

**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 Thichoderma Spp.**

**TABLA DE CONTENIDOS**

<b><u>CONTENIDO</u></b>	<b><u>PÁGINA</u></b>
<b>1 OBJETIVOS Y ALCANCE</b>	<b>3</b>
<b>2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS</b>	<b>3</b>
<b>3 METODOLOGÍA ANÁLISIS RECuento</b>	<b>4</b>
<b>4 METODOLOGÍA ANÁLISIS IDENTIFICACIÓN</b>	<b>6</b>
<b>5 ANÁLISIS DE AGENTES CAUSALES DE ENFERMEDADES HUMANAS</b>	<b>7</b>

## 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 microbianos"*. 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.

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

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."

# 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 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  $25 \pm 2$  °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.

### 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.

## 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 *Thichoderma* Spp.

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-a*; *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:

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

## **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 Thichoderma Spp.**

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, en 5 lotes de producción. En caso de muestras de fiscalización, en 5 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.