

Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad

Adriana Marcela Santos Díaz
Erika Paola Grijalba Bernal
Lissette 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 Agrovoc
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
<hr/>	
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
<hr/>	
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
<i>Lisette Torres Torres</i>	
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
<i>Adriana Marcela Santos, Lisette Torres Torres, Liz Alejandra Uribe, Erika Paola Grijalba</i>	
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 microbiano 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 microbiano 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 microbiano 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. saccharalis</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 micoinsecticidas” (*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

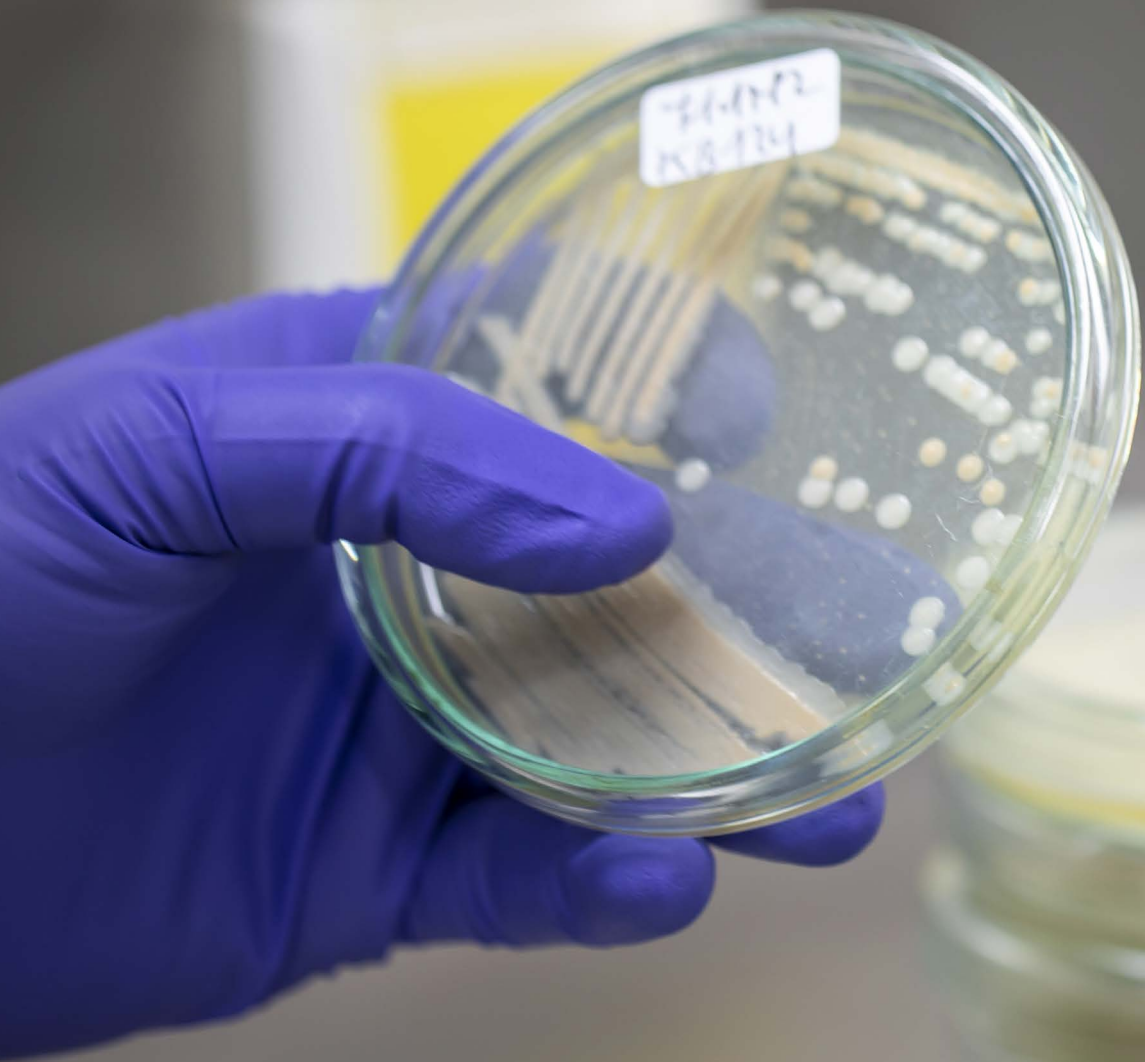
Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8282-7196>

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.



TAPC
K25





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.