

---

**NORMA CUBANA**

**NC**

890: 2012

---

**SANIDAD VEGETAL — *BACILLUS THURINGIENSIS* —  
ESPECIFICACIONES**

Plant health — *Bacillus thuringiensis* — Specifications

---

ICS: 65.020.20

1. Edición    Diciembre 2012  
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.  
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio  
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

**NC 890: 2012**

## **Prefacio**

La Oficina Nacional de Normalización (NC) es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

### **Esta Norma Cubana:**

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización CTN 97 de “Sanidad Vegetal” integrado por especialistas de las siguientes instituciones.
  - Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal
  - Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas
  - Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical
  - Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical
  - Instituto Nacional de Higiene Epidemiología y Microbiología
  - Oficina Nacional de Normalización
- Esta norma fue elaborada a partir de los criterios de especialistas del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal y especialistas del Grupo Empresarial LABIOFAM, siguiendo los Lineamientos de producción de *Bacillus thuringiensis* H-14 ,1990.Organización Mundial de la Salud (OMS).

**© NC, 2012**

**Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:**

**Oficina Nacional de Normalización (NC)**

**Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.**

**Impreso en Cuba.**

## SANIDAD VEGETAL — *BACILLUS THURINGIENSIS* — ESPECIFICACIONES

### 1 Objeto

Esta Norma Cubana establece los requisitos de calidad del biopreparado entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* obtenido por los métodos artesanal y sumergido para el control de insectos y organismos que constituyen plagas agrícolas y para el control de vectores (mosquitos).

### 2 Referencias normativas

Los siguientes documentos de referencia son indispensables para la aplicación de este documento. Para las referencias fechadas, sólo es aplicable la edición citada. Para las referencias no fechadas, se aplica la última edición del documento de referencia (incluyendo cualquier enmienda).

- NC 796 Agricultura. Sanidad Vegetal. Términos y definiciones
- NC 72-02 Biotecnología Agrícola. Biopreparados de entomopatógenos. Métodos de ensayo. 1993
- NC 26-121:1993. Medicamentos no estériles. Determinaciones Microbiológicas

### 3 Términos y definiciones

A los fines de este documento, se aplican los términos y las definiciones establecidos en la Norma Cubana NC 796 y además los siguientes:

#### 3.1 entomopatógeno

provoca enfermedad en los insectos

#### 3.2 esporas

estadio morfológico de algunos grupos de bacterias que se caracterizan por resultar más resistentes que las formas vegetativas.

#### 3.3 cristales

toxina con estructura cristalina características de la especie *Bacillus thuringiensis* cuya formación está asociada al estadio morfológico de esporas.

#### 3.4 contaminación

especie de microorganismos no deseados que pueden aparecer durante el proceso de reproducción de la bacteria.

#### 3.5 cepa

organismo inicial de una población, obtenida a partir de un ancestro único. Todos sus descendientes poseen las características de la especie.

#### 3.6 lote

cantidad definida de un determinado producto, elaborado en condiciones que se presuponen uniformes.

NOTA A los efectos de esta norma se considera lote el total de producción obtenido como resultado de la inoculación de un día.

### 3.7 muestra ensayo

muestra conformada con alícuotas de diferentes frascos del bioplaguicida a analizar.

### 3.8 partida

Cantidad de producto despachado de una sola vez.

## 4 Símbolos y abreviaturas

L2 – larvas de 2<sup>do</sup> instar  
 L3 – larvas de 3<sup>er</sup> instar  
 CL<sub>50</sub> – Concentración Letal Media  
 UP – Unidades de Potencia  
 UFC – Unidades formadoras de colonias  
 mL – mililitros

## 5 Requisitos

### 5.1 Requisitos de higiene

Cumplir con los requisitos establecidos en las Ref. [7] y [8], además de los aspectos siguientes:

- El cuarto de siembra tiene que estar perfectamente limpio de manera que garantice buena esterilidad
- Para la realización de los trabajos es necesario el uso de gorro y bata sanitaria.
- Antes y después de manipular este microorganismo es necesario lavarse las manos con agua, jabón y posteriormente alcohol.
- Todos los frascos y utensilios utilizados estén contaminados o no serán esterilizados. También serán esterilizadas las ropas de trabajo. De manera alternativa, los frascos pueden ser lavados y desinfectados y serán autoclaveados solamente cuando se va a esterilizar el medio de cultivo.

### 5.2 Requisitos de calidad de la materia prima

**5.2.1 Requisitos del medio de cultivo:** El medio que se utilice estará estéril y no presentará partículas gruesas, espuma u otros signos que indiquen contaminación.

## 6 Requisitos de la cepa de *Bacillus thuringiensis*

Tabla 1—Requisitos de la cepa

Denominación	Pureza	Concentración (esporas/mL)	Virulencia (% mín)	Viabilidad (UFC/mL)
Cepa	No se admiten contaminaciones	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	80	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>

NOTA Para determinar la concentración de la cepa añadida al tubo 10mL de agua destilada estéril.

## 7 Disposiciones relativas a la calidad del biopreparado entomopatógeno

### 7.1 Requisitos mínimos

En las Tablas 2 y 3 se establecen los requisitos mínimos de calidad en dependencia del biopreparado y el método de propagación utilizado.

**Tabla 2—Requisitos de calidad. Biopreparados Thurisave**

Método de producción	Artesanal (sólido)	Sumergido
Concentración (esporas /g o mL)	$10^8$ - $10^9$	$10^8$ - $10^9$
Virulencia (%)	Mayor o igual a 70	Mayor o igual a 70
Pureza (UFC/mL contaminantes)	Menor o igual a $10^4$	Menor o igual a $10^4$
Viabilidad (UFC/mL)	$10^8$ - $10^9$	$10^8$ - $10^9$
Efectividad técnica	70-80	70-80
Color	Blanco crema	color crema a carmelita claro
Cristales	presentes	presentes

**Tabla 3—Requisitos de calidad. Biopreparado Bactivec**

Pruebas	Norma
Pureza microbiológica	Menor o igual $10^3$ bacterias/ml. Ausencia de estafilococos, estreptococos, pseudomonas, enterobacterias, clostridios y hongos
Inocuidad	Inocuo
Bioensayo	Mayor o igual 50% en 0.8 ppm
pH	6-8
Características organolépticas	Apariencia: Suspensión que homogeniza fácilmente, sin cuerpos extraños. Color: Gris con intensidad variable Olor: Característico

## 8 Inspección de aceptación

### 8.1 Método de inspección

Para la determinación sensorial de la pureza se realizará la inspección del 100% del lote. La presencia de olores extraños indica la existencia de contaminación aguda del biopreparado.

Para la determinación del resto de los requisitos de calidad se realizará la inspección, por muestreo de la manera siguiente:

- Determinación microscópica de la pureza, concentración y viabilidad, serán muestreados todos los lotes que integran una partida.
- Determinación de la virulencia y efectividad técnica, serán muestreadas todas las partidas una vez que hayan sido conformadas.

## 8.2 Plan de muestreo

El muestreo se realizará de forma aleatoria. Los frascos seleccionados para el ensayo serán previamente desinfectados con una solución desinfectante (alcohol al 70 %, Alcohol fenolado 9%, solución de fenol al 3%). Homogenizar vigorosamente antes de tomar la muestra.

### 8.2.1 Toma de muestra

Los biopreparados BACTIVEC y THURISAVE serán muestreados según presentaciones indicadas en las tablas 4 y 5, de resultar no confiables los resultados obtenidos se toma el doble de los frascos para efectuar una segunda prueba (reprueba)

**Tabla 4—Plan de Muestreo para los Biopreparados Bactivec y THURISAVE**

Presentación	Cantidad de frascos a muestrear	Cantidad de frascos a trabajar
30 mL	30	10 (prueba) 20 (reprueba)
1 L	15	5 (prueba) 10 (reprueba)
20 L	9	3 (prueba) 6 (reprueba)

Para la toma de la muestra de laboratorio se homogeniza bien cada frasco antes de tomar la misma y conformar la muestra de ensayo.

**Tabla 5—Muestra de ensayo BACTIVEC y THURISAVE**

Presentación	Volumen a Colectar x c/frasco (mL)	Volumen total de la muestra de ensayo (mL)
30 mL	10 mL	100 mL
1 L	50 mL	250 mL
20 L	1 L	3 L

**8.2.2** El tamaño de las muestras para ensayos de laboratorio será de 300 g para biopreparado sólido (THURISAVE)

**8.2.2.1** Producto sólido: Se toma una muestra de 300g proveniente de 6 contenedores del lote de producción, 50 g por contenedor, se mezclan bien y se envasan en bolsa sellada y etiquetada convenientemente.

## 9 Tolerancias de calidad

### 9.1 Pureza Microbiológica

Se establece para determinar la ausencia en las muestras ensayadas de cualquier microorganismo que no sea el que constituye el producto, al enfrentarlos a medios de cultivos específicos para la

determinación de bacterias, hongos, levaduras y la observación microscópica. Así como comprobar si cumplen con los límites microbianos establecidos en la NC 72-02 y NC 26- 121.

Esta incluye:

- Tinción de Gram
- Observación en la tinción con violeta cristal y de las características típicas de la especie *B. thuringiensis* al microscopio óptico 1000X
- Determinación del nivel de contaminantes
- Utilización de medios de cultivos específicos para la determinación de bacterias, hongos, levaduras. Siembra en medio líquido: Medio tioglicolato y caldo soya tristoná. Siembra en medios sólidos: agar soya – triptoná y agar sabouraud dextrosa.
- Determinación de microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella sp* y *Escherichia coli*, *Streptococcus*.

### 9.2 Conteo en Cámara de Neubauer

El objetivo es determinar la concentración de esporas, lo cual permite inferir de forma aproximada la concentración de cristales tóxicos (1 espóra / 1 cristal).

### 9.3 Conteo de viables en medio Agar Nutriente

El objetivo es determinar la concentración de esporas viables.

### 9.4 Inocuidad inespecífica

Este método se establece para determinar que el biopreparado es inocuo, para ello son inoculados  $10^6$  esporas/ml en ratones

### 9.5 Bioensayo

El bioensayo se realiza según el tipo de producto y la plaga a la cual va dirigido, ya que existen relaciones de especificidad Cepa-Patotipo.

El objetivo es determinar la patogenicidad y virulencia del producto sobre la plaga que va a ser aplicado. Ver tabla 6.

**Tabla 6—Criterios de análisis**

Concentración	Tiempo de la prueba (horas)	% de virulencia
$10^6$	72	50-60
$10^7$	72	60-80
$10^8$	72	70-85
$10^9$	72	80-95

Cuando el producto no cumpla con los parámetros de actividad biológica establecidos, se considerara que el producto NO está apto para su uso.

## 9.6 Potencia Biológica

La potencia insecticida de *Bacillus thuringiensis* se determina mediante ensayos biológicos y éstos se basan en el sistema de unidades internacionales, que no es más que la actividad biológica del complejo de esporas y cristales proteicos sobre un insecto específico. Las Unidades Internacionales de Potencia (U.I.P.) se relacionan con una formulación de *B. thuringiensis* internacional al que se atribuye arbitrariamente una proteína específica de 1000 U.I./mg.

## 9.7 Determinación de la CL<sub>50</sub>

Mediante análisis Probit que utiliza la mortalidad transformada a su correspondiente valor Probit contra el logaritmo (base 10) de la concentración de *B. thuringiensis* (como variable independiente) para efectuar el análisis de regresión y obtener las concentraciones letales con sus límites de confianza (95%) respectivos.

## 10 Disposiciones sobre la presentación

### 10.1 Homogeneidad

Suspensión que homogeniza fácilmente, sin cuerpos extraños. En caso de producto sólido presencia de partículas de sustrato.

### 10.2 Envasado

Los envases y las tapas cumplirán lo establecido en las tablas 7 y 8.

#### Envase para biopreparados THURISAVE

Producto obtenido por método artesanal (sólido): se utilizarán bolsas de 1kg de capacidad.

Producto obtenido por método sumergido: Se utilizarán frascos plásticos de 1L, 5 L y 20 L de capacidad.

En ambos casos el envase estará limpio y sin residuos de sustancias que puedan dañar o contaminar el producto, la tapa del envase permitirá el cierre hermético.

#### Envase para el biopreparado BACTIVEC

Fracos plásticos de 1L, 5L y 20L de capacidad

##### 10.2.1 Descripción de los envases

**Bolsas de 1Kg:** bolsas de polietileno de baja densidad, tubular, blanca, opaca; sellada por un extremo con una resistencia como mínimo de 7,0 MPa; impresa a 3 colores.

- Longitud de la bolsa (mm):  $270 \pm 1,0$
- Ancho de la bolsa (mm):  $300 \pm 0,6$
- Espesor de la película ( $\mu\text{m}$ ):  $100 \pm 0,015$

## Envases Plásticos de 1 L, 5 L y 20 L:

Tabla 7—Sobre especificaciones de los envases

Especificaciones	ENVASE		
	Frasco plástico de 1 L	Tanque plástico de 5 L	Tanque plástico de 20 L
<b>Tipo de material y características</b>	Polietileno, polipropileno, policarbonato, de alta densidad de soplado PEAD, color natural, 100 % virgen.	Polietileno, polipropileno, policarbonato, de alta densidad de soplado PEAD, color natural, 100 % virgen.	Polietileno, polipropileno, policarbonato, de alta densidad de soplado PEAD, color natural, 100 % virgen.
<b>Peso neto</b>	53 ± 2 g	230 ± 10 g	750 ± 20 g
<b>Peso bruto</b>	-	310 g - 330 g	1440 g – 1500 g
<b>Volumen nominal</b>	1000 mL	5000 ± 25 mL	20 000 mL
<b>Estanqueidad</b>	Buena	Buena	Buena
<b>Especificaciones</b>	<b>Frasco plástico de 1 L</b>	<b>Tanque plástico de 5 L</b>	<b>Tanque plástico de 20 L</b>
<b>Cierre de la tapa</b>	Buena	Buena	Buena
<b>Dimensiones</b>	Diámetro interior del cuello: 22 ± 0.2 mm Altura: 256 ± 1 mm Diámetro máximo: 81.5 ± 0.5 mm	Diámetro interior del cuello: 29.2 ± 0.5 mm Altura: 295 ± 1 mm Ancho: 125 ± 1 mm Largo: 185 ± 1 mm	Diámetro interior del cuello: 58 mm Altura: 376 ± 2 mm Ancho: 235 ± 2 mm Largo: 290 ± 2 mm
<b>Manipulación y conservación</b>	La manipulación debe ser cuidadosa. No debe estar expuesto a los rayos ultravioletas, ni a temperaturas por encima de 50°C por tiempo prolongado. La estiba máxima debe ser de 2 estibas.		

## Tapas para Envases Plásticos de 1 L, 5 L y 20 L:

Tabla 8—Sobre especificaciones de las tapas

Especificaciones	TAPAS		
	Frasco plástico de 1 L. Modelo 314	Tanque plástico de 5 L	Tanque plástico de 20 L
<b>Tipo de material y características</b>	Tapa Toli de polietileno de baja densidad de inyección PEBD, color rojo y rosado. Formulación: 100 % virgen, más entre un 2 y 3 % de master Bach.	Polietileno de alta densidad de inyección PEAD. Color natural Formulación: 100 % virgen	Tapa roscada de polietileno de alta densidad de inyección PEAD, de color natural, con lyner incorporado, con sello de inviolabilidad.
<b>Peso neto</b>	3 g	5,5 g	20 g
<b>Estanqueidad</b>	Buena	Buena	Buena
<b>Cierre de la tapa</b>	Buena	Buena	Buena
<b>Dimensiones</b>	Dimensión de la tapa: 34 mm	Diámetro máximo de la tapa: 47.5 mm	Diámetro máximo: 72,8 mm

	Diámetro del obturador: 22,3 mm Altura: 15,1 mm	Altura: 26.2 mm.	Altura: 29,5 mm
<b>Manipulación y conservación</b>	La manipulación debe ser cuidadosa. No debe estar expuesto a los rayos ultravioletas, ni a temperaturas por encima de 50°C por tiempo prolongado.		

**Precinto de la Tapa para Envase de 20 L:** Para envase complementario de 20 L, de polietileno de alta densidad de inyección PEAD, de color natural.

- **Peso neto:** 1 g.
- **Dimensiones:** Largo: 108,7 mm, Altura: 19,3 mm.

## 11 Marcado y etiquetado

- Naturaleza del producto
- Identificación
- Origen del producto
- Identificación Comercial

### 11.1 Etiquetas

- Etiquetas de papel bond blanco estucada, peso básico de 85 a 90 g/m<sup>2</sup>, impreso a tres colores. Según pantone verde 354C, amarillo y negro.
- Las cajas de envase serán sin impresión gráfica, solo las obligatorias: copa, flecha indicando verticalidad, paragua.
- En la solapa inferior debe aparecer el sello de reciclable y el modelo del cual se trate.
- Franja de color correspondiente con la categoría toxicológica si procede.
- Símbolos, palabras de advertencia y colores que se deben corresponder a la categoría toxicológica: LIGERAMENTE TOXICO: la palabra PRECAUCION. (Color azul).
- Nombre comercial.
- Formulación, concentración y composición del formulado.
- Nombre del Centro Nacional de Toxicología con sus teléfonos de emergencia para solicitar información sobre toxicidad y tratamiento médico.

### 11.2 La información contenida en la etiqueta se agrupará de la siguiente forma:

- Identidad del producto.
- Instrucciones para su uso.
- Protección de la salud humana y del ambiente.

## 12 Transportación, manipulación, almacenamiento y conservación

### 12.1 Transportación y manipulación

El producto se transportará en cualquier tipo de vehículo, separado de otros productos que puedan contaminarlo y siempre que el vehículo esté limpio, fresco y protegido de las radiaciones solares.

## 12.2 Almacenamiento y conservación

- Se almacenará en lugar que esté limpio, fresco y protegido de las radiaciones solares.
- Conservación productos sólidos Thurisave: estables entre 3 meses a 4 meses a temperaturas < 25°C.
- Conservación productos líquidos Thurisave: 6 meses a temperatura 25-30°C.
- Conservación del Bactivec: 2 años a temperatura de 4 hasta 30 °C.

### Bibliografía

- [1] NC 72-03 Biotecnología Agrícola. Biopreparado de entomopatógeno *Verticillium Lecanii*. Especificaciones. 1993
- [2] NC 72-04 Biotecnología Agrícola. Biopreparado de entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Especificaciones. 1993
- [3] NC 72-05. Biotecnología Agrícola. Biopreparado de entomopatógeno. *Beauveria bassiana*. Especificaciones. 1993
- [4] U. S. P. 26 pág. 2006 Año 2003. Ensayo Límite Microbiano.
- [5] Tecnología de Producción de Bactivec, 2003 Grupo Empresarial LABIOFAM
- [6] *Bacteries Entomopathogenes. Institut Pasteur. 24 fev 98 10:56 Bact Entomopath.*
- [7] *Guidelines for production of Bacillus thuringiensis y Bacillus sphaericus 1990.*
- [8] Formas de obtención de controladores biológicos microbianos para su uso en el sistema de producción agrícola del MINAG, Ciudad de La Habana, 2010, Grupo de Tecnologías de Producción de bioplaguicidas y artrópodos benéficos, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). ISBN 978-959-7194-37-8.