

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

Basado en *Trichoderma* spp.

**LINEAMIENTOS PARA EL ANÁLISIS DE RECUENTO E
IDENTIFICACIÓN DE AGENTES FÚNGICOS QUE COMPONEN EL
INGREDIENTE ACTIVO DE UN FERTILIZANTE, BIOESTIMULANTE
O PLAGUICIDA DE ORIGEN MICROBIANO BASADO EN
TRICHODERMA SPP.**

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

Basado en Trichoderma 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	4
4 METODOLOGÍA ANÁLISIS IDENTIFICACIÓN	6
5 ANÁLISIS DE AGENTES CAUSALES DE ENFERMEDADES HUMANAS	7

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

Basado en *Trichoderma* 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 fúngicos que componen el ingrediente activo de un fertilizante, Bioestimulante o plaguicida de origen microbiano.

Los lineamientos están desarrollados en base a especies del género *Trichoderma*, describen la metodología para el recuento, aislamiento y su identificación, mediante técnicas de cultivo en medios artificiales, evaluación morfológica y caracterización molecular complementaria. Este procedimiento no aplica al análisis de hongos micorrízicos arbusculares ni de otros microorganismos biotróficos obligados que no puedan ser aislados y reproducidos en medios de cultivo artificiales.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Altimira, F., & Tapia, E. (2022). Metodología de identificación de las cepas bacterianas y/o fúngicas que componen un pesticida microbiano mediante técnicas de análisis molecular. *Proyecto CORFO "Desarrollo de metodologías y protocolos que permitan la identificación y aseguramiento de la calidad de plaguicidas microbiarios"*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Chile.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., & Samuels, G. J. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3), 558–590.
- 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.
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). (2022). Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas (*D-RIS-RAI-PA-002, Versión 01*). *Gobierno de Chile*.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). Academic Press.

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

Basado en *Trichoderma* spp.

3 METODOLOGÍA ANÁLISIS RECuento

3.1 Preparación de la muestra y diluciones

Las muestras deberán mantenerse en condiciones que eviten alteraciones en la viabilidad microbiana y procesarse a temperatura ambiente previo al inicio del ensayo. Previo al análisis, las muestras deberán homogenizarse completamente hasta obtener una distribución uniforme del producto, evitando precipitación, separación de fases o acumulación de partículas, con el fin de asegurar que la suspensión analizada sea representativa de la formulación original.

Para formulaciones líquidas, la homogenización podrá realizarse mediante agitación orbital, magnética o equivalente, por un tiempo mínimo de 10 minutos o hasta alcanzar una dispersión homogénea. Para formulaciones sólidas, polvos solubles, polvos dispersables, gránulos, pellets o formulaciones de lenta dispersión, la homogenización deberá realizarse durante al menos 20 minutos, pudiendo extenderse hasta 40 minutos o más dependiendo de las características físicas del producto y su capacidad de dispersión.

En caso de requerirse, podrán utilizarse sistemas complementarios de homogenización, tales como vortex, Stomacher® u otros equivalentes previamente verificados por el laboratorio.

3.2 Preparación de la suspensión inicial

Pesar asépticamente 50g de producto sólido o medir 50mL de producto líquido y adicionar 450mL de solución diluyente estéril, manteniendo una proporción 1:10. Esta preparación corresponderá a la dilución 10^{-1} .

Como solución diluyente se utilizará solución salina estéril de NaCl al 0,85% suplementada con Tween 80 al 0,1%, u otro diluyente previamente validado por el laboratorio, siempre que no afecte la viabilidad, recuperación o dispersión de *Trichoderma* spp.

A partir de la suspensión inicial, preparar diluciones seriadas decimales utilizando el mismo diluyente estéril, según la concentración esperada del producto y el rango de recuento requerido.

Cada dilución deberá homogenizarse previo a su utilización.

3.3 Siembra en placa extendida

Transferir alícuotas apropiadas de las diluciones seleccionadas sobre placas con medio de cultivo PDA suplementado con antibiótico, u otro medio previamente validado para la recuperación de *Trichoderma* spp.

La distribución del inóculo deberá realizarse mediante espátula de Drigalsky, rastrillo estéril u otro sistema equivalente que permita una dispersión uniforme sobre la superficie del medio.

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

Basado en *Trichoderma* spp.

Cada dilución deberá sembrarse al menos por duplicado.

Las placas deberán incubarse invertidas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 a 7 días, o hasta observar desarrollo adecuado de colonias compatibles con *Trichoderma* spp.

En formulaciones mixtas que contengan bacterias u otros microorganismos asociados, el laboratorio podrá incorporar antibióticos o medios selectivos previamente verificados, con el fin de favorecer la recuperación y diferenciación del género *Trichoderma*.

3.4 Lectura para Recuento

Las placas deberán observarse periódicamente durante el período de incubación, efectuando una primera evaluación entre las 24 y 48 horas posteriores a la siembra, y continuando las observaciones hasta completar un máximo de 7 días o hasta obtener un crecimiento adecuado para el recuento e identificación presuntiva de las colonias.

El recuento deberá realizarse sobre placas que presenten entre 10 y 100 colonias desarrolladas, o en el rango previamente validado por el laboratorio para asegurar precisión y repetibilidad del método.

Durante la lectura deberán seleccionarse aquellas colonias que presenten características macro y micromorfológicas compatibles con el género *Trichoderma*, considerando aspectos tales como velocidad de crecimiento; coloración de la colonia; textura; morfología del micelio; producción de conidios; características microscópicas compatibles con el género.

El laboratorio deberá verificar la coherencia de los recuentos obtenidos entre diluciones consecutivas, descartando placas con crecimiento confluyente, contaminación evidente o distribución no homogénea del inóculo.

3.5 Expresión de resultados Recuento

Los resultados deberán expresarse como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Trichoderma* spp. por gramo o mililitro de producto, según corresponda.

El cálculo deberá considerar número de colonias contadas; factor de dilución; volumen sembrado; promedio de réplicas válidas.

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

Cuando existan diferencias significativas entre réplicas o diluciones consecutivas, el laboratorio deberá evaluar la validez del recuento y dejar registro de la interpretación realizada.

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

Basado en *Trichoderma* spp.

Cuando no se observe desarrollo compatible con *Trichoderma* spp. en las condiciones del ensayo, el resultado deberá expresarse como: "No se detecta desarrollo compatible con *Trichoderma* spp. en las condiciones del análisis."

Cuando el crecimiento observado impida efectuar un recuento confiable, el resultado podrá informarse como: "crecimiento confluyente"; "recuento fuera de rango"; o equivalente técnicamente justificado.

4 METODOLOGÍA ANÁLISIS IDENTIFICACIÓN

4.1 Preparación de cultivos puros

A partir de colonias con características compatibles con el género *Trichoderma*, deberán obtenerse cultivos puros con el fin de realizar evaluaciones morfológicas y/o análisis moleculares complementarios.

Las colonias seleccionadas deberán transferirse asépticamente a medio PDA sin antibióticos, u otro medio previamente validado para favorecer el crecimiento del aislamiento.

Los cultivos deberán incubarse a 25 ± 2 °C hasta obtener crecimiento adecuado para su caracterización.

El laboratorio deberá evitar la selección de colonias contaminadas, sobrecrecidas o con morfología alterada que pueda interferir con la correcta identificación del aislamiento.

4.2 Extracción ADN

La extracción de ADN podrá realizarse a partir de cultivos puros, micelio, conidios u otras estructuras fúngicas compatibles con *Trichoderma* spp., utilizando kits comerciales o metodologías convencionales previamente validadas por el laboratorio.

El procedimiento utilizado deberá asegurar una adecuada recuperación de ADN; pureza e integridad del material genético; ausencia de inhibidores de PCR; trazabilidad del proceso analítico.

El laboratorio deberá mantener registros asociados a metodología utilizada; lotes de reactivos; controles aplicados; condiciones de almacenamiento; y criterios de aceptación del ADN obtenido.

El ADN extraído deberá conservarse en condiciones que aseguren su estabilidad e integridad hasta su utilización.

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

Basado en *Trichoderma* spp.

4.3 PCR

La identificación molecular de *Trichoderma* 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; identificación a nivel de especie; resolución de aislamientos atípicos; o verificación complementaria del análisis microbiológico.

Podrán utilizarse marcadores moleculares reconocidos para identificación de hongos filamentosos, tales como ITS; tef1- α ; rpb2; u otros equivalentes técnicamente justificados.

Cada corrida de amplificación deberá incorporar, al menos control positivo; control negativo; y control blanco de reacción.

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

La visualización de productos amplificados podrá realizarse mediante electroforesis u otro sistema equivalente previamente validado.

En caso de realizar secuenciación, las secuencias obtenidas deberán compararse con bases de datos reconocidas y actualizadas para apoyar la interpretación taxonómica del aislamiento.

4.4 Expresión de resultados identificación

La interpretación final deberá considerar de manera integrada:

- Resultados microbiológicos;
- Características macro y micromorfológicas;
- Antecedentes moleculares, cuando corresponda.

Las metodologías moleculares utilizadas tendrán carácter complementario al análisis microbiológico y deberán interpretarse en conjunto con la evidencia fenotípica obtenida.

Cuando existan discrepancias entre los resultados microbiológicos y moleculares, el laboratorio deberá dejar registro técnico de la interpretación realizada y, si corresponde, repetir o complementar el análisis.

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:

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

Basado en *Trichoderma* spp.

- *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.