

## Capítulo I

---

### **Control de calidad microbiológico de bioplaguicidas a base de agentes de control biológico**

---

Adriana Marcela Santos Díaz

En el proceso de producción de bioplaguicidas, el control de calidad microbiológico constituye un factor clave porque permite garantizar y predecir la eficiencia del producto en condiciones de campo (Miranda-Hernández et al., 2016). Dicho análisis microbiológico consiste en la evaluación rigurosa durante cada etapa del proceso de producción y en el producto terminado. El objetivo principal es monitorear y evitar los problemas de contaminación y garantizar la calidad del principio activo de la formulación. Sin embargo, la mayoría de las metodologías microbiológicas que son utilizadas en el proceso de control de calidad de bioplaguicidas son el resultado de procesos de investigación y, por esta razón, no se cuenta con metodologías estandarizadas para este tipo de productos (Díaz et al., 2018). El alcance de las técnicas y los procedimientos a aplicar depende del ingrediente activo del bioproducto. Asimismo, su adecuada selección, implementación y análisis es responsabilidad del productor (Ravensberg, 2011).

A continuación se describen las metodologías de control de calidad microbiológico más utilizadas. Se

hará énfasis, principalmente, en técnicas analíticas para establecer los parámetros de calidad en la producción y en el producto terminado de bioplaguicidas a base de hongos, bacterias y virus de interés comercial. De acuerdo con lo anterior, este capítulo está dividido en las siguientes secciones: identificación del agente de control biológico, cuantificación del principio activo, viabilidad del principio activo y contenido de contaminantes. En cada una de dichas secciones se profundiza en la metodología y se hacen las recomendaciones pertinentes de acuerdo con el tipo de agente de control biológico a evaluar.

En general, los parámetros de calidad microbiológica para bioplaguicidas producidos a base de hongos, bacterias y virus son similares, pues se enfocan, principalmente, en la identificación, cuantificación y viabilidad del principio activo y en la determinación del contenido de contaminantes. Sin embargo, existen aspectos particulares que requieren más atención que otros, los cuales dependen del sistema de producción o fermentación, de las características propias del principio activo y del tipo de formulación a utilizar (Burges, 1998; Ibrahim et al., 2015).

## **Identificación del agente de control biológico**

El agente de control biológico utilizado debe ser caracterizado de forma macroscópica, microscópica y metabólica, además de ser identificado por medio de herramientas moleculares. De esta manera, se asegura que el agente utilizado sea el mismo para todo el proceso de producción (Díaz et al., 2018). Generalmente, esta identificación se realiza desde el proceso de selección del agente de control biológico y no como parte del procedimiento de control de calidad de cada lote.

Debido a su asequibilidad y a la facilidad de realización, actualmente, la primera aproximación a la identificación de microorganismos se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas (Bou et al., 2011). Esta identificación fenotípica se basa en la caracterización morfológica, bioquímica y del crecimiento en condiciones diferenciales de temperatura, pH o atmósferas. Sin embargo, existen numerosos sistemas bioquímicos (multipruebas) que garantizan una mayor rapidez en la identificación de algunos microorganismos como bacterias u hongos. Con el fin de garantizar el resultado, todos los sistemas bioquímicos exigen unas condiciones muy precisas de concentración del inóculo, inoculación, incubación y lectura (Bou et al., 2011).

Todos los agentes de control biológico se pueden identificar con base en secuencias de ADN mediante técnicas moleculares. Sin embargo, esta información debe ser contrastada con información morfológica, bioquímica e imágenes macroscópicas y microscópicas (Cotes et al., 2018).

Una vez seleccionado e identificado el agente de control biológico, se debe asegurar la estabilidad genética, fisiológica y, especialmente, su actividad biológica durante largos periodos de tiempo. Lo anterior se realiza a través de la conservación del microorganismo (crioconservación o liofilización) y la generación de un banco de trabajo a partir del cual siempre se debe iniciar el proceso de producción del bioplaguicida. Ravensberg (2011) recomienda que cada vez que se utilice un nuevo vial del banco de trabajo, se identifique otra vez el agente de control biológico. Es entendible que durante el proceso de control de calidad rutinario no sea posible realizar esta identificación, no obstante, es necesario contar con un sistema de identificación de variaciones fenotípicas (fotografías o caracterización bioquímica) que permita generar alertas en la producción del principio activo con el fin de asegurar que el agente de control biológico utilizado mantenga las características por las cuales fue seleccionado (Díaz et al., 2018; Ravensberg, 2011).

## Cuantificación del principio activo

La concentración es la cantidad del agente biocontrolador existente en un producto formulado. Generalmente, es un parámetro utilizado como referencia en el proceso de fermentación y formulación, ya que permite garantizar la cantidad adecuada del ingrediente activo en el producto final. Además, esta información es fundamental para la aplicación del producto en campo, razón por la cual debe especificarse en la etiqueta (Díaz et al., 2018).

Las metodologías de cuantificación del principio activo dependerán del agente biocontrolador. Además, este parámetro no garantiza ni refleja la viabilidad ni la virulencia del principio activo. Por esta razón, la implementación de esta metodología se realiza de manera paralela a la ejecución de metodologías en las cuales se evalúe la viabilidad o efectividad del agente biocontrolador (Glare et al., 2016). Dentro de las más utilizadas se destacan las metodologías clásicas de enumeración de microorganismos, tales como el recuento en placa y aquellas basadas en el uso de hemocitómetro. Las metodologías mencionadas tienen la ventaja de ser rápidas y económicas para ser implementadas en un programa de control de calidad. Aunque a la fecha los métodos de cuantificación basados en herramientas moleculares no

son ampliamente utilizados, son más precisos para cierto tipo de agentes de control biológico como, por ejemplo, los virus entomopatógenos (Inglis et al., 2012).

Dentro de las metodologías de control de calidad más utilizadas para los productos terminados se destacan los métodos directos y los métodos indirectos. Por ejemplo, para la enumeración de esporas fúngicas a partir de insectos, sustratos de producción, hojas o suelo se puede utilizar el método directo de recuento en hemocitómetro o el método indirecto de turbidez o recuento en placa (Inglis et al., 2012). A continuación, se explicarán las particularidades de las metodologías más utilizadas en el control de calidad de bioplaguicidas.

### **Recuento en hemocitómetro (cámara de Neubauer)**

Un hemocitómetro o cámara de Neubauer es un portaobjetos diseñado especialmente para realizar el recuento de células mediante el microscopio. Es una técnica rápida y económica que permite cuantificar el principio activo por unidad de volumen o peso. Dentro de las dificultades para el recuento en cámara de Neubauer se destaca la obtención de una alta reproducibilidad, lo que influye en la selección correcta del tamaño de la muestra, la dilución adecuada, la selección de la cámara de recuento, el aumento del microscopio e, incluso, el llenado de la cámara (Sharga & Feketa, 2018).

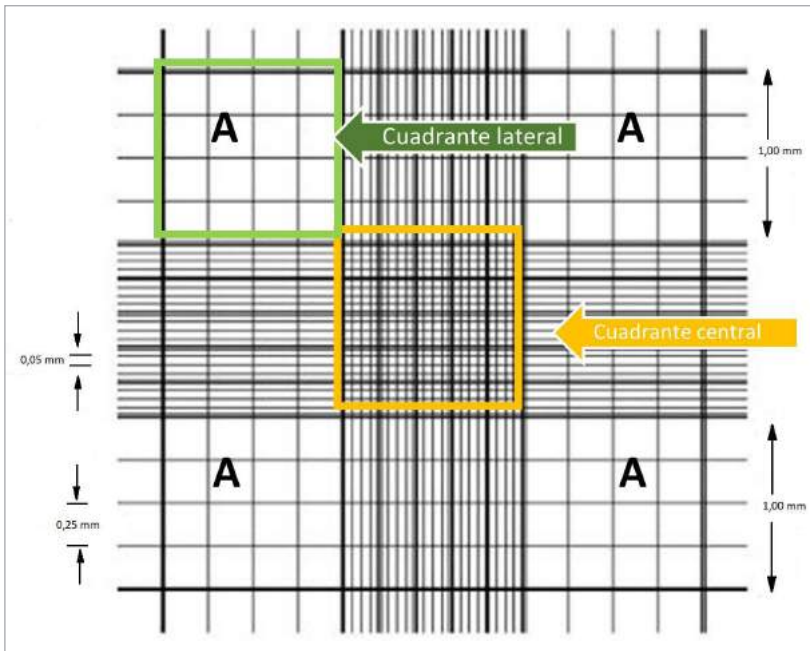
El hemocitómetro es utilizado en la cuantificación del principio activo de bioplaguicidas a base de hongos (mohos y levaduras) y virus. En el caso de suspensiones fúngicas, es posible cuantificar conidios, blastosporas o partes miceliales (Ravensberg, 2011); sin embargo, no es posible distinguir las células viables de las no viables. Para las suspensiones a base de virus, los cuerpos de inclusión (CI) que tienen un alto grado de refracción son cuantificables en microscopios de campo brillante mediante la cámara de Neubauer (alfabaculovirus, cypovirus y entomopoxvirus). Los betabaculovirus son mucho más pequeños (de 0,15  $\mu\text{m}$  a 0,5  $\mu\text{m}$ ) y, por lo tanto, más difíciles de cuantificar; sin embargo el conteo se puede realizar utilizando un hemocitómetro con una profundidad de cámara más pequeña, como una cámara de recuento Petroffe-Hausser de 0,02 mm de profundidad. En este caso, el recuento se debe realizar bajo contraste de fases e iluminación de campo oscuro (Eberle et al., 2012).

En términos generales, la cámara de Neubauer es una placa de vidrio gruesa del tamaño de un portaobjetos de vidrio (30 mm x 70 mm x 4 mm), dividida en tres secciones. La sección media, a su vez, cuenta con un rayado fino que forma una cuadrícula de 3 mm x 3 mm y es identificable fácilmente con el microscopio. Además,

esta sección está exactamente 0,1 mm de distancia más abajo que las secciones laterales, lo cual establece un volumen fijo una vez colocado el cubreobjetos especial (generalmente de cuarzo) (figura 1.1). El cuadrante de 3 mm<sup>2</sup> se divide en 9 cuadrados grandes, cada uno con un área de 1 mm<sup>2</sup>. El cuadrante central (observable con el objetivo 10×), se divide en 25 cuadrantes medianos con líneas dobles o triples. Asimismo, cada uno de estos 25 cuadrantes se divide en 16 cuadrantes pequeños con líneas simples, de modo que cada uno de los cuadrados más pequeños tiene un área de 1/400 mm<sup>2</sup> (figura 1.1) (Eberle et al., 2012).

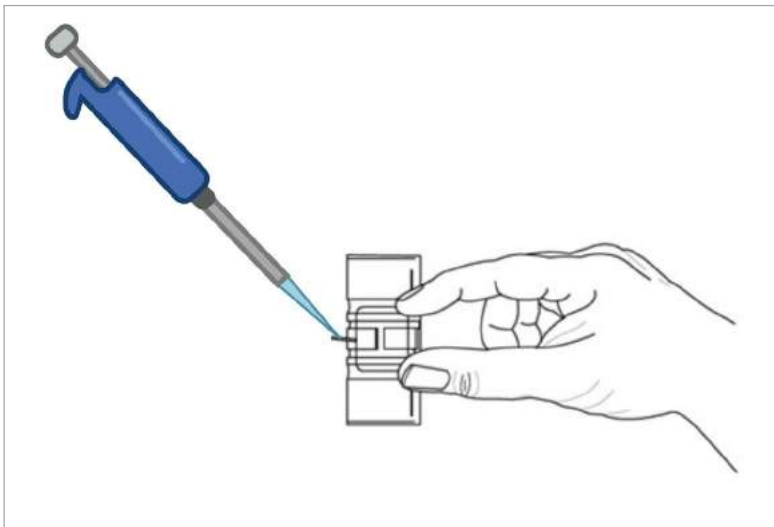
En general, el procedimiento para la cuantificación del principio activo consiste en preparar la muestra, preparar la cámara de Neubauer, introducir la muestra en la cámara de Neubauer, hacer el recuento del principio activo y calcular su cantidad por área y volumen mediante el factor de corrección de la cámara.

- a. **Preparación de la muestra:** dependiendo del tipo de muestra, se debe preparar una dilución a una concentración adecuada para el recuento. Generalmente, el rango de concentración para un recuento utilizando la cámara Neubauer está entre 250.000 células/ml y 2.5 millones de células/ml. Si la muestra no se encuentra diluida de manera correcta, es posible que la cuantificación se dificulte y se generen errores en el resultado. En cambio, si la muestra está muy diluida, el tamaño de la muestra no será suficiente para realizar el recuento y generar confianza en la concentración de la suspensión original. Se recomienda utilizar diluciones en base 10 (Inglis et al., 2012).
- b. **Preparación de la cámara de Neubauer:** para preparar la cámara de Neubauer es necesario limpiar la cámara y el cubreobjetos con etanol al 70 %, pues deben estar libres de polvo y suciedad. Adicionalmente, hay que colocar el cubreobjetos (de cuarzo) en el área central de la cámara Neubauer. Se debe utilizar una superficie plana para colocar la cámara, la cual debe estar nivelada con respecto al suelo (Eberle et al., 2012).
- c. **Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer:** de la dilución o suspensión seleccionada se deben tomar 10 µl con una micropipeta. Posteriormente, se debe colocar la punta de la micropipeta contra el borde del cubreobjetos y expulsar lentamente el líquido hasta que la cámara de Neubauer esté llena. La acción capilar ayudará a asegurar que la cámara se llene de manera homogénea y sin exceso (figura 1.2).



**Figura 1.1.** Secciones de la cámara de Neubauer y dimensiones de la cuadrícula del hemocitómetro. La letra "A" corresponde a la cuadrícula de un 1 mm<sup>2</sup> utilizada para el recuento de agentes de control biológico.

Fuente: Elaboración propia

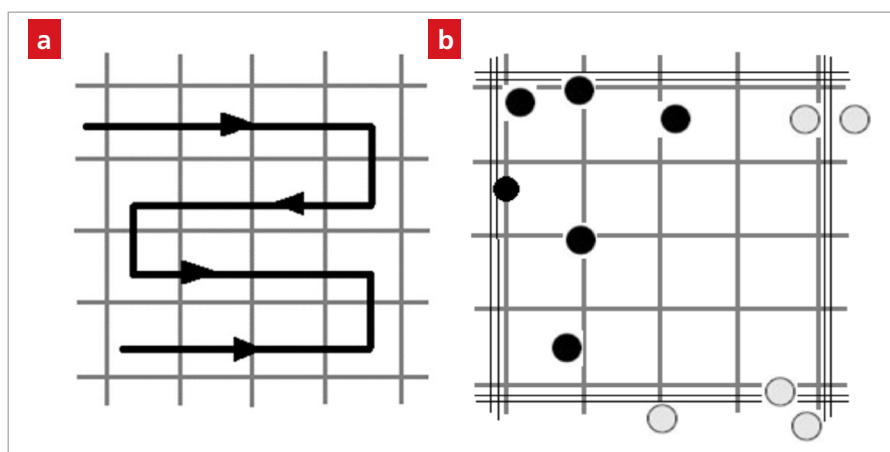


**Figura 1.2.** Introducción de la muestra (volumen de 10 µl) en la cámara de Neubauer.

Fuente: Elaboración propia

Antes de realizar el recuento, la suspensión se debe estabilizar en los cuadrantes a contar, para lo cual hay que esperar de 3 a 5 minutos, aproximadamente. Cuando la dilución contiene como base algún tipo de aceite, se recomienda un mayor tiempo de sedimentación, además de verificar que el aceite no infiltre de manera excesiva la cámara de recuento, ya que el cubreobjetos se puede levantar y aumentar el volumen de la cámara y, por lo tanto, se puede sobrestimar la concentración. Cuando se usa agua como base de la suspensión, se debe garantizar que esta no se evapore antes de realizar el recuento (Inglis et al., 2012). En caso de que aparezcan burbujas o el cubreobjetos se haya movido, es necesario repetir la operación.

- d. **Recuento del principio activo:** para hacer el recuento del principio activo es necesario colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio. Posteriormente, hay que enfocar el patrón de la cuadrícula utilizando el objetivo 10×. Para contar conidios, blastosporas, células (suspensiones fúngicas) o cuerpos de inclusión (suspensiones virales) se debe utilizar el objetivo 40× y ajustar la luz del microscopio para obtener definición y nitidez en la imagen. Se recomienda realizar el recuento de forma organizada por cuadrante (figura 1.3a). Los valores óptimos por cuadrante deben ser mínimo 10 y máximo 100; los valores por fuera de este rango generan una baja precisión en el resultado final (Bioscience, 2018).



**Figura 1.3.** Instrucciones de lectura de la cámara de Neubauer. a. Secuencia correcta para realizar el recuento en un cuadrante de la cámara de Neubauer; b. Criterio para realizar el recuento de principio activo en los cuadrantes internos de la cámara de Neubauer. Color negro se puede cuantificar y color gris no se puede cuantificar.

Fuente: Elaboración propia

Para evitar el doble conteo, el criterio es no contabilizar las estructuras (principio activo) que tocan las líneas inferior y derecha que limitan el cuadrado (figura 1.3b). Para el caso de conidios en proceso de germinación o células de levaduras en gemación que tienen la mitad del tamaño de la célula matriz, estas deben contabilizarse. Se ha establecido que existe uniformidad en el recuento cuando la desviación estándar ( $s$ ) está del 10 % al 15 % de la media (Inglis et al., 2012).

- e. Cálculo del principio activo por área y volumen:** para obtener una estimación de la cantidad de principio activo por mililitro de la suspensión original, el promedio del recuento obtenido en cada cuadrante se multiplica por el factor de conversión de volumen; estos factores de corrección dependerán de la cuadrícula en la cual se realizó el recuento (ecuación 1.1).

$$\frac{\text{Principio activo}}{\text{ml de la muestra}} = \frac{\text{Promedio de recuento de principio activo} * \text{factor de dilución} * 10^3}{\text{Área}(\text{mm}^2) * \text{profundidad de la cámara}(\text{mm})}$$

**Ecuación 1.1.** Ecuación para el cálculo de principio activo utilizando la cámara de Neubauer. El área y la profundidad dependerán del cuadrante seleccionado para realizar el recuento.

El factor de dilución utilizado en la fórmula está determinado por la dilución de la muestra utilizada en el recuento. La profundidad utilizada en la fórmula es siempre 0,1 mm. La superficie del área corresponderá al área del cuadrante utilizado en el recuento. El factor del cuadrante principal de la cámara de Neubauer (figura 1.1) corresponde a 0,02 cm x 0,02 cm x 0,01 cm = 4,0 x 10<sup>-6</sup>. Para los cuadrantes laterales, el factor de la cámara corresponde a 1,0 x 10<sup>-4</sup> (Eberle et al., 2012, Inglis et al., 2012).

## Caso de estudio I

Una muestra de un bioplaguicida a base de *Trichoderma* spp. fue reconstituida en solución de Tween 80 al 0,1 %. A partir de la dilución 10<sup>-2</sup> se obtuvo un recuento total de 230 conidios. El recuento se realizó en los cuadrantes laterales empleando 4 cuadros por cuadrante, para un total de 16 (ecuación 1.2).

$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{\text{Recuento obtenido}}{\text{Número de cuadros contados}} * \text{factor de dilución} * \text{factor de la cámara}$$

**Ecuación 1.2.** Ecuación para el cálculo de conidios de *Trichoderma* spp. utilizando la cámara de Neubauer.

Con base en los datos se hace el reemplazo, tal como se muestra en la ecuación 1.3:

$$\frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = \frac{\frac{230}{16} \times 10^2 \times 10^3}{(0,25 \times 0,25) \times 0,1} = \frac{\text{conidios}}{\text{ml}} = 2,30 \times 10^8$$

**Ecuación 1.3.** Recuento de conidios de *Trichoderma* spp. utilizando la cámara de Neubauer.

Los datos presentan una distribución normal, por lo tanto, la media y el error de la muestra pueden ser utilizados para calcular los intervalos de confianza. Es importante tener en cuenta que el principio activo que se esté cuantificando mediante la cámara de Neubauer no debe presentar agregados, de manera tal que el recuento siga una distribución de Poisson y el error estándar de la media sea igual a lo descrito en la ecuación 1.4:

$$SD = \sqrt{\frac{\tilde{\mathcal{X}}}{N}}$$

Donde:  $\tilde{\mathcal{X}}$  = Número de principio activo cuantificado por cuadrante

$N$  = número de cuadrante contados

**Ecuación 1.4.** Ecuación para el cálculo de la desviación estándar en recuentos de principio activo utilizando la cámara de Neubauer.

La precisión de la estimación dependerá del número de principio activo cuantificado. Siempre que el número sea superior a 50, se pueden calcular los límites de confianza con una distribución normal de 0,975 y en un cuartil de 1,96.

Para el caso de estudio I, corresponderá la ecuación 1.5:

$$\tilde{\mathcal{X}} = \frac{230}{16} = 14,374$$

$$SD = \sqrt{\frac{14,374}{16}} = 0,947$$

**Ecuación 1.5.** Cálculo de la desviación estándar para el recuento de conidios de *Trichoderma* spp. (caso de estudio I).

Como el número de conidios contados es mayor que 50 (caso de estudio I) y se asume que los resultados presentan una distribución normal, los límites de confianza (95 %) del recuento medio corresponderá a lo descrito en la ecuación 1.6):

$$\text{Límites de confianza (95 \%)} = 14,374 \pm 1,96 \times \frac{0,9747}{\text{cuadrante}}$$

$$\text{Límites de confianza (95 \%)} = 14,374 \pm \frac{1,910}{16}$$

$$\text{Límites de confianza (95 \%)} = 14,374 \pm 0,11$$

**Ecuación 1.6.** Cálculo de los límites de confianza al 95% para el recuento de conidios de *Trichoderma* spp. (Caso de estudio I).

A partir de esto, se puede calcular el recuento de conidios de *Trichoderma* spp. con sus respectivos límites de confianza (95 %) (ecuación 1.7).

$$\begin{aligned} \text{Límites de confianza al 95 \%} &= 2,30 \times 10^8 \times (100 \times 0,11 \times 1 \times 10^6) = \\ &= 2,30 \pm 1,10 \times \frac{10^8 \text{ conidios}}{\text{ml}} \end{aligned}$$

**Ecuación 1.7.** Recuento de conidios de *Trichoderma* spp. con límites de confianza al 95 % (caso de estudio I).

La metodología de recuento en cámara de Neubauer se recomienda para productos a base de hongos (mohos y levaduras) y virus, sin embargo, las suspensiones utilizadas deben tener un bajo nivel de partículas o impurezas diferentes al principio activo, lo que garantizará un resultado confiable y de alta precisión.

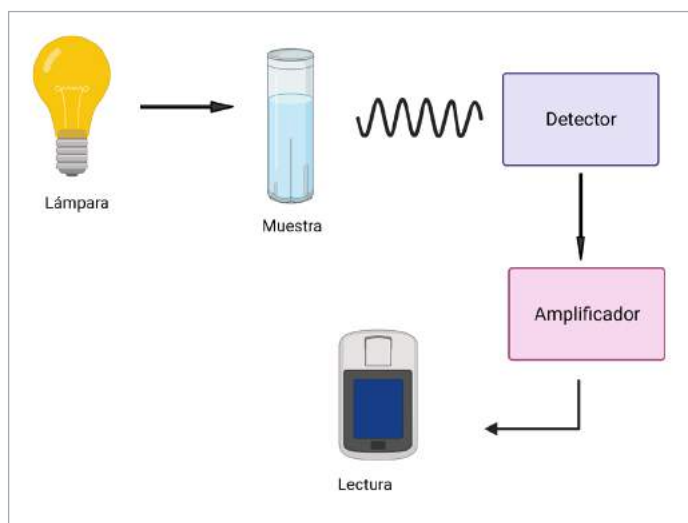
## Métodos espectrofotométricos

Los métodos espectrofotométricos son métodos indirectos utilizados para cuantificar el número de colonias presentes en una muestra líquida de un microorganismo y estimar la concentración de la población microbiana. Este método es utilizado para estimar concentraciones de hongos y bacterias (Hernández & Acebo, 2013). La metodología se basa en la transmitancia de la luz a través de la suspensión y en el hecho de que el porcentaje de luz transmitida disminuirá en proporción a la turbidez. Sin embargo, las lecturas de absorbancia (turbidez) deben estandarizarse mediante la

comparación de las unidades formadoras de colonia por unidad de volumen o por la cantidad de principio activo utilizando un hemocitómetro. Aunque el método turbidimétrico es relativamente simple y rápido, está sujeto a errores debido a la variación en tamaño, forma y aglomeración de los principios activos evaluados (Caligiore-Gei & Valdez, 2015).

El sistema de medición de turbidez cuenta con una lámpara, la muestra a analizar y el fotodetector (figura 1.4). La fuente de emisión (lámpara) tiene la capacidad de emitir una longitud de onda la cual se establece de acuerdo con el tipo de muestra; el fotodetector es el receptor de los fotones y actúa como un sensor óptico. Este sensor permite amplificar las señales en forma de impulsos eléctricos, lo cual genera un valor de turbidez expresado como absorbancia (figura 1.4) (Hernández & Acebo, 2013).

Generalmente, esta metodología es utilizada como control de calidad en el proceso, es decir, durante los procesos de fermentación, ya que se requiere una estimación rápida del crecimiento microbiano (Hernández & Acebo, 2013). Para esto, se mide la absorbancia de una muestra del caldo de fermentación mediante un espectrofotómetro (Hernández & Acebo, 2013). Sin embargo, esta metodología tiene una gran desventaja, ya que no permite diferenciar las células viables de las no viables, porque los dos tipos de células absorben a una longitud de onda específica. Por esta razón, la absorbancia no se puede definir como una medida directa de la viabilidad.



**Figura 1.4.** Esquema general de un sistema de turbidez (espectrofotometría).

Fuente: Elaboración propia

Varios autores han implementado el uso de métodos espectrofotométricos en la cuantificación rutinaria de principios activos de bioplaguicidas. Por ejemplo, Schütz et al. (2020) establecieron una metodología para la preparación rápida y confiable de inóculos de *Trichoderma reesei* y *T. atroviride*, evaluando el efecto del tamaño, la forma y la pigmentación de los conidios a diferentes longitudes de onda. Los autores establecieron que una absorbancia entre 550 nm y 700 nm está directamente relacionada con el recuento de conidios para las cepas de *Trichoderma* spp. y, por lo tanto, las curvas de calibración se pueden usar como una herramienta válida y rápida para estimar la concentración de conidios en una solución.

En el caso de levaduras, el proceso de cuantificación por espectrofotometría es utilizado, principalmente, para la preparación del inóculo en el montaje de pruebas de control de calidad de actividad biológica. Por ejemplo, Magoye et al. (2020), utilizaron esta metodología en la estandarización del inóculo de *Aureobasidium pullulans* para ser evaluado frente hongos como *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp.

Con respecto a bioplaguicidas a base de bacterias, esta metodología es utilizada como control de calidad en el proceso (fermentación) y se han realizado aproximaciones en su uso para la estimación del recuento del producto final. Para bacterias esporoformadoras, la cuantificación de esporas viables se puede realizar mediante la lectura de la absorbancia, debido a que estas tienen un índice de refracción más alto que las células vegetativas y la refractividad está sujeta a disminuir durante el proceso de germinación. De acuerdo con lo mencionado este método es más sensible, rápido y sencillo en comparación con la metodología de recuento en placa (Zhang et al., 2015). De igual manera, en el proceso de germinación de esporas de *Bacillus subtilis*, Gorsuch & Woodruff (2019) utilizaron las lecturas de absorbancia a 600 nm como un método altamente confiable para comparar los resultados con la implementación de un protocolo de cuantificación mediante qPCR en el producto terminado.

Para los virus entomopatógenos, la técnica de espectrofotometría tiene una baja sensibilidad y especificidad, además, no permite cuantificar el principio activo en muestras compuestas, tales como productos de formulación o de suelo (Graham et al., 2015).

## Cuantificación por PCR

La cuantificación por medio de PCR es ampliamente utilizada en el control de calidad en el proceso de fabricación y en las formulaciones de bioplaguicidas a base de virus. Su amplia utilización se debe a que es altamente específica y sensible. Este método

requiere el conocimiento de al menos alguna parte del genoma del virus para generar cebadores específicos que se unan únicamente a la secuencia de interés (Miele et al., 2011). Algunos de los protocolos utilizan “agentes intercaladores fluorescentes” de doble cadena de ADN, sin embargo, se pueden producir falsos positivos si aparecen productos de PCR inespecíficos (Barrera et al., 2016). Las sondas marcadas con fluorescencia son oligonucleótidos que se unen específicamente a la secuencia de interés y permiten la cuantificación por fluorescencia. Se aplican principalmente tres tipos de sondas: TagMan (Barrera et al., 2016), balizas moleculares (Tyagi & Kramer, 1996) y sondas de hibridación (Eberle et al., 2012).

Esta metodología se ha implementado durante las etapas de producción del principio activo (cría de insectos) y en la cuantificación del principio activo en el producto formulado.

- a. **Cría de insectos para la producción de baculovirus:** las crías de insectos se realizan en condiciones controladas de laboratorio o de invernadero. En general, los individuos que se utilizan como pie de cría provienen de campo y se mantienen en cuarentena para garantizar la introducción de individuos libres de infección o enfermedades. Sin embargo, este proceso consume tiempo crítico, por lo que la implementación de la cuantificación por PCR permite detectar la infección por baculovirus presente en una larva, con una alta sensibilidad y especificidad (Barrera et al., 2016).
- b. **Cuantificación de principio activo en producto formulado:** esta técnica es especialmente utilizada para virus de tamaño (densovirus, iridovirus o virus de ARN) que no son cuantificables por medio de técnicas de microscopía óptica. Puede ocurrir un problema si el genoma del virus está segmentado (nodavirus, cypovirus o tetravirus). Aunque la cuantificación de virus mediante qPCR requiere alguna optimización, la cuantificación de genomas de virus mediante técnicas de qPCR es un método estandarizado y de una alta precisión (Eberle et al., 2012). Un ejemplo de la utilización de esta técnica es el trabajo realizado por Barrera et al. (2016), quienes utilizaron la técnica de qPCR para establecer la concentración de granulovirus en un bioplaguicida formulado como un concentrado emulsionable.

## Viabilidad de principio activo

La cuantificación de microorganismos es un elemento crítico en la caracterización y el control de calidad de bioplaguicidas. No solo es importante identificar y cuantificar al microorganismo, también es fundamental conocer el número de microorganismos viables. De esta manera se podrá establecer si los mismos serán capaces de desarrollar y causar el efecto biocontrolador deseado.

Se han diseñado distintas estrategias para cuantificar el principio activo de bioplaguicidas a base de hongos y bacterias (tabla 1.1). En el caso de productos a base de hongos filamentosos, la determinación de la viabilidad se puede realizar por el método de recuento en placa y por el método de germinación de conidios. Para productos a base de levaduras, la viabilidad se determina por medio de recuento en placa con diferentes modificaciones. Para productos a base de bacterias, se pueden utilizar varias metodologías, tales como recuento en placa, goteo en placa y el método del Número Más Probable (NMP) (Corral-Lugo et al., 2012).

**Tabla 1.1.** Metodologías utilizadas para la determinación de la viabilidad del principio activo de bioplaguicidas a base de hongos filamentosos, levaduras y bacterias

Metodología	Principio activo de bioplaguicidas		
	Hongos filamentosos	Levaduras	Bacterias
Recuento en placa	x	x	x
Goteo en placa		x	x
Germinación de conidios	x		
Número más probable			x

Fuente: Elaboración propia

Si bien las metodologías para la determinación de la viabilidad aumentan la precisión de la cuantificación y proporcionan información sobre la distribución espacial del microorganismo, estos métodos requieren de mucha mano de obra en comparación con los métodos de recuento indirectos (por ejemplo: recuento en cámara de Neubauer o espectrofotometría) (Inglis et al., 2012). Además, es importante establecer la metodología ideal de acuerdo con el principio activo, el tipo de formulación (por ejemplo: granulado, polvo o concentrado emulsionable) y la cantidad de contaminantes, ya que este último factor puede afectar el resultado de la cuantificación del principio activo.

## Recuento en placa

La metodología de recuento en placa es una técnica ampliamente utilizada que permite cuantificar la población en una muestra o cultivo (puro o mixto) mediante diluciones seriadas (por ejemplo: 1:10) para, posteriormente, realizar el recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC) (Sieuwerts et al., 2008). Esta metodología tiene la ventaja de tener un buen límite de detección, sin embargo, requiere una gran cantidad de material y más tiempo durante el procesamiento y la lectura de la muestra.

Para esta técnica, dependiendo del principio activo a cuantificar, se utilizan medios de cultivo específicos, selectivos o diferenciales (tabla 1.2). Las técnicas más utilizadas en el control de calidad de bioplaguicidas para el recuento de células viables son el recuento en superficie y el recuento en profundidad. Tanto el método de superficie como el de profundidad consisten en diluir la muestra original en un factor 1:10 hasta la dilución en la cual se pueda realizar un recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) (figura 1.6).

**Tabla 1.2.** Medios de cultivo y método de siembra más utilizados para el recuento del principio activo de bioplaguicidas a base de bacterias, hongos filamentosos y levaduras

Microorganismos principio activo	Medio de cultivo	Suplemento del medio de cultivo	Método de siembra
<i>Pseudomonas</i> spp.	Agar nutritivo	NA	Siembra en superficie / Siembra en profundidad
<i>Paenibacillus</i> spp. <i>Serratia</i> spp.	Agar Luria Bertani (LB)	NA	
Bacilos esporoformadores, (incluyendo <i>Bacillus thuringiensis</i> )	Agar LB	NA	Siembra en superficie / Siembra en profundidad
	Agar brain heart infusion (BHI)	NA	
<i>Trichoderma</i> spp.	Agar papa dextrosa (PDA)	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
	Agar Sabouraud dextrosa	NA	
	<i>Trichoderma</i> selective media (TSM)	NA	
	Agar rosa de bengala	NA	
<i>Beauveria</i> sp.	Agar PDA	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
	Agar avena	NA	

(Continúa)

(Continuación tabla 1.2)

Microorganismos principio activo	Medio de cultivo	Suplemento del medio de cultivo	Método de siembra
<i>Metarhizium</i> sp., <i>Isaria</i> sp., <i>Lecanicillium</i> sp.	Agar PDA	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
<i>Metarhizium rileyi</i>	Agar extracto de malta y levadura (YM)	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Agar PDA	Tritón X-100 (1 %)	Siembra en superficie
Levaduras (e.g. <i>Pichia onychis</i> )	Agar extracto de malta y levadura (YM)	Cloranfenicol	Siembra en superficie
	Agar levadura, peptona, dextrosa (YPD)	Cloranfenicol	
	Agar Sabouraud dextrosa	Cloranfenicol	

\*NA: No aplica.

Fuente: Elaboración propia

Para la cuantificación y determinación de la viabilidad de bioplaguicidas a base de bacterias, hongos filamentosos y levaduras, el método más utilizado es el recuento en superficie. Este método consiste en la colocación de 100 µl de cada una de las diluciones en cajas de Petri independientes que contengan el medio de cultivo gelificado. Los 100 µl en cada caja de Petri son extendidos (plaqueada) con ayuda de un rastrillo o con esferas de vidrio —en ambos casos el material debe estar estéril y a temperatura ambiente (figura 1.5)—. Una vez se hayan sembrado los 100 µl, las cajas de Petri se deben poner a incubar durante 3 a 7 días teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento que requiera el microorganismo a ser cuantificado (tabla 1.3).

**Tabla 1.3.** Condiciones de temperatura y tiempo de crecimiento de acuerdo con el principio activo del bioplaguicida, para su recuento en placa

Microorganismos principio activo*	Temperatura de crecimiento	Tiempo de incubación
Bacterias	30 °C ± 2 °C	24-48 horas
Hongos filamentosos	25 °C ± 2 °C	3-7 días

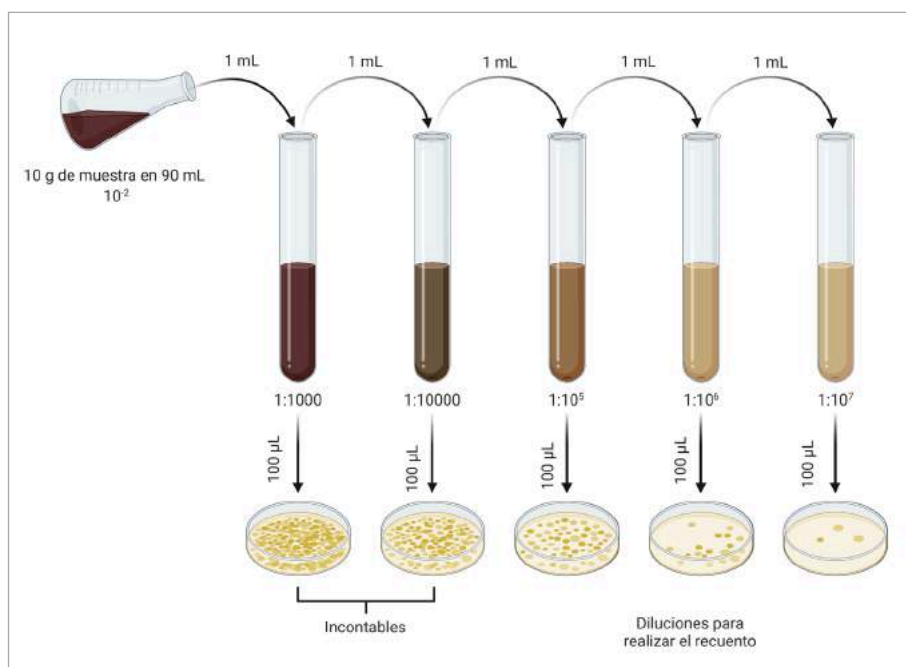
(Continúa)

(Continuación tabla 1.3)

Microorganismos principio activo*	Temperatura de crecimiento	Tiempo de incubación
Levaduras (por ejemplo: <i>Pichia onychis</i> )	28 °C ± 2 °C	48 horas

\*Grupos de microorganismos más utilizados como principio activo de bioplaguicidas. Pueden existir excepciones a las condiciones descritas.

Fuente: Elaboración propia



**Figura 1.5.** Viabilidad de principio activo (hongos y bacterias) de bioplaguicidas. Método de recuento en placa y siembra en superficie mediante diluciones en base 10.

Fuente: Elaboración propia

Con el fin de obtener una desviación estándar inferior al 10 %, se recomienda sembrar mínimo tres cajas de Petri por dilución. Después de que las colonias hayan crecido, se debe seleccionar la dilución en la cual las cajas de Petri contengan los rangos establecidos para cada tipo de principio, por ejemplo, entre 30 a 300 UFC para productos a base de bacterias (Inglis et al., 2012; Muñoz-Rojas et al., 2016). Para calcular el número de UFC presentes en la muestra, se multiplica por 10 el número de colonias presentes en la caja de Petri seleccionada para realizar el recuento. El resultado obtenido es multiplicado por el factor de dilución para obtener el número

de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml o UFC/g), como se describe en la ecuación 1.8.

$$\frac{UFC}{ml} \text{ o } \frac{UFC}{g} = \frac{\left( \frac{\text{Número de colonias contadas} \times 1}{\text{factor de dilución}} \right)}{\text{volumen sembrado}}$$

**Ecuación 1.8.** Cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC) por medio de método de recuento en placa - siembra en superficie (ISO 4833-1:2013).

## Caso de estudio II

Se realizó el recuento en placa de un bioplaguicida a base de *Trichoderma* spp. Para dicho fin se utilizó el método de siembra en superficie en Agar PDA suplementado con Tritón X-100 al 1 %. En la dilución  $10^{-6}$  se obtuvo un recuento de 156 UFC y en la dilución  $10^{-7}$  se obtuvo un recuento de 34 UFC.

**Dilución 1:**

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\left( \frac{156 \times 1}{10^{-6}} \right)}{0,1ml} = 1,56 * 10^9$$

**Dilución 2:**

$$\frac{UFC}{ml} \text{ o } \frac{UFC}{g} = \frac{\left( \frac{34 \times 1}{10^{-7}} \right)}{0,1ml} = 3,40 * 10^9$$

**Consolidado:**

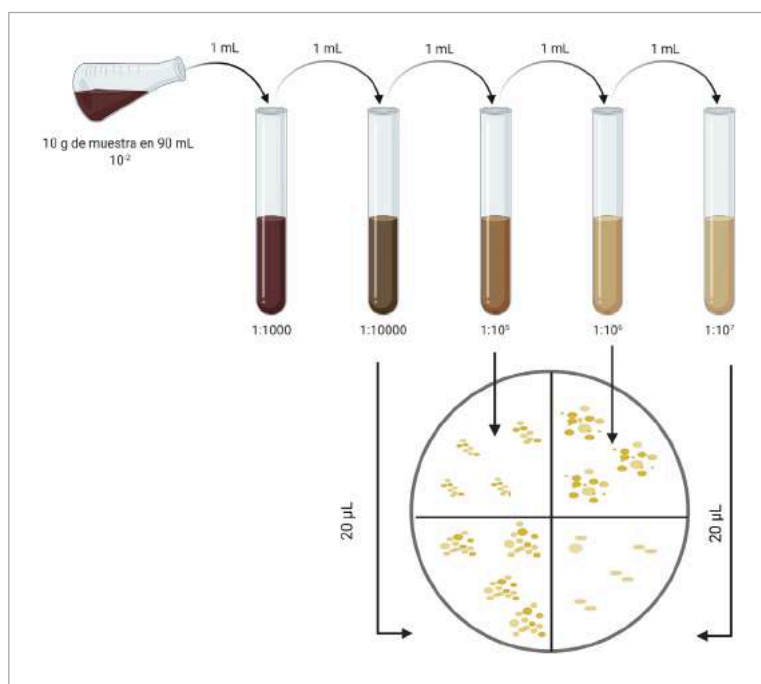
$$\frac{UFC}{ml} = \frac{1,56 * 10^9 + 3,40 * 10^9}{2} = 2,48 * 10^9 \approx 25 * 10^8$$

Para algunos productos a base de bacterias se utiliza el método de siembra en profundidad. Para esto, se agrega 1 ml de cada dilución en las cajas de Petri sin medio de cultivo, se adiciona una cantidad de medio de cultivo fundido (aproximadamente 20 ml) y se agita con suavidad, así se garantiza la homogenización de la muestra. Este método posibilita el crecimiento de bacterias microaerófilas, ya que permite el crecimiento de colonias a bajas concentraciones de oxígeno. El cálculo de las UFC se

realiza de la misma forma que el recuento en superficie; se realiza la corrección con el volumen de siembra (ecuación 1.8).

## Goteo en placa

La metodología de goteo en placa se utiliza en la determinación de la viabilidad de bioplaguicidas a base de bacterias y levaduras. El goteo en placa consiste en colocar 5 gotas de un volumen de 20  $\mu\text{l}$  de cada una de las diluciones seriadas en cajas de Petri con el medio de cultivo. Posteriormente, estas cajas se incuban bajo las condiciones establecidas para cada microorganismo y después del tiempo de incubación se realiza el recuento de las UFC. En general, para esta metodología se requiere el uso de 2 cajas de Petri para garantizar la correcta siembra de las diluciones seriadas, lo que permite aumentar el número de repeticiones y del tamaño de las muestras (figura 1.6) (Muñoz-Rojas et al., 2016). Con el fin de estimar el número de UFC /ml en cada una de las muestras, se debe cuantificar el número de colonias de acuerdo con la dilución seleccionada. Posteriormente, se correlaciona el volumen de 20  $\mu\text{l}$  con 1 ml con el fin de expresar el resultado en UFC /ml (Corral-Lugo et al., 2012).



**Figura 1.6.** Viabilidad del principio activo (hongos y bacterias) de bioplaguicidas. Método de goteo en placa.

Fuente: Elaboración propia

En el caso de hongos, el método de goteo en placa ha sido utilizado para la cuantificación de hongos dimórficos en su fase levaduriforme, ya que permite disminuir el tiempo y es igual de eficiente que el método de recuento en placa. Por ejemplo, Morales-García et al. (2016) seleccionaron la metodología de goteo en placa para ser utilizada como control de calidad en proceso para el hongo *Penicillium* spp., ya que no se presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre esta metodología en comparación con el método de siembra en superficie. Como recomendación para el proceso de implementación de este método, es importante definir el tiempo correcto de lectura con el fin de obtener resultados confiables y seguros.

*Recomendaciones para la evaluación de la viabilidad de bioplaguicidas a base de hongos filamentosos, levaduras y bacterias, mediante la metodología de recuento en placa en superficie o goteo en placa:*

- Para bioplaguicidas formulados como granulados (WG), polvo mojable (WP), polvo para espolvoreo y concentrados emulsionables (CE), la suspensión inicial se debe homogeneizar de manera adecuada. Se puede utilizar una licuadora de inmersión durante máximo 20 segundos o se puede dejar la suspensión inicial en agitación a 1500 rpm  $\pm$  25 rpm durante máximo 30 minutos.
- Para productos a base de bacterias esporoformadoras, el número de células vegetativas y esporas puede evaluarse realizando un choque térmico de 15 minutos a 80 °C  $\pm$  2 °C. Se cuantifica el número de células (antes del choque térmico) y el número de esporas (después del tratamiento térmico).
- Las diluciones seriadas se deben homogeneizar en vórtex durante aproximadamente 10 segundos.
- Para productos a base de hongos se recomienda utilizar un diluyente a base de un tensoactivo como Tween 80 o Tween 20 entre el 0,1 % y el 1 % v/v.
- Para productos a base de bacterias se recomienda utilizar solución salina como diluyente (0,9 % NaCl) o agua peptonada (0,1 %).
- Para expresar el resultado como UFC/g se debe realizar la corrección con la cantidad de muestra (gramos) utilizada en la suspensión inicial.

*Para el recuento de unidades formadoras de colonia UFC:*

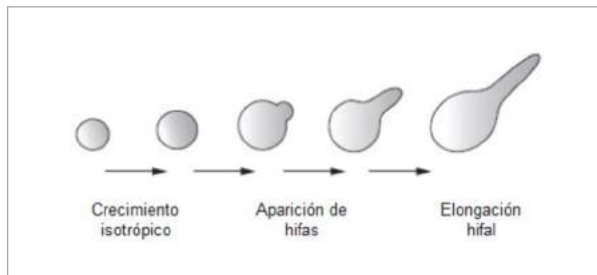
- Cuando tres cajas de Petri de una misma dilución contienen un número de unidades de colonia características del microorganismo a evaluar, se promedian los números y se multiplica por el inverso de la dilución.
- Cuando haya una caja de Petri con crecimiento extendido, ni esta ni su triplicado son considerados.
- Cuando hay cajas de Petri representativas en 2 diluciones seguidas, se promedia cada una con su triplicado, se aplica el factor de dilución a cada una y luego se promedia nuevamente.
- Si en las cajas de Petri no hay crecimiento de UFC (o no corresponden a las características del microorganismo), se debe reportar el resultado como:  $10^{-x}$  (dilución más baja utilizada) y se debe informar como valor estimado.
- El rango de recuento para bioplaguicidas a base de bacterias es de 30 a 300 UFC.
- El rango de recuento para bioplaguicidas a base de hongos es de 10 a 150 UFC.
- Cuando el número de colonias por caja de Petri exceda el rango establecido, se deben cuantificar las colonias en aquellas porciones de la caja de Petri que sean representativas de la distribución de colonias e informar como valor estimado.

## **Germinación de conidios**

Para productos a base de hongos filamentosos, la determinación de la germinación de conidios es el parámetro de viabilidad más utilizado dentro del control de calidad en el proceso y el producto terminado (Jenkins & Grzywacz, 2000). La germinación es el mecanismo mediante el cual una spora o conidio inactivo o en proceso de dormancia crece vegetativamente y es capaz de reproducirse de forma sexual o asexual (Sephton-Clark & Voelz, 2018).

Este proceso se da bajo condiciones ambientales favorables de oxígeno y disponibilidad de agua y se caracteriza por un rápido hinchamiento del conidio como resultado del proceso de hidratación. La infiltración de agua en los conidios por ósmosis aumenta su presión hidrostática interna y es seguida por la formación de un tubo germinal de paredes delgadas (Lacey, 2017). Generalmente, este proceso ocurre en cuatro etapas: crecimiento isotrópico o hinchazón, polarización celular, aparición

de hifas y elongación de hifas (Sephton-Clark & Voelz, 2018) (figura 1.7). En la etapa de crecimiento isotrópico se observa el proceso de hinchazón, ya que las esporas aumentan su contenido interno y, por lo tanto, reorganizan las paredes celulares. Las esporas también aumentan su actividad metabólica y pueden utilizar fuentes de energía externas o internas para iniciar procesos de transcripción y traducción de información genética. La polarización de la pared celular después de la hinchazón determina dónde emergerá el tubo germinal. En esta etapa, la pared celular requiere un proceso de ajuste ya que debe permitir el crecimiento de las hifas. Cuando las hifas emergen, crecen hasta formar lo que puede verse como una estera hifal o matriz en la cual las hifas pueden solaparse e incluso crecer hacia fuentes de luz o nutritivas (Sephton-Clark & Voelz, 2018).



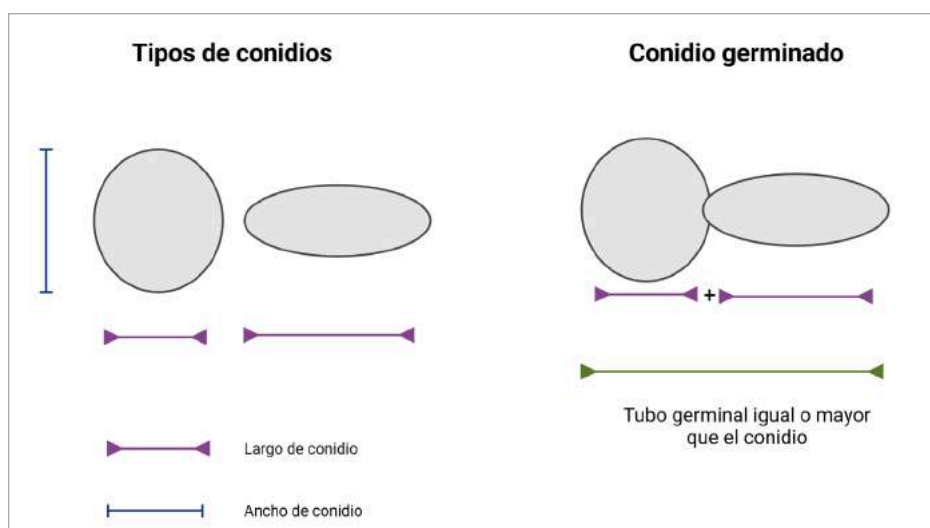
**Figura 1.7.** Proceso de germinación de conidios.

Fuente: Elaboración propia con base en Sephton-Clark & Voelz (2018)

En la actualidad, los conidios son el principio activo de casi el 75 % de los bioplaguicidas disponibles en el mercado (Zaki et al., 2020). Debido a esto, el protocolo para evaluar la germinación de los conidios es habitualmente la técnica más utilizada en el proceso de control de calidad de productos a base de hongos filamentosos. Sin embargo, existen diferencias y variaciones entre los protocolos descritos y, en general, no hay un método estandarizado en el mundo para evaluar esta característica. Algunos de los factores que influyen en la germinación de conidios son el pH y la composición de los medios de cultivo, la disponibilidad de agua, la temperatura de incubación, el proceso de hidratación de la célula y hasta la temperatura del diluyente utilizado (Lopes et al., 2013). Por esta razón, es importante establecer estos parámetros para el montaje de la prueba.

Para la evaluación de la germinación, la muestra a evaluar se diluye en diluciones seriadas en base 10 (1:10). Posteriormente, de las diluciones seleccionadas (una concentración aproximada de  $10^6$  conidios/ml) se siembran 100  $\mu$ l por medio de la técnica de superficie en el medio de cultivo elegido; las cajas de Petri inoculadas se

incuban aproximadamente durante 18 a 24 horas y trascurrido el tiempo de incubación, los conidios germinados y no germinados se cuantifican mediante observación en microscopio (Inglis et al., 2012). Se considera como conidio germinado cuando el tubo germinal es igual o más largo que el conidio no germinado (figura 1.8) (Faria et al., 2015; Oliveira et al., 2015).



**Figura 1.8.** Esquema representativo de tipos de conidios y de un conidio germinado con el respectivo tubo germinal. Dimensiones morfológicas (largo y ancho) de acuerdo con cada tipo de conidio.

Fuente: Elaboración propia

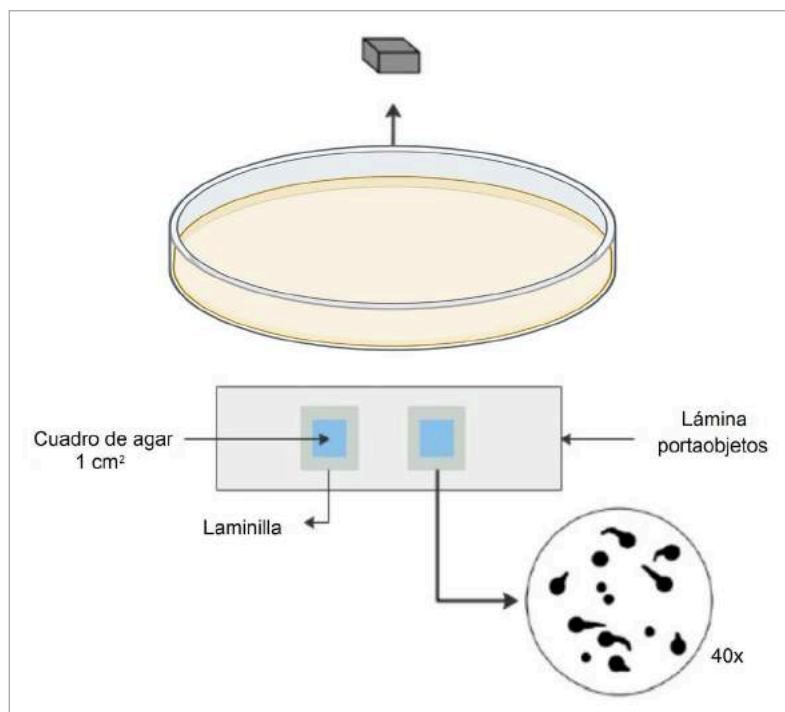
A continuación se describe la metodología implementada para la determinación del porcentaje de germinación en el control de calidad de bioplaguicidas a base de *Trichoderma* spp. (concentración teórica de  $10^9$  conidios/g) (Santos et al., 2012).

1. En primer lugar, hay que preparar una suspensión inicial adicionando 1 g o 1 ml de la muestra de conidios o del bioplaguicida a evaluar en una solución de 99 ml de Tween 80 al 0,1%.
2. En segundo lugar, hay que homogeneizar la suspensión anterior (dilución  $10^{-2}$ ) con una licuadora de inmersión o dejarla en agitación hasta que la dilución esté homogénea.
3. En tercer lugar, hay que realizar diluciones seriadas en base 10 hasta la dilución  $10^{-3}$ . Es fundamental evitar el contacto entre la micropipeta y el diluyente.

4. En cuarto lugar, hay que sembrar por triplicado 100  $\mu\text{l}$  de las tres últimas diluciones en las cajas de Petri con agar agua suplementado con benomil (0,0003 %). Además, hay que distribuir el contenido de manera homogénea sobre el medio de cultivo.
5. En quinto lugar, hay que incubar las cajas de Petri inoculadas a una temperatura de 25 °C durante 24 horas en un ambiente oscuro y ubicarlas dentro de la incubadora de manera invertida.
6. En sexto lugar, hay que cortar con un bisturí un trozo del medio de cultivo inoculado de aproximadamente 1  $\text{cm}^2$  y colocarlo sobre una lámina portaobjetos. Si se requiere, se debe adicionar una gota del reactivo azul de lactofenol y cubrir con una laminilla (figura 1.9).
7. En séptimo lugar, se procede a cuantificar los conidios germinados y no germinados en microscopio de luz (objetivo 40 $\times$ ). Como mínimo se deben contar 100 conidios (germinados y no germinados) por cada caja de Petri a evaluar.
8. Para el conteo de conidios germinados y no germinados se debe partir del extremo superior izquierdo del cuadrado (1  $\text{cm}^2$ ) del medio de cultivo y avanzar en forma de zigzag, para evitar el doble conteo de conidios.
9. Finalmente, se puede determinar el porcentaje de germinación de conidios mediante la siguiente fórmula (ecuación 1.9):

$$\text{Germinación(\%)} = \left( \frac{\sum \text{conidios germinados}}{\sum \text{conidios germinados} + \sum \text{conidios no germinados}} \right) \times 100$$

**Ecuación 1.9.** Cálculo del porcentaje de germinación de conidios.



**Figura 1.9.** Montaje de la prueba de germinación para el proceso de cuantificación de conidios germinados y no germinados.

Fuente: Elaboración propia

#### *Recomendaciones para la determinación del porcentaje de germinación de conidios:*

- Una densidad adecuada para la cuantificación de conidios está en el rango de  $10^6$  conidios. Idealmente, la caja de Petri a utilizar debe ser de un diámetro de 9 cm (referencia 90 mm \* 16 mm).
- Las condiciones de incubación (temperatura y tiempo) dependerán del microorganismo a evaluar.
- El medio de cultivo debe ser seleccionado para cada microorganismo. Se sugiere un medio de cultivo basal (agar agua); sin embargo, algunos hongos tienen requerimientos nutricionales especiales. Por ejemplo, para el proceso de germinación, *Metarhizium rileyi* requiere una fuente nutricional de nitrógeno y el medio de cultivo que se utiliza es agar extracto de malta (tabla 1.4).

**Tabla 1.4.** Medios de cultivo comúnmente utilizados para evaluar la germinación de conidios de hongos biocontroladores

Microorganismo principio activo	Medio de cultivo	Referencia
<i>Trichoderma</i> spp.	Agar agua + benomil (0,0003 %)	Santos et al. (2012)
	Agar agua	Kobori et al. (2014)
	Agar PDA	Sanogo et al. (2002)
	Caldo papa dextrosa	Hjeljord (2000)
	Caldo peptona (1 %)	Jackson et al. (1991)
<i>Beauveria</i> spp.	Agar PDA	Alves et al. (1996)
	Agar PDA + benomil (10 µl/l)	Oliveira et al. (2015)
	Agar PDA + carbendazima (10 µl/l).	Oliveira et al. (2015)
	Agar PDA + extracto de levadura (1g /l)	Fernandes et al. (2007)
	Medio de cultivo esporulación	Alves et al. (2002)
	Agar agua (2 % p/v)	
	Agar Czapeck Dox	Petlamul & Prasertsan (2012)
	Agar Sabouraud dextrosa + levadura (1 %)	Talaei-Hassanloui et al. (2007)
	Agar glucosa (1 %) + peptona (0,5 %) + Extracto de levadura (0,5 %)	Horaczek & Viernstein (2004)
Agar Sabouraud dextrosa	Kim et al. (2019)	
<i>Metarhizium</i> spp.	Agar extracto de levadura + benomil (0,005 g/l)	Faria et al. (2010)
	Agar PDA + extracto de levadura (1 g/L)	Rangel et al. (2005)
	Agar PDA + benomil (10 µl/L)	Oliveira et al. (2015)
	Agar PDA + carbendazima (10 µl/l).	Oliveira et al. (2015)
	Agar Sabouraud dextrosa	Ibrahim et al. (2015)
	Caldo medio mínimo (MM)	Lazzarini et al. (2006)
	Agar Czapeck Dox	Petlamul & Prasertsan (2012)
	Agar glucosa (1 %) + peptona (0,5 %) + extracto de levadura (0,5 %)	Horaczek & Viernstein (2004)
	Agar extracto de malta y levadura	Santos et al. (2017)

(Continuación tabla 1.4)

Microorganismo principio activo	Medio de cultivo	Referencia
<i>Metarhizium</i> spp.	Agar extracto de malta y levadura + benomil (0,00008 %)	Grijalba et al. (2018)
<i>Lecanicillium</i> spp.	Agar Sabouraud	Grijalba et al. (2018)
	Agar agua	Rivas et al. (2014)
	Agar Sabouraud, maltosa, extracto de levadura y neopeptona (SMAY)	Feng et al. (2002)
	Agar glucosa (2 %)	Shi et al. (2006)

Fuente: Elaboración propia

- Los medios de cultivo enriquecidos, como el agar papa dextrosa, contienen todos los nutrientes necesarios y las condiciones ideales para el proceso de germinación, lo que puede generar una sobrevaloración del porcentaje de germinación. En el caso contrario, cuando se utilizan medios de cultivo basales como el agar agua, las condiciones son mínimas y similares a las que se pueden presentar en condiciones de campo.
- El medio de cultivo a utilizar debe ser de un color traslúcido y debe ser agar de capa delgada (10 ml por caja de Petri), de manera tal que facilite la visualización de los conidios.
- Diferentes autores han sugerido la adición de fungicidas al medio de cultivo debido a que a bajas concentraciones generan una sincronización en el proceso de germinación y permiten realizar un recuento uniforme y en diferentes tiempos de lectura. Además, permiten la formación de tubos germinales, aunque previenen el desarrollo de hifas y evitan el crecimiento excesivo (Milner et al., 1991; Oliveira et al., 2015). El fungicida más utilizado es el benomilo y las concentraciones de uso generalmente son inferiores a 0,001 %. Sin embargo, este producto ya no tiene aprobación en varios países. Por lo tanto, es necesario seleccionar un fungicida registrado y disponible comercialmente que presente un efecto similar cuando se mezcle con el medio de cultivo. Por ejemplo, Oliveira et al. (2015) demostraron que el fungicida carbendazima (también del grupo químico benzimidazol) a una concentración de 10 µl por litro de medio de cultivo (0,005 g de ingrediente activo por litro de medio) puede usarse para evaluar la germinación de productos a base de *B. bassiana* y *M. anisopliae*.
- Se recomienda la adición de antibióticos al medio de cultivo, ya que evita el crecimiento de contaminantes bacterianos y facilita el recuento. Dentro de los antibió-

ticos más utilizados se destacan los de amplio espectro como el cloranfenicol, la tetraciclina, la estreptomycinina y la eritromicina.

- Para facilitar el recuento de conidios, se utiliza como colorante el azul de lactofenol pero se debe utilizar de forma moderada ya que puede causar una sobrestimación de los recuentos, pues elimina los conidios no germinados de las zonas de inoculación (Lopes et al., 2013).
- La laminilla o el cubreobjetos sobre el cuadro de agar seleccionado para el recuento debe colocarse de manera que no haya presión hidráulica sobre el medio de cultivo y no afecte la distribución de los conidios.

Además de la prueba de germinación, en algunas ocasiones es necesario evaluar el parámetro definido como vigor, el cual se relaciona con la velocidad de germinación de los conidios y el crecimiento de los tubos germinales (Faria et al., 2015). Esta metodología es útil en estudios de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento o en pruebas donde se evalúen condiciones de estrés. Los conidios con un alto nivel de vigor germinan entre las 18 y las 24 horas posteriores a la inoculación, mientras que la germinación de conidios estresados se puede retrasar y volver asincrónica, por lo cual puede tener lugar entre las 24 y las 72 horas (Faria et al., 2015). Sin embargo, la implementación de este parámetro depende de las características del producto y del interés de complementar la información y las recomendaciones del bioproducto.

La germinación de conidios se considera un indicador de la capacidad del hongo para producir un tubo germinal y, por lo tanto, generar un efecto biocontrolador. Una germinación rápida se relaciona con una mayor probabilidad de éxito en condiciones de campo, sin embargo, la alta germinación no garantiza altos valores de eficacia, por esta razón, las metodologías de viabilidad y actividad biológica son complementarias (Miranda-Hernández et al., 2016).

## **Contenido de contaminantes: pureza**

Las especificaciones en un bioplaguicida para determinar el nivel aceptable de contaminantes dependen del método de producción masiva, formulación y empaque. La producción masiva es el proceso más susceptible de verse perjudicado por una posible contaminación debido a que los contaminantes (bacterias u hongos), pueden crecer sin ningún tipo de restricción (Jenkins & Grzywacz, 2000). Todas las fermentaciones microbianas tienen un alto riesgo de contaminación debido a la alta

disponibilidad nutricional del sustrato y a las condiciones ambientales. La contaminación en los sistemas de fermentaciones, tanto líquidas como sólidas, afectará el rendimiento debido a la competencia por nutrientes y, en algunos casos, al efecto inhibidor de los metabolitos secundarios (Jenkins & Grzywacz, 2000). Además, los contaminantes bacterianos o fúngicos pueden afectar la concentración del principio activo en el producto final, en especial si la contaminación no ha sido monitoreada y cuantificada.

Para el caso de bioplaguicidas a base de virus, la contaminación microbiana puede ser el resultado del proceso de producción del principio activo. Teniendo en cuenta que su producción se realiza en condiciones *in vivo*, puede presentar una carga alta de microorganismos contaminantes presentes en las dietas utilizadas y en el insecto mismo (Caballero et al., 2001; Santos et al., 2014).

La metodología más utilizada para la cuantificación de contaminantes microbianos es la técnica de recuento en placa en superficie (numeral 1.3) y el resultado se expresa como UFC/g o UFC /ml de producto. Para cuantificar el total de contaminantes microbianos se deben cuantificar individualmente las bacterias, las levaduras y los hongos contaminantes. Posteriormente se realiza la sumatoria aplicando la ecuación 1.10. Este parámetro también se puede expresar en términos de porcentaje de pureza (ecuación 1.11).

$$\frac{UFC}{g} \text{ o } \frac{UFC}{ml} \text{ de bacterias} = \frac{UFC * \text{inverso de la dilución} * 10}{\text{peso de la muestra}}$$

$$\frac{UFC}{g} \text{ o } \frac{UFC}{ml} \text{ de levaduras} = \frac{UFC * \text{inverso de la dilución} * 10}{\text{peso de la muestra}}$$

$$\frac{UFC}{g} \text{ o } \frac{UFC}{ml} \text{ de hongos} = \frac{UFC * \text{inverso de la dilución} * 10}{\text{peso de la muestra}}$$

**Ecuación 1.10.** Cálculo de unidades formadoras de colonias (UFC) de contaminantes microbianos.

$$\text{Pureza}(\%) = \frac{UFC \text{ de contaminantes}}{UFC \text{ de principio activo} + UFC \text{ de contaminantes}} * 100$$

**Ecuación 1.11.** Cálculo del porcentaje de pureza para productos a base de agentes de control biológico.

El efecto de la contaminación microbiana en un bioplaguicida fue descrito por Meikle et al. (2012). Los autores evidenciaron que un bioplaguicida formulado a base de *B. bassiana* para el control de ácaros en colonias de abejas presentó resultados contradictorios en condiciones de campo. Las colmenas de abejas tratadas con el bioplaguicida murieron a un ritmo elevado, perdieron más peso y tuvieron una densidad de ácaros más alta en comparación con las colmenas utilizadas como control. Los autores identificaron que el bioplaguicida estaba contaminado con bacterias del grupo de *Pseudomonas fluorescens*. En condiciones de laboratorio se demostró que la cepa de *P. fluorescens* ralentiza o suprime el crecimiento de *B. bassiana*, comportamiento que se evidenció en condiciones de campo.

Por otro lado, patógenos para humanos como *Salmonella* spp. o *Escherichia coli* se pueden cuantificar por medio de las metodologías usadas para el análisis de alimentos o materias primas. Los niveles de presencia de estos patógenos deben ser estrictos y en algunos casos se exige que estén ausentes. Este parámetro en la actualidad no es obligatorio dentro de un programa de control de calidad rutinario pero se recomienda realizarlo en el proceso de desarrollo del producto y en el proceso de registro del mismo. Jenkins & Grzywacz (2000) recomiendan realizar un análisis de riesgo para determinar las posibles entradas en el sistema de este tipo de contaminante con el fin de garantizar la seguridad del producto cuando se aplique en condiciones de campo.

Para productos a base de virus, en algunos países solicitan la evaluación de especies de *Bacillus* spp., ya que puede ser un contaminante muy común en virus producidos *in vivo*, en especial cuando los insectos muertos se recolectan después de la muerte. Todas estas especies forman esporas, que son mucho más resistentes a la destrucción tanto por calor como por medios químicos que las células bacterianas vegetativas. Una de las bacterias más comúnmente encontrada en productos a base de NPV es *Bacillus cereus*, la cual puede ser aislada en agar nutritivo. Sin embargo, si otras especies son abundantes, la detección de pequeñas cantidades ( $10^{-1}$  a  $10^{-2}$  por ml) de *B. cereus* puede resultar difícil. Para estas situaciones, se recomienda utilizar medios de cultivo específicos para *B. cereus*. La identificación y confirmación se puede realizar mediante tinción o utilizando un perfil bioquímico.

Para establecer un nivel aceptable de contaminantes, se deben determinar niveles de referencia durante el proceso de fermentación, formulación y empaque del producto. A partir de esta carta control se generan los límites de aceptación para el producto final. Por esta razón y con base en los requisitos específicos para el registro comer-

cial, el productor es quien establece el límite y la pureza del producto. Sin embargo, en el ámbito internacional se reconoce un nivel máximo de 0,1 % de contaminantes en comparación con la concentración del principio activo (Ravensberg, 2011).

## Perspectivas

El aspecto central para lograr un buen control de calidad de un bioinsumo se centra en el establecimiento y estricto cumplimiento de los procedimientos o protocolos de control de calidad. Para el caso de las características microbiológicas, el elemento central consiste en que, una vez elegidos y establecidos los protocolos, estos se deben seguir de manera estricta sin importar las presiones externas ni internas en el desarrollo del producto. Si no se hace un estricto cumplimiento de estas metodologías, el sistema de control de calidad dejará de funcionar y los resultados no podrán garantizarse.

A pesar del uso y la proyección en el mercado que tienen los productos biológicos a base de agentes de control biológico, existe una gran variedad de protocolos para determinar las características microbiológicas. Por lo tanto, se requiere de un trabajo en conjunto entre los productores de bioinsumos, los investigadores y los entes reguladores en el establecimiento de requerimientos mínimos para los productos. Asimismo, es imperativa la generación de lineamientos y metodologías estandarizadas que sean aplicables en condiciones ambientales similares, de manera que sean repetibles y reproducibles. Otro de los desafíos está relacionado con que las metodologías implementadas sean prácticas, precisas, económicas y estén siempre basadas en desarrollos metodológicos que cumplan con los requerimientos científicos.

## Referencias

- Alves, S. B, Pereira, R. M., & Stimac, J. L. (1996). Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low, above-freezing temperatures. *Biocontrol Science and Technology*, 6(1), 575-582. <https://doi.org/10.1080/09583159631217>
- Alves, S. B, Rossi, L. S, Lopes, R. B., Tamai, M. A, & Pereira, R. M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 81(2), 70-77. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00147-7)

- Barrera, G. P., Murcia, J., Cerón, J. L., Cuartas, P. E., Guzmán, C. A., & Villamizar, L. F. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 24-31. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61514>
- Bioscience. (2018). *Identifying and resolving the sources of hemacytometer counting error through automation*. Bioscience.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Burges, H. D. (1998). *Formulation of microbial biopesticides*. Kluwer Academic Publishers.
- Caballero, P., Williams, T., & López-Ferber, M. (2001). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma.
- Caligiore-Gei, P. F., & Valdez, J. G. (2015). Ajuste de un método rápido para la cuantificación de suspensiones de esporas de *Fusarium* spp. en fitopatología. *Revista Argentina de Microbiología*, 47, 152-154. <https://doi:10.1016/j.ram.2015.03.002>
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y., Pazos-Rojas, L., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147-156.
- Cotes, A. M., Fargetton, X. & Köhl, J. (2018). Diseño conceptual, selección y prueba de concepto de microorganismos biocontroladores. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 594-628). AGROSAVIA.
- Díaz, A., Gómez, M., Grijalba, E., Santos, A., Cruz, F., León, D., Alarcón, E., & Cotes, A. (2018). Desarrollo y escalamiento de bioplaguicidas. En A. Cotes. (Ed.), *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas* (pp. 628-692). AGROSAVIA.
- Eberle, K. E., Wennmann, J. T., Kleespies, R. G., & Jehle J. A. (2012). Basic techniques in insect virology. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 15-74). Elsevier.

- Faria, M., Hotchkiss, J. H., Hajek, A. E., & Wraight S. P. (2010). Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(1), 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.011>
- Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., & Wraight, S. P. (2015). Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* 125(1), 68-72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>
- Feng, K. C., Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2002). Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 18(1), 217-224. <https://doi.org/10.1023/A:1014933229314>
- Fernandes, E. K., Rangel, D. E. N., Moraes, A. M. L., Bittencourt, V., & Roberts, D. W. (2007). Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96(1), 237-243.
- Glare, T., & Moran, M. (2016). *Microbial-based Biopesticides: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Gorsuch, J. P. & Woodruff, P. (2019). Nutrient germination improves DNA recovery from industrial *Bacillus subtilis* endospores during qPCR enumeration assays. *Heliyon*, 5(12), e02917. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02917>
- Graham, R. I., Tummala, Y., Rhodes, G., Cory, J. S., Shirras, A., Grzywacz, D., & Wilson, K. (2015). Development of a real-time qPCR assay for quantification of covert baculovirus infections in a major african crop pest. *Insects*, 6(3), 746-759. <https://doi.org/10.3390/insects6030746>
- Grijalba, E. P., Espinel, C., Cuartas, P. E., Chaparro, M. L., & Villamizar, L. F. (2018). *Metarhizium rileyi* biopesticide to control *Spodoptera frugiperda*: Stability and insecticidal activity under glasshouse conditions. *Fungal Biology*, 122(11), 1069-1076. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.08.010>
- Hernández, D., & Acebo, A. (2013). Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista Cenic Ciencias Biológicas*, 44(1), 1-18.
- Hjeljord, L. (2000). Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. *Biological Control*, 19(2), 149-160. <https://doi.org/10.1006/bcon.2000.0859>

- Horaczek, A., & Viernstein, H. (2004). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control* 31(1), 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.04.016>
- Ibrahim, L., Laham, L., Touma, A., & Ibrahim, S. (2015). Mass production, yield, quality, formulation and efficacy of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* conidia. *British Journal of Applied Science & Technology*, 9(5), 427-440. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4339.2484>
- Inglis, G., Enkerli, J., & Goettel, M. S. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi. Hypocreales. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 189-253). Elsevier.
- Jackson, A., Whipps, J. M., Lynch, J. M., & Bazin, M. (1991). Effects of some carbon and nitrogen sources on spore germination, production of biomass and antifungal metabolites by species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* antagonistic to *Sclerotium cepivorum*. *Biocontrol Science and Technology*, 1(1), 43-51. <https://doi.org/10.1080/09583159109355184>
- Jenkins, N., & Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents assurance of products performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6), 753-777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- Jenkins, N., & Grzywacz, D. (2003). Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures. En J. C. van Lenteren (Ed.), *Quality control and production of biological control agents: Theory and Testing Procedures*. CABI Publishing.
- Kim, J. C., Lee, M. R., Kim, S., Lee, S. J., Park, S. E., Baek, S., Gasmi, L., Shin, T. Y., & Kim, J. S. (2019). Long-term storage stability of *Beauveria bassiana* ERL836 granules as fungal biopesticide. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(2), 537-542. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.04.001>
- Kobori, N. N., Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Schisler, D. A., & Money, N. (2014). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 119(4), 179-190. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>
- Lacey, A. L. (2017). *Microbial control of insect and mite pests*. Elsevier.

- Lazzarini, G., Rocha, L., & Luz, C. (2006). Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycological Research*, 110(4), 485-492. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.12.001>
- Lopes, R. B., Martins, I., Souza, D. A., & Faria, M. (2013). Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *Journal of Invertebrate Pathology* 112(3), 236-242. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.010>
- Magoye, E., Pfister, M., Hilber-Bodmer, M., & Freimoser, F. M. (2020). Competition assays to quantify the effect of biocontrol yeasts against plant pathogenic fungi on Fruits. *Bio-Protocol*, 10(3), e3518. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3518>
- Meikle, W. G., Mercadier, G., Guermache, F., & Bon, M. C. (2012). *Pseudomonas* contamination of a fungus-based biopesticide: Implications for honey bee (Hymenoptera: Apidae) health and *Varroa mite* (Acari: Varroidae) control. *Biol Control*, 60(3), 312-320. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.12.004>
- Miele, S. A., Belaich, M. N., Garavaglia, M. J., & Ghiringhelli, P. (2011). Quality control of baculoviral bioinsecticide production. En I. Akyar (Ed), *Wide spectra of quality control* (pp. 411-428). IntechOpen.
- Milner, R. J., Huppertz, R. J., Swaris, S. C. (1991). A new method for assessment of germination of *Metarhizium* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57(1), 121-123.
- Miranda-Hernández, F., Angel-Cuapio, A., & Loera-Corral, O. (2016). Production of fungal spores for biological control. En A. Pandey, S. Negi & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (pp. 757-779). Elsevier.
- Morales-García, Y. E., Hernández-Canseco, J., Ramos-Castillo, G., Pérez-Terrón, R., & Muñoz-Rojas, J. (2016). Cuantificación de *Penicillium* sp. Por el método de goteo en placa. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 3(1), 12-19.
- Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y. E., Baez-Rogelio, A., Quintero-Hernández, V., Rivera-Urbalejo, A. P. & Pérez-Terrón, R. (2016). Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. En G. Chavira (Ed.), *Instituciones de educación superior la labor investigadora e innovadora en México* (pp. 67-84). Science Associated Editors.

- Oliveira, D., Pauli, G., Mascarin, G. M., & Delalibera, I. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *Journal of Microbiological Methods*, 119(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.021>
- Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2012). Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology*, 40(2), 111-116. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.2.111>
- Rangel, D., Braga, G., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2005). Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(1), 55-58. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.05.005>
- Ravensberg, W. (2011). Quality control. En J. Grould, K. Hoelmer, & J. Goolshy (Eds.), *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control products for control of arthropods* (pp. 129-197). Springer.
- Rivas, F., Núñez, P., Jackson, T., & Altier, N. (2014). Effect of temperature and water activity on mycelia radial growth, conidial production and germination of *Lecanicillium* spp. isolates and their virulence against *Trialeurodes vaporariorum* on tomato plants. *BioControl*, 59(1), 99-109. <https://doi.org/10.1007/s10526-013-9542-y>
- Sanogo, S., Pomella, A., Hebbar, P. K., Bailey, B., Costa, J. C. B., Samuels, G. J., & Lumsden, R. D. (2002). Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis perniciosus* on cacao. *Phytopathology*, 92(10), 1032-1037. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.10.1032>
- Santos, A., Brandão, P., & Villamizar, L. (2017). Efecto de estrés térmico y de irradiación con luz ultravioleta (UV-B) sobre características de *Nomuraea rileyi* Nm006. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 81-91. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.55943>
- Santos, A., García, M., Cotes, A. M., Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3), 150-156.

- Santos, A., Grijalba, E., Zuluaga, M., Gómez, M., & Villamizar, L. (2013). Compatibilidad in vitro de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae) con agroquímicos empleados en los cultivos de algodón y berenjena. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 132-142. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.38025>
- Schütz, G., Haltrich, D., & Atanasova, L. (2020). Influence of spore morphology on spectrophotometric quantification of *Trichoderma* inocula. *Biotechnique*, 68(5), 2-5. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0152>
- Sephton-Clark, P. C. S., & Voelz, K. (2018). Spore germination of pathogenic filamentous fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 112(1), 117-157. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.10.002>
- Sharga, B. M., & Feketa, V. (2018). *The estimation of the number of cells in suspension or culture using hemocytometer*.
- Shi, Z., Li, M., & Zhang, L. (2006). Effects of nutrients on germination of *Verticillium lecanii* (=Lecanicillium sp.) conidia and infection of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *Biocontrol Science Technology*, 16(1), 599-606. <https://doi.org/10.1080/09583150500532832>
- Siewewerts, S., De Bok, F. A. M., Mols, E., De Vos, W. M., & Van Hylckama Vlieg, J. (2008). A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), 275-278. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x>
- Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M. S., Little, S., & Mozaffari, J. (2007). Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(2), 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.09.009>
- Tyagi, S. , & Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 14, 303-308. <https://doi.org/10.1038/nbt0396-303>
- Zaki, O., Weekers, F., Thonart, P., Tesch, E., Kuenemann, P., Jacques, P. (2020). *Limiting factors of mycopesticide development*. *Biological Control*, 144(1), 104220. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104220>

