



DOCUMENTO GENERAL

Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

METODOLOGÍA DE RECuento DE AGENTES MICROBIANOS DE CONTROL DE PLAGAS Y DE CONTAMINANTES BIOLÓGICOS EN PRODUCTOS MICROBIANOS DE CONTROL DE PLAGAS

Tabla de contenidos

1. Ámbito de aplicación	4
2. Método de recuento en placa: Recuento de células viable	4
2.1 Procedimiento	4
2.2 Equipos y materiales	4
2.3 Tampones y medios de cultivos	5
2.4 Consideraciones para realizar el método de recuento en placa.....	5
2.5 Procedimiento para realizar el método de recuento en placa	5
3. Técnica de recuento del número más probable (NMP) de AMCP de un PMCP	6
3.1 Fundamento.....	6
3.2 Equipos y materiales.....	6
3.3 Medios de cultivos	7
3.4 Procedimiento	7
4. Protocolo de biopotencia de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	12
4.1 Fundamento.....	12
4.2 Equipos y reactivos.....	13
4.3 Procedimiento	13
5. Protocolo de detección de contaminantes microbianos.....	18
5.1 Justificación	18
5.2 Equipos y materiales.....	20
5.3 Medios y reactivos	20
5.4 Procedimiento	20
6. Determinación de la producción de micotoxinas por contaminantes microbianos de PMCP	22
6.1 Fundamento.....	22
6.2 Equipos y materiales.....	22



DOCUMENTO GENERAL

Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

6.3	Procedimiento	23
6.4	Detección de β -exotoxinas producidas por subespecies de <i>B. thuringiensis</i>	24
7.	Medios de Cultivos	24
7.1	Tampón fostato o fosfato Butterfield	24
7.2	Agar para recuento en placa (AC) (métodos estándar)	24
7.3	Agar Luria Bertani.....	25
7.4	Agar R2A.....	25
7.5	Agar TSA o TSB.....	25
7.6	PDA o PDB.....	25
7.7	YPD	25
7.8	Caldo nutritivo	26
7.9	Agar DRBC.....	26
7.10	Agar DG18	26
7.11	Agar malta (MA)	26
7.12	Agar extracto de malta - (levaduras y mohos) (MEAYM).....	27

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

1. **Ámbito de aplicación**

Se describen los protocolos para cuantificar el o los AMCP que componen el PMCP junto con los protocolos que permiten la cuantificar los agentes microbianos (exceptuando los patógenos humanos) y toxinas que puedan contaminar los PMCP.

2. **Método de recuento en placa: Recuento de células viable**

2.1 Procedimiento

- a. Una célula viable es aquella que es capaz de dividirse y originar descendencia (ej. una colonia). En base a este principio se ha desarrollado el método de recuentos de células viable en placa con un medio sólido que sea propicio para el crecimiento del microorganismo que se requiere cuantificar. El método de recuento en placa se emplea para el conteo de microorganismos de matrices simples. Consiste en la siembra de un volumen de cultivo diluido (0,1 mL) que se extiende con un asa estéril de Drikalsky sobre la superficie del medio sólido. Posteriormente, la placa se incuba a una temperatura idónea hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número.
- b. En este método es importante que el número de colonias que aparezcan en las placas no sea elevado ni escaso. Las placas con alta carga microbiana pueden no formar colonias y algunas colonias se pueden fusionar originando estimaciones erróneas. También es importante que el número no sea demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo. Se recomienda que el número de colonias oscile entre 20 y 200 en el caso de recuentos bacterianos y entre 25 y 100 para recuentos fúngicos. Para obtener un número adecuado de colonias para el recuento se realizan diluciones decimales de la muestra.

2.2 Equipos y materiales

Los medios de cultivos que se indican a continuación se describen en la sección 7.

- a. Campana de bioseguridad.
- b. Placas de Petri, vidrio o plástico (al menos 15 × 90 mm)
- c. Pipetas con propipetas (sin pipeteo bucal) o pipetas, 1, 5 y 10 mL, graduadas en unidades de 0,1 mL
- d. Frascos de dilución, 6 oz (160 mL), vidrio resistente al borosilicato, con tapones de goma o tapones de rosca de plástico
- e. Recipientes para pipetas y placas de Petri
- f. Baño de agua circulante, para templar agar, controlado termostáticamente a 45 ± 1 °C
- g. Incubadoras
- h. Contador de colonias, campo oscuro, Quebec o equivalente, con fuente de luz adecuada y placa de rejilla
- i. Contador Tall
- j. Tubos con 90 ± 1 mL de tampón fosfato de Butterfield o 0,85% de NaCl.
- k. Agar para recuento en placa (ACP)
- l. Refrigerador, para enfriar y mantener las muestras a 0 - 5 °C
- m. Congelador, para mantener las muestras congeladas de -15 a -20 °C
- n. Termómetros (mercurio) rango apropiado; precisión comprobada con un termómetro certificado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST)
- o. Rojo Congo
- p. Sale biliars (Sigma Aldrich)

2.3 Tampones y medios de cultivos

Los tampones y medios de cultivos que se mencionan a continuación se describen en la sección 7.

- a. Tampón fosfato de Butterfield o 0,85% de NaCl.
- b. Agar Luria Bertani (LB)
- c. R2A
- d. Triptona sucralosa soya (TSA)
- e. Agar papa dextrosa (PDA)
- f. Extracto de levadura, peptona, dextrosa (YPD)

2.4 Consideraciones para realizar el método de recuento en placa

- a. Se debe tener la identificación del(os) AMCP(s) que componen el PMCP tal como se describe en el documento "Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular", código D-RIS-RAI-PA-001.
- b. Se recomienda que para el recuento de AMCP de origen bacteriano se emplee agar LB, ACP, R2A o TSA. Si el AMCP se desplaza en el agar ("swarming") suplementar con 0,075 g/L de sales biliares (Sigma Aldrich) para inhibir el "swarming". Si el PMCP posee una mezcla de AMCPs emplear 0,025 g/L de colorante de rojo Congo. Este último incrementa la distinción visual entre las morfologías de las colonias.
- c. En el caso de que el AMCP sea un hongo se recomienda realizar el recuento en el medio PDA o YPD.
- d. Se debe tener previamente un registro fotográfico junto con la caracterización fenotípica de las colonias del AMCP en el medio en el que se va a realizar el recuento del PMCP. En el caso de que el AMCP sea de origen bacteriano, se debe considerar las características morfológicas de la colonia, tales como tamaño, borde (ej. circular, liso, irregular, lobulado, rizoide, etc) elevación (ej. planas, levantadas, convexas, cóncavas, etc), pigmentación (ej. incolora, pigmentada o pigmento difusible), consistencia (ej. mucoide, seca, filante, etc), características ópticas (ej. opacas, brillantes, translúcidas, opalescentes, etc) y superficie (ej. lisas o rugosa). En el caso de hongos, se debe tener un registro de las características de la colonia, estructura del conidióforo, raquis y tamaño, forma (ej. globosas, elipsoidales, esféricas, etc) y color de las conidias (ej. verdes, hialinas, etc). Estos antecedentes sirven para realizar el reconocimiento del AMCP en el medio de cultivo en donde se realizará el recuento.
- e. A continuación, se indican la metodología del recuento en placa de microorganismos que componen un PMCP.

2.5 Procedimiento para realizar el método de recuento en placa

- a. El análisis debe ser realizado a 5 lotes de producción del PMCP con 5 repeticiones.
- b. Agregar 450 ml de tampón fosfato Butterfield o solución de 0,85% de NaCl a 50 g o 50 mL de PMCP. Esta suspensión corresponde a la dilución 10^{-1}
- c. Homogenizar en agitador orbital a 200 rpm o Stomacher por 15-20 min.
- d. Realizar diluciones del homogeneizado original con prontitud, utilizando pipetas que entreguen el volumen requerido con precisión. No entregue menos del 10% del volumen total de pipeta. Por ejemplo, no utilizar una pipeta con una capacidad superior a 10 mL para administrar volúmenes de 1 mL; para suministrar volúmenes de 0,1 mL, no utilice pipetas con una capacidad superior a 1,0 mL.
- e. Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y otras según corresponda, de homogeneizado de PMCP, transfiriendo 10 ml de la dilución anterior a 90 ml de diluyente.

	<p>DOCUMENTO GENERAL</p> <p>Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas</p>
---	---

Evitar tomar muestras de espuma. Agite todas las diluciones 25 veces en un arco de 30 cm en 7 s o aplicar vortex (1250 a 2500 rpm) por 7s.

- f. Sembrar 100 µL de las últimas 3 diluciones en la placa con medio sólido. Emplear asa de Drigalsky para esparcir el volumen homogéneamente sobre el medio de cultivo.
- g. Rotular e incubar a la temperatura óptima de crecimiento del AMCP por 18 a 48 h. Se debe trabajar en duplicado.
- h. Observar la placa y contar las colonias presentes.
- i. Verificar que todas las colonias presenten las características morfológicas descritas para el(os) AMCP(s) del PMCP. En el caso de colonias bacterianas corresponden al tamaño, borde (ej. circular, liso, irregular, lobulado, rizoide, etc) elevación (ej. planas, levantadas, convexas, cóncavas, etc), pigmentación (ej. incolora, pigmentada o pigmento difusible), consistencia (ej. mucoide, seca, filante), características ópticas (ej. opacas, brillantes, translúcidas, opalescentes) y superficie (ej. lisas o rugosa).
- j. En el caso de hongos, evaluar adicionalmente la estructura del conidióforo, tamaño y forma de la conidia y comparar las observaciones con las características descritas en la literatura de la especie o género del microorganismo fúngico a contabilizar en el PMCP.
- k. Seleccionar las placas que contengan entre 20 y 200 colonias para el conteo de UFC de origen bacteriano, mientras que para el recuento de UFC de origen fúngico seleccionar las placas que contengan entre 25 a 100 colonias. Realizar el recuento de colonias en contador de Quebec.

3. Técnica de recuento del número más probable (NMP) de AMCP de un PMCP

3.1 Fundamento

La técnica del número más probable (NMP) es un método para obtener estimaciones cuantitativas de microorganismo en muestras de agua o alimentos calculados en base a la distribución de Poisson.

3.2 Equipos y materiales

- a. Campana de bioseguridad.
- b. Pipetas con propipetas (sin pipeteo bucal) o pipetas, 1, 5 y 10 mL, graduadas en unidades de 0,1 mL
- c. Frascos de dilución, 6 oz (160 mL), vidrio resistente al borosilicato, con tapones de goma o tapones de rosca de plástico
- d. Recipientes para pipetas y placas de Petri, adecuados para protección
- e. Agitador orbital con control de temperatura.
- f. Tubos con 90 ± 1 mL de tampón fosfato de Butterfield(S1)
- g. Refrigerador, para enfriar y mantener las muestras a 0 - 5 °C
- h. Congelador, para mantener las muestras congeladas de -15 a -20 °C
- i. Termómetros (mercurio) rango apropiado; precisión comprobada con un termómetro certificado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST)

3.3 Medios de cultivos

Los tampones y medios de cultivos que se mencionan a continuación se describen en la sección 7.

- a. Caldo nutritivo
- b. Caldo TSB
- c. PDB

3.4 Procedimiento

- a. Agregar 450 mL de tampón fosfato Butterfield o solución de 0,85% de NaCl a 50 g o a 50 mL de PMCP. Esta suspensión corresponde a la dilución 10^{-1} .
- b. Homogeneizar en agitador orbital a 200 rpm o Stomacher por 15-20min.
- c. Realizar diluciones del homogeneizado original con prontitud, utilizando pipetas que entreguen el volumen requerido con precisión. No entregue menos del 10% del volumen total de pipeta. Por ejemplo, no utilizar una pipeta con una capacidad superior a 10 mL para administrar volúmenes de 1 mL; para suministrar volúmenes de 0,1 mL, no utilice pipetas con una capacidad superior a 1,0 mL.
- d. Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y otras según corresponda, de homogeneizado de PMCP, transfiriendo 10 mL de la dilución anterior a 90 mL de diluyente. Evitar tomar muestras de espuma. Agite todas las diluciones 25 veces en un arco de 30 cm en 7s.
- e. Inocular una alícuota de 1 mL de cada dilución a 3 a 5 tubos con medio de cultivo (TSB o medio nutritivo) para bacterias o para hongos (PDB) dependiendo de la naturaleza del AMCP. No deben transcurrir más de 15 minutos desde el momento en que se mezcla la muestra hasta que todas las diluciones se inoculan en los medios apropiados.
- f. Incubar los tubos a la temperatura óptima de crecimiento del AMCP por un transcurso de 18 a 48 h.
- g. Emplear las 3 últimas diluciones que se ejemplifican en la Figura 5.
- h. Para obtener el NMP se debe emplear la Tabla 15 (3 réplicas) y 16 (5 réplicas). Las Tablas 15 y 16 se aplican a diluciones de matrices de PMCP de 10^{-1} ; 10^{-2} y 10^{-3} . Cuando se seleccionan diferentes diluciones a las establecidas en la Tabla 15 o 16, multiplique el NMP y los límites de confianza por cualquier multiplicador que haga que las diluciones coincidan con las diluciones de las tablas. Por ejemplo, si las diluciones seleccionadas fueran 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} con 5 réplicas por dilución, multiplicar por 100 haría que estas coincidieran con las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) que se exhiben en las Tablas 15 y 16. Ver ejemplo de la Figura 6.

Figura 5. Elección de diluciones para la determinación del NMP. En la tabla se presenta el número de réplicas positivas por cada dilución. En este caso se ocuparon 5 réplicas por cada dilución. Las diluciones que se seleccionan para la determinación del NMP se enmarcan en rojo.

Ejemplo	10 g	1 g	0,1 g	0,01 g	0,001 g
A	5	1	0	0	0
B	5	5	1	0	0
C	4	5	4	5	1
D	4	5	4	3	1
E	4	3	0 +	1 +	1

Número de réplicas positivas

En estos casos se escogen las 3 últimas diluciones que contienen la dilución que presenta el mayor número de réplicas positivas.

Seleccionar las últimas 3 diluciones positivas adyacente a la dilución que contiene el mayor número de réplicas positivas.

Ninguna dilución tiene todos los tubos positivos. La suma de las réplicas positivas en las diluciones con 0,1; 0,01 y 0,001 g se asigna para formar la tercera dilución con 0,1 g.

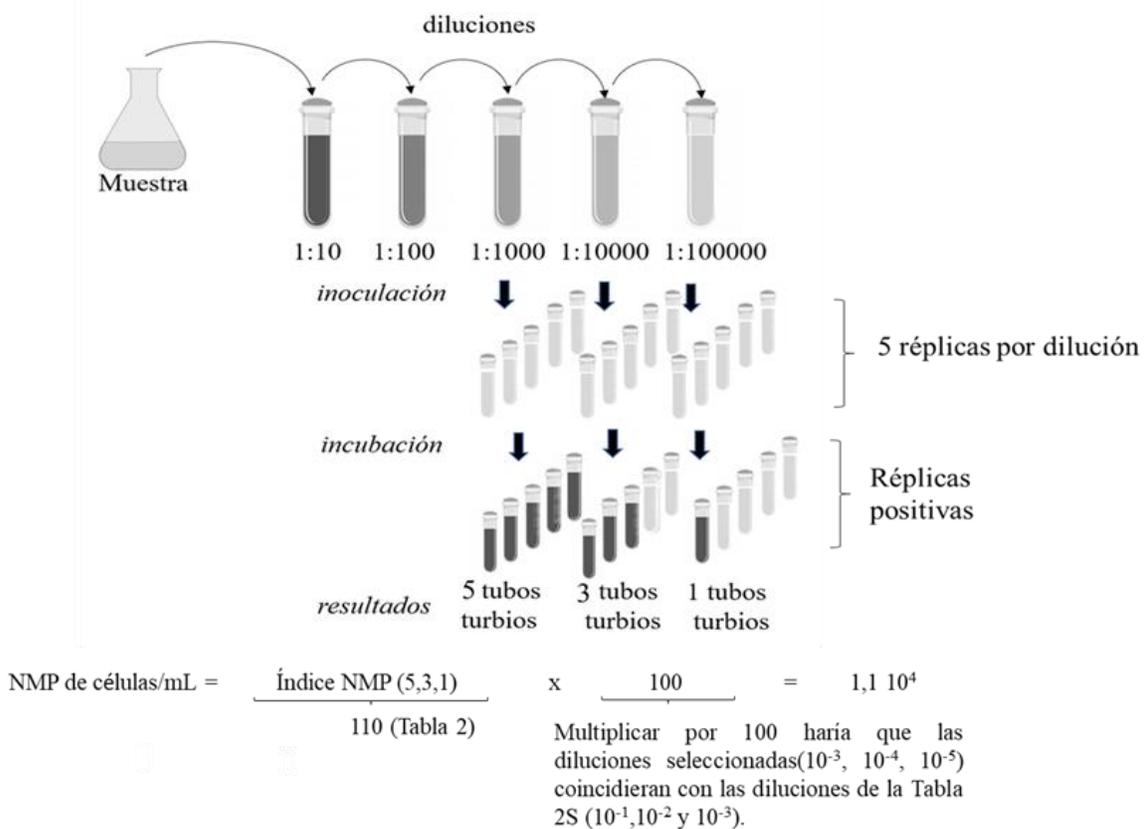
En estos casos se escogen las 3 últimas diluciones que contienen la dilución que presenta el mayor número de réplicas positivas.

Seleccionar las últimas 3 diluciones positivas adyacente a la dilución que contiene el mayor número de réplicas positivas.

Ninguna dilución tiene todos los tubos positivos. La suma de las réplicas positivas en las diluciones con 0,1; 0,01 y 0,001 g se asigna para formar la tercera dilución con 0,1 g.

- = Selección de diluciones para la determinación del NMP
- = Dilución más alta que contiene el mayor número de réplicas positivas

Figura 6. Ejemplo de metodología de determinación de NMP para el recuento de microorganismo.



	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

Tabla 15. NMP de un ensayo que consta de 3 tubos de cada dilución decimal seriada de PMCP. D1, D2 y D3 corresponden a 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}

Tubos positivos			Índice <u>NMP</u> g o mL	Lim. conf*		Tubos positivos			Índice <u>NMP</u> g o mL	Lim. conf*	
D1	D2	D3		Menor	Mayor	D1	D2	D3		Menor	Mayor
0	0	0	<>	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	-

***Intervalos con 95% de confianza.**

Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

Tabla 16. NMP de un ensayo que consta de 5 tubos de cada dilución decimal seriada de PMCP. D1, D2 y D3 corresponden a 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}

Tubos positivos			Índice NMP g o mL	Lim. conf*		Tubos positivos			Índice NMP g o mL	Lim. conf*	
D1	D2	D3		Menor	Mayor	D1	D2	D3		Menor	Mayor
0	0	0	<>	-	6.8	4	0	2	21	6.8	40
0	0	1	1.8	0.09	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	1	0	1.8	0.09	6.9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3.6	0.7	10	4	1	1	21	6.8	42
0	2	0	3.7	0.7	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
1	0	0	2	0.1	10	4	2	1	26	9.8	70
1	0	1	4	0.7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1.8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0.7	12	4	3	0	27	9.9	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8.1	3.4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8.3	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3.5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3.5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	0	23	6.8	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	2	43	14	100

***Intervalos con 95% de confianza.**

Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

Tabla 16. NMP de un ensayo que consta de 5 tubos de cada dilución decimal seriada de PMCP (Continuación) D1, D2 y D3 corresponden a 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} (continuación Tabla 16)

Tubos positivos			Índice NMP g o mL	Lim. conf*		Tubos positivos			Índice NMP g o mL	Lim. conf*	
D1	D2	D3		Menor	Mayor	D1	D2	D3		Menor	Mayor
2	1	0	6.8	1.8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4.1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4.1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5.9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4.1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5.9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5.9	36	5	2	3	120	36	250
3	0	0	7.8	2.1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3.5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5.6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3.5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9.8	70	5	4	5	430	150	1,100
3	4	0	21	6.8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9.8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4.1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	-

4. Protocolo de biopotencia de *Bacillus thuringiensis* (Bt)

4.1 Fundamento

- a. Inicialmente, la potencia (actividad insecticida) de las formulaciones de Bt se determinó mediante recuentos de esporas. Sin embargo, el número de esporas en la preparación no está relacionado con su potencia y la variabilidad asociada con este método es extremadamente alta. Por lo que se sugiere realizar un bioensayo de cada producto Bt contra un estándar internacional aceptado usando un insecto de prueba específico para determinar la biopotencia del producto. La biopotencia se obtiene comparando la Concentración letal 50 (CL₅₀) de las larvas de mosquito causada por el PMCP con el CL₅₀ producido por el estándar de referencia correspondiente. La biopotencia se mide en Unidades Internacionales de Toxicidad (UIT) por mg de producto. La estandarización de este ensayo permite comparar diferentes formulaciones en el laboratorio.
- b. Actualmente, existen referencias internacionalmente reconocidos que permiten la determinación de la biopotencia usando bioensayos de preparaciones bacterianas para larvas de mosquito descritas más abajo.
- c. La biopotencia de los PMCP basados en *Bacillus thuringiensis* subesp. *israelensis* (Bti) se compara contra el producto liofilizado de referencia (IPS82, línea 1884) de estas especies bacterianas, usando larvas de *Aedes aegypti* (línea Bora Bora) de cuarto estadio larval temprano. La toxicidad arbitrariamente asignada al IPS82 contra esta cepa de insectos es de 15. 000 UIT/mg del polvo.
- d. La biopotencia de los PMCP basados en *Bacillus sphaericus* (Bsph) se determina contra el producto de referencia liofilizado (SPH88, línea 2362) de esta especie bacteriana usando larvas en cuarto estadio temprano de *Culex pipiens pipiens* (línea Montpellier). La toxicidad arbitrariamente designada al SPH88 contra esta cepa de insecto es de 1.700 UIT/mg de polvo.
- e. La biopotencia de los PMCP basados de *Bacillus thuringiensis* subp. *kurstaki* (Btk) se determina contra el producto de referencia *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* HD-1-S-1980, usando larvas de *Trichoplusia ni* de 4 días de edad. La toxicidad arbitrariamente asignada a la cepa HD-1-S-1980 contra esta cepa de insectos es de 16.000 UIT/mg del polvo.
- f. La toxicidad de todas las preparaciones bacterianas en base Bti o Bsph o Btk se puede determinar contra los productos de referencia o estándar. La toxicidad (UIT/mg) del producto ensayado se determina de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Título (UIT/mg) del producto ensayado (PMCP)} = \frac{\text{título del estándar (UIT/mg)} \times \text{CL}_{50}}{\text{(mg/L) estándar}}$$

CL₅₀ (mg/L) del PMCP

- g. El uso de productos larvicidas bacterianos de referencia alternativos y/o líneas alternativas de mosquito en este ensayo debe aproximarse con cautela, porque resulta inevitable que se obtengan diferentes resultados con ellos. Tales alternativas deben estar sujetas a una calibración cruzada respecto a los productos y/o líneas de referencia indicadas anteriormente. Idealmente, un grupo de laboratorios expertos independientes debe conducir esta calibración cruzada. Los productos/líneas alternativas y los datos de la calibración cruzada que los apoyan, deben estar disponibles para quien quiera usarlos, o comprobar, el ensayo con los polvos/cepas alternativas.

4.2 Equipos y reactivos

- a. Homogenizador o revolvedor.
- b. Baño frío (envase de hielo compactado).
- c. Balanza analítica (precisión de $\pm 0,1$ mg).
- d. Balanza (precisión de ± 10 mg).
- e. Agua desionizada.
- f. Agente humectante (por ej., Tween 80).
- g. Vidrio de boro silicato o vaso plástico de 200 ml.
- h. Botella de vidrio transparente, cuello alto y tapón de rosca de 500 ml.
- i. Botellas de vidrio transparentes, con tapón de rosca de 100 ml.
- j. Micropipeta.
- k. Pipeta de 10 ml.
- l. Tubos plásticos con tapón, de 12 ml.
- m. Tasas plásticas de 200 ml o recubiertas con papel encerado.

4.3 Procedimiento

4.3.1 Producción de larvas de prueba de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens pipiens*

- a. Las larvas L4 representan la sensibilidad total de la población "blanco". Es muy importante usar una población homogénea de estadios de cuarta etapa temprana, los cuales se obtienen con cinco días de eclosión usando métodos estandarizados de crianza.
- b. Para *Aedes aegypti*, los huevos yacen alineados en una copa, con papel filtro y llenos hasta un tercio con agua desionizada. El papel se seca a temperatura ambiente y se mantiene almacenado por varios meses, en una bolsa plástica sellada a temperatura ambiente. Cuando las larvas lo requieren, el papel se sumerge en agua sin cloro. Para sincronizar la eclosión, adicionar alimento de larva al agua, 24 horas antes de agregar los huevos. El crecimiento bacteriano desoxigenará el agua provocando la salida del huevo. Por lo general induce que el primer estadio encube dentro de 12 horas. Estas larvas se transfieren a un envase (25 x 25 x profundidad cm) que contiene 2 litros de agua sin cloro, para obtener una población de 500 a 700 larvas por envase. El alimento larval puede ser hojuelas de proteína, como el que se usa en peces de acuario, o galletas de gato molidas y los envases se mantienen a 25 ± 2 °C. Es importante que la cantidad de alimento se mantenga baja para evitar un fuerte crecimiento bacteriano que mataría las larvas. Situación óptima son varias alimentaciones con uno o dos intervalos y observación diaria de la larva. Si el agua se enturbia, reemplace el agua filtrando las larvas y transfiriéndolas a un envase limpio con agua limpia y alimento. Se debe obtener una población homogénea de cuarto estado inicial a de cinco a siete días después (5 días de edad y 4 a 5 mm de largo).
- c. Para las larvas de *Culex pipiens pipiens*, es más difícil obtener una población homogénea de cuarto estado. En primer lugar, es necesario que las hembras pongan un gran número de navículas de huevos que flotan y que éstas sean recogidas en el mismo día.
- d. Para acumular más huevos para la eclosión, éstos se pueden almacenar a 15-18 °C. Los primeros estadios son frágiles y no deben ser manipulados así. El desarrollo del segundo estadio usualmente toma 3-4 días a 25 ± 2 °C después de ser puestos los huevos. Cuando estén listos, se agrupan los segundos estadios en una bandeja con 3 litros de agua sin cloro, con 4-6 cm de profundidad, 800 – 1000 larvas por bandeja. Se requiere alimento (extracto de levadura y galletas de perro o gato). Los estadios de cuarta etapa iniciales, adecuados para el ensayo, se obtienen usualmente dentro de 7 días, aunque a veces se requiere 8 o 9 días.

4.3.2 Producción de larvas de prueba de *Trichoplusia ni*

- a. La crianza de *Trichoplusia ni* se puede modificar para adaptarse a las necesidades individuales, sin embargo, es importante que la dieta, la temperatura y la humedad estén estandarizadas. La dieta que recomendamos se describe en la Tabla 17. La harina de alfalfa de grado entomológico tiene que estar garantizada la ausencia de residuos de insecticidas. Las bandejas de cría y ensayo deben incubarse a $29,5 \pm 0,5$ °C; jaulas de emergencia y apareamiento a $27,3 \pm 0,5$ °C. Todas las salas de cría y de ensayo deben mantenerse a $50 \pm 10\%$ de HR. La colonia de cría debe inspeccionarse periódicamente para detectar la presencia de enfermedades y mantenerse libre de enfermedades mediante el uso de técnicas apropiadas.

Tabla 17. Dieta empleada para la crianza y bioensayo de *Trichoplusia ni*

Grupo	Ingrediente	Cantidad
I ^a	Agua destilada (calentar hasta hervir)	1200 mL
	4 M de KOH	18 mL
	Caseína	126 g
	Harina de alfalfa (grado entomológico)	54 g
	Sacarosa	126 g
	Mezcla de sal Wesson	36 g
	Alphacel (celulosa)	18 g
	Germen de trigo	108 g
	Ácido de ascórbico	14,5 g
	Aureomicina (250 mg/capsula)	0,50 g
	Ácido de sórbico	4 g
	Solución de metil-p-hidroxibenzoato al 15%	35 mL
	Solución de cloruro de colina al 10%	36 mL
	Solución de formaldehído al 10%	13 mL
II	Agar granulado, disuelto en 2,5 L de agua destilada hervida	90 g
III	Solución de vitamina A ^b	12 mL
IV	Solución de vitamina B ^c	12 mL

^a Preparar grupo I en un equipo mezclador: agregar los componentes en el orden indicado en el mezclador operando en velocidad muy lenta. Agregue el grupo II, enfríe a aproximadamente 60- 65 °C, y agregue los grupos III y IV. El pH final de la dieta será alrededor de 5.2.

^b Solución de vitamina A: amida de ácido nicotínico, 12,0 g; pantotenato de calcio, 12,0 g; tiamina clorhidrato, 3,0 g; clorhidrato de piridoxina, 3,0 g; biotina, 0,24 g; vitamina B11, 0,024 g; H₂O destilada, 1000 ml.

^c Solución de vitamina B: riboflavina, 6,0 g; ácido fólico, 3,0 g. Disolver en solución de 2,24 g de KOH en 1L de agua destilada.

	<p>DOCUMENTO GENERAL</p> <p>Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas</p>
---	---

4.3.3 Preparación de suspensiones estándares de referencia para calibración de bioensayo

- a. Antes de preparar la suspensión, comprobar que la agitación de la mezcla entre el agente humectante y del agua, descrita en el párrafo siguiente, no conduzca a la formación de espuma. Si se forma espuma, diluir (por ejemplo, 1:10) el agente humectante antes de usarlo. Pesar con precisión aproximadamente 50 mg \pm 0,1 mg del producto estándar de referencia y transferir a un vaso de 200 mL que contiene 100 mL de agua desionizada (puede ser transferir directamente a la botella de 500 mL si el cuello es lo suficientemente amplio para aceptar la cabeza del revolver /mezclador).
- b. En el caso del producto de referencia HD-1-S-1980 se debe resúspender en un tampón fosfato salino de la siguiente composición: NaCl, 0,85%; K₂HPO₄, 0,6% y KH₂PO₄, 0,3%. Si la muestra de ensayo es difícil de humedecer, se pueden agregar 2,5 ml de una solución de Tween 80 al 1% a cada 100 mL de solución salina.
- c. Permitir que la mezcla repose por 30 minutos y agregue una pequeña gota de agente humectante (aproximadamente 2,5 mL a 100 mL de tween 80 al 1% e).
- d. Colocar la taza en el baño helado y revuelva la mezcla por 2 min. Compruebe visualmente que no permanezca ninguna partícula grande y repita la mezcla si la hubiera.
- e. Pesar o tarar la botella de 500 mL y transferir la suspensión/solución a ella, enjuagando cuidadosa y metódicamente la taza y el mezclador. Agregar más agua desionizada para completar el peso del contenido a 500 g (500 mL), tape la botella y agite vigorosamente para mezclar los contenidos.
- f. Confirmar, a través de un examen de microscopio en una pequeña alícuota, que no persistan agregados de esporas o cristales. Si alguno estuviera presente, los contenidos deben ser nuevamente mezclados o revueltos en el baño helado. Esta suspensión/solución inicial contiene 1 mg/10 ml y debe ser vigorosamente agitada, inmediatamente antes de sacar las alícuotas.
- g. Transferir 10 mL de alícuota de la solución/suspensión inicial a tubos limpios de 12 mL que se cierran/tapan inmediatamente. Si transfiere varias alícuotas, tape y agite la suspensión/solución inicial a intervalos que no excedan los 3 min., porque las esporas y cristales sedimentan rápidamente en agua. Las alícuotas pueden ser almacenadas por un mes a 4 °C y por 2 años a -18 °C en un congelador. Cada envase contiene 1 mg de polvo estándar.
- h. Para preparar una "solución madre", pesar o tarar una botella de 100 ml. Transferir una de las alícuotas de 10 mL dentro de la botella de 100 mL, enjuagando cuidadosamente con agua desionizada al menos dos veces y enrasar a un total de 100 mL.
- i. Agitar la mezcla vigorosamente (o use el mezclador) para producir una suspensión homogénea. Antes de ser usadas, las alícuotas congeladas deben ser homogeneizadas cuidadosamente, porque las partículas se aglomeran durante el congelamiento. La solución madre generada contendrá 10 mg/L.
- j. Preparar diluciones a partir de la solución madre. Para ello, adicionar 600 μ L, 450 μ L, 300 μ L, 150 μ L, 120 μ L y 75 μ L de la solución madre y enrasar a 150 mL. Las soluciones se mezclan para producir concentraciones finales de los productos estándares de referencia de 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,008 y 0,005 mg/L, respectivamente. Se usan por concentración 4 réplicas (vasos) y un control de 4 vasos, el cual contiene sólo 150 mL de agua desionizada.
- k. Colocar en vasos 25 larvas en estado L4 temprano de *Aedes aegypti* o *Culex pipiens* (dependiendo de las especies bacterianas a ser ensayadas: *Aedes* para Bti y *Culex* larvae para *B. sphaericus*) se agregan mediante una pipeta Pasteur antes de adicionar las suspensiones bacterianas. En el caso de *Trichoplusia ni*, todas las larvas utilizadas deben provenir de huevos recolectados el mismo día y presentar 4 día de edad y pesar entre



DOCUMENTO GENERAL

Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

15 y 25 mg. Aunque las larvas se segregan en el ensayo, no es necesario segregadas durante la cría.

- I. Remover el agua adicionada por la incorporación de larvas en los vasos.

4.3.4 Preparación de las suspensiones del PMCP para su evaluación de biopotencia

- a. Para los bioensayos de las preparaciones de productos secos de toxicidad desconocida, se hace una homogenización inicial del mismo modo descrito para el polvo estándar de referencia. Se deben preparar 4 repeticiones de las suspensiones/soluciones principales. Las diluciones y larvas se preparan como se describe y se preparan diluciones comparables como estándares de referencia.
- b. Para productos de toxicidad desconocida, se realizan bioensayos de reconocimiento de rangos, usando un amplio rango de concentraciones del producto bajo ensayo, para determinar su toxicidad aproximada. Los resultados se usan para determinar una curva de rango de concentraciones para un ensayo más preciso.

4.3.5 Determinación de la toxicidad para productos de *Bti* y *Bsph*

- a. No agregar comida a las larvas de *Aedes*. Para el bioensayo en *Culex*, adicionar y mezclar al agua extractos de levaduras molida (1.5 mg) para producir una concentración de 10 mg/L.
- b. Todas las pruebas deben ser conducidas a 28 ± 2 °C, con un ciclo de 12 horas luz/12 horas de oscuridad.
- c. Para evitar los efectos adversos de la evaporación del agua con baja humedad, debe mantenerse la humedad relativa a $50 \pm 15\%$, de ser factible.
- d. Cada serie de bioensayos debe involucrar, preferentemente, 6 concentraciones por 4 repeticiones por 25 larvas para el estándar de referencia y el desconocido, y 100 larvas para el control.
- e. El propósito es identificar un rango de concentraciones que den una mortalidad entre el 5 y 95% (porque se usan 100 larvas). Los datos que dan 0 o 100% de mortalidad se ignoran para efectos del cálculo de la concentración letal media (CL50). Para preparar una curva dosis-respuesta válida, sólo se deben usar concentraciones que entreguen valores entre 95% y 5% de mortalidad.
- f. Para asegurar la validez del valor, debe haber dos puntos de dilución por encima y por debajo de la CL50. La sensibilidad de la colonia de insectos puede requerir el uso de una serie de 6 diluciones ligeramente diferentes. El cálculo del CL50 se describe en la sección 4.3.6 de cálculos de resultados.
- g. La mortalidad se determina a las 24 y 48 horas, mediante un recuento de las larvas que permanecen vivas. Si ocurre la pupación, las pupas deben ser removidas y su número excluido de los cálculos. Si más del 5% de las larvas pupan, el ensayo no es válido porque las larvas 24 horas antes de la pupación ya no comen y muchas larvas pueden sobre vivir simplemente por tener mucha edad.
- h. Debido a la rápida acción asesina de *Bti*, usualmente no existe diferencia entre la mortalidad a las 24 y 48 horas. En este caso, el recuento de las 48 horas confirma la lectura de las 24 horas y comprueba la posible influencia de factores distintos a los componentes del *Bti*. Debido a la lenta velocidad de acción del *Bsph*, la mortalidad se registra a las 48 horas en estas preparaciones.
- i. Si la mortalidad del control excede del 5%, la mortalidad de los grupos tratados debe ser corregida de acuerdo a la fórmula de Abbott's.

X - Y

porcentaje (%) control = -----

$$X * 100$$

donde X = % supervivencia en control no tratado,

Y = % supervivencia en control tratado.

- j. Deben descartarse los ensayos que presentan una mortalidad control mayor del 10%, o cualquier pupación superior al 5%. Las líneas de regresión de mortalidad – concentración pueden ser dibujadas en un papel logarítmico Gaussiano, pero es muy subjetivo. Es preferible utilizar un programa estadístico, que incorpore un análisis de probabilidad logarítmica. Con este programa estadístico, la fórmula de Abbott's no se requiere, porque el programa realiza la corrección automáticamente.
 - k. La toxicidad de una preparación desconocida se determina por estimación y comparación de los (CL50) del producto ensayado y las preparaciones estándares de referencia, usando la fórmula anteriormente descrita. La toxicidad de las preparaciones *Bti* se define por el conteo a las 24 horas después de iniciado el ensayo, mientras que de *Bsph* se define por el recuento después de 48 horas de exposición larval.
- 4.3.6 Determinación de la toxicidad para productos de Btk
- a. La dieta utilizada para el ensayo de toxicidad debe ser la misma que se utiliza en la crianza (Tabla 17). Debe enfriarse a aproximadamente 55 °C y mantenerse a esa temperatura hasta su uso.
 - b. Las diluciones del estándar y del producto a evaluar se mezclan con la dieta en una proporción 1:10. La dieta es bastante viscosa, por lo que la mezcla debe realizarse hasta asegurar una completa uniformidad. Para ello, mezclar por 2 min en una licuadora o realizar la mezcla por 1 min con un agitador de laboratorio vertical motorizado. La licuadora no debe usarse con menos de 250 mL de dieta, y el agitador de laboratorio no debe usarse con más de 100 mL.
 - c. Emplear dispensadores o botellas de plástico que se puedan presionar para la dosificación de la mezcla de dieta y muestra.
 - d. Los recipientes que alojen las larvas deben ser uniformes dentro de un ensayo y deben permitir el almacenamiento de las larvas de forma individual. Se prefieren los envases desechables. Los tipos y el procedimiento para seguir se describen a continuación.

Dispensar 2,5 g de mezcla de dieta y muestra en 50 cavidades de una bandeja de plástico de dimensiones de 9,24 cm³ x 15 mm x 55 mm. La mezcla se deja solidificar y secar durante aproximadamente 1 hora antes de que cada cavidad se infeste con 1 larva. Después de la infestación, cada vial se cubre sin apretar con una tapa de plástico.
 - e. **Infestación.** Los recipientes infestados con larvas de *Trichoplusia nide* 4 días de edad, de 15 a 25 mg. Se utilizan cincuenta larvas para cada dilución de muestra y estándar, y se infestan 50 recipientes o cavidades como control al principio y al final del ensayo. Las dietas de control deben prepararse con la misma solución salina tamponada utilizada para preparar las muestras de ensayo incorporadas en la dieta a una dilución 1:10.
 - f. **Incubación.** Después de la infestación, los recipientes deben incubarse durante 5 días a 29,5 °C y 50 ± 10% de humedad relativa.
 - g. **Lectura de los ensayos.** Los recipientes se examinan después de 5 días y se registra el porcentaje de mortalidad para cada dilución de muestra y para las larvas de control. Muchas de las larvas que se alimentan de preparaciones de *B. thuringiensis* sufrirán un retraso grave en su desarrollo. En caso de duda sobre si una larva está viva o muerta, se debe tocar con la punta de un lápiz o una aguja. Si no hay respuesta, el insecto debe registrarse como muerto. Si hay alguna respuesta, no importa cuán débil sea, el insecto

Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

debe registrarse como vivo. No debe tenerse en cuenta la muerte inminente. Si muere más del 4% del control, la precisión del ensayo debe cuestionarse seriamente. Sin embargo, las mortalidades observadas en las muestras de prueba no deben corregirse por las muertes de control.

- h. **Cálculo de resultados.** Llevar a cabo el siguiente procedimiento:
- Determinar el % de mortalidad por Abbott. Realizar una tabla que indique la concentración del pesticida, log (concentración del pesticida), % mortalidad, índice de Probit (consultar Tabla de Probit) asociado al % de mortalidad.
 - Realizar una regresión lineal entre el \log_{10} [concentración de muestra del producto estándar o comercial] (variable independiente) y el índice de Probit (variable dependiente).
 - Determinar el valor de la pendiente (m) e intercepto (n).
 - Conociendo los valores de n y m, calcular los valores de CL₅₀ al despejar la variable X de la ecuación obtenida y considerando el valor Y de índice de Probit. Es decir: $\text{Log}(X) = (Y - n) / m$; $X = \text{antilog} [(Y - n) / m]$.
 - Obtener los valores Probit esperados de la función que relaciona valores Probit observados (PO) con el log de la dosis. La función de Probit esperados se define como: $Y = n + m (\text{Log } X)$, donde X corresponde a la concentración de muestra del producto estándar o comercial.
 - Evaluar la significancia de la regresión. La significancia de la regresión Log dosis-% Mortalidad se estima a través de una prueba de χ^2 .
 - Determinar las unidades internacionales para cada muestra comparando su CL₅₀ con la del estándar mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Título (UIT/mg) del producto ensayado} = \frac{\text{título del estándar (UIT/mg)} \times \text{CL}_{50} \text{ (mg/L) estándar}}{\text{CL}_{50} \text{ (mg/L) del PMCP}}$$

- viii. Estandarización de productos comerciales. La potencia del material comercial debe determinarse sobre la base de ensayos realizados en 3 días separados, y deben calcularse las UIT diarias para determinar si existe alguna discrepancia en cualquiera de los 3 ensayos; si los hay, se deben realizar 2 ensayos adicionales para confirmar los resultados. A continuación, se deben calcular los valores promedio de CL₅₀ del estándar y de la muestra en toda la serie de ensayos, y estos promedios deben usarse para calcular las UIT/mg del material.
- ix. Generalmente, el contenido de agua no debe exceder de 5%, para prevenir la degradación prematura del producto. Se recomienda que se cumplan los siguientes estándares mínimos de estabilidad:

Un máximo de 10% de pérdida en biopotencia por debajo del valor de la potencia indicado en la etiqueta, cuando se almacena a 5°C por 2 años.

Un máximo de 10% de pérdida en la biopotencia por debajo del valor de la potencia indicado en la etiqueta, cuando se almacena de 20 a 25°C por 1 año.

5. Protocolo de detección de contaminantes microbianos

5.1 Justificación

- a. Las levaduras microscópicas y mohos presentan la capacidad de crecer en diferentes condiciones ambientales. Aunque la mayoría de las levaduras y mohos son aerobios obligados (requieren oxígeno libre para su crecimiento), su requerimiento ácido/alcalino para el crecimiento es bastante amplio, oscilando entre pH 2 y pH superior a 9. Su rango

Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

de temperatura (10-35 °C) también es amplio. Los requisitos de humedad de los hongos transmitidos por los alimentos son relativamente bajos; la mayoría de las especies pueden crecer con una actividad de agua (aw) de 0,85 o menos, aunque las levaduras generalmente requieren una mayor actividad de agua.

- b. Tanto las levaduras y mohos (ej., *Aspergillus*, *Penicillium*) provocan diversos grados de deterioro y descomposición de los insumos en donde se desarrollan. Pueden invadir y crecer en prácticamente cualquier tipo de alimento en cualquier momento; invaden cultivos como granos, nueces, frijoles y frutas en los campos antes de la cosecha y durante el almacenamiento. También crecen en insumos procesados y mezclas de alimentos. Su detectabilidad depende del tipo de insumo, los organismos involucrados y el grado de invasión; el insumo puede estar levemente contaminado, severamente contaminado o completamente descompuesto, y el crecimiento real se manifiesta por manchas de podredumbre de varios tamaños y colores, costras antiestéticas, limo, micelio algodonoso blanco o moho esporulante muy coloreado. También se pueden producir sabores y olores anormales. De vez en cuando, un insumo parece estar libre de moho, pero tras un examen micológico se descubre que está contaminado. La contaminación de los insumos por levaduras y mohos puede resultar en pérdidas económicas sustanciales para el productor, el procesador y el consumidor. Adicionalmente, varios mohos transmitidos por los alimentos, y posiblemente levaduras, también pueden ser peligrosos para la salud humana o animal debido a su capacidad de producir metabolitos tóxicos conocidos como micotoxinas. La mayoría de las micotoxinas son compuestos estables que no se destruyen durante el procesamiento de alimentos o la cocina casera. Aunque los organismos generadores pueden no sobrevivir a la preparación de alimentos, la toxina preformada todavía puede estar presente. Ciertos hongos y levaduras transmitidos por los alimentos también pueden provocar reacciones alérgicas o pueden causar infecciones. Aunque la mayoría de los hongos transmitidos por los alimentos no son infecciosos, algunas especies pueden causar infección, especialmente en poblaciones inmunodeprimidas, como las personas ancianas y debilitadas, las personas infectadas por el VIH y las personas que reciben quimioterapia o tratamiento con antibióticos.
- c. Los medios de cultivos que se emplean para la detección de estos contaminantes microbianos son los mismos que se podrían emplear para el recuento de AMCP de origen fúngico. Sin embargo, la velocidad de crecimiento de los contaminantes microbianos en la mayoría de los casos es más rápida que la de los AMCP en medio de cultivo, esto último debería facilitar su detección. No obstante, la capacidad de distinguir el AMCP del contaminante microbiano va a depender del conocimiento de las características morfológicas del AMCP y de la experiencia del analista en microbiología encargado de los análisis.

5.2 Equipos y materiales

- a. Incubadora, 25 °C
- b. Cofre de vapor Arnold
- c. medidor de pH
- d. Baño de agua, 45 ± 1 ° C

5.3 Medios y reactivos

Los medios de cultivos que se mencionan a continuación se describen en la sección 7.

- a. gar diclorán rosa de bengala cloranfenicol (DRBC)
- b. Agar diclorán 18% glicerol (DG18)
- c. Agar para recuento en placa (PCA), métodos estándar; añada 100 mg/L de cloranfenicol cuando este medio se utilice para el recuento de levaduras y mohos.
- d. Agar de malta (MA)
- e. Agar extracto de malta (levaduras y mohos) (MEAYM)
- f. Agar patata dextrosa (PDA), deshidratado; disponible comercialmente

Soluciones antibióticas. Se adiciona antibióticos a los medios micológicos para inhibir el crecimiento bacteriano de los PMCP. El cloranfenicol es el antibiótico de elección, porque es estable en condiciones de autoclave. Por lo tanto, la preparación del medio es más fácil y rápida debido a la eliminación del paso de filtración. La concentración recomendada de este antibiótico es de 100 mg/L de medio. Si se observa un crecimiento excesivo de bacterias, prepare el medio agregando 50 mg/L de cloranfenicol antes de la esterilización en autoclave y 50 mg/L de clortetraciclina esterilizada con filtro cuando el medio se haya templado, justo antes de verter el medio a las placas.

5.4 Procedimiento

5.4.1 Preparación de soluciones antibióticas

- a. Preparar la solución madre disolviendo 0,1 g de cloranfenicol en 40 mL de agua destilada.
- b. Agregar a esta solución a 960 mL de mezcla de medio antes de esterilizar en autoclave.
- c. Si se utilizan tanto cloranfenicol como clortetraciclina, agregar 20 mL de la solución madre de cloranfenicol anterior a 970 mL de medio antes de esterilizar en autoclave.
- d. Luego, preparar la solución madre de clortetraciclina disolviendo 0,5 g de antibiótico en 100 mL de agua destilada y esterilice por filtración.
- e. Utilizar 10 mL de esta solución por cada 990 mL de medio autoclavado y templado.
- f. Almacenar las soluciones madres refrigeradas en oscuridad hasta por un mes.
- g. Las soluciones madre deben llevarse a temperatura ambiente antes de agregarlas al medio templado.

5.4.2 Preparación de la muestra

- a. Analizar 25-50 g o 25-50 mL de cada submuestra; En general, los tamaños de muestra más grandes aumentan la reproducibilidad y disminuyen la varianza en comparación con las muestras pequeñas.
- b. Agregar la cantidad apropiada de agua de peptona al 0,1% a la muestra pesada para lograr una dilución de 10⁻¹.
- c. Homogenizar en un stomacher durante 2 min o en un agitador orbital a 200 rpm
- d. Realizar diluciones decimales seriadas en agua con peptona al 0,1%. La dilución 10⁻⁶ deberían ser suficiente.

- e. Sembrar asépticamente 0,1 mL de cada dilución en placas de agar DRBC y esparcir el inóculo con un asa de Drigalski estéril. Se prefiere el medio DG18 cuando la actividad del agua de la muestra analizada es inferior a 0,95. Sembrar cada dilución en una placa por triplicado.
- f. Incubar las placas en la oscuridad a 25 °C. No apilar más de 3 placas y no invertir.
- g. Contar las placas después de 5 días de incubación. Si no hay crecimiento a los 5 días, vuelva a incubar durante otras 48 h.
- h. No contar las colonias antes del final del período de incubación porque la manipulación de las placas podría provocar un crecimiento secundario de las esporas desprendidas, lo que invalidaría los recuentos finales.
- i. Contar las placas que contengan de 10 a 150 colonias. Si están presentes principalmente levaduras, las placas con 150 colonias suelen ser contables. Sin embargo, si hay cantidades sustanciales de moho, dependiendo del tipo de moho, el límite superior contable puede tener que reducirse a discreción del analista.
- j. Adicionalmente, los analistas experimentados pueden identificar *Aspergillus*, *Penicillium* y la mayoría de los otros géneros de mohos transmitidos por los alimentos directamente en un medio con un aumento de baja potencia (10-30X).
- k. Informar los resultados en UFC/g o UFC/mL según el recuento promedio de conjuntos por triplicado. Redondee los recuentos a dos cifras significativas. Si el tercer dígito es 6 o superior, redondee al dígito anterior (por ejemplo, 456 = 460); si es 4 o menos, redondee al dígito inferior (por ejemplo, 454 = 450). Si el tercer dígito es 5, redondee al dígito siguiente si los primeros 2 dígitos son un número par (por ejemplo, 445 = 440); redondee al dígito anterior si los primeros 2 dígitos son un número impar (por ejemplo, 455 = 460).
- l. Cuando las placas de todas las diluciones no tengan colonias, informe los recuentos de hongos y levaduras (MYC) como menos de 1 vez la dilución más baja utilizada.
- m. Aislar colonias individuales en PDA o MA, si es necesario un análisis adicional e identificación de especies.

5.4.3 Fundamento de análisis de microscopía de fluorescencia para la cuantificación de levaduras viables y no viables en PMCP líquidos

Los métodos para contar levaduras viables mediante recuento en placa se describen anteriormente. Aquí se presenta un procedimiento microscópico directo para el recuento de levaduras viables y no viables en PMCP líquidos. La cuantificación de células de levadura mediante microscopía elimina la necesidad de una incubación prolongada, lo que reduce el tiempo analítico requerido. Se pueden contar todas las levaduras y se pueden diferenciar las células de levadura vivas y muertas. Para el empleo de esta metodología se debe tener un entrenamiento previo para la distinción de la morfología de la levadura, evitando la confusión con algún artefacto.

5.4.3.1 Materiales y reactivos

- a. Portafiltros de disco Millipore para jeringas estándar
- b. Filtros Millipore: AABG, 0,8 µm, negros, cuadrículados; 25 mm de diámetro
- c. Jeringas desechables
- d. Pipetas
- e. Pinzas
- f. Papel bibuloso
- g. Portaobjetos de microscopio y cubreobjetos de 24 × 24 mm
- h. Microscopio de fluorescencia: excitación azul; oculares 10X con recuento de moldes Howard u otra rejilla de ocular; Objetivo de 20X o 40X.

5.4.3.2 Procedimiento para muestras de productos líquidos filtrables

- a. Filtrar una alícuota (normalmente 10 mL) de la muestra a través del filtro Millipore (AABG, 0,8 µm, negro, cuadrículado) (el tamaño de poro se puede aumentar o disminuir, según el nivel de contaminación). Utilizar un portafiltros de disco Millipore que se acople a una jeringa estándar. Asegúrese de que la jeringa sea precisa. De lo contrario, retire el émbolo, conecte la jeringa al portafiltros y pipetee 10 mL en la jeringa. Presione toda la muestra a través del filtro. Haga esto con un colchón de aire de aproximadamente 3 mL entre el émbolo y la muestra.
- b. Mantener el portafiltro en posición vertical para asegurar una distribución uniforme de la muestra sobre el filtro. Retire el filtro del portafiltros y colóquelo en un portaobjetos de microscopio; la cuadrícula debe estar paralela a los bordes del portaobjetos para facilitar el conteo.

5.4.3.3 Procedimiento para muestras para líquidos que obstruyen el filtro (no filtrables)

Para suprimir la interferencia de fondo en el microscopio de fluorescencia, mezclar 4 mL de muestra con 1 mL de hidróxido de sodio (2,5 g/L de agua). Agitar bien y esperar 10 min. Colocar el filtro Millipore (AABG, 0,8 µm, negro, cuadrículado) sobre una hoja de papel absorbente y esparcir 0,1 o 0,01 mL (según el nivel de contaminación) de la muestra sobre el filtro. Cuando la superficie del filtro esté seca, coloque el filtro en el portaobjetos del microscopio, manteniendo la rejilla paralela a los bordes del portaobjetos para facilitar el conteo.

5.4.3.4 Límites de tolerancia de contaminantes microbianos

El límite de tolerancia para contaminantes aerobios mesófilos, tales como levaduras y mohos debe ser menor a 10^3 UFC/g o mL de PMCP.

6. Determinación de la producción de micotoxinas por contaminantes microbianos de PMCP

6.1 Fundamento

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos, pertenecientes esencialmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, que se pueden encontrar como contaminantes alimentarios. De las numerosas micotoxinas sintetizadas por estos hongos, la FDA evalúa activamente las aflatoxinas, fumonisinas, tricotecenos (es decir, DON, HT-2, T-2), ocratoxina A, patulina y zearalenona en los productos alimenticios. Estos productos son responsables de diferentes toxicidades que afectan la salud humana y animal. Las micotoxinas son productos de bajo peso molecular (250 a 720 Da) con diferentes estructuras y actividades químicas, producidos por un gran número de especies de hongos. La Tabla 18 resume los principales grupos de micotoxinas, los productores, los efectos tóxicos, los métodos analíticos utilizados para su detección y los límites de tolerancia que se permiten en los PMCP. Este último parámetro se obtuvo del Reglamento Sanitario de los Alimentos. DTO. N° 977/96.

6.2 Equipos y materiales

- a. Matraces Erlenmeyer, 300 ml, boca ancha
- b. Algodón, no absorbente
- c. Embudos, vidrio de tallo corto, 90-100 mm de diámetro
- d. Papel de filtro, 18 cm de diámetro, doblado (Schleicher & Schuell No. 588)
- e. Virutas hirviendo de carburo de silicio

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

- f. Campana extractora equipada con baño de vapor; caudal de aire, 100 pies cúbicos / min
- g. Licuadora, de alta velocidad, a prueba de explosiones
- h. Cromatografo de capa fina o cromatógrafo de líquidos de alta resolución
- i. Incubadora, 22-25 ° C
- j. Arroz pulido de grano largo o corto
- k. Cloroformo para la extracción de aflatoxinas, ocratoxinas, esterigmatocistina, xantomegnina, luteosquirina, patulina, ácido penicílico, citrinina, toxina T-2, zearalenona
- l. Metanol para extracción de deoxinivalenol
- m. Estándares de micotoxinas apropiados
- n. Solución de NaClO, 5%

6.3 Procedimiento

- a. Añadir 50 g de arroz y 50 mL de agua destilada a un matraz Erlenmeyer de boca ancha de 300 mL.
- b. Tapar los matraces con algodón y esterilizar en autoclave durante 20 min a 121 °C y 15 psi.
- c. Inocular asépticamente matraces enfriados separados con aislados de moho individuales (aislado desde el PMCP).
- d. Incubar los matraces inoculados a 22-25 °C hasta que toda la superficie esté cubierta de crecimiento y el micelio haya penetrado hasta el fondo del matraz (15-20 días).
- e. A cada matraz, agregar 150 mL de cloroformo (150 mL de metanol si la toxina en cuestión es deoxinivalenol), utilizando un embudo de vidrio de vástago corto insertado junto con un tapón de algodón sin quitar (para minimizar la diseminación de esporas de moho).
- f. Calentar el contenido del matraz en una campana extractora en un baño de vapor hasta que el solvente comience a hervir. (Realice todos los pasos posteriores en la campana de extracción).
- g. Con una espátula, rompa la torta de arroz mohosa y transfiera el contenido del matraz a una licuadora.
- h. Mezcle a alta velocidad durante 1 minuto.
- i. Filtrar el contenido de la licuadora a través de papel de filtro insertado en un embudo de vidrio de vástago corto.
- j. Recoger el filtrado en un matraz Erlenmeyer de 300 mL.
- k. Regresar las tortas de arroz a la licuadora, agregue 100 ml de solvente sin calentar y mezcle 1 min a alta velocidad.
- l. Filtrar como se indica arriba y combinar los filtrados. Agregar las virutas hirviendo al matraz que contiene los filtrados y evapore hasta alcanzar los 20-25 mL. Si el análisis no va a seguir inmediatamente, evaporar hasta sequedad y almacenar el matraz en la oscuridad.
- m. Enjuague toda la cristalería, etc., utilizada para la extracción en una solución de NaOCl al 5% antes de limpiar con agua y jabón.
- n. Sumerja la torta de arroz en una solución de NaClO al 5% durante 72 h antes de esterilizarla en autoclave y desecharla.
- o. Análisis de toxinas
- p. Se requieren estándares de micotoxinas apropiados para el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de la toxina.
- q. Para determinar las potenciales micotoxinas producidas por los cultivos de los mohos emplear los protocolos descritos en la Tabla 18.

6.4 Detección de β -exotoxinas producidas por subespecies de *B. thuringiensis*

Los aislados de *Bacillus thuringiensis* también pueden producir una betaexotoxina termoestable llamada thuringiensin. Los solicitantes de registro deben proporcionar datos que demuestren la falta de actividad beta-exotoxina en el PMCP. La presencia de beta-exotoxina, thuringiensina, ha sido evaluada mediante HPLC y / o bioensayo de larvas de mosca. Se puede requerir el descarte de los lotes de producción si la beta-exotoxina no se elimina durante la producción y se detecta en las pruebas de control de calidad del lote. Cabe señalar que su detección no se requiere si el fabricante demuestra que la línea de *Bacillus thuringiensis* no es capaz de producir beta-exotoxina. En caso de que, si se requiera su detección, se debe realizar el protocolo descrito por Hernández *et al.*, 2001.

Tabla 18. Micotoxinas

Grupo de toxina	Hongo (género)	Efecto	Análisis	Protocolo	Límites
Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2)	<i>Aspergillus</i>	Carcinogénico, aflatoxicosis	HPLC-FLD, TCL	AOAC 991.31	10 ppb
Aflotoxinas M	<i>Aspergillus</i>	Carcinogénico, aflatoxicosis	HPLC-FLD	J. AOAC Int. 99, 174-179	0,5 ppb
Fumonisinias	<i>Fusarium</i>	Hepatotóxico, cancer	HPLC-FLD	AOAC 995.15	1000-4000 ppb
Ochratoxina	<i>Aspergillus, Penicillium</i>	Nefrotóxico, carcinogénico	HPLC-FLD, TCL	AOAC 2000.03	5 ppb
Patulina	<i>Penicillium, Aspergillus</i>	Toxico en altas concentraciones	HPLC-UV	AOAC 932.14C	50 ppb
Tricoteceno	<i>Fusarium, Myrothecium, Phomopsis, Stachybotrys, Trichoderma, Trichothecium</i>	Hemorragia, vomito, dermatitis, desordenes en sistema nervioso central	GC, HPLC-UV, TCL	AOAC Int. 79 AOAC Int. 98	100-2000 pb
Zearalenona	<i>Fusarium</i>	Problemas reproductivos	HPLC-FLD, ELISA	LIB 4488	200 ppb

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC- FLD: HPLC con detector de fluorescencia, HPLC-UV: HPLC con detector UV, TLC: Cromatografía de capa fina, ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas. GC: Cromatografía de gases.

7. Medios de Cultivos

7.1 Tampón fostato o fosfato Butterfield

- KH_2PO_4 34 g
- Agua destilada 500 mL
- Ajuste el pH a 7,2 con NaOH 1 N. Llevar el volumen a 1 litro con agua destilada.
- Esterilizar 15 min a 121 ° C. Conservar en frigorífico.

7.2 Agar para recuento en placa (AC) (métodos estándar)

- Triptona 5 g
- Extracto de levadura 2,5 g
- Dextrosa 1 g

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

- d. Agar 15 g
- e. Agua destilada 1 litro
- f. Ajustar pH a $7,0 \pm 0,2$. Autoclavar a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min

7.3 Agar Luria Bertani

- a. Peptone 140 10 g/L
- b. Extracto de levadura 5g/L
- c. Cloruro de sodio 5g/L
- d. Ajustar a pH $7,3 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Autoclavar a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min

7.4 Agar R2A

- a. Extracto de levadura 0,5 g/L
- b. Peptona proteasa 0,5 g/L
- c. Glucosa 0,5 g/L
- d. Almidón soluble 0,5 g/L
- e. Piruvato de sodio 0,3 g/L
- f. K_2HPO_4 0,3 g/L
- g. MgSO_4 0,024 g/L
- h. Ajustar a pH $7,2 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

7.5 Agar TSA o TSB

- a. Digerido pancreático de caseína 17,0 g/L
- b. NaCl, 5,0 g/L
- c. Digerido papaico de harina de soja 3,0 g/L
- d. K_2HPO_4 2,5 g/L
- e. Glucosa 2,5 g/L
- f. Agar 15 g/L (en el caso del TSB omitir el agar)
- g. Ajustar pH $7,3 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Autoclavar a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min.

7.6 PDA o PDB

- a. Infusión de patata 200 g
- b. Dextrosa 20 g
- c. Agar 20 g (en el caso de PDA, no colocar agar)
- d. Para preparar la infusión de papa, hervir 200 g de papa en rodajas sin pelar en 1 litro de agua destilada durante 30 min. Filtrar a través de una gasa, recolectando el efluente, que es la infusión de papa (o use una forma comercial deshidratada). Mezcle la infusión con los otros ingredientes. Autoclavar 15 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dispensar porciones de 20-25 ml en placas de Petri estériles de 15×100 mm. PH final, $5,6 \pm 0,2$.
- e. El medio no se debe volver a derretir más de una vez. El medio en polvo está disponible comercialmente, pero puede requerir un suplemento con agar extra hasta una concentración final de 20 g/L. Al medio deshidratado BBL o Difco, agregue 5 g de agar.

7.7 YPD

- a. Peptona bacteriológica, 20 g/L
- b. Glucosa, 20 g/L
- c. Extracto de levadura, 10 g/L
- d. Ajustar pH $5,1 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Autoclavar a 121°C por 15 min.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas

7.8 Caldo nutritivo

- a. Digestión pancreática de caseína 10,0 g/L;
- b. extracto de levadura 5,0 g/L
- c. glucosa 2,0 g/L
- d. Extracto de bacto-ternera 3,0 g/L
- e. Bactopeptona 5,0 g/L
- f. Ajustar pH 6,8 a 25 °C. Autoclavar a 121°C por 15 min

7.9 Agar DRBC

- a. Glucosa 10,0 g/L
- b. Peptona bacteriológica 5,0 g/L
- c. Fosfato de potasio, monobásico 1,0 g/L
- d. Sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g/L
- e. Rosa de Bengala (Solución al 5%, p / v) 0,5 ml/L
- f. Solución de diclorán (2,6-dicloro-4-nitroanilina) (0,2% (p / v) en etanol) 1,0 ml/L
- g. Cloranfenicol 0,1 g/L
- h. Agar 15,0 g/L
- i. El pH final debe ser de 5,6. Mezclar los ingredientes, calentar para disolver el agar y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 min. Temperar a 45 ± 1 ° C en un baño de agua y vierta las placas.
- j. El agar DRBC es especialmente útil para analizar muestras que contienen mohos "esparcidores" (por ejemplo, *Mucor*, *Rhizopus*, etc.), ya que el diclorán y la rosa de bengala añadidos ralentizan eficazmente el crecimiento de hongos de crecimiento rápido, lo que permite la detección de otras levaduras y propágulos de mohos, que tienen tasas de crecimiento más bajas.
- k. Los medios que contienen rosa de bengala son sensibles a la luz; una exposición relativamente corta a la luz dará como resultado la formación de compuestos inhibidores. Mantenga estos medios en un lugar oscuro y fresco hasta que los use. El agar DRBC debe usarse solo para cultivos en placas de extensión.

7.10 Agar DG18

- a. Glucosa 10.0 g/L
- b. Peptona 5,0 g/L
- c. Fosfato de potasio monobásico 1,0 g/L
- d. Sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g/L
- e. Dicloro (0,2% en etanol, p / v) 1,0 mL/L
- f. Agar 15,0 g/L
- g. Cloranfenicol 0,1 g/L
- h. Mezclar los elementos anteriores y cocinar al vapor para disolver el agar, luego llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada. Añadir 220 g de glicerol y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 min. El pH final debe ser de 5,6 y la actividad del agua de 0,955.
- i. Este medio se utiliza como medio de enumeración de mohos de uso general y se prefiere cuando la actividad del agua del alimento analizado es 0,95 o inferior. La baja actividad de agua de este medio reduce la interferencia de bacterias y hongos de rápido crecimiento. Cuando se deben enumerar las levaduras y los mohos, se debe utilizar agar DRBC.

7.11 Agar malta (MA)

- a. Extracto de malta en polvo 20,0 g

	<p>DOCUMENTO GENERAL</p> <p>Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas</p>
---	---

- b. Agar 20,0 g
 - c. Mezclar los ingredientes, y esterilizar durante 15 min a 121 ° C. Templar el medio a 45 ° C y verter las placas en condiciones asépticas.
 - d. Este medio se recomienda como medio de mantenimiento general.
- 7.12 Agar extracto de malta - (levaduras y mohos) (MEAYM)
- a. Extracto de malta en polvo 20 g/L
 - b. Glucosa 20 g/L
 - c. Peptona 1,0 g/L
 - d. Agar 20 g/L
 - e. Mezclar los ingredientes, ajustar pH a 5,4. Esterilizar a 121 ° C durante 15 min. Templar el medio a 45 ° C y verter las placas en condiciones asépticas. El MA deshidratado está disponible comercialmente, pero dado que existen varias fórmulas de MA, verifique la composición correcta.
 - f. Este medio se recomienda para la identificación de *Aspergillus* y *Penicillium*.