

Lineamientos de análisis, recuento e identificación de agentes bacterianos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Basado en el grupo *Bacillus* spp.

Lineamientos de análisis, recuento e identificación de agentes bacterianos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Basado en el grupo *Bacillus* spp.

Lineamientos de análisis, recuento e identificación de agentes bacterianos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Basado en el grupo *Bacillus* spp.

TABLA DE CONTENIDOS

<u>CONTENIDO</u>	<u>PÁGINA</u>
1 OBJETIVOS Y ALCANCE	3
2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS	3
3 METODOLOGÍA ANÁLISIS RECuento	3
4 METODOLOGÍA ANÁLISIS IDENTIFICACIÓN	5
5 ANÁLISIS DE AGENTES CAUSALES DE ENFERMEDADES HUMANAS	7

Lineamientos de análisis, recuento e identificación de agentes bacterianos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Basado en el grupo *Bacillus* spp.

1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es establecer los lineamientos para los protocolos que se deberán entregar para el análisis de recuento e identificación de agentes bacterianos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Los lineamientos están desarrollados en base a especies del Grupo *Bacillus*, describen la metodología para el recuento, aislamiento y su identificación, mediante técnicas de aislamiento en medio de cultivo, evaluación morfológica y caracterización molecular complementaria.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Albanesi, A.; Benintende, S.; Cassán, F.; Perticari, A. 2013 Manual de Procedimientos Microbiológicos para la Evaluación de Inoculantes. Publicación de la Red Nacional de Control de Calidad de Inoculantes de la División Agrícola y Ambiental de la Asociación Argentina de Microbiología. ISSN 978-987-26716-4-8. 78p.
- Asociación Española de Normalización 2025 Bioestimulantes de plantas Preparación de la muestra para análisis microbiano. Norma Española UNE-EN 17708:2025. 20p.
- Benintende, S.; Perticari, A.; Rossi, A.; Toresani, S. 2025 Manual de Procedimientos Microbiológicos para la Evaluación de Calidad de Inoculantes, Bioestimulantes y Biocontroladores, Segundo Manual. Publicación de la Red de Control de Calidad de Inoculantes (REDCAI) de la División Agrícola y Ambiental de la Asociación Argentina de Microbiología. ISBN 978-987-48458-3-2. 231p.
- Huang, Ch.; Huang, L.; Chang, M.; Wu, Ch. 2017 Use of novel specific primers targeted to pheS and tuf gene for species and subspecies identification and differentiation of the *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus licheniformis*. African Journal of Microbiology Research Vo. 11(7), pp. 264-270. DOI 10.5897/AJMR2017.8434.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Evaluación de la pureza de ACBM. Laboratorio Biológico Bacteriología, Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay. 16p
- Servicio Agrícola y Ganadero Resolución 723 de 2022, Aprueba y establece como oficiales las metodologías y protocolos que indica, para la identificación y determinación de parámetros de calidad de plaguicidas microbianos.

3 METODOLOGÍA ANÁLISIS RECuento

3.1 Preparación de la muestra y diluciones

Estabilizar las muestras a temperatura ambiente y alejada de la luz directa durante 30 minutos. Homogenizar agitando manualmente (por inversión) previamente al inicio del ensayo.

Lineamientos de análisis, recuento e identificación de agentes bacterianos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Basado en el grupo *Bacillus* spp.

- Pesar 25g del producto en caso de ser formulación sólida o extraer 25ml si la muestra es líquida y, en forma aséptica, diluir en un frasco tipo Schott de 500ml, con 225ml de solución salina con Tween (NaCl al 0.85% +tween 80 al 0.1%). Esta es la dilución 10^{-1} .
- Agitar 20 minutos en agitador orbital a 150rpm aproximadamente. Pudiendo extenderse hasta 40 minutos o más dependiendo de las características físicas del producto y su capacidad de dispersión.
- Retirar el frasco del agitador (la dilución 10^{-1} deberá estar homogénea, evitando la precipitación o la separación de fases).
- En cabina de seguridad biológica extraer 1ml de la dilución 10^{-1} y colocarlo en un tubo de ensayo, conteniendo 9ml de solución salina con Tween (NaCl 0.85%+Tween 80 al 0.1%) previamente esterilizado (dil 10^{-2}).
- Homogeneizar durante 20 segundos en Vortex.
- Repetir el paso anterior hasta llegar a la dilución 10^{-7} .

En caso de productos que declaren tener más de 10^9 UFC/g o ml, se recomienda aumentar el número de diluciones decimales para realizar el recuento, para obtener una solución que contenga entre 10 y 99 UFC/ml o g según la concentración declarada del producto.

3.2 Siembra en placa extendida

- Sembrar 100 μ l (0.1 ml) de cada dilución de las últimas tres diluciones en placas de Petri con medio de cultivo TSA.
- Comenzar por la mayor dilución colocando el volumen en el centro de la placa.
- Con la espátula de Drigalsky previamente esterilizada por flameo en llama extender el líquido sobre la superficie de la caja de Petri.
- Realizar la siembra de cada dilución por triplicado. Dejar reposar las placas sembradas hasta que se absorba totalmente el líquido.
- Incubar las placas invertidas en la estufa entre 28 a 30°C.

En caso de mezclas con agentes fúngicos, realizar la siembra en TSA con cicloheximida (100mg/Lt).

3.3 Lectura para Recuento

- Realizar la lectura a las 24hrs y verificar a las 48hrs desde la siembra.
- Realizar el recuento de las colonias con morfología típica de *Bacillus sp.* en las placas que presenten entre 30 y 300 colonias, verificando la proporcionalidad entre diluciones.

Las colonias típicas de *Bacillus sp.* en el medio TSA son normalmente blancas, opacas, con borde irregular dentado, de aspecto seco-terroso, que pueden presentar una elevación central característica. La morfología varía según especie y tiempo de incubación.

Lineamientos de análisis, recuento e identificación de agentes bacterianos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Basado en el grupo *Bacillus* spp.

Fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \text{N}^\circ \text{ de colonias contadas} \times \text{factor de siembra} \times \text{factor de dilución}$$

Referencias:

- N° de colonias contadas: promedio del número de colonias presentes en las 3 placas de lectura.
- Factor de siembra: 10
- Factor de dilución: es la inversa de la dilución en la cual se realiza el recuento de colonias para la obtención de resultados.

3.4 Expresión de resultados Recuento

Registrar la concentración obtenida en UFC/ml o g para el género determinado.

Determinar el recuento promedio a partir de 3 submuestras del mismo envase.

En el caso que no se observen colonias o se desarrollen colonias que no presentan morfología similar a las descritas para el género y/o no respeten los tiempos de crecimiento, registrar lo observado.

3.5 Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el momento en el que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo final no debe ser superior a 45 min.

De forma adicional, el tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial y la preparación de todas las diluciones posteriores no debe ser superior a 30 min.

4 METODOLOGÍA ANÁLISIS IDENTIFICACIÓN

4.1 Preparación de cultivos puros

A partir de las colonias de crecimiento característico de *Bacillus* y que correspondan a Gram positivo, se procede a realizar cultivos puros con el fin de multiplicar la bacteria. Estos cultivos puros se utilizarán en las pruebas complementarias.

Los pasos a seguir para realizar cultivos puros son:

- Seleccionar colonias sospechosas.
- Traspasar las colonias sospechosas a medio TSA.
- Incubar a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Lineamientos de análisis, recuento e identificación de agentes bacterianos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Basado en el grupo *Bacillus* spp.

4.2 Extracción de ADN a partir de colonias

- El ADN bacteriano puede extraerse con kits de extracción de ADN microbiano siguiendo las instrucciones del fabricante. Por ejemplo: kit de ADN bacteriano innuPREP (Analytik Jena).

4.3 PCR

La identificación molecular de bacterias del Grupo *Bacillus* spp. podrá realizarse mediante PCR convencional, PCR en tiempo real, secuenciación u otra metodología molecular previamente validada por el laboratorio.

La caracterización molecular podrá utilizarse como confirmación del género e identificación a nivel de especie.

Podrán utilizarse marcadores moleculares reconocidos para identificación de especies del Grupo *Bacillus* spp., complementado con análisis genéticos moleculares que permita la identificación a nivel de especie.

Las condiciones de amplificación, composición de mezclas de reacción, partidores utilizados y parámetros de interpretación deberán encontrarse documentados y previamente validados por el laboratorio.

4.4 Expresión de resultados identificación

La identificación final deberá considerar:

- La morfología típica de *Bacillus* sp. Las colonias típicas de *Bacillus* sp. en el medio TSA son normalmente blancas, opacas, con borde irregular dentado, de aspecto seco-terroso, que pueden presentar una elevación central característica. La morfología varía según especie y tiempo de incubación.
- Gram positivo.
- Resultado PCR y Secuenciación.
- En el caso de realizar secuenciación de genes parciales, el aislado puede identificarse mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del producto de la PCR, seguido de la comparación de esta secuencia con secuencias conocidas almacenadas en una base de datos, por ejemplo, mediante análisis de alineamiento de secuencias (BLAST) en "GenBank". El porcentaje de identidad de nucleótidos con los parientes más cercanos debe darse y ser superior al 97 %.
- En el caso de realizar secuenciación del genoma completo, el aislado puede identificarse a nivel de especie, mapeando las lecturas con respecto al genoma de referencia de las diferentes especies del Grupo *Bacillus*.

Lineamientos de análisis, recuento e identificación de agentes bacterianos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Basado en el grupo *Bacillus* spp.

5 ANÁLISIS DE AGENTES CAUSALES DE ENFERMEDADES HUMANAS

Los Laboratorios deberán, en forma complementaria, presentar protocolo de análisis y diagnóstico de los siguientes agentes, capaces de causar enfermedades humanas:

- *Escherichia coli*
- *Salmonella* spp.
- Coliformes fecales
- Huevos de *Helmintos*.

Para el caso de los tres primeros agentes, los protocolos deben basarse en la Resolución 723 de 2022, la cual aprueba y establece como oficiales las metodologías y protocolos que indica, para la identificación y determinación de parámetros de calidad de plaguicidas microbianos; o, en el Procedimiento Evaluación de la pureza de ACBM, del Laboratorio Biológico Bacteriología, Dirección General de Servicios Agrícolas, Uruguay.

El muestreo debe ser realizado, en caso de centros de producción, es por lote de producción. En caso de muestras de fiscalización, en 3 submuestras del mismo envase.

Una vez tomada la muestra, ésta se debe almacenar a 2-8°C y enviar lo más pronto posible al Laboratorio, manteniéndose la cadena de frío hasta su recepción o manteniendo las condiciones de almacenamiento indicadas en el etiquetado del producto.