

## Control de calidad de los insecticidas microbianos

Orietta Fenández-Larrea Vega<sup>1</sup>

### Introducción

La calidad se define como un conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que lo hacen apto para satisfacer las necesidades para lo cual fue creado.

El control de calidad ha evolucionado con los años; a principios de siglo el capataz controlaba el trabajo del obrero, mientras que en la actualidad se han implementado sistemas de control de calidad que permiten la certificación de productos y procesos avalando la calidad total.

Un plaguicida biológico, al igual que cualquier otro producto debe cumplir con un proceso de control de calidad. La calidad de un insecticida microbiano puede regirse por las normas para la producción de entomófagos establecidas en la Reunión del Grupo Activo de Control de Calidad de la Organización Internacional de Control Biológico, celebrada en Dinamarca en 1992. Los tres tipos de control de calidad establecidos en esa reunión fueron:

- Control de la producción: seguimiento de la ejecución de todas las operaciones, procedimientos, equipos y condiciones ambientales de producción con el objetivo de mantener el rendimiento.
- Control de proceso: seguimiento de la calidad del producto no terminado, como la detección de contaminantes.
- Control del producto: seguimiento de la calidad del producto final.

### Control de calidad de insecticidas microbianos

La cantidad de un insecticida microbiano requerido para lograr el control de una plaga depende de la susceptibilidad de la plaga y de la potencia del producto. En los plaguicidas sintéticos, la potencia del producto es equivalente a la cantidad de ingrediente activo, pero en el caso de los insecticidas microbianos, se necesitan otros métodos para estimar su potencia.

En este aspecto, el primer paso fue establecer un criterio de estandarización sobre las unidades más apropiadas para medir el potencial insecticida microbiano.

En los inicios de la producción comercial de plaguicidas biológicos, el conteo de microorganismos viables constituía el único criterio, y se asumía que en el caso de la producción de toxinas, esta debía ser estable. Posteriormente, se demostró que esto resultaba un error y se consideró que la potencia hay que analizarla referida a su acción biológica. En la calidad del producto final se analizan la cantidad de esporas, conidios o unidades infectivas, la viabilidad, la virulencia y la pureza.

### Concentración de unidades infectivas

Para determinar la concentración de unidades infectivas presentes en el producto se realiza un conteo directo, para lo cual se emplean diferentes métodos.

- Conteo en cámara: se realiza usando un microscopio óptico y resulta un método muy eficaz, especialmente, cuando no es necesario usar el lente de inmersión. En este caso, el uso del contraste de fases facilita la visualización de las estructuras.
- Conteo de partículas en preparaciones teñidas fijas: es útil cuando se debe encontrar más de un tipo de partículas o cuando se necesita aceite de inmersión. Se coloca una gota de volumen conocido (0,01 ml) y se extiende en un área de 1 cm<sup>2</sup>. La película formada por la gota se seca, fija y tiñe, y se cuentan las partículas contenidas en el área marcada.
- Conteo electrónico: en este tipo de conteo se utiliza el equipo llamado "Coulter counter"; no obstante, es un equipo caro y su uso se justifica únicamente en la producción industrial. Se requieren cultivos puros porque el equipo cuenta las partículas de un tamaño determinado
- Conteo al microscopio electrónico: generalmente este método se utiliza con virus.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. La Habana, Cuba. ofllarea@inisav.cu

## Conteo de organismos viables

Se realiza a partir de diluciones seriadas de una suspensión de esporas o conidios, la cual posteriormente se siembran en cajas de Petri con agar. La siembra puede ser superficial o a profundidad. En el primer caso, la siembra se hace sobre el agar solidificado, añadiendo 0,1 ml de la suspensión, la cual se disemina con una espátula de “Drygalsky” estéril. Para el segundo caso se coloca 1 ml de la suspensión en el fondo de una placa estéril, a la cual se le agrega 10 ml del agar fundido y enfriado a 45 °C, se homogeneiza con cuidado y se deja hasta que el agar se solidifique.

Para ambos métodos se realiza la incubación a la temperatura y tiempo establecido para el microorganismo utilizado y se procede a contar las colonias. Se deben contar un mínimo de 400 colonias para minimizar el error.

## Análisis serológico

En el caso de *Bacillus thuringiensis*, este análisis se puede realizar mediante una reacción específica con antisuero del cristal tóxico, lo cual permite determinar la cantidad de toxina presente. En este caso el método resulta seguro y reproducible y se deben utilizar suspensiones puras de esporas y cristales. En algunos casos este análisis también permite conocer la especificidad según el tipo de cristal.

## Bioensayo

De todos los aspectos que deben considerarse para la certificación de la calidad de un plaguicida biológico, el bioensayo es el más importante. Este puede resultar un proceso laborioso y costoso pero hasta el momento, es la única forma segura de validar la calidad de un producto. Se han realizado muchos esfuerzos para encontrar marcadores indirectos que permitan obviar estas pruebas; sin embargo, ninguna a dado resultados exactos y en todos los casos, ha sido necesario corroborarlos con el bioensayo correspondiente.

Otro aspecto importante es la estandarización de estas pruebas, para lo cual es necesario considerar el mecanismo de acción del microorganismo sobre el objeto de control. Es muy importante seleccionar el objeto específico que se pretende controlar con el producto, así como las condiciones en la que se va a realizar la prueba.

La preparación de las muestras a evaluar, así como el análisis a que se van a someter influyen en los resultados obtenidos. El método debe ser lo más sen-

cillo posible, pero sobre todo fácil de replicar.

Los patrones o estándares de referencia deben estar bien conservados y su verificación es una premisa para la validación de las producciones.

Debido a la diversidad y variabilidad en el espectro de acción de los microorganismos utilizados para estos fines, e incluso de la especificidad de algunos de ellos sobre determinadas especies, es necesario tener insectos patrones para cada tipo de microorganismo y en algunos casos, también para diferentes cepas.

Los aspectos que se deben considerar en un bioensayo son: el mecanismo de acción del plaguicida biológico, el insecto u organismo objeto, la preparación de la muestra, el análisis de los resultados, la facilidad para replicar la prueba, la conservación y verificación de los patrones y el análisis de los resultados.

El bioensayo consiste en aplicar una dosis conocida del insecticida biológico sobre un número de insectos y medir su efecto, el cual comúnmente consiste en la muerte de éstos y el resultado se expresa como porcentaje de mortalidad. Se ha discutido la posible consideración de otros efectos como el tiempo en que demoran los insectos en morir, pero estos resultan más difíciles de interpretar.

Al evaluar un ámbito de dosis se obtiene suficiente información sobre la mortalidad y se puede determinar la dosis letal media, así como la potencia del preparado, a partir de la comparación con un patrón conocido.

## Controles de calidad durante los procesos

Como ya se ha mencionado, la calidad no sólo se refiere al producto final, también es necesario conocer el comportamiento de los diferentes parámetros durante el proceso.

El control de calidad comienza con la cepa e incluye las cepas de mantenimiento y la de producción. Para ambas hay que establecer métodos de conservación y mantenimiento. En el primer caso, es necesario garantizar la estabilidad por tiempos prolongados y entre los métodos más usados están la liofilización, suelo estéril y agar semisólido. Las cepas de trabajo se mantienen en cultivos con agar, empleando medios específicos para cada microorganismo. Estos cultivos se deben mantener en refrigeración, a temperaturas entre 4 y 10 °C.

En las cepas de producción se deben evitar los pases o reactivación sucesiva porque se puede perder la virulencia. Un método que se usa frecuentemente para reactivar la acción insecticida de las cepas es el pase por el insecto a que está dirigido el control, desde

el cual posteriormente se aísla nuevamente la cepa. En este caso debe verificarse su pureza y las características principales que la identifican, y por supuesto el restablecimiento de su actividad biológica.

El control de la pureza y la actividad biológica de las cepas debe realizarse con la frecuencia necesaria para garantizar que mantenga las condiciones por las cuales ha sido seleccionada.

La preparación del inóculo es uno de los pasos más importantes y su pureza debe corroborarse así como la concentración de células/ml y la viabilidad.

Antes de la inoculación de los medios de cultivos, independientemente del método de producción empleado, deben verificarse las condiciones de esterilidad, no sólo mediante observación visual, o al microscopio, sino mediante la siembra de una alicuota en medio nutritivo con agar. En el caso de la producción artesanal de plaguicidas biológicos, en los cuales se emplean varios contenedores, se toma una muestra representativa (2-5 %) del lote, o sea de los frascos que se preparan y esterilizan cada día.

Como norma de seguridad debe dejarse un frasco sin inocular, el cual se incuba en las mismas condiciones que se va a realizar la reproducción de los inoculados y se observa si hay presencia de algunos contaminantes.

Si la producción se realiza en equipos fermentadores, las muestras se toman antes de la inoculación y se someten a los mismos análisis. Es conveniente colocar la muestra de control en condiciones de agitación en una zaranda y al final de la fermentación comparar ambos resultados.

Durante el proceso, y dependiendo del método de reproducción, se establece un programa de muestras. Las muestras se observan al microscopio óptico, se determina el pH y se realizan los análisis químicos para determinar la calidad. En caso de que se determina que no cumple los parámetros establecidos, se detiene la producción, lo cual evita pérdidas mayores.

## **Materias primas**

No en todos los casos se dispone de materias primas certificadas, por lo cual cada nuevo lote debe ser sometido a un análisis físico y químico. Además durante el almacenamiento debe considerarse la temperatura, las condiciones y el tiempo en que pueden ser almacenadas las materias primas sin detrimento de su calidad. Cada tipo de producción debe seguir normas y regulaciones que garanticen la calidad de procesos y productos. En estas normas se exponen los paráme-

tros considerados para la calidad, así como las medidas a tomar cuando no se cumplen esas normas.

## **Control de la calidad de producción de plaguicidas biológicos en Cuba**

El registro junto con las normas y procedimientos para el control de la calidad de los procesos de producción y producto final constituyen la garantía para la validación de los plaguicidas biológicos.

La supervisión se realiza mediante procedimientos establecidos en las Normas y Programas Estatales, las cuales incluyen las técnicas que deben emplearse en cada caso y el procedimiento a seguir.

La revisión sistemática de estos controles la realiza el Sistema Estatal de Sanidad Vegetal. El Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV) garantiza la entrega de cepas certificadas y controla la calidad de los productos mediante un programa de recepción de muestras y visitas periódicas a los Laboratorios Provinciales de Sanidad Vegetal. Los laboratorios a su vez controlan y supervisan directamente a los centros productores, tanto biolaboratorios como plantas de producción. El no cumplimiento de las normas es sancionado por la Dirección General de la Sanidad Vegetal, lo cual puede llevar al cierre parcial del centro productor.

Los problemas más importantes para lograr el control de calidad se deben a la diversidad de alternativas de producción por métodos artesanales utilizados en los centros de producción. Esto requiere de una vigilancia y supervisión estricta y constante de parte del sistema que apoya la producción y uso de los plaguicidas biológicos en Cuba.

## **Literatura consultada**

- Meadows MP. 1993. Bt. *In the Environment Ecology and Risk Assessment*. Enstwistle. p. 193-213.
- Sharlene, R; Matew, R; Willam, S. 1993. Biological Pesticides and the U.E Environment Protection Agency. *In Advanced in Engineered pesticides*. Kim, L. Ed. p 321-337.
- Manual metodológico para la reproducción de entomófagos y entomopatógenos. 1990. Cuba, CNSV-INISAV. Ministerio de la Agricultura. 45 p.
- FAO. 1996. Small Scale Process of Microbial Pesticides. Agricultural Services Bulletin 96.90 p.