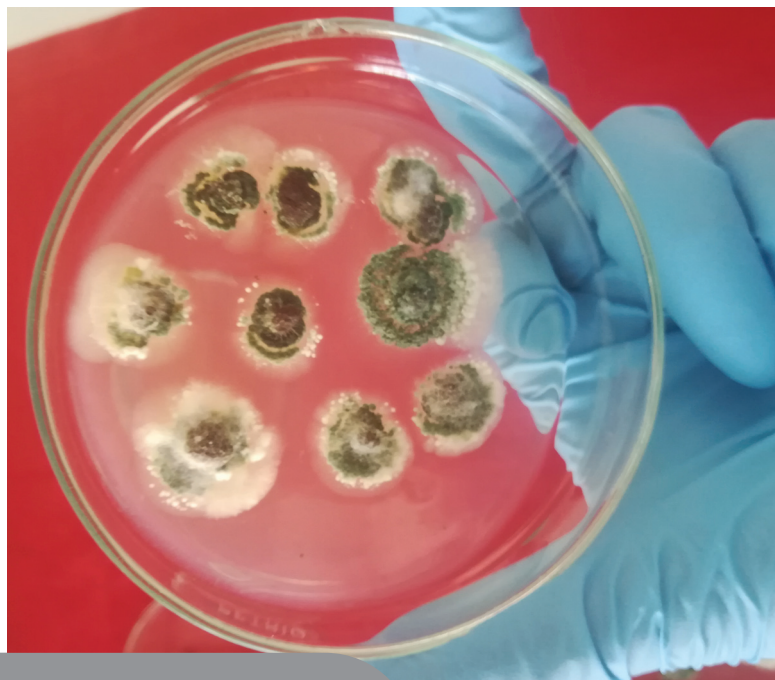


MANUAL DE ANÁLISIS DE CALIDAD PARA FORMULACIONES CON BASE EN HONGOS BIOCONTROLADORES



CRÉDITOS

Instituciones participantes:

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - INIAP
New Zealand Pastoral Agriculture Research Institute Limited - AgResearch Ltd.
New Zealand Ministry of Foreign Affairs and Trade - MFAT
Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura - IICA

Proyecto de Investigación y Desarrollo: “Implementación del control biológico para mejorar la calidad de vida de pequeños agricultores de los Andes Ecuatorianos”.

AUTORES:

Francisco Báez
Cynthia Perdomo
Ana Pincay
Cristina Tello
Laura Villamizar
Trevor Jackson
Stefan Jaronski
William Viera

Impresión y diseño realizado:

Industria gráfica Grupo Correa

Citación correcta de esta publicación:

Báez, F., Perdomo, C., Pincay, A., Tello, C., Villamizar, L., Trevor, J., Jaronski, S., Viera, W. (2019). Manual para el análisis de calidad de formulaciones de hongos benéficos. Manual N° 112. INIAP - Experimental Santa Catalina. Mejía - Ecuador. 45 p.

ISBN Impreso: 978-9942-22-472-9

ISBN Digital: 978-9942-22-473-6

Octubre, 2019

Todos los derechos reservados.

Prohibida la reproducción total o parcial sin autorización

PRESENTACIÓN

Los microorganismos representan un grupo de importancia porque son responsables de la dinámica de la transformación de suelos y equilibrio de ecosistemas. Muchos aislamientos de microorganismos son utilizados para la elaboración de bioformulados para el control de plagas, así como para biofertilizantes.

Los bioformulados varían según el tipo de portador utilizado en su preparación, pueden ser sólidos o líquidos y pueden incluir osmoprotectores, agentes adherentes, nutrientes, etc., que aseguren la calidad de los inoculantes microbianos, la cual radicará en el número de células viables presentes en el microorganismo.

Uno de los principales desafíos para favorecer el éxito final en la aplicación de los bioformulados es hacer un adecuado control de calidad a través de métodos apropiados, que nos permitan conocer las características del producto terminado, con el fin de asegurar a los usuarios un producto de calidad.

En la actualidad, los parámetros de calidad considerados para formulaciones biológicas en su mayoría son microbiológicos, sin tomar en cuenta las propiedades fisicoquímicas del producto o los cambios que éstas pueden sufrir a través del tiempo de almacenamiento (vida útil), por lo que se deben considerar todos estos parámetros en el campo de control de calidad para mejorar la producción de bioformulados en el mercado nacional.

En este contexto, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, a través del Departamento de Protección Vegetal de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC), inició trabajos conjuntos con el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura - IICA y AgResearch Ltd. - Nueva Zelanda, entre los cuales está la estandarización de metodologías de laboratorio de los principales parámetros microbiológicos y fisicoquímicos para el control de calidad de bioinsumos formulados utilizando hongos biocontroladores; asistiendo de esta manera a la investigación en el área de control biológico, la transferencia de tecnología para beneficio de agricultores y aportando al desarrollo de una producción sostenible.

Este manual constituye una herramienta guía que describe de una forma didáctica los procedimientos utilizados en el Departamento de Protección Vegetal del INIAP para realizar investigación y servicios a clientes externos en el análisis de control de calidad de bioinsumos con base en hongos biocontroladores, enfocándonos en el control de calidad del producto final, es decir, productos elaborados listos para su uso o comercialización.

El presente documento está dirigido para técnicos de laboratorio que desean implementar un control de calidad a su producción de bioformulaciones de uso agrícola.

CONTENIDO

Introducción	VII
SECCIÓN 1: CONCEPTOS Y GENERALIDADES DE CONTROL BIOLÓGICO, HONGOS BIOCONTROLADORES Y BIOFORMULACIONES	2
1. Control biológico.....	2
2. Hongos biocontroladores.....	2
2.1 <i>Trichoderma</i>	3
2.2 <i>Beauveria</i>	4
2.3 <i>Isaria</i>	5
2.4 <i>Metarhizium</i>	5
3. Bioformulaciones	6
3.1 Generalidades	6
3.2 Tipos de formulaciones	7
3.2.1 Formulaciones sólidas	7
3.2.1.1 Polvos de aplicación directa.....	7
3.2.1.2 Polvos mojables (Polvos de reconstitución en agua)	7
3.2.1.3 Granulados	7
3.2.2 Formulación líquida	8
3.2.2.1 Concentrados emulsionables	8
3.3 Control de calidad en formulaciones a base de hongos biocontroladores.....	8
3.4 Equipamiento y materiales utilizados en el control de calidad de productos biológicos.....	8
SECCIÓN 2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE BIOINSUMOS CON BASE A HONGOS BIOCONTROLADORES.....	10
1. Germinación de conidios (%).....	10
1.1 Objetivo	10
1.2 Materiales y equipos.....	10
1.3 Metodología	10
1.4 Diagrama de la metodología	11
1.5 Interpretación de resultados	11
2. Determinación de la viabilidad/ concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) (Cuantificación por recuento en caja Petri).....	13
2.1 Objetivo	13
2.2 Materiales y/o equipos	14
2.3 Metodología	14
2.4 Diagrama de la metodología para cuantificación de UFC	16
2.5 Interpretación de resultados	17

3.	Determinación de la concentración de conidios (cuantificación en hematocitómetro o cámara de Neubauer).....	19
3.1	Objetivo	19
3.2	Materiales y equipos.....	19
3.3	Metodología	19
3.4	Interpretación de resultados	21
4.	Determinación de porcentaje de pureza	23
4.1	Objetivo	23
4.2	Materiales y equipos.....	23
4.3	Metodología	23
4.4	Interpretación de resultados	23
	SECCIÓN 3. PRUEBAS FISICOQUÍMICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE BIOINSUMOS CON BASE A HONGOS BIOCONTROLADORES.	26
1.	Determinación de parámetros fisicoquímicos	26
1.1	Objetivo	26
1.2	Materiales y equipos.....	26
1.3	Metodología	26
1.3.1	Medición de actividad de agua (a_w).....	26
1.3.2	Medición de porcentaje de humedad.....	26
1.3.3	Medición de pH	27
1.3.4	Determinación de la densidad apisonada (g/ml)	27
1.3.5	Determinación de la suspendibilidad	27
1.3.6	Humectabilidad	28
1.3.7	Tamaño de la partícula (%)	28
1.3.8	Estabilidad de concentrado emulsionable	28
1.4	Interpretación de resultados pruebas fisicoquímicas.....	29
1.4.1	Actividad de agua (a_w).....	29
1.4.2	Porcentaje de humedad.....	29
1.4.3	pH.....	29
1.4.4	Densidad apisonada.....	29
1.4.5	Suspendibilidad	29
1.4.6	Humectabilidad	30
1.4.7	Tamaño de partícula	30
1.4.8	Estabilidad de concentrado emulsionable	30
	ANEXOS	32
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Equipos necesarios para el control de calidad de productos biológicos.	9
Tabla 2. Ejemplo práctico de germinación de conidios (%)	12
Tabla 3. Diluciones requeridas para estimar concentración (UFC/g o UFC/ml).	15
Tabla 4. Ejemplo práctico para la determinación UFC.	17
Tabla 5. Ejemplo práctico de recuento de propágulos en cámara de Neubauer.....	21
Tabla 6. Ejemplo para cálculo de pureza de un producto biológico	24
Tabla 7. Resumen de parámetros de calidad para calificar un bioinsumo con base en hongos biocontroladores en diferentes tipos de formulación.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras microscópicas de <i>Trichoderma harzianum</i> (conidióforos, fiálides y conidios).	4
Figura 2. Estructuras microscópicas de <i>Beauveria bassiana</i> (conidióforos, fiálides y conidios). .	4
Figura 3. Estructuras microscópicas de <i>Isaria</i> sp. (conidióforos y conidios)	5
Figura 4. Estructuras microscópicas de <i>Metarhizium</i> sp. (conidióforos y conidios)	6
Figura 5. Conidios germinados de <i>B. bassiana</i> a las 16 horas de incubación.....	12
Figura 6. Preparación de diluciones seriadas y siembra en caja Petri. Adaptado de Landa et al., 2009.	16
Figura 7. Regiones de cuantificación de propágulos en cámara de Neubauer (Swaminathan et al., 2011).	19
Figura 8. Esquema de las celdas para cuantificación de propágulos > 3 µm en cámara de Neubauer, (Swaminathan et al., 2011).	20

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de solución de Tritón X-100 al 0,1%.....	32
Anexo 2. Preparación medio de cultivo Agar Agua (AA)	32
Anexo 3. Preparación de solución Azul de Lactofenol.	33
Anexo 4. Preparación de medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA).....	33
Anexo 5. Preparación de medio de cultivo Agar Rosa de Bengala.....	32
Anexo 6. Preparación de medio de cultivo Extracto de Levadura y Malta (YM).....	32
Anexo 7. Formato para registro de germinación de conidios (%).....	34
Anexo 8. Formato para registro de viabilidad / concentración UFC.....	35
Anexo 9. Formato para registro de concentración de conidios.	36
Anexo 10. Formato para registro de porcentaje de pureza.....	37
Anexo 11. Formato para registro de información de pruebas fisicoquímicas.....	38

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la preocupación en la salud, medio ambiente y los efectos negativos de los productos químicos utilizados en la agricultura, han incidido en la búsqueda de estrategias para la disminución del uso de plaguicidas tóxicos; motivo por el cual, se investigan componentes alternativos para el manejo integrado de plagas (Rubio y Fereres, 2005). El control biológico (CB) es un medio específico que permite mitigar poblaciones de plagas con el uso de uno o más microorganismos benéficos (biocontroladores), reduciendo el nivel de daño económico. Entre los agentes biocontroladores de plagas están bacterias, hongos, parasitoides, depredadores, entre otros (Nicholls, 2008).

Los hongos biocontroladores de plagas pueden ser utilizados como ingrediente activo en el desarrollo de bioinsumos, los cuales deben mantener su capacidad infectiva por un período de tiempo considerable. La comercialización de estos productos requiere de un control de sus propiedades biológicas, físicas y químicas para asegurar al usuario su eficacia en el campo. Por este motivo, las investigaciones también se han dirigido a desarrollar procedimientos para el control de calidad de bioinsumos, los cuales permiten analizar periódicamente los productos presentados en diferentes sustratos (ICA, 2017).

El control de calidad de un biocontrolador puede ser dividido en dos instancias importantes: la primera considera el control durante la producción para asegurar que las operaciones unitarias sean óptimas, con el mínimo porcentaje de riesgos de contaminación. La segunda instancia corresponde al control del producto final o producto terminado, que asegura que el producto empacado y comercializado cumple con los estándares declarados para su registro. Los objetivos más importantes de un control de calidad son: corroborar las especificaciones establecidas por el fabricante, mantener consistencia entre lotes de producción y asegurar la calidad del producto final (Ravensberg, 2011).

Entre los parámetros más utilizados en el control de calidad de productos biológicos están: la concentración del número de conidios por gramo o mililitro, la viabilidad del producto expresado en unidades formadoras de colonia (UFC/g o ml), porcentaje de germinación de conidios y el porcentaje de pureza (Berlanga, 2006); sin embargo, existen otras especificaciones importantes que deben considerarse en un bioformulado, tales como: virulencia, contenido de humedad, tamaño de partículas, humectabilidad, actividad de agua, entre otras (Jenkins y Grzywacz, 2000).

SECCIÓN 1: CONCEPTOS Y GENERALIDADES DE CONTROL BIOLÓGICO, HONGOS BIOCONTROLADORES Y BIOFORMULACIONES

1. Control biológico

El control biológico es una práctica agrícola en constante crecimiento que busca disminuir los efectos negativos que causan las plagas en los diferentes cultivos, mediante el uso de enemigos naturales, que no necesariamente eliminan las poblaciones de plagas, pero sí las mantienen en niveles bajo el umbral de daño económico. Además, el uso de controladores biológicos disminuye la aplicación de sustancias químicas sintéticas que ha traído como consecuencia la aparición de individuos resistentes, nuevas plagas y la contaminación ambiental y del hombre (Spadaro y Gullino, 2004).

Existen numerosos microorganismos empleados como agentes de control biológico entre los cuales están los virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos; sin embargo, los hongos han sido ampliamente estudiados por su gran variedad de especies y sus diversos mecanismos de acción frente a plagas agrícolas (Charnley y Collins, 2007).

Según Grijalba et al. (2018), para que un microorganismo sea considerado como agente de control biológico debe poseer algunas características como:

- Inocuos para los seres humanos
- No patogénico para los cultivos
- Estables genéticamente
- Capaz de sobrevivir y establecerse en condiciones adversas
- Eficaz para el control de determinada plaga a bajas concentraciones
- Compatible con prácticas de cultivo
- Fácil de producir, usar y almacenar
- Debe poseer especificidad

2. Hongos biocontroladores

Los hongos son un grupo de microorganismos filogenéticamente diversos, heterótrofos, eucariontes, unicelulares o hifales (filamentosos), que presentan reproducción por esporas sexuales, asexuales o ambas (Humber, 2012); estos pueden actuar como promotores de crecimiento, antagonistas o entomopatógenos. Los hongos promotores de crecimiento vegetal (PCV), son un conjunto de diferentes especies que pueden incrementar el crecimiento y productividad en las plantas como los hongos micorrícicos arbusculares (González, Aguilar y Rodríguez, 2012; Barrera, 2009). Los hongos antagonistas son componentes naturales del suelo, encontrándose en materiales vegetales en estado de descomposición en numerosos suelos de uso agrícola y tienen la capacidad de adaptarse a varios ambientes. Uno de los géneros más importantes por su acción antagonica contra un amplio rango de hongos fitopatógenos es *Trichoderma*, utilizado debido a su amplia distribución, facilidad para ser aislado y producido de forma masiva, sin causar efectos adversos al ambiente (Gómez, Soberanis, Tenorio y Torres, 2013).

Por otro lado, los hongos entomopatógenos son empleados para el control de insectos, con más de 700 especies reunidas en 100 géneros (Nava, García, Camacho y Vázquez, 2012). Entre los más utilizados están *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium lecanii*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* (Gómez, Zapata, Torres y Tenorio, 2014). A continuación, se describe al género *Trichoderma* como ejemplo de antagonista y a los géneros *Beauveria*, *Isaria* y *Metarhizium* como ejemplos de entomopatógenos.

2.1 Trichoderma

El género *Trichoderma* presenta especies que son utilizadas en la agricultura como biocontroladores (Pérez, Hermosa y Monte, 2017). Hongo filamentoso, anaerobio facultativo, ampliamente distribuido en el mundo, puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos, son fáciles de aislar y multiplicar, tienen la capacidad de asimilar una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura y además producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas que causan vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular en los organismos con los que interactúa, convirtiéndolos en excelentes biocontroladores (Martínez, Danay y Reyes, 2013). Dentro de este género las especies más estudiadas hasta el momento son: *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. asperellum* y *T. harzianum* (Infante, Martínez, González y Reyes, 2009).

Además de la capacidad antagonista de este género, tienen la capacidad de mejorar una amplia gama de estreses abióticos, aliviar tensiones fisiológicas como el envejecimiento de las semillas, mejorar la absorción de nutrientes en las plantas e incluso algunas cepas mejoran la eficiencia fotosintética y probablemente las actividades respiratorias de las plantas (Shoresh, Harman y Mastouri, 2010).

Las colonias de *Trichoderma* poseen crecimiento rápido con la presencia de micelio blanco de textura algodonosa, que con el tiempo y la exposición a la luz se tornan a coloraciones que van desde verde amarillento a verde oscuro, esto depende de la cepa y del tipo de medio que se utilice para su crecimiento (Mishra, Khan y Krishna, 2016).

La mayoría de las especies del género *Trichoderma* durante el desarrollo y crecimiento presentan hifas de 5 -10 μm de ancho, que conforman el micelio hialino y septado con paredes compuestas por quitina y glucano, donde se originan los conidióforos. Las ramas principales del conidióforo producen ramas laterales que pueden presentarse en forma verticilada o no, en la mayoría de los casos, el conidióforo termina en una o más fiálides con formas cilíndricas o casi subglobosas. Los conidios asexuales unicelulares son de color verde o hialino, lisos cilíndricos y oblongos con diámetro promedio de 3 a 5 μm , los cuales se encuentran en los extremos de los conidióforos (Figura 1) (Martínez, Infante y Pereira, 2015).

Trichoderma bajo condiciones de estrés puede producir estructuras de resistencia que perduran a través del tiempo conocidas como clamidósporas, ubicadas en la parte terminal o intermedia de las hifas, 5 a 10 veces más grandes que los conidios, por contener grandes reservas de lípidos (Rifai, 1969; Martínez et al., 2015).

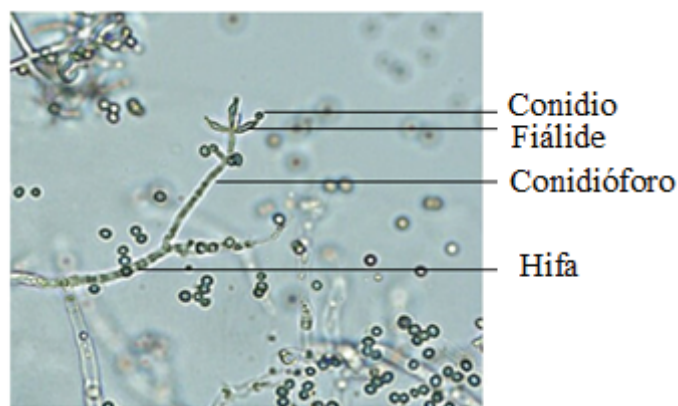


Figura 1. Estructuras microscópicas de *Trichoderma harzianum* (conidióforos, fiálides y conidios).

2.2 Beauveria

Es un parásito facultativo, heterótrofo que posee células quitinizadas, se encuentra de forma natural en suelos, o parasitando un alto número de especies de insectos. Ataca a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes como: coleópteros, dípteros, heterópteros, homópteros, lepidópteros, tisanópteros. Entre las plagas más importantes controladas por especies del género *Beauveria*, están la broca del café, la palomilla del repollo y el cupido del plátano (Vásquez, 2015). Además, no se reporta toxicidad a vertebrados y es compatible con diversos ingredientes de formulación, incluyendo aceites, emulsiones surfactantes, por lo que ha sido empleado como ingrediente activo en un sinnúmero de bioinsumos, actualmente en uso en todo el mundo (Wraight et al., 2000).

El hongo entomopatógeno *Beauveria* en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) presenta aspecto algodonoso, polvoriento blanco, después de 14 días de desarrollo, se vuelve amarillento y cremoso (González et al., 2012).

Microscópicamente *Beauveria* se caracteriza por presentar micelio blanco, conformado por hifas septadas. Posee conidióforos sencillos agrupados irregularmente o en grupos verticilados, presentándose en forma de zig-zag; los conidios miden de 2,5 a 4,5 μ m de diámetro, son hialinos, lisos, redondeados a ovoides y unicelulares (Figura 2) (Humber, 2012).

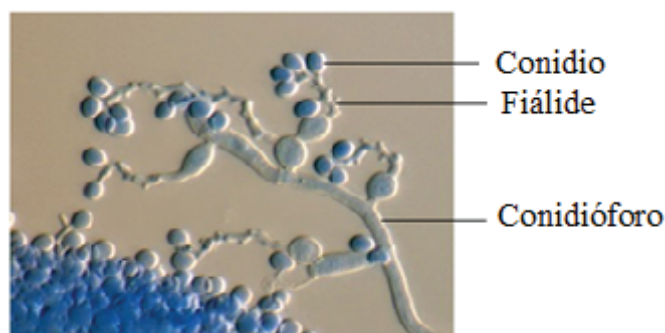


Figura 2. Estructuras microscópicas de *Beauveria bassiana* (conidióforos, fiálides y conidios).

2.3 Isaria

Isaria (antes conocido como *Paecilomyces*) es un hongo entomopatógeno de interés agrícola; debido a su potencial como controlador de insectos plaga de diferentes órdenes, siendo inofensivo contra organismos benéficos (Macías et al., 2013). Las infecciones causadas por *Isaria* sobre insectos se reconocen por la coloración rosado pálido (*I. fumosoroseus*) o violeta claro (*I. lilacinus*) (González et al., 2012). Como la mayoría de las especies de hongos entomopatógenos, el ciclo de infección consiste en la adhesión de las esporas, germinación, penetración, crecimiento vegetativo y conidiogénesis (Gandarilla et al., 2018).

Las colonias del hongo sobre medio de cultivo PDA, son inicialmente de color blanco y a medida que continua su desarrollo adquiere un tinte rosado, en el revés la colonia presenta un color amarillento que se torna anaranjado intenso con el tiempo (González et al., 2012). *Isaria* produce dos tipos de propágulos: conidios y blastosporas (Gandarilla et al., 2018). Los conidios son cuerpos especializados hialinos, de forma ovoide y unicelular caracterizados por poseer una gruesa pared exterior y 3 capas que protegen el interior de la espora, con un tamaño de 3 a 5 x 1 a 2 µm, las cuales se encuentran agrupadas en cadenas largas sobre los conidióforos que alcanzan hasta 100 µm de largo y 1,5 a 3 µm de diámetro. Por su parte, las blastosporas son de forma levaduriforme sensibles a la desecación con menor capacidad de sobrevivir que los conidios, (Figura 3) (Gandarilla et al., 2018; González et al., 2012).

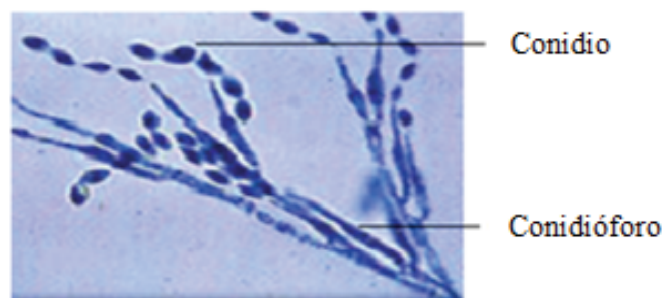


Figura 3. Estructuras microscópicas de *Isaria fumosorosea* (conidióforos y conidios)

2.4 Metarhizium

Hongo entomopatógeno que ataca más de 300 especies de insectos de varios órdenes; el modo de acción consiste en cubrir con micelio completamente a insectos, los cuales se tornan blancos y finalmente presenta coloración verde cuando el hongo esporula. *Metarhizium* presenta acción sobre insectos como el salivazo de la caña de azúcar (*Aeneolamia varia*) y chinches de diversos cultivos (González et al., 2012). Este hongo entomopatógeno es aislado mayoritariamente de insectos, aunque puede desarrollarse en la rizosfera de plantas y en el suelo, actuando como saprófito, sin embargo, especies como *M. robertsii* actúa como endófito y promotor de crecimiento vegetal (Marques, Gutiérrez, Gato y Lequerque, 2017). El género *Metarhizium* con base a sus características morfológicas describe variedades como *M. anisopliae var anisopliae* y *var. Majus*, así también *M. flacociridae*, *M. album*, *M. cylindrospora*, *M. guizhouense* y *M. pingshaense* (Padilla, Bernal, Vélez y Montoya, 2000).

Metarhizium sobre medio PDA presenta un crecimiento de micelio con borde blanco. Los conidióforos se tornan coloreados con la multiplicación de los conidios de color olivo a amarillo verdoso hasta verde, en el revés tiene una tonalidad color miel y pigmentación amarilla que se

extiende en el medio (Padilla et al., 2000). Las colonias del hongo son de forma completamente redonda, con colores oliváceos, amarillento, verdoso, marrón oscuro, mientras que, en el revés van de incoloro a marrón, con tonalidad verde citrino. Los conidióforos del hongo son irregulares ramificados que nacen del micelio presentando dos a tres ramas por septo, con un tamaño aproximado de 4 a 14µm de longitud x 1,5 a 2,5µm de diámetro. Los conidios son cilíndricos, truncados y unicelulares, miden de 3,5 a 9µm de longitud y 1,5 a 3,5µm de diámetro (Figura 4) (González et al., 2012).

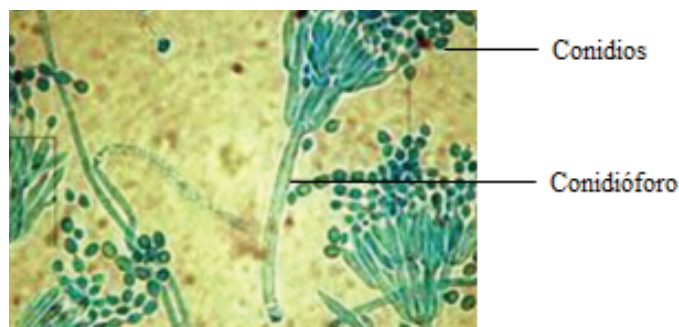


Figura 4. Estructuras microscópicas de *Metarhizium* sp. (conidióforos y conidios)

3. Bioformulaciones

3.1 Generalidades

Según Urtubia y France (2007), las formulaciones (bioinsumos) consisten en una combinación equilibrada de ingredientes inertes (excipientes), que proporcionan estabilidad al biocontrolador (ingrediente activo) como hongos, levaduras, bacterias, virus o nematodos y las protege de las condiciones ambientales, dándoles un mayor tiempo de viabilidad y ayudando a su desarrollo una vez aplicado en el suelo. Los bioinsumos a base de hongos se elaboran con materiales inertes tales como portadores, solventes, emulsificantes o gelificantes y otros aditivos que pueden ser nutrientes o estimulantes, los cuales deben tener características como:

- Ser inocuo al ambiente y al ser humano
- Presentar características físicas adecuadas para mezclarse con el ingrediente activo
- Facilitar la aplicación del producto
- No tener actividad biológica
- No afectar la actividad del hongo
- Proporcionar protección al hongo de condiciones ambientales desfavorables
- Económicamente rentable.

Las formulaciones pueden ser elaboradas a base de un solo aislamiento o de un consorcio microbiano, de fácil reproducción y alta patogenicidad a la plaga que se desea controlar. Investigaciones revelan que las combinaciones o mezclas de cepas son más efectivas para el control que las cepas individuales, por ello se deben realizar ensayos rigurosos para seleccionar a las mejores cepas y conocer la concentración de esporas necesarias para el control biológico en el campo (Jaramillo, Montoya, Benavides y Góngora, 2015).

El producto formulado debe ser empacado o envasado en recipientes herméticamente cerrados que no permitan la entrada de luz, la absorción y penetración de agua o de cualquier agente no

contemplado en el proceso de formulación, que altere la viabilidad del microorganismo. Se recomienda mantenerlos en lugares frescos, apartados de la luz si se almacenan por periodos cortos, o en refrigeración si se almacenan por periodos largos (Díaz et al., 2019).

3.2 Tipos de formulaciones

Las formulaciones microbianas pueden dividirse en dos grupos: sólidos/secos, que utilizan un sustrato que absorbe la humedad de los conidios y los encapsula para mantenerlos viables por un tiempo considerable; y líquidos/emulsiones, en los que los conidios están suspendidos en el medio para lograr una mezcla homogénea que garantice una buena aplicación; además, este líquido debe evitar la absorción de agua por los conidios y mantener la viabilidad del hongo (Quiroga, 2009).

3.2.1 Formulaciones sólidas

3.2.1.1 Polvos de aplicación directa

Son elaborados a base de ingredientes inertes con capacidad absorbente, que actúan como diluyente o portador, los más utilizados en este tipo de formulación son talcos de silicatos, minerales de sílice en proporciones variadas según la densidad deseada. El tamaño de partícula oscila desde 5 a 20 μ m, la concentración del ingrediente activo (conidios) es menor al 10% y la forma de aplicación es mediante espolvoreo directamente sobre las plantas o el suelo (Quiroga, 2009).

3.2.1.2 Polvos mojables (Polvos de reconstitución en agua)

Son elaborados a base de una mezcla de excipientes (ingredientes inertes) que proporcionan estabilidad a los conidios durante el almacenamiento y se diluyen en agua fácilmente permitiendo su aplicación por aspersión. Entre las principales propiedades de un polvo mojable se destacan: fluidez, humectabilidad, baja producción de espuma, estabilidad física y química, suspendibilidad y tamaño pequeño de partícula (Ramírez, 1982).

3.2.1.3 Granulados

Son elaborados a base de ingredientes inertes como: a) agentes estabilizantes, que se añaden para evitar pérdidas del ingrediente activo durante el almacenamiento, b) agentes humectantes, para mejorar la eficacia, la lixiviación y percolación en el suelo, c) agente antiaglomerantes, para conservar la fluidez del material, d) portador diluyente que puede ser inerte (zeolita, vermiculita, diatomitas, caolinitas, carbonatos o arcillas extruidas) u orgánico (cáscaras de arroz o de maíz, cereales, etc.), capaces de absorber o de recubrirse con el resto de los excipientes y el ingrediente activo; el tamaño de partícula varía entre 100 a 6000 μ m y la concentración va desde 5 a 20% (Padin, Lampugnani y Abramoff, 2013; Burges, 1998; Ramírez, 1982).

Los granulados deben ser secos, fluir libremente sin tendencia a aglomerarse, con índice de polvos bajo, tamaño uniforme de las partículas y proporcionar estabilidad al principio activo (Contreras, 2003). Existen dos tipos principales de granulados:

a. Gránulos cubiertos

Es un proceso de granulación sencillo y económico en el cual las partículas de polvo y el ingrediente activo son adheridas a un soporte mediante la utilización de un agente adherente y su forma de aplicación es mediante espolvoreo directamente sobre el suelo (Burgues, 1998).

b. Gránulos dispersables

Están elaborados a base de sustancias finamente fragmentadas que se comprimen en gránulos de mayor tamaño durante el proceso de elaboración y al ser colocados en agua tienden a separarse en las partículas originales finamente fragmentadas y para su aplicación se puede utilizar cualquier técnica de aspersión o fertirrigación (Tijani et al., 2016).

3.2.2 Formulación líquida

3.2.2.1 Concentrados emulsionables

Son elaborados a base de ingredientes oleosos que mantienen suspendido al ingrediente activo; y surfactantes que presentan cadenas polares hidrofílicas (solubles en agua) o no polares lipofílicas (solubles en aceite), de manera que al mezclarse con agua se forme una emulsión estable constituida por pequeñas gotas del portador oleoso que contienen el principio activo y que están dispersas en el agua de manera homogénea, para su aplicación por aspersión, drench, goteo, etc. (Burgues, 1998).

3.3 Control de calidad en formulaciones a base de hongos biocontroladores

Es importante tener en cuenta que el control de calidad de un bioinsumo consiste en controlar y evaluar de manera rigurosa el comportamiento de los diferentes parámetros en cada uno de los procesos de elaboración, como la producción de inóculos, obtención de conidios, mezcla de excipientes, producto final, envasado y almacenamiento, con el fin de garantizar un producto efectivo y de calidad (Díaz et al, 2019).

Sin embargo, en este manual nos enfocaremos únicamente en el control de calidad del producto final, mediante el análisis de una muestra significativa de un lote del bioinsumo en su envase de venta/comercialización.

3.4 Equipamiento y materiales utilizados en el control de calidad de productos biológicos

En el laboratorio, es necesario un adecuado manejo de los equipos para garantizar la exactitud, fiabilidad y puntualidad de los análisis; debe contar con un registro de los equipos con la fecha de adquisición, fecha y número de mantenimientos preventivos y/o correctivos, y la documentación del fabricante con relación al funcionamiento y mantenimiento del equipo, para asegurar la confiabilidad de los datos y durabilidad del equipo (Tabla 1).

Por otro lado, los materiales necesarios para realizar el control de calidad de productos biológicos son: algodón, agujas micrológicas, asas de Drigalsky, bandejas plásticas, bisturí (mangos y hojas), cajas Petri de vidrio de 10ml, cámara de Neubauer, cronómetro, contador

manual, embudo, espátulas, frascos autoclavables de 500ml, 1000ml y 2000ml, gradillas, tubos de ensayo (capacidad 15ml), jeringuillas (10ml y 60ml), material de protección (mandil, guantes, mascarillas, cofia, gafas), mechero de alcohol, papel parafilm, papel aluminio, pipetas de 10ml, pinzas, porta y cubre objetos, probetas (50ml, 100ml, 250ml y 1000ml), puntas para micropipetas (1000µl y 100µl), regla metálica 30cm, soporte metálico, tabla de madera 20 x 25,5cm con 3cm grosor, vasos de precipitación (250ml, 400ml, 600ml).

Finalmente, los reactivos necesarios en el control de calidad de productos biológicos son: agua desionizada o destilada, alcohol 70%, alcohol 90%, ácido láctico, medios de cultivo (Papa Dextrosa Agar, Agar Agua, Luria Bertani, Agar Nutritivo, Rosa de Bengala, etc.), Tritón x-100 o Tween 80 o Silwet, antibióticos (cloranfenicol), fungicida (captán), azul de lactofenol.

Tabla 1. Equipos necesarios para el control de calidad de productos biológicos.

Equipo	Función
Agitador (orbital, dispersor sumergible de alta velocidad)	Homogenizar las muestras para obtener resultados confiables de concentración, viabilidad, pureza. El tipo de agitador dependerá del tipo de muestra a analizar
Autoclave	Esterilizar medios de cultivos, soluciones para diluciones, sustratos y materiales de laboratorio
Balanza analítica	Preparar mezclas de componentes en proporciones predefinidas para realizar las distintas pruebas de control de calidad
Cámara de flujo laminar	Asegurar un ambiente estéril para realizar: Pruebas de control de calidad (viabilidad, pureza, concentración) Aislamientos, purificación, multiplicación, y conservación de microorganismos Dispensar medios de cultivo
Estufa	Esterilizar por calor seco y secar material o sustancias empleadas para la elaboración de formulaciones
Incubadora	Proporcionar una temperatura óptima para el crecimiento de microorganismos
Medidor de actividad de agua	Medir la cantidad de agua metabólica, esto nos da una idea del estado (latencia o actividad) del microorganismo
Balanza Medidora de Humedad	Determinar la cantidad de agua que contiene un material
Micropipetas volumen variable (10, 100 µl y 1000 µl)	Tomar volúmenes exactos y pequeños
Microscopio Óptico	Identificación microscópica Conteo de conidios (concentración) Pruebas de germinación
pH-metro	Medir la acidez o alcalinidad de una formulación, parámetro que influye en la germinación del ingrediente activo.
Plato agitador y agitadores magnéticos	Homogenizar muestras y realizar pruebas de pH y suspendibilidad
Refrigerador	Conservar microorganismos para mantener su viabilidad por algunos meses.

SECCIÓN 2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE BIOINSUMOS CON BASE A HONGOS BIOCONTROLADORES.

1. Germinación de conidios (%)

1.1. Objetivo

Determinar el porcentaje de conidios germinados en un tiempo determinado de hasta 24 horas.

1.2 Materiales y equipos

- Solución Tritón X-100 al 0,1% (Anexo 1)
- Agar Agua (Anexo 2)
- Micropipetas 1000µl y 100µl
- Cajas Petri
- Bisturí
- Porta y cubre objetos
- Lactofenol (Anexo 3)
- Incubadora
- Cámara de flujo laminar

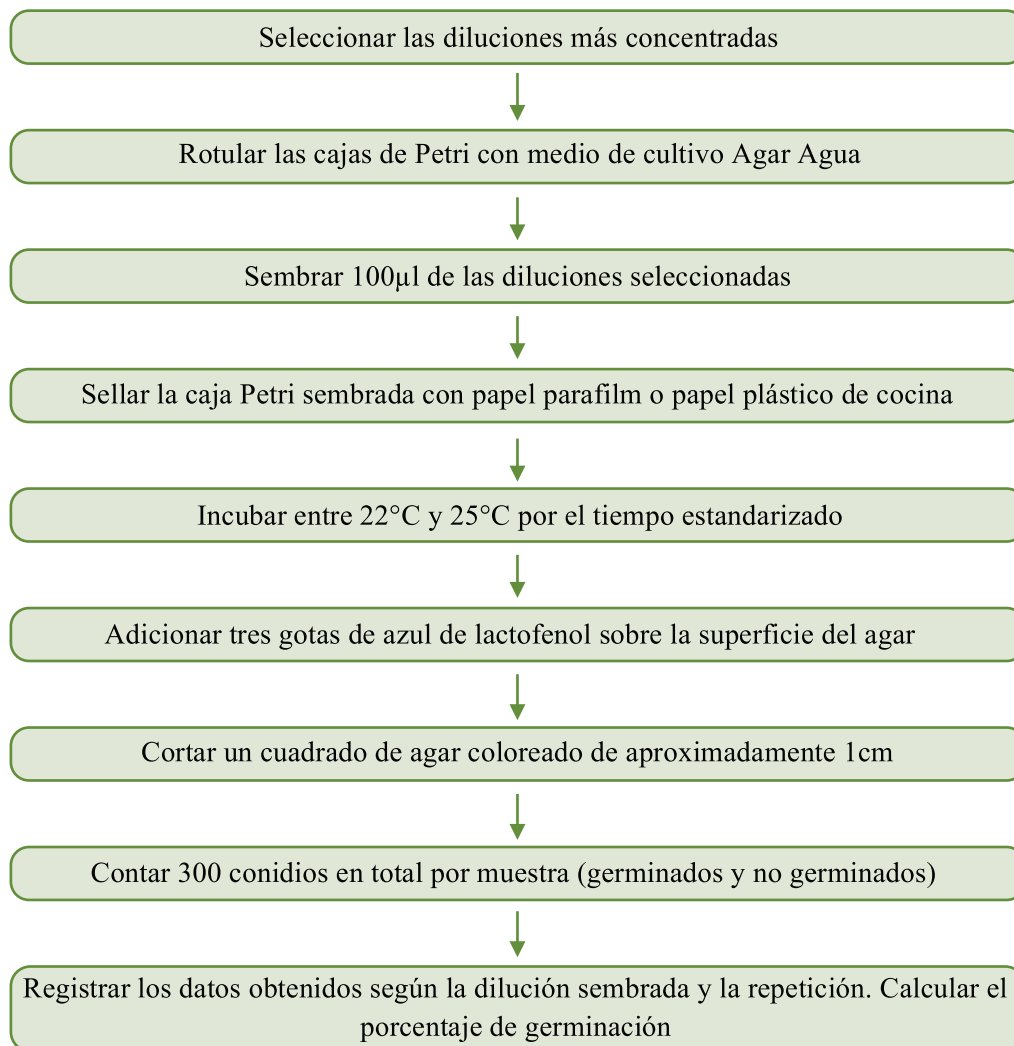
1.3 Metodología

1. Tomar tres submuestras de 1g para muestras sólidas o 1ml con micropipetas para muestras líquidas
2. Colocar las submuestras en tubos de ensayo de 15ml.
3. Adicionar a cada tubo 9ml de solución estéril de Tritón X-100 al 0,1%.
4. Agitar en vórtex hasta que la muestra se disperse completamente.
5. La suspensión obtenida corresponde a la suspensión madre o dilución 10^{-1} .
6. Seleccionar las diluciones más concentradas del producto a evaluar (10^{-2} , 10^{-3}).
7. Rotular las cajas Petri con medio de cultivo Agar Agua:
 - a. Nombre de la muestra
 - b. Fecha de siembra
 - c. Número de dilución
8. Sembrar 100µl de las diluciones seleccionadas por triplicado en Agar Agua y extender la muestra por toda la superficie de la caja Petri utilizando un asa de Drigalsky, evitando el daño del medio de cultivo por excesiva fuerza.
9. Sellar la caja Petri sembrada con papel parafilm o papel plástico de cocina.
10. Incubar entre 22°C y 25°C por el tiempo estandarizado para medir germinación del hongo en estudio. **Ejemplo.** *Trichoderma* sp. puede ser evaluada a partir de las 16 horas de incubación.

Nota: Las horas de incubación dependerán del hongo utilizado como ingrediente activo en el bioinsumo, sin embargo, la germinación puede ser evaluada a partir de las 10 horas de incubación hasta en un máximo de 24 horas.

11. Adicionar tres gotas de azul de lactofenol sobre la superficie del agar para detener el proceso de germinación y realizar el conteo.
12. Cortar un cuadrado de agar coloreado de aproximadamente 1cm² y colocar en una lámina portaobjetos.
13. Cubrir la lámina con una laminilla cubre objetos, para observar al microscopio, contar conidios germinados y no germinados por campo óptico.
14. Contar un mínimo 300 conidios en total por muestra (germinados y no germinados), para obtener resultados confiables.
15. Registrar los datos obtenidos según la dilución sembrada y la repetición. El resultado se expresa en porcentaje de germinación (%) (Gómez et al., 2014).

1.4 Diagrama de la metodología



1.5 Interpretación de resultados

1. Obtener el total de conidios germinados y no germinados en las tres cajas Petri según la dilución seleccionada.
2. Calcular el porcentaje de germinación del microorganismo utilizando la siguiente fórmula (Berlanga y Hernández, 2006):

$$\text{Germinación \%} = \frac{\text{Número de conidios germinadas}}{\text{Total de conidios evaluadas}} \times 100$$

3. Se considera que un bioinsumo es de calidad cuando el valor de su germinación es mayor al 85% complementado con el resto de las pruebas microbiológicas y fisicoquímicas (Vélez *et al.*, 1997).

- Ejemplo práctico de germinación de conidios (%)

Determinar el porcentaje de germinación de conidios de *B. bassiana* de un bioinsumo en gránulo. Extraer una muestra de 1g del producto, diluir en 9ml de solución de Tritón 0,1%. Realizar diluciones seriadas 10^{-2} y 10^{-3} y sembrar 100 μ l de estas en medio de cultivo Agar Agua (3 cajas/dilución). Determinar el número de conidios germinados y sin germinar a las 16 horas de sembradas las muestras en la dilución que presente mejor dispersión de conidios (Figura 5).

Del recuento realizado en la dilución 10^{-3} se obtuvieron los siguientes valores (Tabla 2):

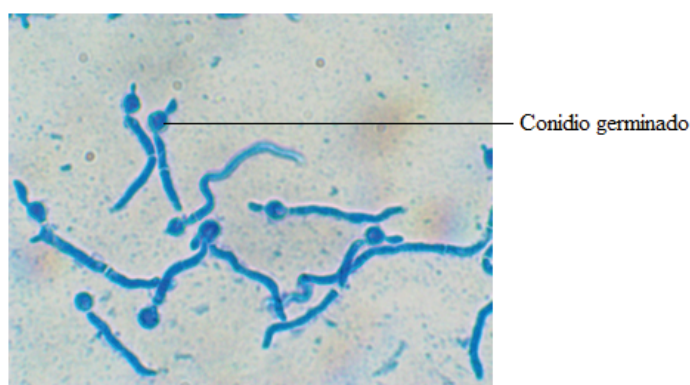


Figura 5. Conidios germinados de *B. bassiana* a las 16 horas de incubación.

Tabla 2. Ejemplo práctico de germinación de conidios (%)

N° campos ópticos/ caja Petri	Producto (<i>B. bassiana</i>)					
	Caja 1		Caja 2		Caja 3	
	Germinados	No germinados	Germinados	No germinados	Germinados	No germinados
1	10	2	12	2	12	0
2	12	1	14	4	23	0
3	21	0	15	5	21	0
4	35	0	16	0	14	0
5	32	0	39	0	15	1
6	12	2	21	0	17	2
7	11	1	13	0	20	3
8	14	1	14	1	23	5
9	12	6	16	4	25	6
10	10	7	17	6	33	7
Total	169	20	177	22	203	24
Promedio	16,9	2	17,7	2,2	20,3	2,4

$$\text{Germinación \%} = \frac{\text{conidios germinados (caja1 + caja2 + caja3)}}{\text{Total de conidios (germinados + no germinados)}} \times 100$$

$$\text{Germinación \%} = \frac{169 + 177 + 203}{615} \times 100$$

$$\text{Germinación \%} = 89,27$$

El porcentaje de germinación de conidios de *B. bassiana* en el producto es de 89,27% a las 16 horas.

- **Formato para registro de información.** Ver Anexo 7.

2. Determinación de la viabilidad/ concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) (Cuantificación por recuento en caja Petri).

2.1 Objetivo

Determinar el número de propágulos microbianos (micelio, conidios, blastosporas, entre otros) viables por unidad de masa o volumen.

2.2 Materiales y/o equipos

- Solución Tritón X-100 al 0,1%
- Micropipetas 1000µl y 100µl
- Vórtex
- Balanza analítica
- Cajas Petri
- Agar PDA (Anexo 4)
- Asas de Drigalsky
- Incubadora

2.3 Metodología

2.3.1 Preparación de la muestra para recuento de UFC

1. Tomar tres submuestras de 1g para muestras sólidas o 1ml con micropipetas para muestras líquidas.
2. Colocar las submuestras en tubos de ensayo de 15ml.
3. Adicionar a cada tubo 9ml de solución estéril de Tritón X-100 al 0,1%.
4. Agitar en vórtex hasta que la muestra se disperse completamente.
5. La suspensión obtenida corresponde a la suspensión madre o dilución 10^{-1} .

2.3.2 Preparación de diluciones seriadas

1. Tomar 1000µl (1ml) de la suspensión madre y colocar en otro tubo con 9ml de solución estéril de Tritón X-100 al 0,1%.
2. Agitar en vórtex vigorosamente el tubo hasta que la muestra se disperse completamente (dilución 10^{-2}).
3. A partir de la dilución 10^{-2} , repetir los pasos anteriores tantas veces como sea necesario para alcanzar el número de diluciones deseadas. Marcar los tubos con el nombre de la dilución correspondiente (ej. 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc.). El número de diluciones dependerá de la concentración del producto, generalmente se realiza hasta la dilución 10^{-7} .

2.3.3 Determinación de la concentración de Unidades Formadoras de colonias (UFC)

1. Basados en la concentración del producto reportada por el fabricante, seleccionar las diluciones a sembrar para realizar el conteo (ver Tabla 3). Cabe destacar que en algunos casos se desconoce la concentración y entonces se debe seleccionar un rango más amplio de diluciones para sembrar.
2. Rotular las cajas Petri con medio de cultivo PDA con el nombre de la muestra, la fecha y el número de la dilución siguiente a la del tubo que es utilizado para sembrar (Tabla 3, Figura 6). Tener en cuenta que se requiere tres repeticiones (cajas inoculadas) por dilución y se siembran tres diluciones por muestra, es decir nueve cajas Petri por submuestras resultando en un total de 27 cajas por producto.

Tabla 3. Diluciones requeridas para estimar concentración (UFC/g o UFC/ml).

Dilución en el tubo de siembra	Factor de dilución (rótulo en cajas Petri)	Concentración del producto reportada en la etiqueta o por el fabricante					
		10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰
10 ⁻¹	10 ⁻²	X	X				
10 ⁻²	10 ⁻³	X	X	X			
10 ⁻³	10 ⁻⁴		X	X	X		
10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			X	X	X	
10 ⁻⁵	10 ⁻⁶				X	X	X
10 ⁻⁶	10 ⁻⁷					X	X
10 ⁻⁷	10 ⁻⁸						X

3. Transferir 100µl de las diluciones a sembrar a las respectivas cajas Petri debidamente rotuladas utilizando una micropipetas y puntas estériles.
4. Extender la muestra por toda la superficie de la caja Petri utilizando un asa de Drigalsky.
5. Incubar las cajas Petri sembradas de manera invertida a temperatura de 24°C ± 1°C, hasta que las colonias estén suficientemente grandes para ser contadas (Usualmente es necesario 5 días para el caso de *Trichoderma* y 7 días para otras especies de hongos).
6. Seleccionar la dilución adecuada para realizar el conteo teniendo en cuenta que se recomienda aquella que presente de 10 a 100 colonias para hongos y de 30 a 300 colonias para productos con base en bacterias.
7. Contar el número de colonias en las tres cajas Petri de la dilución seleccionada.

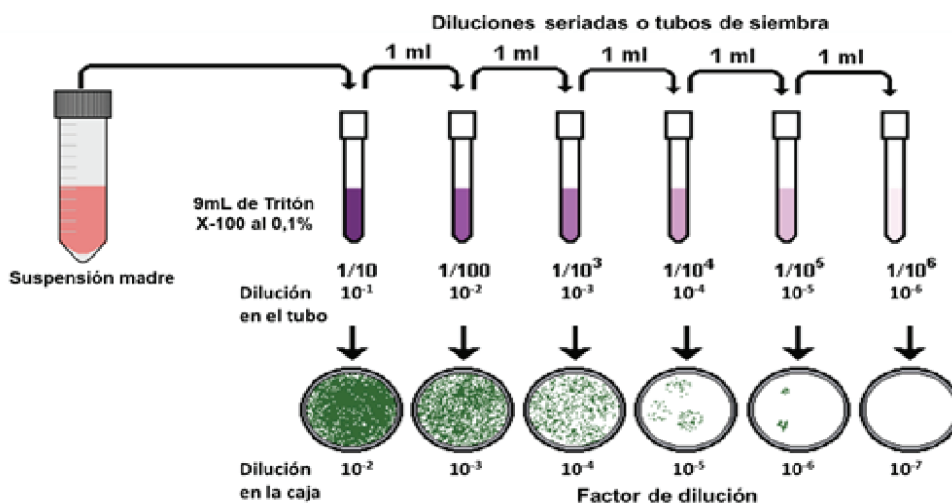
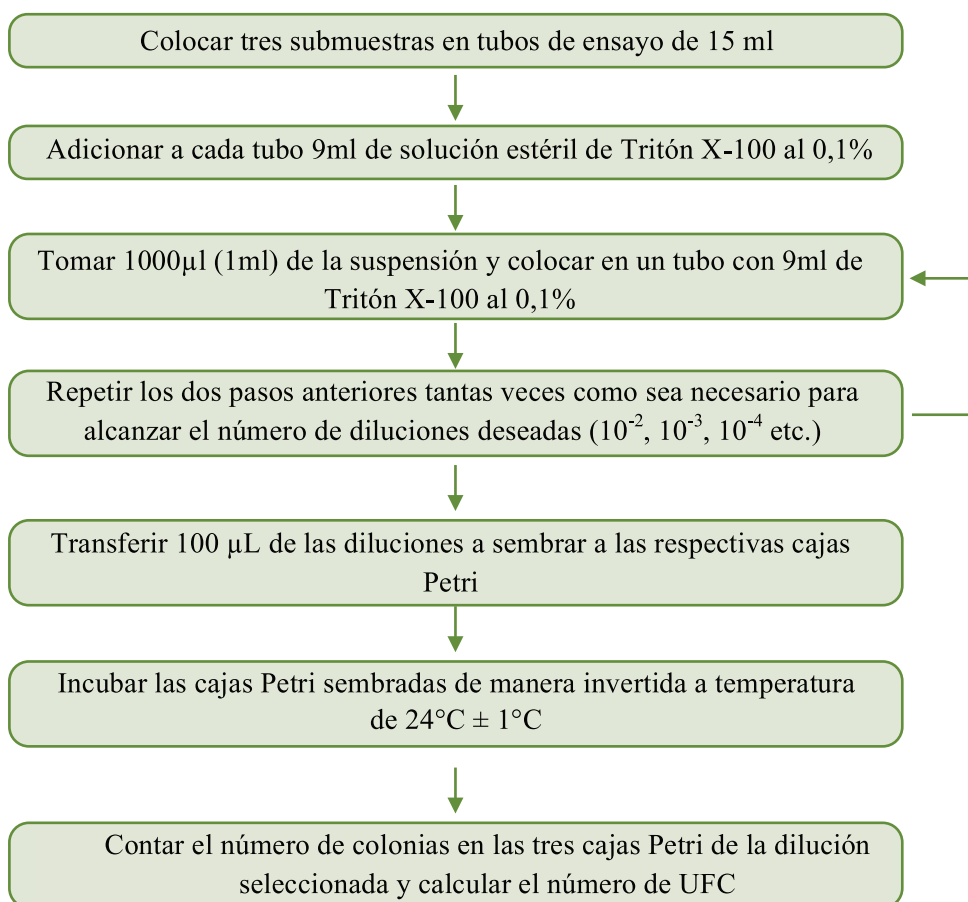


Figura 6. Preparación de diluciones seriadas y siembra en caja Petri. Adaptado de Landa, Arrieta y Galicia, 2009.

2.4 Diagrama de la metodología para cuantificación de UFC



2.5 Interpretación de resultados

1. Promediar el número de colonias registrado para las tres cajas Petri en la dilución seleccionada.
2. Realizar el cálculo de UFC con la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad/Concentración del bioinsumo (UFC/g ó ml)} = P \times \text{FD}$$

Donde,

P: Promedio del número de colonias en las tres cajas de la dilución seleccionada

FD: factor de dilución (inverso) de la dilución rotulada en la caja Petri.

Nota: Se considera un bioinsumo de mala calidad cuando la concentración determinada es inferior a la declarada en la etiqueta.

- Ejemplo práctico de cuantificación de UFC

Una formulación líquida a base de *Trichoderma* reporta en su etiqueta una concentración de $3,0 \times 10^9$ conidios/ml, para cuya confirmación se realizará un recuento de UFC en la caja de Petri. Primero se toman 3 submuestras de producto (1ml) y se reconstituyen con 9ml de solución de Tritón X-100 al 0,1%. A partir de las submuestras reconstituidas y basándose en la concentración de conidios declarada del producto y en la Tabla 4, se deben preparar todas las diluciones hasta 10^{-6} . Las diluciones utilizadas para las siembras del producto serán las últimas tres (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}). Cada dilución se siembra por triplicado (3 cajas Petri), con un total de 9 cajas por submuestra. Al cabo del tiempo de incubación se realizan los conteos de las colonias del hongo obteniendo los siguientes valores:

Tabla 4. Ejemplo práctico para la determinación UFC.

Dilución sembrada	Factor de dilución									
		Submuestra 1			Submuestra 2			Submuestra 3		
		Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 1	Caja 2	Caja 3
10^{-4}	10^{-5}	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*	NC*
10^{-5}	10^{-6}	260	290	278	250	310	288	245	305	298
10^{-6}	10^{-7}	32	28	26	31	25	29	22	33	35

NC* = No contables, demasiadas colonias en la caja Petri

Los valores utilizados para el cálculo de concentración deben estar comprendidos entre 10 a 100 colonias, en nuestro ejemplo corresponde a la dilución rotulada en la caja Petri 10^{-7} .

Se procede al cálculo del promedio de colonias por caja Petri en el ejemplo será: $(32+28+26+31+25+29+22+33+35) / 9 = 29$ colonias.

Posteriormente, este valor es multiplicado por el factor de dilución (inverso de la dilución rotulada en la caja Petri 10^{-7}) para calcular la concentración en la muestra reconstituida, que en el ejemplo sería:

$$\text{Concentración del Bioformulado} = 29 \times 10^7 = 2,9 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

Nota: Es importante tener presente que una colonia puede originarse de un agregado de células, lo cual puede subestimar la cantidad real, por ello se corrobora la viabilidad de un producto biológico a base de hongos, mediante la estimación del porcentaje de germinación.

- **Formato para registro de información.** Ver Anexo 8.

3. Determinación de la concentración de conidios (cuantificación en hematómetro o cámara de Neubauer).

3.1 Objetivo

Determinar el número de propágulos microbianos (células, conidios, blastosporas, entre otros) por unidad de masa o volumen.

3.2 Materiales y equipos

- Solución Tritón X- 100 al 0,1%
- Hematómetro/ Cámara de Neubauer
- Micropipetas 1000 μ l y 100 μ l
- Vórtex
- Microscopio

3.3 Metodología

3.3.1 Generalidades del hematómetro/cámara de Neubauer

El hematómetro/cámara de Neubauer es un portaobjetos con dos zonas ligeramente deprimidas o áreas de conteo dentro de las que se encuentra una cuadrícula de dimensiones conocidas, se usa de acuerdo con el tamaño de los propágulos a cuantificar. El cubreobjetos para la cámara de Neubauer es específico y con peso definido para asegurar la exactitud del volumen de muestra contenida en cada rejilla o celda y la interpretación del resultado (Inglis, Enkerli y Goettel, 2012) como se muestra en la Figura 7.

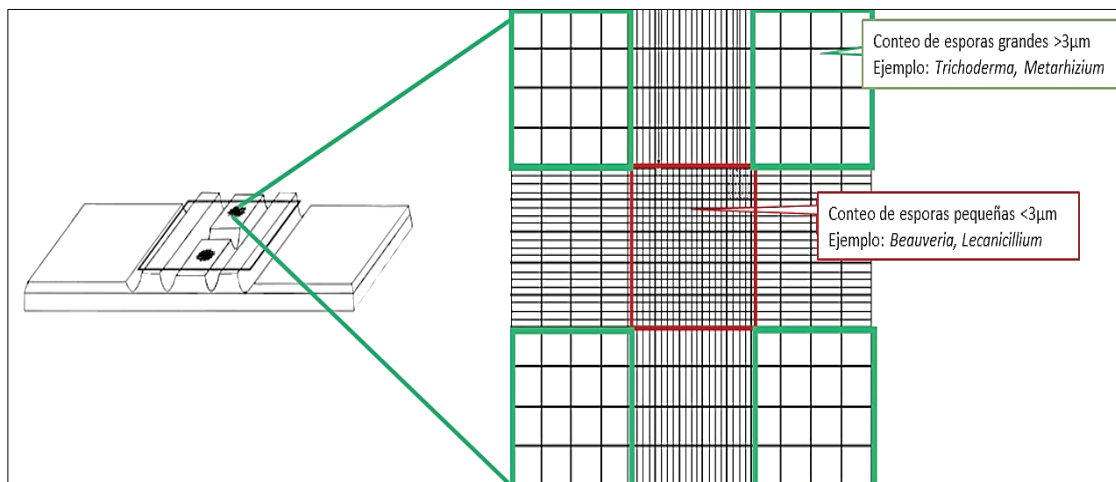


Figura 7. Regiones de cuantificación de propágulos en cámara de Neubauer (Swaminathan, Nelson y Jackson, 2011).

3.3.2 Preparación de la muestra para recuento en cámara de Neubauer

1. Tomar una muestra de 25µl de la dilución 10^{-3} (referirse al proceso de diluciones seriadas en la metodología de concentración de colonias).
2. Transferir la muestra a la cámara Neubauer, hasta que por capilaridad se llene un lado de la cámara.
3. Tomar una segunda muestra de 25µl de la misma dilución 10^{-3} .
4. Transferir la muestra por el lado opuesto de la cámara.

3.3.3 conteo de conidios en la cámara de Neubauer con observación al microscopio

1. Enfocar la cámara de Neubauer con el objetivo 40X.
2. Ubicarse en el primer cuadrante (superior derecho).
3. Observar y contar los conidios.

Nota: Si el número de conidios por cuadro es muy escaso <20 , lavar la cámara y montar la dilución anterior y si es mayor de 100 conidios, lavar y montar la dilución siguiente.

4. Cuantificar los conidios presentes en 5 cuadros por cuadrante como se muestra en la Figura 8, contar los cuatro cuadrantes para obtener un total 20 datos (Swaminathan et al., 2011).

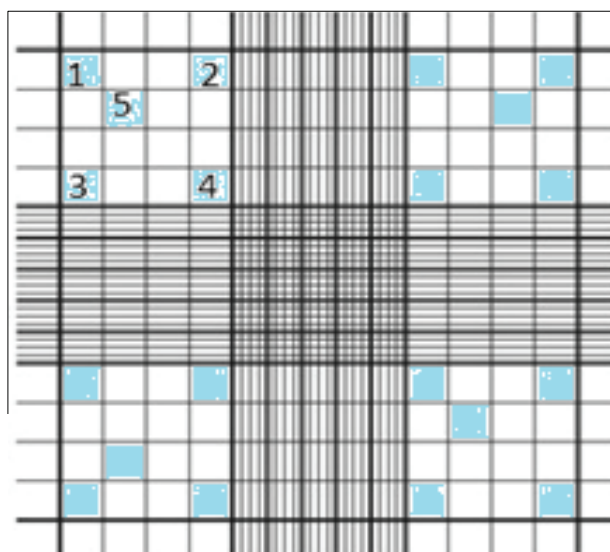


Figura 8. Esquema de las celdas para cuantificación de propágulos $> 3 \mu\text{m}$ en cámara de Neubauer, (Swaminathan et al., 2011).

3.4 Interpretación de resultados

La concentración de conidios (conidios/g o ml) de un bioinsumo se calcula con el promedio de las 20 lecturas realizadas en una de las áreas de conteo de la cámara de Neubauer. El resultado se obtiene con la aplicación de la siguiente fórmula ajustada de Gómez et al. (2014):

$$\text{Concentración de conidios (conidios/g ó ml)} = \bar{x} \times 10000 \times 16 \times \text{FD}$$

Donde,

\bar{x} : Promedio de las 20 lecturas por área de conteo

FD: Factor de dilución (inverso de la dilución cuantificada)

16 y 10 000: constantes para cuadrantes laterales

25 y 10 000: constantes para cuadrante central

Nota: Se considera un bioinsumo de mala calidad cuando la concentración determinada es inferior a la declarada en la etiqueta, complementario a las pruebas de germinación y viabilidad.

Ejemplo práctico de recuento de propágulos en cámara de Neubauer

Determinar la concentración de conidios de *Trichoderma* sp. de una bioformulación en polvo. Extraer una muestra de 1g del producto, diluir en 9ml de solución de Tritón 0,1%. Realizar diluciones seriadas de 10^{-3} . Preparar la cámara de Neubauer con la dilución 10^{-3} , realizar el recuento de conidios en los cuadrantes correspondiente, como se indica en la Figura 6, Tabla 5.

Tabla 5. Ejemplo práctico de recuento de propágulos en cámara de Neubauer

Área de conteo	Lecturas cámara de Neubauer										Promedio	Concentración Conidios/g
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11,7	$1,87 \times 10^9$
	11	10	13	9	14	12	11	5	6	8		
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
	12	14	15	16	17	18	19	11	5	8		
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11,5	$1,84 \times 10^9$
	12	11	3	6	7	12	15	16	5	8		
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
	12	15	17	21	7	12	11	14	12	15		

1. Promedio de las 20 lecturas (área 1): 11,7
2. Promedio de las 20 lecturas (área 2): 11,5
3. El factor de dilución: 10^3
4. Aplicamos la fórmula:

Área de conteo 1:

$$\text{Concentración de conidios} = 11,7 \times 10000 \times 16 \times 1000$$

$$\text{Concentración de conidios} = 1,87 \times 10^9 \text{ (conidios/g)}$$

Área de conteo 2:

$$\text{Concentración de conidios} = 11,5 \times 10000 \times 16 \times 1000$$

$$\text{Concentración de conidios} = 1,84 \times 10^9 \text{ (conidios/g)}$$

La concentración de la bioformulación en polvo: **$1,86 \times 10^9$ conidios/gramo.**

3.4.1 Formato para registro de información. Ver Anexo 9.

4. Determinación de porcentaje de pureza

4.1 Objetivo

4.2 Materiales y equipos

- Solución Tritón X-100 al 0,1%
- Cloranfenicol (antibiótico)
- Medios de cultivo: Agar Nutritivo; Agar Rosa de Bengala (Anexo 5); Agar Extracto de Levadura y Malta (YM) (Anexo 6)
- Micropipeta 1000µl y 100µl
- Vórtex
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora

4.3 Metodología

La determinación de la pureza establece la proporción porcentual del biocontrolador y los microorganismos diferentes en un producto biológico. Una alta carga microbiana diferente al biocontrolador genera un efecto negativo en el tiempo de vida útil del ingrediente activo, pérdida de la eficiencia y cambios en las propiedades físicas del producto siendo óptimo valores de pureza superiores al 90% con menos del 0,1 de contenido de contaminantes (Berlanga y Hernández, 2006). A continuación, se describe la metodología:

1. Seleccionar un medio de cultivo adecuado de acuerdo con lo que se quiere cuantificar.
Bacterias: medio Agar Nutritivo
Mohos: medio Rosa de Bengala con antibiótico.
Levaduras: medio Agar Extracto de Levadura y Malta con antibiótico.
2. Tomar 1g o ml del producto biológico a evaluar.
3. Realizar diluciones seriadas (hasta 10^{-6}).
4. Sembrar por triplicado 100µl de las diluciones más concentradas o un rango amplio de diluciones escalonadas que permitan hacer un conteo más preciso.
5. Incubar a 25°C, por 48 horas para bacterias, 72 horas para mohos y levaduras.
6. Realizar el conteo de colonias de microorganismos contaminantes en la dilución donde se encuentren entre 10 a 100 colonias por caja (hongos), 30 a 300 colonias para bacterias.
7. Calcular la concentración del contenido de contaminantes siguiendo la fórmula para UFC (referirse a la metodología de concentración de colonias).

4.4 Interpretación de resultados

El porcentaje de pureza (%) de un producto biológico se determina con las concentraciones de los microorganismos contaminantes y el biocontrolador aplicando la siguiente fórmula (Chiriboga, Gómez y Garcés, 2015):

$$\text{Pureza \%} = \frac{[MO B]}{[MO B] + [MO C]} \times 100$$

Donde,

MO B: concentración del microorganismo biocontrolador

MO C: concentración de los microorganismos contaminantes

Ejemplo para cálculo de pureza de un producto biológico

Una formulación granulada a base de *Trichoderma* sp. registra una concentración de $3,50 \times 10^8$ UFC/g del producto en su etiqueta, el recuento de colonias de microorganismos contaminantes es el siguiente (Tabla 6):

Tabla 6. Ejemplo para cálculo de pureza de un producto biológico

Microorganismos Contaminantes	Factor de dilución (rótulo en las cajas de Petri)	Número de colonias contaminantes								
		Submuestra 1			Submuestra 2			Submuestra 3		
		RI	RII	RIII	RI	RII	RIII	RI	RII	RIII
Bacterias	10^{-2}	40	36	35	40	37	46	38	37	41
	10^{-3}	1	1	2	1	1	0	0	2	0
	10^{-4}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mohos	10^{-5}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-6}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-7}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Levaduras	10^{-2}	3	7	3	8	5	1	0	9	6
	10^{-3}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10^{-4}	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Se calcula el promedio de colonias contaminantes:

Agar Nutritivo: $(40+36+35+40+37+46+38+37+41) / 9 = 38,89$ colonias

Agar Rosa de Bengala: 0 colonias

Agar extracto de levadura: no se toma en cuenta ya que el conteo de colonias es inferior al umbral de conteo que es de 10 a 100 colonias.

Teniendo en cuenta las diluciones se calcula la concentración de contaminantes y se expresa en UFC/g de producto siguiendo la metodología descrita previamente.

Agar Nutritivo (bacterias): $3,89 \times 10^4$ UFC/g

Agar Rosa de Bengala (mohos): no se encontró contaminantes

Agar Extracto de Levadura y Malta (levaduras): despreciable por ser menor de 1000 UFC/g

Concentración total de contaminantes = $3,89 \times 10^4$ UFC/g

Aplicando la fórmula con base en la concentración del ingrediente activo descrita anteriormente:

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{(389\ 00 \frac{\text{UFC}}{\text{g}})}{(350\ 000\ 000 \frac{\text{UFC}}{\text{g}} + 3980 \frac{\text{UFC}}{\text{g}})} \times 100$$

$$\text{Pureza (\%)} = 99,99\%$$

- **Formato para registro de información.** Ver Anexo 10.

SECCIÓN 3. PRUEBAS FISICOQUÍMICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE BIOINSUMOS CON BASE A HONGOS BIOCONTROLADORES.

1. Determinación de parámetros fisicoquímicos

1.1. Objetivo

Determinar las características fisicoquímicas de bioinsumos, mediante la medición de actividad de agua, pH, porcentaje de humedad, densidad apisonada (bioformulado sólidos), suspendibilidad (bioformulado sólidos), humectabilidad (bioformulado sólidos), tamaño de la partícula y estabilidad de concentrado emulsionable.

1.2 Materiales y equipos

- Equipo medidor de actividad de agua
- Balanza medidora de humedad
- pH-metro
- Agua destilada desionizada
- Agitador magnético
- Plato calentador
- Incubadora
- Soporte de madera con medición vertical
- Micropipetas de 100 μ l a 1000 μ l
- Cajas Petri
- Balanza
- Tamices
- Agitador vibratorio
- Cronómetro

1.3 Metodología

1.3.1 Medición de actividad de agua (a_w)

1. Colocar una muestra de 2g del producto biológico en el equipo medidor de actividad de agua (AQUA LAB 4TE), la muestra debe cubrir toda la base del contenedor del equipo.
2. Accionar el equipo, una vez finalizado el procedimiento observar el valor de actividad de agua en la pantalla de lectura.
3. Realizar tres lecturas por producto biológico.

1.3.2 Medición de porcentaje de humedad

1. Colocar 2g del producto biológico en la balanza de medición de porcentaje de humedad.
2. Accionar el equipo y esperar que se presente el porcentaje de humedad en la pantalla de lectura. La técnica usada por el equipo es de pérdida de peso por secado.
3. Realizar un mínimo de tres lecturas por producto biológico.

1.3.3 Medición de pH

1. Para formulaciones líquidas o sólidas pesar 5ml o 5g del producto biológico.
2. Reconstituir la muestra en 50ml de agua destilada desionizada.
3. Homogeneizar con agitador magnético a 150 rpm durante dos minutos.
4. Medir el pH en la muestra homogeneizada.
5. Realizar tres lecturas por producto biológico.

1.3.4 Determinación de la densidad apisonada (g/ml)

Descripción (Adaptación metodología CIPAC MT 186, 1989)

1. Colocar una muestra de 10 g del bioinsumo en una probeta plástica de 50ml.
2. Ubicar la probeta sobre un soporte de madera.
3. Levantar la probeta a 5cm de altura de la base y dejar caer en posición vertical.
4. Repetir el paso anterior por 50 veces.
5. Registrar el volumen de la muestra apisonada después de su compactación.
6. Realizar tres lecturas por producto biológico
7. Determinar la densidad apisonada mediante la fórmula (Quiroga, 2009):

$$\text{Densidad apisonada} = \frac{10g}{\text{volumen después de la compactación}}$$

1.3.5 Determinación de la suspendibilidad

Adaptación metodología CIPAC MT 161, 1989

1. Pesar 2,5g del producto biológico.
2. Reconstituir la muestra en un vaso de precipitación con 50ml de agua destilada, previamente calentada a 30°C.
3. Mezclar la muestra durante dos minutos a 120 rpm, hasta obtener una suspensión homogénea.
4. Colocar la suspensión en una probeta de 250ml y completar el volumen de esta con agua destilada.
5. Sellar la probeta con un tapón e invertir a 180° por 30 veces durante 1 minuto.
6. Incubar la suspensión a 30°C por 30 minutos.
7. Extraer 225ml del volumen de líquido considerando una misma altura de extracción y sin perturbar el sedimento.
8. Transferir el sedimento a una caja Petri de peso conocido.
9. Llevar a estufa durante 24 horas a 90°C.
10. Registrar el peso final de los sólidos de la muestra.
11. Realizar tres lecturas por producto.
12. Calcular el porcentaje de suspendibilidad del producto aplicando la fórmula (Quiroga, 2009):

$$\text{Suspendibilidad (\%)} = 111\left(1 - \frac{a}{w}\right)$$

Donde,

a: Peso de la masa seca en los 25ml de residuo

w: Peso de la muestra inicial (2,5g)

1.3.6 Humectabilidad

Adaptación de metodología CIPAC MT 53.3, 1989

1. Pesar 5g del producto biológico.
2. Agregar la muestra desde una altura de 25cm en un vaso de precipitación con 100ml de agua destilada, sin agitación.
3. Registrar el tiempo en segundos que tarda el producto en humedecerse completamente.
4. Realizar tres lecturas por producto.

1.3.7 Tamaño de la partícula (%)

Adaptación metodología, CIPAC MT 197, 1989

1. Pesar una muestra de mínimo 10g del producto biológico
2. Colocar la muestra en una columna de tamices de poro conocido ordenados de mayor a menor correspondientes a 2mm, 1,7mm, 250µm, 150µm y 53µm para formulaciones granuladas y 500µm, 250µm, 150µm, 106µm, y 53µm para polvo, en la base de la columna ubicar un colector.
3. Ubicar la columna a utilizar en un agitador vibratorio por 5 minutos.
4. Pesar el material retenido en cada tamiz.
5. Realizar tres lecturas por producto
6. El porcentaje se obtendrá de la siguiente manera (Villamizar et al., 2005):

$$\text{Porcentaje de material retenido (\%)} = \frac{A \times B}{100}$$

Donde,

A: cantidad de material retenido en el tamiz

B: total de la muestra evaluada

1.3.8 Estabilidad de concentrado emulsionable

Adaptación metodología CIPAC MT 20, 1989

1. Colocar 2ml del producto biológico gota a gota en un vaso de precipitación de 100ml con 28ml de agua destilada.
2. Mezclar el sistema con una varilla de vidrio dirigiendo el flujo hacia el centro del vaso de precipitación.
3. Transferir el producto oleoso a una probeta de 100ml y completar su volumen con agua destilada.
4. Dejar en reposo durante una hora y registrar los cambios presentados por la emulsión.
5. Mantener en reposo durante 24 horas y registrar los cambios.

El formato para registro de resultados de las pruebas fisicoquímicas se presenta en el Anexo 11.

1.4 Interpretación de resultados pruebas fisicoquímicas

1.4.1 Actividad de agua (a_w)

El valor a_w depende de la composición, la temperatura y el contenido en agua del producto, este parámetro influye en el crecimiento y la viabilidad de los microorganismos (Madigan, 2009).

- Valores superiores a 0,96: los microorganismos tienen su metabolismo activo.
- Valores por debajo de 0,60: los microorganismos no pueden crecer permaneciendo en un estado de latencia (Equinlab, 2009).
- Para mantener la viabilidad de un producto biológico con base en hongos se consideran valores de actividad de agua entre 0,2 a 0,7 (Villamizar et al., 2005).

1.4.2 Porcentaje de humedad

Depende del tipo de formulación:

- Formulaciones sólidas (gránulos, polvos): los valores recomendados para mantener la viabilidad del producto oscilan entre 4 a 8% (Villamizar et al., 2005).
- Formulación polvo mojable: se recomiendan rangos entre 2 y 5% (Villamizar et al., 2005).
- Formulaciones líquidas (soluciones, emulsiones): los valores oscilan entre el 90 y 98% (Lawrie, Down y Greaves, 2009).

1.4.3 pH

Los intervalos óptimos de pH oscilan entre 5,5 y 7,5 para productos con base en hongos (Cenicafé, 2012).

1.4.4 Densidad apisonada

Los intervalos óptimos comprenden valores de 0,60 a 1,05g/ml (Villamizar et al., 2005). Indica el peso máximo de una sustancia que puede ser envasada en un recipiente de un volumen dado y es de utilidad para predecir el comportamiento de las formulaciones sólidas durante el manipuleo, transporte y almacenamiento (Padin et al., 2013; Quiroga, 2009).

1.4.5 Suspendibilidad

Se recomiendan porcentajes Suspendibilidad superiores al 60% para asegurar una mezcla homogénea durante su aplicación a fin de evitar el taponamiento de boquillas (FAO y OMS, 2004). Sin embargo, el límite de aceptación establecido por el INIAP para este parámetro son porcentajes superiores al 90%. Esta prueba tiene como propósito verificar que el ingrediente activo se encuentra homogéneamente disperso en la suspensión.

1.4.6 Humectabilidad

Se sugiera sea inferior a un minuto sin necesidad de agitación para garantizar la calidad al momento de aplicación evitando la formación de grumos y taponamiento de boquillas (Quiroga, 2009).

1.4.7 Tamaño de partícula

Debe ser homogéneo y no disperso, es decir se recomienda porcentajes del material retenido en un mismo tamiz superiores al 90% (Quiroga, 2009).

1.4.8 Estabilidad de concentrado emulsionable

Se considera estable la emulsión cuando cumple con los siguientes requisitos referentes al cremado en reposo (MAG/MEIC, 1997):

- Al instante de reconstitución presenta una emulsificación completa y espontánea
- A los 30 minutos se puede observar 2ml de cremado máximo
- A la 1 hora presenta 3ml de cremado máximo
- A las 24 horas es capaz de reemulsificarse completamente mediante agitación

A continuación, se presenta un resumen de los rangos sugeridos para las diferentes pruebas microbiológicas y fisicoquímicas para el control de calidad de bioinsumos con base en hongos biocontroladores (Tabla 7):

Tabla 7. Resumen de parámetros de calidad para calificar un bioinsumo con base en hongos biocontroladores en diferentes tipos de formulación.

Parámetros	Tipo formulación/bioinsumo	Límite de aceptación / Fuente
Germinación de conidios (%)	Todos los bioinsumos	> 85% de conidios germinadas en 24 horas (Gómez et al., 2014)
Viabilidad (UFC/g o ml)	Todos los bioinsumos	Depende de la viabilidad declarada en etiqueta del bioinsumo Aceptando únicamente concentraciones superiores a 10^5 (AGROCALIDAD, 2019)
Concentración de conidios (conidios/g o ml)	Todos los bioinsumos	Depende de la viabilidad declarada en etiqueta del bioinsumo Aceptando únicamente concentraciones superiores a 10^5 (AGROCALIDAD, 2019)
Pureza (%)	Todos los bioinsumos	> 90% sin encontrarse patógenos de plantas, animales o humanos (Chiriboga et al., 2015)
Densidad apisonada (g/mL)	WP WG	0,60 – 1,05 g/mL Establecido por el laboratorio de Control Biológico del INIAP

	CG	
Tamaño de partícula (Porcentaje de retención)	WP	>80% del material <106µm Establecido por el laboratorio de Control Biológico del INIAP
	WG	>80% del material entre 250µm – 1,7mm Establecido por el laboratorio de Control Biológico del INIAP
	CG	>80% del material entre 250µm - 2 mm Establecido por el laboratorio de Control Biológico del INIAP
Humedad (%)	Formulaciones líquidas	Los valores oscilan entre 90 y 98% (Lawrie et al., 2009)
	WP	2% - 5% (Villamizar et al., 2005)
	WG / CG	4% - 8% (Villamizar et al., 2005)
a_w	WP	0,2 – 0,7 (Villamizar et al., 2005)
	WG	
	CG	
pH	WP	5,5 – 7,5 (Cenicafé, 2012)
	WG	
	CG	
Suspendibilidad (%)	WP	> 90% (Villamizar et al., 2005)
	WG	
Humectabilidad (segundos)	WP	<1minuto (Quiroga, 2009)
	WG	

WP: polvo mojable; WG: gránulo soluble en agua; CG: gránulo cubierto

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de solución de Tritón x- 100 al 0,1%

Esta solución tiene la propiedad de dispersar los conidios, haciendo más fácil su conteo posterior:

Tritón x-100----1ml

Agua destilada--1000ml

Preparación:

Mezclar el agua con el Tritón x-100, mezclar hasta homogenizar.

Esterilizar en autoclave a 121° C y 15 libras de presión por 15 minutos.

Nota: Esta solución puede prepararse y guardarse en refrigeración hasta ser utilizada

Anexo 2. Preparación medio de cultivo Agar Agua (AA)

Agar----- 20 g

Agua destilada ---1000ml

Preparación:

Disolver el agar en el agua destilada

Esterilizar a 121°C y 15 lb de presión por 15 minutos

Nota: Se utiliza para aislamientos monospóricos y prueba de porcentajes de germinación.

Anexo 3. Preparación de Solución Azul de Lactofenol

Fenol en cristales----20g

Ácido láctico-----20ml

Glicerol-----40ml

Agua destilada-----20ml

Azul de algodón-----0,03g

Disolver el fenol en agua destilada tibia

Agregar el ácido láctico y la glicerina, mezclar bien.

Agregar el Azul de Lactofenol.

Anexo 4. Preparación medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)

Papa-----250g
 Dextrosa o Glucosa--18g
 Agar-----20g
 Agua destilada-----1000ml

Preparación:

Lavar las papas, pelarlas, pesarlas y picarlas en trozos pequeños
 Ponerla a hervir las papas en 1000ml de agua destilada, por 35 minutos.
 Filtrar a través de una gasa.
 Con agua destilada aforar a un litro, agregar el agar y la dextrosa, mezclar bien.
 Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión.

Anexo 5. Preparación de medio de cultivo Agar Sabouraud – Rosa de Bengala

Agar ----- 20g
 Peptona ----- 5g
 Sulfato de magnesio heptahidratado 0,5g
 Fosfato dipotásico----- 1g
 Glucosa----- 10g
 Rosa de Bengala al 5% (p/v) ----- 0,5ml
 Cloranfenicol ----- 0,1g
 Agua destilada ----- 1000ml

Preparación:

Mezclar todos los ingredientes y esterilizar en autoclave a 121° C y 15 libras de presión por 15 minutos.

Anexo 6. Preparación medio de cultivo Extracto de Levadura y Malta (YM).

Extracto de levadura ----- 3,0 g
 Extracto de malta ----- 3,0 g
 Dextrosa -----10,0 g
 Bactopentona -----5,0 g
 BactoAgar -----20,0 g
 Antibiótico-----0,23 g

Preparación:

En 1000ml de agua destilada mezclar cada uno de los ingredientes
 Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121° C y 15 libras de presión.
 Nota: Se utiliza para cuantificación de levaduras.

Anexo 7. Formato para registro de germinación de conidios (%)

Datos generales:

Tipo de formulación:	Origen:
Microorganismo:	Código del producto:
Fecha de evaluación:	Fecha de elaboración del producto:
Concentración declarada (UFC/g o ml):	
Germinación declarada (%):	

N° campos ópticos/ caja de Petri	Producto (Bioformulado)					
	Caja 1		Caja 2		Caja 3	
	Germinados	No germinados	Germinados	No germinados	Germinados	No germinados
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
Total						

Resumen:

Fecha de siembra:	
Horas de incubación:	Factor de dilución:
Conidios germinados:	Conidios No germinados:
Porcentaje de germinación (%):	Dentro de los parámetros: SI NO

Observaciones:

Nombre del técnico responsable: _____

Anexo 8. Formato para registro de viabilidad / concentración UFC

Datos generales:

Tipo de formulación:	Origen:
Microorganismo:	Código del producto:
Fecha de evaluación:	Fecha de elaboración del producto:
Concentración declarada (UFC/g o ml):	

Dilución sembrada (rótulo del tubo)	Factor de dilución (rótulo en las cajas de Petri)	Producto (Bioformulado)								
		Submuestra 1			Submuestra 2			Submuestra 3		
		Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 1	Caja 2	Caja 3

Resumen:

Promedio de Lecturas	Sub 1	Sub 2	Sub 3
Concentración determinada (UFC/g o ml):			
Dentro de los parámetros: SI		NO	

Observaciones:

Nombre del técnico responsable: _____

Anexo 9. Formato para registro de concentración de conidios (conidios/g o ml).

Datos generales:

Tipo de formulación:	Origen:
Microorganismo:	Código del producto:
Fecha de evaluación:	Fecha de elaboración del producto:
Concentración declarada (conidios/g o ml):	

Área de conteo	Lecturas cámara de Neubauer										Promedio	Concentración Conidios/g
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1												
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		

Fecha de siembra:	Dilución:
Peso de la muestra:	Promedio de Lecturas:

Observaciones:

Nombre del técnico responsable: _____

Anexo 10. Formato para registro de porcentaje de pureza.

Datos generales:

Tipo de formulación:	Origen:
Microorganismo:	Código del producto:
Fecha de evaluación:	Fecha de elaboración del producto:
Concentración declarada (conidios/g o ml):	

Concentración de colonias contaminantes (UFC/g):

Microorganismos contaminantes	Factor de dilución (rótulo en las Cajas Petri)	Número de colonias contaminantes								
		Submuestra 1			Submuestra 2			Submuestra 3		
		R I	R II	R III	R I	R II	R III	R I	R II	R III
Bacterias										
Mohos										
Levaduras										

Resumen:

Fecha de siembra:	Fecha de evaluación:
Contaminantes Bacterias (UFC):	Contaminantes Mohos (UFC):
	Contaminantes levaduras (UFC):
Otros contaminantes (UFC):	Pureza (%):
Dentro de los parámetros: SI	NO

Observaciones:

Nombre del técnico responsable: _____

Anexo 11. Formato para registro de información de pruebas fisicoquímicas

Tipo de formulación:	Origen:
Microorganismo:	Código del producto:
Fecha de evaluación:	Fecha de elaboración del producto:
Concentración declarada (UFC/g o ml):	
Fecha de recepción del bioinsumo:	

Parámetros	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Resultado
pH				
Actividad de Agua (aw)				
Temperatura				
Humedad (%)				
Tamaño de la partícula (%)				
Densidad apisonada (g/ml)				
Suspendibilidad (%)				
Humectabilidad				
Tiempo				
Estabilidad de la emulsión				

Dentro de los parámetros de calidad: **SI** _____ **NO** _____

Observaciones:

Nombre del técnico responsable: _____

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROCALIDAD. (2019). Requisitos específicos para el registro de inoculantes biológicos. Dirección de registro de insumos agrícolas. 5p. Obtenido de: <http://www.agrocalidad.gob.ec/direccion-de-registro-de-insumos-agricolas/>
- Barrera, S. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungi as alternative to sustainable agriculture, Obtenido de: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n1/v7n1a14.pdf>
- Berlanga, P. y Hernández, V. (2006). Parámetros de calidad de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Colima México. 43 p.
- Burges, H. ed. (1998). Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic. p. 381
- Cenicafé. (2012). Stato dell'arte sulle tecniche di produzione additiva per metalli (Mayo, 2012). (S. Milena, Ed.), Metallurgia Italiana (Vol. 109). Caldas-Colombia. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Charnley, A. y Collins, S. (2007). Capítulo 10: Entomopathogenic fungi and their role in pest control. pp 159-187. En Kubicek, C. y Druzhinina, I. The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships. Segunda edición. Springer, Berlin.
- Chiriboga, P., Gómez, B. y Garcés, E. (2015). Protocolos para formulación y aplicación del bioinsumo: *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (ysaú). Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00089-9>.
- CIPAC - Collaborative International Pesticides Analytical Council. (1989). CIPAC Handbook F. Black Bear Press, Cambridge. UK. 472 p.
- Contreras, C. (2003). Evaluación de la estabilidad en almacenamiento de preformulados a base de *Rhizopus stolonifer* en la postcosecha de tomate. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá.
- Díaz, A., Gómez, M., Grijalba, E., Santos, A. Cruz, F., León, D., Alarcón, E. y Cotes, A. (2019). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. En AGROSAVIA. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros Volumen 2. Colombia.
- Equinlab. (2009). Medición De La Actividad Del Agua. *Novasina*, 1–5. Obtenido de: [http://www.equinlab.com/pdf_/La importancia de la actividad de agua \(aw\).pdf](http://www.equinlab.com/pdf_/La%20importancia%20de%20la%20actividad%20de%20agua%20(aw).pdf)
- FAO y OMS. (2004). Manual sobre elaboración y empleo de las especificaciones de la FAO y de la OMS para plaguicidas. Obtenido de: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42968/1/9253048573.pdf>
- Gandarilla, F., Morales, L., Pereyra, B., Elías, M. y Quintero, I. (2018). Producción de unidades infectivas de *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) a partir de aislados nativos del noreste de México mediante 3 estrategias de propagación. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 81–89. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.008>
- Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M. y Torres, E. (2013). *Manual de producción y uso de hongos antagonistas*. 34p. Obtenido de: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>

- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E. y Tenorio, M. (2014). *Producción y uso de hongos entomopatógenos. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos*. PERÚ. Obtenido de: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producción-y-Uso-de-Hongos-Entomopatógenos.pdf>
- González, M., Aguilar, C. y Rodríguez, R. (2012). Control De Insectos-Plaga En La Agricultura Utilizando Hongos Entomopatogenos: Retos Y Perspectivas. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(8), 42–53. Obtenido de: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/divulgacionAQM.html>
- Grijalba, E., Espinel, C., Cuartas, P., Chaparro, M. y Villamizar, L. (2018). *Metarhizium rileyi* biopesticide to control *Spodoptera frugiperda*: Stability and insecticidal activity under glasshouse conditions. *Fungal Biology*. 122 (11). 1069-1076 p.
- Humber, R. (2012). Preservation of entomopathogenic fungal cultures. En Lacey, L. (ed). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Second edition. Washington – Estados Unidos de América. Elsevier Ltd. pp. 317-328
- ICA, (2017). Control de Bioinsumos. Laboratorio de Control de Calidad de Bioinsumos Agrícolas del Instituto Colombiano Agropecuario. Obtenido de: <https://www.controldebioinsumos.com/resena-historica.html>
- Inglis, G., Enkerli, J. y Goettel, M. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. pp 189-253 En Lacey, L. (ed). *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Second edition. Washington – Estados Unidos de América. Elsevier Ltd.
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista Protección Vegetal* 24:1.
- Jaramillo, J., Montoya, E., Benavides, P. y Góngora, C. (2015). *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo. *Revista Colombiana de Entomología* 41 (1): 95-104
- Jenkins, N. y Grzywacz, D. (2000). Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents - Assurance of Product Performance, *Biocontrol Science and Technology*, 10:6, 753-777, DOI: 10.1080/09583150020011717
- Landa, L., Arrieta, V. y Galicia, A. (2009). Estudio de la constitución y deconstrucción de prácticas de los Ingenieros Bioquímicos, Caso Diluciones seriadas. Universidad Autónoma de Guerrero. México. 9p. Obtenido de: <http://funes.uniandes.edu.co/5065/1/ArrietaUnestudioAlme2009.pdf>
- Lawrie, J., Down, J. y Greaves, M. (2009). Effects of storage on viability and efficacy of granular formulations of the microbial herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola*. *Biocontrol Science and Technology*. 11: 283-295.
- Macías, A., Díaz, M., Ramos-López, M., Navarro, S., Espinosa, G. y Ruiz, D. (2013). Estudio del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* como control microbiológico de la mosquita blanca *Bemisia tabaci*. *Interciencia*, 38(7), 523–527.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2009). Brock: biología de los microorganismos. Doceava edición. Editorial Prentice Hall. Madrid, España. 1259 p.
- MAG/MEIC. (1997). RTCR 172:1991 plaguicidas. determinacion de la estabilidad de la emulsion de formulaciones de plaguicidas, 2–7. Obtenido de: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd38/CostaRica/D-27040.pdf>
- Marques, E, Gutiérrez, M., Gato, Y. y Lequerque, A. (2017). El género *Metarhizium Sorokin* y su aplicación en el control de insectos plagas. *Revista Cubana De Ciencias Biológicas*, 5(2), 1–13.

- Martínez, B., Danay, I. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg.*, 28(1), 1–11.
- Martínez, B., Infante, D., y Peteira, B. (2015). Taxonomía Polifásica y Variabilidad en el Género *Trichoderma*. *Rev. Protección Veg.* 30(5), 11–22.
- Mishra, N., Khan, S. y Krishna, S. (2016). Native isolate of *Trichoderma*: a biocontrol agent with unique stress tolerance properties. *Microbiol Biotechnol* 32: 130 DOI 10.1007/s11274-016-2086-4
- Nava, E., García, C., Camacho, J. y Vázquez, E. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, vol. 8, núm. 3b, Universidad Autónoma Indígena de México.
- Nicholls, C. (2008). Control Biológico de Insectos: Un enfoque Agroecológico (1ra edición). Antioquia: Septiembre, 2008. Obtenido de: <https://www.socla.co/wp-content/uploads/2014/ClaraNicholls.pdf>
- Padilla, G., Bernal, M., Vélez, P. y Montoya, C. (2000). Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. *CENICAFE*, 51(1), 28–40.
- Padin, S., Lampugnani, G., Abramoff, C. y Laporte, G. (2013). Formulaciones comunes sólidas. Biocontrol de *Rhizoctonia solani* por *Trichoderma* spp. Universidad Central de Venezuela.
- Perdomo, C. (2018). Desarrollo de cuatro bioformulaciones con base en conidios de *Trichoderma asperellum*. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito-Ecuador. pp. 10-14; 20-29.
- Pérez, A., Hermosa, R. y Monte, E. (2017). *Trichoderma* Biocontrol Activity Against Plant Pathogenic Ascomycetes, 2, 85–93.
- Quiroga, I. (2009). Caracterización de prototipos de bioplaguicida a base de granulovirus para el control de *Tecia solanivora* en campo. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá.
- Ramírez, C. (1982). *Seminario Control de Malezas en Praderas: Formulación de Herbicidas*. ICA. Bogotá Colombia. pp. 38 – 44.
- Ravensberg, W. (2011). A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods. Springer Science y Business Media. 386 p.
- Rifai, M. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycology Paper* 116:1–56.
- Rubio, S. y Fereres, C. (2005). Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. In *Ciencias Agrarias* (pp. 1–16). Madrid. Obtenido de: <https://core.ac.uk/download/pdf/36025273.pdf>
- Shoresh, M., Harman, G. y Mastouri, F. (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:21–43.
- Spadaro, D. y Gullino, M. (2004). State of the art future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91: 185–194.
- Swaminathan, J., Nelson, T., y Jackson, T. (2011). Technology Transfer Manual – NZAID Project for INIAP, Ecuador. Nueva Zelanda. 15 p.
- Tijjani, A., Bashir, K., Mohammed, I., Muhammad, A., Gambo, A. y Musa, H. (2016). *Biopesticides for pests control: A Review Journal of Biopesticides and Agriculture*, vol. 3 No. 1, 6-13, September, 2016.
- Urtubia, I. y France, A. (2007). *Formulaciones de hongos entomopatógenos para control de plagas en agricultura*. INIA TIERRA adentro. Obtenido de: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR34779.pdf>
- Vásquez, M. (2015). Efecto de *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* sobre, *Oligonychus*

- punicae* , en condiciones de laboratorio. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de ciencias biológicas. Trujillo, Perú. 42p.
- Vélez, P., Posada, F., Marín, P., González, M., Osorio, E. y Bustillo, A. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos*. Caldas-Colombia.
- Villamizar, L., Zeddám, J. L., Espinel, C. y Cotes, A. (2005). Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base de *Granulovirus* de *Phthorimaea operculella* PhopGV. *Revista Colombiana de Entomología* 31 (2): 127-132.
- Wraight, S., Carruthers, R., Jaronski, S., Bradley, S., Garza, C. y Galaini, S. (2000). Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control* 17, 203–217p. doi:10.1006/bcon.1999.0799.

GLOSARIO

Actividad de agua (aw): Cantidad de agua disponible para que los microorganismos puedan desarrollar su metabolismo.

Agente microbial: sustancia o mezcla de sustancias elaboradas con virus u organismos vivos como bacterias, hongos o protozoos que, por su capacidad de antagonismo, competencia antibiosis o patogenicidad son empleados en el control biológico de plagas.

Agitador vibratorio: equipo para tamizado en seco que reproduce el movimiento de golpeo del tamizado manual, mediante una acción mecánica

Blastospora: espora formada por gemación.

Biocontroladores: sustancia o mezcla de sustancias con agentes microbiales nematodos entomopatógenos, parasitoides o predadores utilizados para el control de plagas.

Bioinsumo: sustancia o mezcla de sustancias elaboradas de origen biológico o natural sostenible e inocuo, clasificado como agente biológico para el control de plagas, inoculante biológico, bioformulación, bioplaguicida o bioabono.

Cepa (de un hongo): en una especie, es un subgrupo que generalmente se caracteriza por tener uno o varios factores en común; por ejemplo, procedencia geográfica y hospedero.

Conidio: espora asexual de los hongos

Conidióforo: rama de micelio que sostiene conidios.

Clamidóspora: espora de paredes gruesas de varias clases de los hongos. Etapa del ciclo vital del organismo que sobrevive en condiciones desfavorables, tales como estaciones secas o cálidas. Las clamidósporas son generalmente de color oscuro, esférica y una superficie lisa.

Densidad: Relación de masa por unidad de volumen.

Densidad apisonada: Compactación que sufre una formulación después de su orientación conforme a su mejor acomodamiento, eliminando el aire entre ellas.

Microorganismo contaminante: todo microorganismo diferente al ingrediente activo en que está basado el bioinsumo.

Entomopatógeno: organismo con la capacidad de causar enfermedad en los insectos.

Emulsión: Líquido de aspecto lácteo que contiene en suspensión pequeñas partículas o gotas de otra sustancia insoluble.

Excipientes: sustancia inactiva usada para incorporar el principio activo.

Humedad: Contenido porcentual de agua en la formulación.

Humectabilidad: velocidad con que un sólido se moja.

Ingrediente activo: en los productos para controlar plagas, malezas o insectos, es el componente que ejerce tal acción.

Propágulo microbiano: estructura de reproducción y propagación microbiana.

Sedimento: Conjunto de partículas sólidas que queda depositado en el fondo del recipiente que contiene un líquido.

Suspendibilidad: capacidad de las partículas para mantenerse en suspensión.

Tritón: tenso activo que permite un mejor contacto del solvente con el propágulo.

Unidades formadoras de colonias – UFC: propágulos que tienen la capacidad de multiplicarse y formar colonias en la superficie de un medio de cultivo.

Viabilidad: estimación aproximada del número de propágulos vivos, capaces de crecer y multiplicarse.

Volumen: Espacio que ocupa un cuerpo.

Más información:



Departamento de Protección Vegetal

Estación Experimental Santa Catalina

Panamericana Sur, Km 1
Apartado Postal: 17-01-340
Teléfono (593) 300 6433
E-mail: iniap@iniap.gob.ec
www.iniap.gob.ec
Mejía - Ecuador

ISBN: 978-9942-22-472-9



agroinvestigacionecuador



@INIAPECUADOR



agroinvestigación iniap

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)
Av. Eloy Alfaro N-30-350 y Av. Amazonas. Edificio MAGAP-Piso 4
Casilla 17-17-362. Teléfonos (593-2) 2565963 / 2504 996 / 2567 645

www.iniap.gob.ec