó hasta disolver completamente y se verificó que la temperatura de la suspensión fuera de 20 °C.
2. Se verificó la calibración del potenciómetro mediante una de las soluciones amortiguadoras de pH 4 y pH 7.
3. Se realizó la lectura del pH de la muestra tres veces y por triplicado por cada uno de los analistas.

Los resultados obtenidos se encuentran registrados en la tabla 5.9.

Tabla 5.9. Resultados de la determinación del pH del agente microbial a base de *T. koningiopsis*, obtenidos por cada analista

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
Analista 1	1	6,12	6,12	6,14	6,13	<i>x</i>	6,12
	2	6,12	6,12	6,10	6,11	SD	0,01
	3	6,11	6,12	6,12	6,12	CV (%)	0,11
Analista 2	1	6,14	6,14	6,15	6,14	<i>x</i>	6,12
	2	6,09	6,11	6,12	6,11	SD	0,02
	3	6,12	6,12	6,13	6,12	CV (%)	0,30

Fuente: Elaboración propia

Para el analista 1 se obtuvieron valores de pH entre 6,10 y 6,14 con una media de 6,12 ± 0,01 y un coeficiente de variación del 0,11 %. Para el analista 2 se obtuvieron valores de pH entre 6,09 y 6,15 con una media de 6,12 ± 0,02 y un coeficiente de variación del 0,30 %. Estos resultados establecen que la variabilidad de las evaluaciones para cada analista fue pequeña, lo cual se refleja en el valor de coeficiente de variación obtenido (0,11 % y 0,30 %, respectivamente). Estos coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 10 %, lo cual corrobora la repetibilidad de las evaluaciones siguiendo la metodología establecida.

Los resultados obtenidos al realizar la prueba T pareada determinaron un valor de p del 0,3466 el cual, al ser mayor a 0,05, permitió la aceptación de la hipótesis nula, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre valores de pH obtenidos por los dos analistas (tabla 5.10).

Tabla 5.10. Resultados de la prueba T

Media	-5,56 x 10 ⁻³
Error Estándar	5,56 x 10 ⁻³
Media H0	-5,56 x 10 ⁻³
Lower 95 % CI	-0,0184
Upper 95 % CI	7,26 x 10 ⁻³
T	-1,00
DF	8
Valor p	0,3466

Fuente: Elaboración propia

H_0 : Hipótesis nula: No hay diferencias significativas entre los valores de pH obtenidos por los dos analistas

H_1 : Hipótesis alterna: Hay diferencias significativas entre los valores de pH obtenidos por los dos analistas

Posteriormente se determinó la reproducibilidad, la repetibilidad y el r&R (%) mediante la metodología de promedios y rangos (tabla 5.11).

Tabla 5.11. Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad, reproducibilidad y de r&R (%) para la determinación de pH del agente microbiano a base de *T. koningiopsis*

Rango por medición	Analista 1	Analista 2
	0,01	0,05
	0,00	0,03
	0,04	6,13
Repetibilidad (%)	1,33	
Reproducibilidad (%)	0,31	
r&R (%)	1,37	

Fuente: Elaboración propia

La metodología para determinar el pH del agente microbiano a base de *T. koningiopsis* presentó una repetibilidad del 1,33 %, una reproducibilidad del 0,31 % y un porcentaje de relación entre estos dos parámetros (r&R %) del 1,37 % (≤ 10 %). Lo anterior sugiere que la metodología analítica es repetible y reproducible en el tiempo y se aprueba para su uso y aplicación.

Estandarización de la actividad biológica del bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis*

Para la actividad biológica se evaluó la eficacia en de *Trichoderma koningiopsis* contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Ascomycota: Sclerotiniaceae) en condiciones *in vitro*. Para la estandarización de la metodología se definieron los siguientes criterios:

Criterios biológicos

- Patógeno: esclerocios de *S. sclerotiorum*.

- Agente de control: bioplaguicida a base del aislamiento Th003 de *T. koningiopsis* y como control positivo se evaluó la cepa de referencia Th003 (microorganismo sin formular y cultivado en PDA durante 10 días).

Criterios de evaluación

- Condiciones físicas y ambientales: bioensayo montado en condiciones de laboratorio con una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Sistema de aplicación: aspersión del agente de control sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*.
- Montaje de la unidad experimental: una caja de Petri con suelo y cinco esclerocios de *S. sclerotiorum*.
- Signos del parasitismo: se evidencia un crecimiento micelial de color blanco y una esporulación de color verde del hongo antagonista sobre los esclerocios del patógeno.

Criterios para el aseguramiento de los resultados

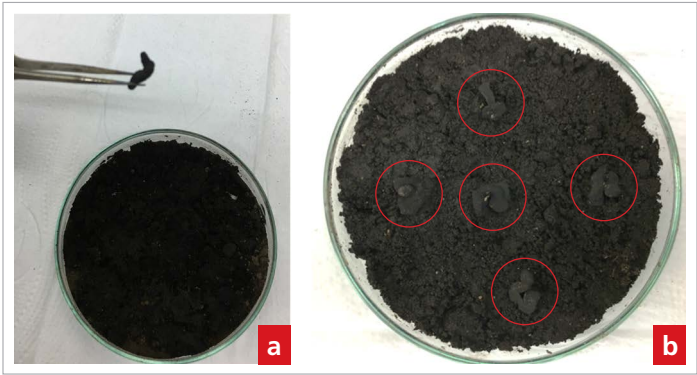
- Parámetros de aceptación: el testigo absoluto no debe presentar parasitismo por el agente biocontrolador ni contaminación. El coeficiente de variación entre las réplicas de un mismo tratamiento debe ser menor al 30 %. La cepa de referencia (aislamiento Th003 de *T. koningiopsis*) debe alcanzar un parasitismo superior al 80 %. El bioensayo se debe realizar bajo las condiciones de temperatura establecidas anteriormente.

Criterios estadísticos

- Tratamientos: la aplicación del agente de control (bioplaguicida y cepa de referencia) y un testigo absoluto. Cada analista evaluó la metodología establecida tres veces (tres repeticiones).
- Número de réplicas: se evaluaron tres réplicas por tratamiento.
- Unidades experimentales: una caja de Petri con suelo y cinco esclerocios de *S. sclerotiorum*, asperjados y no asperjados con el agente de control.
- Diseño experimental: diseño experimental completamente al azar (DCA).
- Variable respuesta: Porcentaje de parasitismo (ver el capítulo 3).

La metodología estandarizada fue la siguiente:

Cinco esclerocios desinfectados de *S. sclerotiorum* se dispusieron sobre 35 g $\pm$ 0,1 g de suelo contenidos en una cada de Petri (figura 5.3). Posteriormente, se asperjaron 550 μ l de una suspensión del agente control biológico ajustado a la concentración de 1×10^7 conidios.ml⁻¹ sobre cada uno de ellos (unidad experimental o réplica). Cada réplica (tres por tratamiento) se incubó a 25 °C $\pm$ 1 °C durante siete días en completa oscuridad. Adicionalmente, se evaluó un testigo absoluto (esclerocios no asperjados con el agente de control).



Fotos: Lisette Torres Torres

Figura 5.3. Ubicación de los esclerocios de *S. sclerotiorum* sobre el suelo. a. Esclerocio de *S. sclerotiorum*; b. Ubicación equidistante de los esclerocios sobre el suelo estéril.

Transcurrido dicho tiempo, se observó cada uno de los tratamientos y se cosecharon los esclerocios de cada uno de ellos. Luego de su desinfección con alcohol al 70 % e hipoclorito de sodio al 2 % y de enjuagues con agua estéril, estos se sembraron en Agar agua con cloranfenicol y se incubaron bajo las mismas condiciones de temperatura por siete días más. Finalmente se determinó el porcentaje de parasitismo en cada uno de los tratamientos.

Los resultados obtenidos para cada uno de los analistas se encuentran en la tabla 5.12.

Tabla 5.12. Porcentaje de parasitismo del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*, obtenidos por cada analista

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
Analista 1	1	100,00	100,00	100,00	100,00	x	100,00
	2	100,00	100,00	100,00	100,00	SD	0,00
	3	100,00	100,00	100,00	100,00	cv (%)	0,00

(Continúa)

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
Analista 2	1	100,00	100,00	100,00	100,00	x	100,00
	2	100,00	100,00	100,00	100,00	SD	0,00
	3	100,00	100,00	100,00	100,00	cv (%)	0,00

Fuente: Elaboración propia

Tanto para el analista 1 como para el analista 2 se obtuvieron porcentajes de parasitismo del 100 % en todas sus evaluaciones, por lo que en ambos casos el coeficiente de variación (cv) fue de 0 %. Lo anterior corrobora la repetibilidad la metodología establecida. Luego de transformar los porcentajes de parasitismo mediante la función de arcoseno, se determinó la reproducibilidad, repetibilidad y el r&R (%) mediante la metodología de promedios y rangos (tabla 5.13 y 5.14).

Tabla 5.13. Porcentaje de parasitismo del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum* transformados mediante la función arcoseno

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3
Analista 1	1	1,00	1,00	1,00
	2	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00
Analista 2	1	1,00	1,00	1,00
	2	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00

Fuente: Elaboración propia

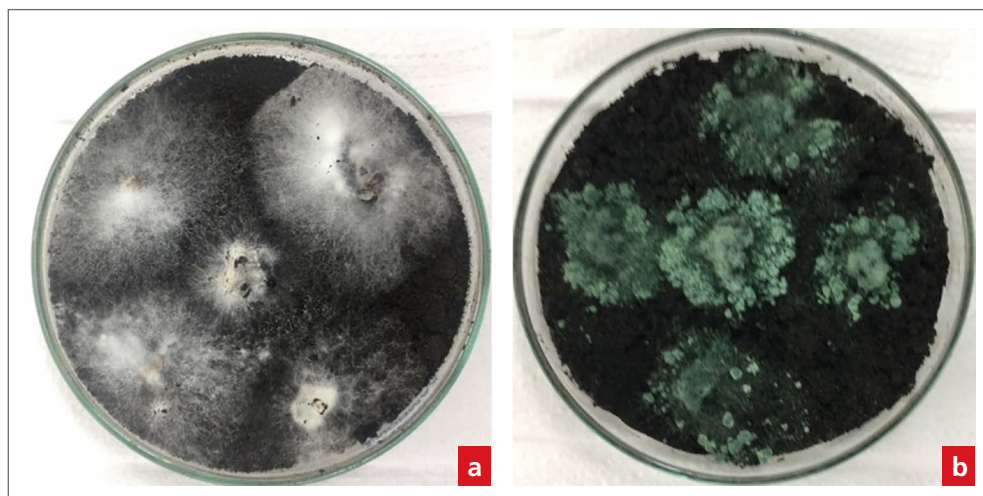
Tabla 5.14. Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad, reproducibilidad y de r&R (%) para la evaluación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*

Rango por medición	Analista 1	Analista 2
	0,00	0,00
	0,00	0,00
	0,00	0,00
Repetibilidad (%)	0,00	
Reproducibilidad (%)	0,00	
r&R (%)	0,00	

Fuente: Elaboración propia

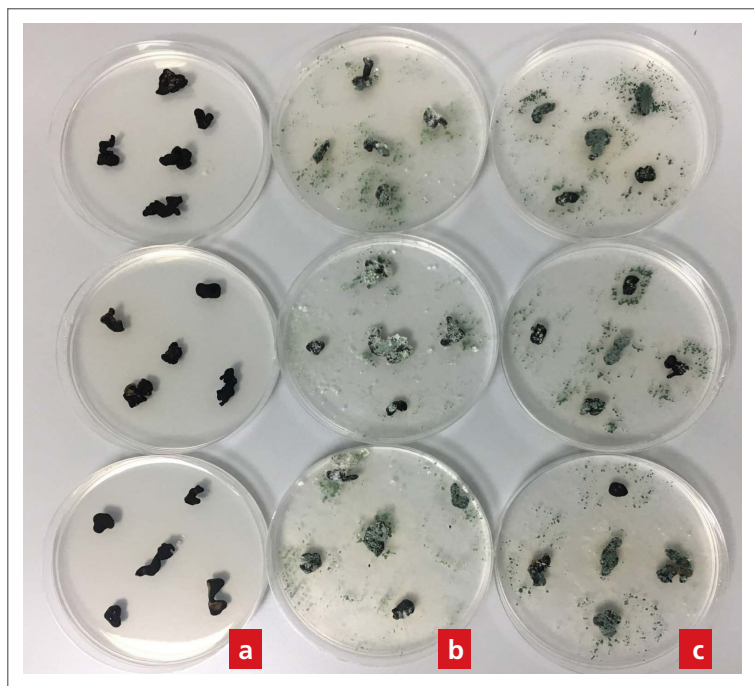
La metodología para evaluar la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum* presentó una repetibilidad del 0 %, una reproducibilidad del 0 % y un porcentaje de relación entre estos dos parámetros ($r\&R$ %) del 0 % ($10 \% \leq r\&R$). Lo anterior sugiere que la metodología analítica es repetible y reproducible en el tiempo y se aprueba para su uso y aplicación.

Por otra parte, los esclerocios tratados con la cepa de referencia (Th003) presentaron un parasitismo del 100 % y estos, junto con los tratados con el bioplaguicida, presentaron un crecimiento micelial lanoso con una esporulación típicamente de color verde en comparación con testigo absoluto (figura 5.4). Esta misma observación se hizo con los esclerocios mantenidos en agar agua, lo cual corrobora el parasitismo del agente biocontrolador (figura 5.5).



Fotos: Lisette Torres Torres

Figura 5.4. Evaluación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*. a. Esclerocios de *S. sclerotiorum* germinados (testigo absoluto) sobre suelo; b. Esclerocios de *S. sclerotiorum* parasitados por el agente de control biológico a base de *T. koningiopsis*.



Fotos: Lissette Torres Torres

Figura 5.5. Confirmación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de *T. koningiopsis* sobre esclerocios de *S. sclerotiorum*. a. Esclerocios de *S. sclerotiorum* (testigo absoluto) crecidos en agar agua; b. Esclerocios de *S. sclerotiorum* parasitados por la cepa de referencia (Th003) de *T. koningiopsis*; c. Esclerocios de *S. sclerotiorum* parasitados por el bioplaguicida a base de *T. koningiopsis*.

Caso de estudio II

El presente caso tuvo como objetivo estandarizar la metodología relacionada con la determinación de la eficacia de *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Clavicipitaceae) sobre larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Para esto, a partir de una misma muestra homogénea (el mismo cultivo del agente de control e insectos de la misma edad), bajo las mismas condiciones, los mismos instrumentos, en el mismo laboratorio y durante el mismo día, dos analistas evaluaron la metodología establecida cinco veces cada uno (repetición). Adicionalmente, se tuvieron en cuenta tres réplicas por repetición para cada uno de los tratamientos evaluados, los cuales correspondieron a un testigo absoluto y al aislamiento del hongo entomopatógeno en cuestión. Luego de la evaluación, se calcularon los estimadores estadísticos para cada grupo de bioensayos realizados independientemente para cada analista (repetibilidad) y entre ellos (reproducibilidad). Finalmente, se aplicó el método de promedios y rangos (Llamosa et al., 2007; Paisan et al., 2010).

Para la estandarización de la metodología se definieron los siguientes criterios:

Criterios biológicos

- Insecto plaga: Larvas de *D. saccharalis* de seis días de edad provenientes de la Unidad de Crías del Laboratorio de Entomología de AGROSAVIA en el Centro de Investigación Tibaitatá.
- Agente de control: Hongo entomopatógeno *M. anisopliae* (aislamiento Mt004), cultivado en agar papa dextrosa agar (PDA) durante ocho a diez días.

Criterios de evaluación

- Condiciones físicas y ambientales: bioensayo montado en condiciones de laboratorio con una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de $36\% \pm 5\%$.
- Sistema de aplicación: inmersión durante 20 segundos en una suspensión del agente de control ajustado a una concentración de 1×10^7 conidios. ml^{-1} .
- Montaje de la unidad experimental: un recipiente plástico de 0,5 oz con un grano de maíz tierno y una larva viva del insecto.
- Síntomas y signos de la infección: se evidencian por un crecimiento micelial de color blanco y una esporulación de color verde del hongo entomopatógeno sobre el cuerpo del insecto.

Criterios para el aseguramiento de los resultados

- Parámetros de aceptación: la mortalidad en el testigo absoluto debe ser menor al 20 %. El coeficiente de variación entre las réplicas de un mismo tratamiento debe ser menor al 30 %. El material de referencia (aislamiento Mt004 de *M. anisopliae*) debe alcanzar un porcentaje de eficacia superior al 80 %. El bioensayo se debe realizar bajo las condiciones de temperatura y humedad establecidas anteriormente.
- Repetibilidad y reproducibilidad: el coeficiente de variación de los datos obtenidos por cada analista (repetibilidad, r) debe ser inferior al 10 %. La prueba T pareada no debe arrojar diferencias significativas en los datos obtenidos entre los datos obtenidos por los dos analistas (reproducibilidad, R). La relación entre r & R (%) obtenida al aplicar el método de promedios y rangos debe ser $r \& R (\%) < 10\%$ (se aprueba) o $10\% \leq r \& R (\%) < 30\%$ (puede ser aceptable según su uso y aplicación).

Criterios estadísticos

- Tratamientos: la aplicación del aislamiento Mt004 y un testigo absoluto. Cada analista evalúa la metodología establecida cinco veces (cinco repeticiones).
- Número de réplicas: se evalúan tres réplicas por tratamiento.
- Unidades experimentales: un recipiente plástico de 0,5 oz con un grano de maíz tierno y una larva viva del insecto.
- Diseño experimental: diseño experimental completamente al azar (DCA).
- Variable respuesta: porcentaje de eficacia (Zar, 1999).

La metodología de estandarización fue la siguiente:

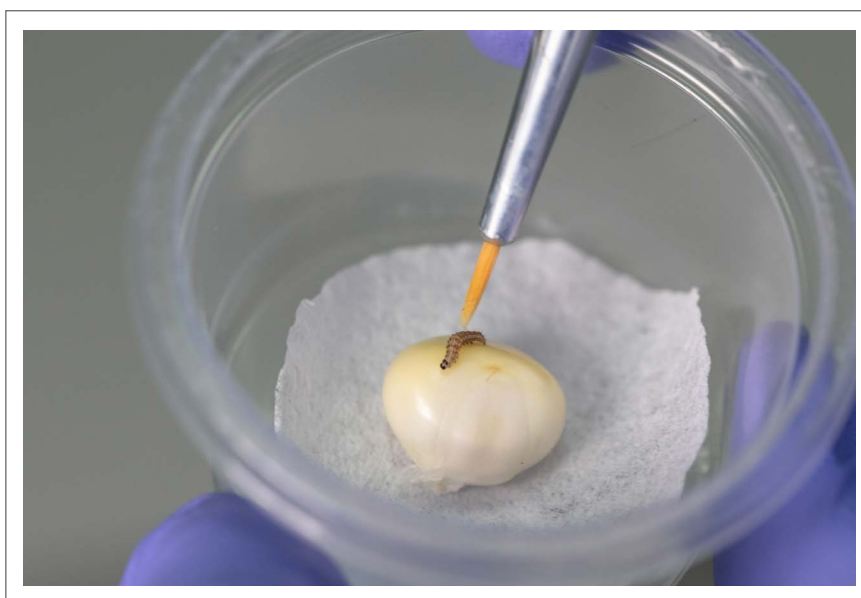
La evaluación del agente de control a base de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis* se realizó mediante la técnica de inmersión durante 20 segundos. Para ello, 15 larvas de seis días de edad fueron sumergidas en una suspensión del hongo con una concentración final de 1×10^7 conidios. ml^{-1} (figura 5.6).



Fotos: Lissette Torres Torres

Figura 5.6. Determinación de la eficacia de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis*. a. Inmersión de las larvas de *D. saccharalis* en la suspensión del agente biocontrolador; b. Montaje de las larvas de *D. saccharalis* luego de su inmersión en la suspensión del agente biocontrolador.

Posteriormente, cada larva se ubicó de manera individual en recipientes plásticos de 0,5 oz con un grano de maíz (*Zea mays*) como sustrato de alimentación, lo cual constituyó una réplica (figura 5.7). Igualmente, se evaluó un testigo absoluto con sus tres réplicas. Finalmente, se registró la mortalidad hasta el noveno día posterior a la inmersión, se calculó la eficacia (%) y se comprobó el crecimiento y la esporulación del hongo entomopatógeno sobre el cuerpo del insecto mediante observaciones en el estereoscopio y el montaje del microcultivo.



Fotos: Lissette Torres Torres

Figura 5.7. Montaje de la unidad experimental para determinar la actividad biocontroladora de *M. anisopliae* sobre *D. saccharalis*.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad biocontroladora (mortalidad) del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis* bajo condiciones de laboratorio están relacionados, para cada uno de los analistas, en la tabla 5.15.

Tabla 5.15. Mortalidad expresada como eficacia (%) del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. sacchralis*, obtenidos por cada analista

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3	x	Consolidado por analista	
Analista 1	1	86,7	93,3	100,0	93,33	x	95,56
	2	93,3	100,0	100,0	97,78	SD	2,22
	3	93,3	93,3	100,0	95,56	CV (%)	2,33
Analista 2	1	93,33	86,67	86,67	88,89	x	91,85
	2	86,67	100,00	86,67	91,11	SD	3,39
	3	86,67	100,00	100,00	95,56	CV (%)	3,70

Fuente: Elaboración propia

Para el analista 1 se obtuvieron porcentajes de eficacia del 86,7 % al 100 % con una media del 95,56 % $\pm$ 2,22 % y un coeficiente de variación del 2,33 %. Para el analista 2, se obtuvieron porcentajes de eficacia del 86,67 % al 100 % con una media de 91,85 % $\pm$ 3,39 % y un coeficiente de variación del 3,70 %. Estos resultados establecieron que la variabilidad de las evaluaciones para cada analista fue pequeña, lo cual se refleja en el valor del coeficiente de variación obtenido (2,33 % y 3,70 %, respectivamente). Los coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 10 %, lo cual corrobora la repetibilidad de las evaluaciones siguiendo la metodología establecida.

Los resultados obtenidos al realizar la Prueba T pareada determinaron un valor de p del 0,1796 el cual, al ser mayor a 0,05, permitió la aceptación de la hipótesis nula. Lo anterior indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de eficacia obtenidos entre los dos analistas y corroboró la reproducibilidad de la metodología (tabla 5.8).

Tabla 5.16. Resultados de la prueba T pareada

Media	36,911
Error Estándar	25,096
Media H ₀	36,911
Lower 95 % CI -4,7434	-20,961
Upper 95 % CI 2,1914	94,783
T	1,47
DF	8
Valor p	0,1796

Fuente: Elaboración propia

Hipótesis nula (H_0): no hay diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de eficacia obtenidos por los dos analistas.

Hipótesis alterna (H_1): hay diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de eficacia obtenidos por los dos analistas.

Luego de transformar los porcentajes de eficacia mediante la función de arcoseno se confirmó la reproducibilidad y repetibilidad de la metodología por medio de la aplicación del método de promedios y rangos (tabla 5.16 y 5.17).

Tabla 5.17. Mortalidad (porcentaje de eficacia) del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis*, transformados mediante la función arcoseno

Analista	Evaluación	R 1	R 2	R 3
Analista 1	1	0,93	0,97	1,00
	2	0,97	1,00	1,00
	3	0,97	0,97	1,00
Analista 2	1	0,97	0,93	0,93
	2	0,93	1,00	0,93
	3	0,93	1,00	1,00

Fuente: Elaboración propia

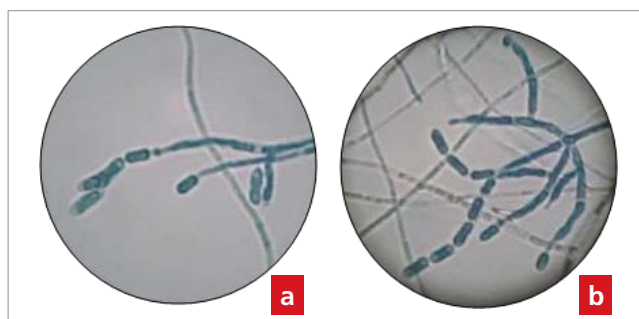
Tabla 5.18. Rangos de medición obtenidos para cada analista y valores de repetibilidad (r), reproducibilidad (R) y de r&R (%) para la evaluación de la actividad biológica (mortalidad) del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae*

	Analista 1	Analista 2
Rango por medición	0,04	0,09
	0,07	0,1
	0,07	0,09
Repetibilidad (%)	13,84	
Reproducibilidad (%)	7,44	
r&R (%)	15,71	

Fuente: Elaboración propia

La metodología para evaluar la actividad biocontroladora del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae* sobre larvas de *D. saccharalis* presentó una repetibilidad del 13,84 %, una reproducibilidad del 7,44 % y un porcentaje de relación entre estos dos parámetros ($r\&R$ %) del 15,71 % ($10 \% \leq r\&R (\%) < 30 \%$). Lo anterior sugirió que la metodología analítica es repetible y reproducible en el tiempo y se acepta para su uso y aplicación.

Por otra parte, se corroboró el crecimiento y esporulación del hongo entomopatógeno sobre el cuerpo de los insectos y se confirmó su identidad mediante el montaje de microcultivos. El entomopatógeno se caracterizó por presentar micelio blanco, hifas septadas, ramificadas y hialinas, así como conidios alargados que forman cadenas originadas en fiálides de color verde (figura 5.8). Estas características concordaron con las reportadas por Barnett & Hunter (1998) para *M. anisopliae*.



Fotos: Lissette Torres Torres

Figura 5.8. Características microscópicas del aislamiento Mt004 de *M. anisopliae*. a. Conidios aseptados, cilíndricos u ovoides; b. Conidios en cadena, compactados en columnas.

Validación de metodologías analíticas

El principal objetivo de un laboratorio de análisis es reportar resultados altamente confiables, por lo tanto, se debe controlar y asegurar la calidad de estos (Valencia, 2010a). En este sentido, se deben desarrollar procedimientos internos que permitan asegurar la calidad de los resultados que se obtienen y emiten, en síntesis, es fundamental validar las metodologías analíticas que se utilizan. Como se ha mencionado en los capítulos anteriores, se recomienda usar materiales de referencia o certificados. En este sentido, para evitar recurrir a varios métodos para el cumplimiento de un mismo objetivo, se debe tener en cuenta que los organismos de normalización ya tienen desarrollados y validados métodos de referencia armonizados (Leclercq et al., 2019).

El siguiente apartado contiene información sobre los parámetros que se deben considerar cuando se vaya a validar una metodología que va a ser empleada para control de calidad. Sin embargo, es importante recordar que para que un proceso de validación sea exitoso, es imperativo que el laboratorio involucrado en el análisis esté equipado adecuadamente para cumplir con los requisitos de bioseguridad y trazabilidad (Singh & Anannd, 2020). Asimismo, es fundamental tener en cuenta que el método analítico a validar debe estar normalizado antes de iniciar el proceso de validación (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals [ICH, Q2A], 1995).

La validación garantiza que los requisitos para la realización de un ensayo se cumplen, que las posibilidades de error en los resultados disminuyen y que las técnicas son compatibles en las condiciones en que se está trabajando. El proceso de validación permite evaluar si un método analítico es aceptable para su propósito previsto (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020). En suma, la validación es la manera de demostrar que, por medio de evidencia documentada, el procedimiento analítico en cuestión producirá de manera persistente y permanente resultados confiables.

Básicamente, existen dos tipos de validación según el objetivo que se quiere alcanzar: validación primaria y validación secundaria. La validación primaria es un proceso exploratorio que se emplea para establecer los límites operativos y las características de un método nuevo o que ha sido modificado (Sartory, 2005). Por otro lado, la validación secundaria o verificación se emplea cuando se van a usar metodologías desarrolladas y validadas por terceros, como las metodologías de los ensayos físico-químicos. En este caso se deben tener en cuenta los parámetros evaluados por quienes desarrollaron la metodología (Sartory, 2005).

Existen diferentes guías sobre métodos de validación que han sido publicadas para brindar orientación al respecto (Raposo & Ibelli-Bianco, 2020). Aunque algunas están dirigidas a otras áreas, pueden ser útiles en la validación de metodologías que se utilizan de manera similar en los ensayos de control de calidad de bioplaguicidas (tabla 5.19).

Tabla 5.19. Guías para la validación de metodologías analíticas

Nombre de la organización	Sigla	Área o disciplina	Año
Collaborative International Pesticides Analytical Council	Cipac	Agrochemical formulations	2003
The United States Pharmacopeia	USP	Pharmaceutical	2016
Association of Analytical Communities	AOAC	Foods	2002
The International Council for Harmonization of Technical Requeriments for Pharmaceuticals	ICH	Pharmaceutical	2005
The Organization of Economic Co-operation & Development	OECD	Biocides	2014

Fuente: Raposo & Ibelli-Bianco (2020)

Etapas en el desarrollo de la validación de una metodología analítica y criterios de aceptación

No existe una guía oficial que enumere los pasos a seguir; esto dependerá del método en sí mismo (Velandia, 2008). Sin embargo, a continuación se sugieren los pasos generales que se deben seguir para la validación de una técnica (tabla 5.20).

Tabla 5.20. Pasos para tener en cuenta para la validación de técnicas de análisis

Proceso de validación					
Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6
Metodologías que se pueden validar:	Identificar: parámetros y variables	Obtención de datos	Análisis estadístico	Comparación con requisitos	Método validado
Cualitativos	Diseñar: experimentos estadísticamente (DEE)				
Semicuantitativos	Ejecutar: ensayos de laboratorio				
Cuantitativos	Medir: observaciones				

Fuente: Elaboración propia

Según Velandia (2008), “la validación de un procedimiento analítico establece mediante estudios de laboratorio que las características de desempeño del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas” (p 42). Son precisamente esas características o criterios los que evidencian que el método analítico permitirá obtener resultados confiables en el tiempo. De acuerdo con el tipo de ensayo a realizar, algunos de los parámetros a tener en cuenta para su validación se presentan en la tabla 5.21 (Valencia, 2010b).

Tabla 5.21. Parámetros de validación a tener en cuenta de acuerdo con el tipo de ensayo de control de calidad

Tipo de ensayo	Parámetros a tener en cuenta en la validación						
	Precisión	Linealidad	Repetibilidad	Reproducibilidad	Exactitud	Especificidad	Robustez
Microbiológico			X	X		X	X
Fisicoquímico	X	X	X	X	X		X
Biológico		X	X	X			X

Fuente: Elaboración propia

A continuación, se aplicarán diferentes parámetros en el proceso de validación de una metodología de recuento en placa para microorganismos. Es necesario tener en cuenta que la validación aplica para metodologías establecidas por entes internacionales como los establecidos en la tabla 5.19.

Parámetros de validación

1. Precisión: hace referencia a la distancia o alejamiento de los datos obtenidos de una medida media o central (dispersión). Los datos de precisión proporcionan evidencia sobre la aceptabilidad del protocolo (Jacobs et al., 2019). El objetivo es conocer la variabilidad debida a “errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo que no pueden ser siempre controlados (analista, equipo, instrumental, reactivos, tiempo, entre otros)” (Velandia, 2008, p. 30). Este parámetro suele expresarse en la forma de “imprecisión” como desviación estándar absoluta (s o SD), desviación estándar relativa (RSD), coeficiente de variación (CV) o varianza (s²) (Buick et al., 1990).

2. Linealidad: de acuerdo con Velandia (2008), corresponde a “la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro del rango establecido”. La linealidad es una relación entre la concentración y la medida de valoración que se puede modelar mediante una línea recta que describe con precisión la relación de la concentración versus la respuesta (USP, 2007). Este tipo de modelo lineal es ideal, dado que facilita el trazado, la interpolación y la interpretación de los datos (AEFI, 2001). Sin embargo, no siempre es así (USP, 2007), entonces el uso de modelos cuadráticos o modelos de regresión superior pueden ser necesarios para evitar “puntos altamente influyentes” y desviaciones en bajos niveles de concentración (Rasopo & Ibelli-Bianco, 2020).

Ejemplo 5.1. Linealidad entre dos métodos utilizada para cuantificar la concentración de un microorganismo (resultado expresado como Log10 ufc/ml)

Método de referencia Log ₁₀ UFC/ml	Método para validar Log ₁₀ UFC/ml
4,50	4,32
4,60	4,62
4,58	4,70
5,42	5,30
5,87	6,00
4,40	4,32
4,65	4,62
4,68	4,70
5,32	5,30
5,97	6,00
4,44	4,32
4,67	4,62
4,68	4,70
5,22	5,30
6,02	6,00

Fuente: Elaboración propia

Empleando los datos del ejemplo 5.1. se determinó el coeficiente de correlación (r) y el error típico (Sxy):

- r = El coeficiente de correlación mide el grado de linealidad. En este caso corresponde a 0,99.

- S_{xy} = El error típico es de 0,09.

3. Repetibilidad: es la confiabilidad de los datos obtenidos en una prueba. Este análisis relaciona la variabilidad entre los resultados obtenidos de mediciones sucesivas con el método efectuado o una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (por un mismo analista, con los mismos equipos y reactivos, en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto) (AEFI, 2001). Como se mostró en la primera parte de este capítulo, la repetibilidad de un ensayo se estima con el coeficiente de variación (cv) (desviación estándar relativa) de una serie de medidas (AEFI, 2001). Sin embargo, para procesos de validaciones, el límite de repetibilidad r se define como la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba individuales independientes (transformados con $\log_{10}$) obtenidos utilizando el mismo método, el mismo aparato dentro del intervalo de tiempo más corto posible, con material de prueba idéntico, en el mismo laboratorio y realizados por el mismo operador. No se debe exceder el valor r en $> 5 \%$ de los casos. Si la diferencia entre la repetibilidad resultante dentro de un laboratorio excede r , los resultados pueden necesitar más investigaciones (ejemplo 5.2) (Jacobs et al., 2019).

Ejemplo 5.2. Repetibilidad entre analistas en un proceso de validación

Para la validación de un método, tres analistas evaluaron por quintuplicado un material de referencia (valor asignado de la cepa de referencia es: 5,36 log UFC/ml). Los resultados del recuento de UFC se transformaron a logaritmo en base 10 para normalizar la distribución y se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 5.22.

Tabla 5.22. Resultados normalizados obtenidos del recuento de colonias de tres analistas

Analistas	Resultado 1 Log10 (ufc/ml)	Resultado 2 Log10 (ufc /ml)	Resultado 3 Log10 (ufc /ml)	Resultado 4 Log10 (ufc /ml)	Resultado 5 Log10 (ufc /ml)	Promedio	Desviación Sr
Analista 1	5,70	5,71	5,69	5,64	5,72	5,69	0,03
Analista 2	5,68	5,67	5,66	5,61	5,64	5,65	0,03
Analista 3	5,75	5,78	5,80	5,81	5,77	5,78	0,02

Fuente: Elaboración propia

Teniendo en cuenta los datos del ejemplo 5.1, se quiere estimar:

- La desviación estándar (repetibilidad) expresada como Desvest o σn^{-1} .
- La desviación estándar (reproducibilidad) entre analistas
- Sesgo expresado como Promedio laboratorio - valor asignado (cepa de referencia)

Para lograr lo anterior: en primer lugar, se calculó el promedio y la desviación estándar de los datos obtenidos con cada uno de los analistas; en segundo lugar, se estimó la repetibilidad de cada uno de los analistas ($x < 5\%$) con la desviación estándar de sus replicados y, en tercer lugar, una vez estimada la desviación estándar de la repetibilidad de cada uno de los analistas, se calculó una estimación global de la desviación estándar de la repetibilidad. Para dicho fin, se obtuvieron los promedios de las estimaciones de la desviación estándar de la repetibilidad de los analistas empleando la ecuación 5.3:

$$S = \sqrt{\frac{(Sr1)^2 + (Sr2)^2 + (Sr3)^2}{3}}$$

Ecuación 5.6. Cálculo para determinar la repetibilidad.

El resultado S global (log10 UFC/ml) es 0,03.

4. Reproducibilidad: a diferencia de la repetibilidad, la reproducibilidad analiza la capacidad de un método, ensayo o experimento de ser reproducido por otros bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios (AEFI, 2001). También se define como la medida de la dispersión de los resultados de ensayos realizados sobre la misma muestra homogénea pero ejecutados por diferentes analistas en días diferentes (ejemplo 5.3, tabla 5.13) (Calpena et al., 1991). Con la desviación estándar de los datos obtenidos entre analistas se estima la reproducibilidad de la técnica. El límite de reproducibilidad (R) se define como la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba únicos (transformados en log10) obtenidos utilizando el mismo método, con material de prueba idéntico, en diferentes laboratorios y con diferentes operadores que utilizan diferentes equipos. El valor R no debe superarse en $> 5\%$ de los casos. Si la diferencia entre la reproducibilidad de los resultados entre laboratorios excede R, los resultados pueden necesitar investigaciones más profundas (Jacobs et al., 2019).

Ejemplo 5.3. Reproducibilidad entre analistas.

Tabla 5.23 Análisis de datos obtenido entre analistas

Analistas	Log ₁₀ (UFC /ml)	Desviación (S / σ)
Analista 1	5,69	0,03
Analista 2	5,65	0,03
Analista 3	5,78	0,02
Desviación Sr (repetibilidad)		0,03
Desviación SR (reproducibilidad)	0,07	

Fuente: Elaboración propia

Con los datos obtenidos se calculó el sesgo: $5,71 - 5,36 = 0,35$

Conclusiones del ejercicio expuesto: Con los resultados obtenidos se evalúa la aptitud del laboratorio para realizar el ensayo:
Sr (log UFC /ml): 0,03
SR (log UFC /ml): 0,07
Sesgo (log UFC /ml): 0,35

5. Exactitud: expresa la cercanía entre el valor que se acepta convencionalmente como verdadero (o un valor de referencia aceptado) y el valor encontrado experimentalmente. En síntesis, la exactitud permite evaluar qué tan cercano se encuentra el valor obtenido por un ensayo, método o equipo del valor medio (ICH, Q2A, 1995).

6. Especificidad: es la capacidad para evaluar inequívocamente el analito en la presencia de componentes que se espera estén presentes. En otras palabras, la especificad hace referencia a la capacidad de un método, ensayo o equipo de obtener un resultado verdaderamente negativo o positivo. Este análisis es importante, dado que generalmente una muestra puede incluir impurezas, productos de degradación o componentes del vehículo, entre otros (ICH, Q2A, 1995). Sin embargo, la carencia de especificidad en un método puede ser compensada por otros procedimientos analíticos.

La especificidad tiene las siguientes implicaciones:

Identificación: para asegurar la identidad de un analito.

Prueba de pureza: para asegurar que todos los procedimientos analíticos permitan una declaración precisa del contenido de impurezas de un analito, por ejemplo, sustancias relacionadas con el ensayo, límite de metales pesados, residuos de solventes o productos de degradación. En este sentido, la prueba de pureza se lleva a cabo para proveer un resultado exacto que garantice una declaración precisa del contenido o potencia del analito en la muestra (ICH, Q2A, 1995).

7. Robustez: hace referencia a la capacidad de la metodología analítica, ensayo o equipo de medición para no afectarse por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método. El análisis de robustez tiene la propiedad de indicar la confiabilidad de un método, equipo o ensayo durante su uso normal (ICH, Q2A, 1995). En otras palabras, la robustez demuestra la capacidad del procedimiento de análisis para proporcionar resultados válidos en presencia de pequeños cambios respecto de las condiciones descritas en el método susceptibles de producirse durante su utilización (AEFI, 2001).

Caso de estudio para validar un método

Se analizó por quintuplicado una misma utilizando el método a validar y el método de referencia (Peñaranda, 2010) para el recuento en placa de microorganismos.

Tabla 5.24. Datos brutos de recuento UFC/ml

UFC/g		Log UFC/g	
Método a validar	Método de referencia	Método a validar	Método de referencia
2.000	2.100	3,30	3,32
1.800	2.200	3,26	3,34
1.900	2.300	3,28	3,36
1.800	2.100	3,26	3,32
2.100	2.200	3,32	3,34
Promedio		3,28	3,34
S		0,03	0,02
F		0,30	

Fuente: Elaboración propia

- Se evaluaron las diferencias en la precisión entre ambos métodos mediante una prueba de F. Para dicho fin, en Excel se colocó = prueba F (los datos del método a validar y los datos del método de referencia). F= 0,98.

Con los datos se obtuvo la siguiente información:

Tabla 5.25. Análisis de datos con prueba F

	Método a validar	Método de referencia
Media	3,28	3,34
Varianza	0,03	0,02
Datos	5	5
Grados de libertad	4	4
α 0,05		
F	3,107	F estadístico < valor crítico
P(F<f) una cola	0,14	
Valor crítico para F (una cola)	6,388 (*)	Valor límite

* El valor crítico se obtiene de la tabla Fisher

Fuente: Elaboración propia

En conclusión, con un α 0,05 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la varianza de los dos métodos, por lo tanto, se aceptó el método a validar bajo las condiciones establecidas en el procesamiento de muestras.

Referencias

Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria [AEFI]. (2001). *Validación de métodos analíticos* [Monografía]. Comisión de normas de buena fabricación y control de calidad. AEFI.

Altieri, M. A, Koohafkan, P., Giménez, E. H., & Division, W. (2012). Agricultura verde: Fundamentos agroecológicos para diseñar sistemas agrícolas biodiversos, resilientes y productivos. *Agroecología*, 7(1), 7-18. <https://revistas.um.es/agroecologia/article/view/170961>

Arango, M., Gómez M., Rodrigo A., & Zapata, J. (2013). Medición y mejoramiento de la operación de despacho de carbón a través de modelos estadísticos r&R. *Boletín de Ciencias de la Tierra*, 33(1), 135-146.

Barros, I., & Tavares, M. (1995). Estimativa do tamanho ótimo de parcelas experimentais através de cálculos algébricos. *Bragantia*, 54(1), 209-215. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051995000100024>

- Betancourt, L., & García, J. (2018). *Estandarización de técnicas para la caracterización química de los plastificantes usados en la producción de botas en PVC para la empresa Croydon Colombia*. Fundación Universidad de América.
- Botero-Arbeláez, M., Mendoza-Vargas, J., & Arbeláez-Salazar, O. (2007). Método Anova utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. *Science & Technology*, 13(37), 533-537, <https://doi.org/10.22517/23447214.4181>
- Bowman, D. T., & Rawlings, J. O. (1995). Establishing a rejection procedure for crop performance data. *Agronomy Journal*, 87(1), 147-151.
- Buick, A. R., Doig, M. V., Jeal, S. C., Land, G. S., & McDowall, R. D. (1990). Method validation in the bioanalytical laboratory. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 8(12), 629-637. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(90\)80093-5](https://doi.org/10.1016/0731-7085(90)80093-5)
- Calpena, A. C., Escribano, E., & Fernández, E. (1991). Validación de los métodos analíticos. *Farmacología Clínica*, 7(9), 749-758.
- Cuevas, M. D. C., Pinette, G., López-Hidalgo, A. M., Cruz-Sanches, J. S., Nieto-Peña, M. De L. (2012). Requerimientos de control de calidad en bioensayos. En M. C. Cuevas, G. Espinosa, C. A. Ilizaliturri, A. Mendoza, M. Montejo (Eds.), *Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos* (pp. 127-135).
- Gómez, H. (1997). *Estadística experimental*. Universidad Nacional de Colombia.
- Gómez, K. A., & Gómez A. A. (1984). *Statistical procedures for agricultural research*. Wiley-Interscience Publication.
- González, G., & Falcón, C. (2015). Procedimiento para el análisis de repetibilidad y reproducibilidad en procesos de manufactura. *Revista Cubana de Ingeniería*, 6(3), 53-59.
- Górdon-Mendoza, R., & Camargo-Buitrago, I. (2015). Selección de estadísticos para la estimación de la precisión experimental en ensayos de maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 55-63.
- Gutiérrez, H., & De La Vara, R. (2004). *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw Hill.
- Hrvat, F., Cifric, S., Aleta, A., Dzuho, A., Pokvic, L. G., & Badnjevic, A. (2020). *ISO/IEC 15189 Implementation in Microbiology Laboratory - General Concepts*. IEEE International Workshop on Metrology for Industry 4.0 & IoT, 2020, pp. 611-616, <https://doi.org/10.1109/MetroInd4.0IoT571.2020.9138169>

- International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals [ICH, Q2A]. (1995). *Validation of analytical procedures: Definitions and methodology*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guide-line/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
- Jacobs, W., Jongenburger, I., De Boer, E., & Biesta, E. (2019). Validation by interlaboratory trials of EN ISO 10272-Microbiology of the food chain-Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp.-Part 2: Colony-count technique. *International Journal of Food Microbiology*, 288(1), 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.008>
- Jarosova, E. (2020). The use of D-optimal design in an expanded gauge R&R study. *Quality Engineering*, 33(1), 1-9. <https://doi.org/10.1080/08982112.2020.1745233>
- Johnson, P. D., & Besselsen, D. G. (2002). Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR Journal*, 43(4), 223-232. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.202>
- Lacey, A. L. (2012). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Elsevier.
- Leclercq, A., Hardouin, G., & Lombard, B. (2019). European and International validation of 15 main reference methods in the microbiology of the food chain. *International Journal of Food Microbiology*. 288(1), 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.024>
- Llamosa, L. E., Meza, L., & Botero, M. (2007). Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica. *Scientia et Technica*, 1(35), 455-460. <https://doi.org/10.22517/23447214.5479>
- Manterola, C., Grande, L., Otzen, T., García, N., Salazar, P., & Quiroz, G. (2018). Reliability, precision or reproducibility of the measurements. Methods of assessment, utility and applications in clinical practice. *Revista chilena de infectología*, 35(6), 680-688, <https://doi.org/10.4067/S0716-10182018000600680>
- Martínez, R. & Martínez, N. (1997). *Diseño de experimentos. Análisis de datos estándar y no estándar*. Fondo Nacional Universitario. Universidad Nacional de Colombia.
- Milliken, G. & Johnson D. (1992). *Analysis of Messy Data. Volumen 4. Basics of Experimental Design*. Chapman & Hall/CRC. Press Company.

- Mosquera, C., & López, E. (2007). Comparación entre los métodos de evaluación de incertidumbre y estudios de repetibilidad y reproducibilidad para la evaluación de las mediciones. Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E., Baez-Rogelio, A., Quintero-Hernández, V., Rivera-Urbalejo, A. P., & Pérez-Terrón, R. (2016). Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. En G. Chavira-Juárez (Ed.), *Instituciones de educación superior la labor investigadora e innovadora en México* (pp. 67-84).
- Paisan, Y., & Moret, J. (2010). La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. *Revista Tecnología Química* 30(2), 117-121.
- Parada, M. & Muñoz, C. (2015). *Bioinsumo de uso agrícola: potencialidades y desafíos*. <https://agriculturers.com/bioinsumos-de-uso-agricola-potencialidades-y-desafios/>
- Patel, J. K., Patel, N. M., & Shyani, R. L. (2001). Coefficient of variation in field experiments and yardstick thereof - An empirical study. *Current Science*, 81(9,10), 1163-1164.
- Peñaranda, S. (2010). *Memorias: Validación de los métodos microbiológicos. Análisis estadístico de los resultados*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Raposo, F., & Ibelli-Bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validations: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends in analytical chemistry*, 129, 115913, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>
- Ravensberg, W. (2011). Quality control. En J. Grould, K. Hoelmer y J. Goolshy (Eds.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods* (pp. 129-197). Springer.
- Ravensberg, W. (2011). Quality control. En J. Grould, K. Hoelmer, & J. Goolshy (Eds.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods* (pp. 129-197). Springer.
- Riera, L., Lugo, S., Sosa, I., Entrena, A., Acevedo, M., Tabares, T., Llanes, H., Fernández, N., Joglar, I., Otaño, A., Zamora, Z., Negrín, N., González, A., Rodríguez, K., Muñoz, E., Crespo, E., Peña, M., & Chala, T. (2008). Quality Assurance Programs in the Production of Laboratory Animals. *Revista de Salud Animal*, 30(1), 12-16.
- Sartory, D. P. (2005). Review Validation, verification and comparison: Adopting new methods in water microbiology. *Water Sa*, 31(3), 393-396.

- Schmildt, E. R., Silva, W., Ambrosio, J., Schmildt, O., Nascimento, A. L., & Fernandes, A. A. (2017). Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de alface. *Revista agro@Mbiente on-line*, 11(4), 290, <http://doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i4.4412>
- Segnini, S. (2004). *Fundamentos de Bioestadística*. Universidad de los Andes.
- Singh, N., & Anand, A. (2020). *Analytical Methods J Microbiological*. Reference Module in Food Sciences.
- United States Pharmacopeial 30 edition. [USP 30]. (2007). Rockville: Mack printing.
- Vargas, J. C., & Navarro, J. R. (2019). Tamaño y forma de unidad experimental para ensayos de rendimiento de arroz (*Oryza sativa*), en Guanacaste, Costa Rica. *UNED Research Journal*, 11(3), 355-360, <https://doi.org/doi:10.22458/urj.v11i3.2653>
- Vargas, J. C., Vega, E. V., & Cerdas, R. (2020). Tamaño y forma de la unidad experimental en ensayos de rendimiento de Brachiaria híbrido CIAT 3608. *Pastos y Forrajes*, 43(2), 144-149.
- Vásquez, R., & Caballero, A. (2011). Inconsistencia del Coeficiente de Variación para expresar la variabilidad de un experimento en un modelo de Análisis de Varianza. *Cultivos tropicales*. 32(3). 59-62.
- Velandia, J. (2008). *Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica verterinaria*. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.
- Valencia, L. (2010a). *Estrategias para la validación de métodos de análisis microbiológicos*. Colombia: Curso validación de métodos microbiológicos, Programa de Educación Continua, Pontificia Universidad Javeriana (no publicado).
- Valencia, L. (2010b). *Validación de métodos de ensayos*. Colombia: Curso validación de métodos microbiológicos, Programa de Educación Continua, Pontificia Universidad Javeriana (no publicado).
- Vocabulario Internacional de Metrología (VIM). (2012). *Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados*. Centro Español de Metrología.
- Wayne, D. (2006). *Bioestadística*. Limusa.
- Zar, J.H. (1999). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall.



Glosario

Bioplaguicida: compuestos que incluyen sustancias naturales que controlan plagas (plaguicidas bioquímicos), microorganismos que controlan plagas (plaguicidas microbianos) y sustancias plaguicidas producidas por plantas que contienen material genético agregado, como protectores incorporados en las plantas (PIP) (United States Environmental Protection Agency [US EPA], 2019).

Blastospora: célula vegetativa (similar a una levadura) producida por diversos hongos entomopatógenos que es capaz de germinar e infectar insectos de forma más rápida que un conidio (Lacey, 2017).

Concentración letal media: concentración de un patógeno o agente que produce la muerte de la mitad de los individuos evaluados. El método experimental no es suficiente para determinar la dosis precisa a la que los individuos evaluados fueron expuestos. Su símbolo es CL_{50} (difiere de la dosis letal media) (Lacey, 2012).

Conidio: espora especializada de reproducción asexual que se forma en el extremo de una hifa a partir de un conidióforo. Permite la dispersión del hongo hacia nuevos hábitats (Rey et al., 2017).

Conidióforo: hifa especializada sobre la cual se forman conidios externamente (Cepero et al., 2012).

Dosis letal media: dosis con la cual se produce la mitad de la muerte de los individuos evaluados. Su símbolo es DL_{50} (Lacey, 2012).

Epicarpo: es la parte más externa que suele proteger al resto del fruto del exterior. El epicarpio forma la epidermis protectora del fruto que, a menudo, contiene glándulas con esencias y pigmentos. En muchas frutas se llama comúnmente piel (EcuRed, s. f.)

Error experimental: son aquellas variaciones o alteraciones en los resultados debidos a factores no controlados o no conocidos. Al error se le atribuye la diferencia que se presenta entre unidades experimentales tratadas idénticamente. Las principales fuentes de error están relacionadas con la variabilidad natural existente en el material sobre el cual se aplican los tratamientos; la falta de uniformidad con que se manejan las unidades experimentales; errores en la observación y en la medición y efectos combinados de factores extraños (Gómez, 1997).

Excipiente: grupo de auxiliares de formulación, inertes y que deben proteger y liberar al ingrediente activo (Díaz et al., 2018).

Experimento/Bioensayo: es un proceso por medio del cual se obtiene una observación o medición. Un bioensayo es un experimento aleatorio cuyos resultados no pueden predecirse y, por lo tanto, están sujetos al azar. Asimismo, los bioensayos incluyen tres etapas: planeación, ejecución y análisis e interpretación de resultados (Gómez, 1997). También corresponde a una prueba experimental de control de calidad realizada en un laboratorio o invernadero que permite verificar la actividad biológica de un insumo de uso agrícola (ICA, 2011).

Flóculo: signo de inestabilidad de una emulsión en el cual las gotas de la fase interna se unen y forman agregados debido a las fuerzas de atracción de Van der Waals (Aranberri et al., 2006).

Ingrediente o principio activo: componente de una formulación que ejerce la actividad biológica. Puede incluir un microorganismo, extracto vegetal, metabolito, entre otros. (Díaz et al., 2018).

Insecto alterno: insecto sobre el cual se evalúa la actividad biológica de un agente de control biológico el cual, en principio, está dirigido para el control de otro (insecto blanco). Surge como una alternativa cuando la consecución del insecto blanco es una limitación.

Líquidos inmiscibles: líquidos que no se mezclan (Brown et al., 1997).

Microesclerocio: agregados hifales compactos y pequeños, frecuentemente melanizados, con tolerancia a la desecación, productores de compuestos secundarios que pueden ser antibacteriales, antifúngicos o interrumpir la alimentación en insectos (Cooke, 1983 citado por Lacey, 2017).

Surfactante: contracción del término agente de la superficie activa, es una sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones en un sistema tiene la propiedad de adsorberse sobre la superficie o interfase de este y alterar la energía libre presente en la superficie o interfase (Rosen & Kunjappu, 2012).

Testigo absoluto: corresponde a los individuos control en un bioensayo y, por lo tanto, no reciben ningún tratamiento, ninguna aplicación y se disponen en la unidad experimental correspondiente (Lacey, 2012).

Testigo tratado: corresponde a un tratamiento control. A los individuos de este tratamiento se les coloca el vehículo de aplicación sin el principio activo a evaluar. En este caso, la sustancia es generalmente inocua y se usa sola, administrada de la misma manera que el tratamiento (Johnson & Besselsen, 2002).

Tiempo letal medio: periodo de tiempo de exposición a un patógeno en el cual se produce la muerte en la mitad de los individuos sometidos a prueba (Lacey, 2012).

Tratamiento: los tratamientos son las condiciones experimentales que se desean comparar en un experimento (Johnson & Besselsen, 2002).

Unidad experimental: es la unidad o individuo al cual se le aplica un tratamiento (Gould, 2012).

Referencias

- Aranberri, I., Binks, B. P., Clint, J. H., & Fletcher, P. D. I. (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3), 211-231.
- Brown, T. L., Lemay, H. E., Bursten, B. E., Murphy, C. J., Woodward, P. M., & Stoltzfus, M. W. (1997). *Chemistry: The central science*. Pearson.
- Cepero, M., Restrepo, S., Franco-Molano, A., Toquica, M., & Estupiñán, N. (2012). *Biología de hongos*. Uniandes.
- Díaz, A., Gómez, M., Grijalba, E., Santos, A., Cruz, F., León, D., Alarcón, E., & Cotes, A. (2018). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 628-692). AGROSAVIA.

- EcuRed. (s. f.). *Enfermedades del cultivo de la papaya*. https://www.ecured.cu/Enfermedades_del_cultivo_de_la_papaya.
- Gómez, H. (1997). *Estadística experimental*. Universidad Nacional de Colombia.
- Gould, A. L. (Ed.). (2015). *Statistical methods for evaluating safety in medical product development*. John Wiley & Sons.
- Instituto Colombiano Agropecuario [ICA]. (2011). Resolución 000698 de 2011 “Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones”. <https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx>
- Johnson, P. D., & Besselsen, D. G. (2002). Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR Journal*, 43(4), 223-232. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.202>
- Lacey, A. L. (2012). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Elsevier.
- Lacey, A. L. (2017). *Microbial control of insect and mite pests*. Elsevier.
- Rey, A., Garea, M., & Lago, J. C. (2017). *Glosario micológico y acepciones complementarias o afines*. Agrupación Micótica A. Zarrota.
- Rosen, M. J. & Kunjappu, J. T. (2012). *Surfactants and interfacial phenomena*. Wiley Online Library.
- United States Pharmacopeial. 30 ed. [USP 30]. (2007). Rockville: Mack printing.

Medios de cultivo y soluciones

Medios de cultivo

- **Agar avena**

Preparación para un litro:

25 g de avena en hojuelas

18 mg de agar

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar agua**

Preparación para un litro:

18 g de agar

500 g de cloranfenicol

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar infusión cerebro corazón (BHI)**

Preparación para un litro:

37 g de Infusión cerebro corazón

18 g de agar

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar extracto de levadura (YM)**

Preparación para un litro:

3 g de extracto de levadura

3 g de extracto de malta

10 g de sacarosa

5 g de peptona

18 g de agar

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar extracto de malta**

Preparación para un litro:

5 g de extracto de malta

3 g de sacarosa

5 g de peptona

18 g de agar

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar extracto de levadura peptona dextrosa (YPD)**

Preparación para un litro:

20 g de peptona

20 g de glucosa

10 g de extracto de levadura

18 g de agar

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar Luria Bertani (LB)**

Preparación para un litro:

10 g de triptona

5 g de extracto de levadura

10 g de cloruro de sodio

18 g de agar

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar nutritivo**

Preparación para un litro:

28 g agar nutritivo

5 g de agar

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar papa dextrosa (PDA)**

Preparación para un litro:

2 g de sacarosa

39 g de agar PDA (papa dextrosa agar)

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar papa dextrosa (PDA) suplementado con Tritón X 100 (1 %)**

Preparación para un litro:

2 g de sacarosa

39 g de agar PDA (papa dextrosa agar)

1 ml de Tritón X 100

1 g de cloranfenicol

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar rosa de bengala**

Preparación para un litro:

5 g de peptona

10 g de glucosa

1 g de fosfato dipotásico

0,5 g de sulfato de magnesio

0,05 g de rosa de bengala

18 g de agar

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Agar Sabouraud dextrosa**

Preparación para un litro:

65 g de agar Sabouraud

2 g de agar

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Trichoderma selective media**

Preparación para un litro:

0,2 g de sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

0,9 g de fosfato de potasio

0,15 g de cloruro de potasio

1 g de nitrato de amonio

3 g de glucosa

0,15 g de rosa de bengala

18 g de agar

03 g de ácido difenilamin-4-sulfónico

0,2 g de pentaclorobenceno

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

Soluciones

- **Solución de agua peptonada al 0,1 %**

Preparación para un litro:

1,85 g de agua peptona

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

- **Solución de Tween 80 al 0,1 %**

Preparación para un litro:

1 ml de Tween 80

Completar volumen con agua destilada a 1000 ml

AGROSAVIA

Corporación colombiana de investigación agropecuaria

Esta publicación tiene por objeto dar a conocer los estudios a nivel mundial y las experiencias de AGROSAVIA en control de calidad de bioinsumos agrícolas, con especial énfasis en parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y biológicos de plaguicidas microbianos. El uso de microorganismos con interés comercial implica diferentes etapas y los controles son de gran importancia para asegurar la máxima eficacia en campo; sin embargo, actualmente existen muy pocos reportes en los que se detallen los métodos y los procesos de aseguramiento para obtener resultados confiables y veraces. En ese sentido, esta obra constituye un aporte que permitirá, además, mejorar e implementar metodologías de control de calidad rutinario de bioinsumos agrícolas.



BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

CORREO: **bac@agrosavia.co**

TELÉFONO: **(57 601) 422 73 00** EXT. **1257 o 1274**

SKYPE: **biblioteca.agropecuaria**

www.agrosavia.co

Distribución gratuita

Prohibida su venta



**El campo
es de todos**

Minagricultura