



Evaluación de parámetros para la producción del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en fermentación líquida

Carlos Andrés Moreno Salgüero

Universidad Nacional De Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

2017

Evaluación de parámetros para la producción del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en fermentación líquida

Carlos Andrés Moreno Salguero

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

Dra. en Ingeniería. Liliana Serna Cock

Codirectores:

Dr. en Ciencias, Biotecnología. Norberto Chavarría Hernández

Ph. D. en Entomología. Alex Enrique Bustillo Pardey

Línea de Investigación:

Protección de Cultivos

Universidad Nacional De Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ACTA DE JURADO DE TESIS
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN PROTECCIÓN DE CULTIVOS

En Palmira a los 08 días del mes de junio de 2016, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los investigadores DANIEL URIBE VELEZ y EYDER DANIEL GOMEZ LOPEZ.

Para calificar la Tesis de Grado de:

CARLOS ANDRÉS MORENO SALGUERO

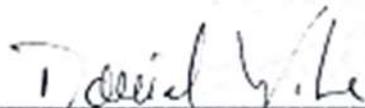
Titulada:

'Evaluación de parámetros para la producción del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en fermentación líquida', bajo la dirección de los Investigadores Alex Enrique Bustillos Parley, Norberto Chavarría Hernández y Lilia Serna Cock.

Después de terminada la sustentación, el jurado evaluador compuesto por los investigadores DANIEL URIBE VELEZ y EYDER DANIEL GOMEZ LOPEZ, mediante deliberación privada decidieron calificar la Tesis como:

APROBADA

REPROBADA


DANIEL URIBE VELEZ


EYDER DANIEL GOMEZ LOPEZ

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi padre José Vicente Moreno Aguirre y al amor entrañable de mi madre Blanca Aliria Acevedo E.

Agradecimientos

Al Dr. Alex Enrique Bustillo Pardey por aportar a mi formación en la investigación entomológica y su confianza en mi labor profesional.

Al Dr. Norberto Chavarría Hernández por guiar el presente trabajo de investigación y aportar a con su vasta experiencia a mi conocimiento.

Al Ing. Jades Jiménez por compartir su experiencia y contribución para la ejecución del presente trabajo de investigación.

A la Dra. Liliana Serna Cock por poner a disposición el laboratorio de Bioconversiones de la UN Palmira, por el seguimiento y asesoría técnica brindados al proyecto.

A la Dra. María del Rosario Manzano por la constante y oportuna motivación.

Al Dr. German Vargas y a la Dra. Tatiana Daza, investigadores de Cenicaña, por poner a disposición los laboratorios de entomología y microbiología industrial.

A la Corporación Centro de Investigación en Palma de Aceite (Cenipalma) y a Colciencias por el financiamiento del presente trabajo investigación.

Al Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, por la grata acogida en sus instalaciones.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira por la habilitación de espacios y equipos.

A la empresa Productos Biológicos Perkins LTDA, por el apoyo logístico y aporte del material biológico.

Al Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia (Cenicaña) por permitir el uso de sus instalaciones y equipos.

A quienes participaron y/o apoyaron las diferentes actividades del proyecto; Yoan Camilo Guzmán, Carlos Andrés Rengifo, Claudia Ximena Rosero, Milena Jiménez y Gladis Urbano. Esta sección es opcional, en ella el autor agradece a las personas o instituciones que colaboraron en la realización del trabajo. Si se incluye esta sección, deben aparecer los nombres completos, los cargos y su aporte al trabajo.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VI
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas.....	¡Error!
Marcador no definido.V	
Introducción.....	1
Hipótesis.....	3
Objetivos.....	4
1. CAPITULO 1. MARCO CONCEPTUAL.....	5
1.1. Clasificación y filogenia de los nematodos entomopatógenos.....	5
1.2. Generalidades del género <i>Photorhabdus</i>	5
1.3. Complejo nematodo-bacteria.....	7
1.4. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos.....	8
1.5. Potencialidades en el control biológico de artrópodos plaga.....	10
1.6. Tecnologías para la producción de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotes.....	11
1.6.1. Sistemas <i>In vivo</i>	11
1.6.2. Sistemas <i>In vitro</i>	11
1.7. Parámetros adicionales para la fermentación líquida de nematodos entomopatógenos.....	17
1.8. Estado del arte	19
1.9. Bibliografía.....	20
2. CAPITULO 2. AISLAMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS ASOCIADOS AL AGROECOSISTEMAS DE LA PALMA DE ACEITE.....	31

2.1. Introducción.....	31
2.2. Metodología.....	31
2.2.1 Multiplicación del nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco)....	32
2.3. Resultados.....	33
2.3.1 Aislamiento del nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis</i> sp (Tumaco) a partir de plantaciones comerciales de palma de aceite.	33
2.3.2. Multiplicación <i>In vivo</i> y mantenimiento de nematodos entomopatógenos.....	33
2.4. Bibliografía.....	35
3. CAPÍTULO 3. CICLO DE VIDA, RENDIMIENTO Y PATOGENICIDAD DE <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) EN CULTIVO MONOXÉNICO SÓLIDO.....	37
3.1. Introducción.....	37
3.2. Metodología.....	37
3.2.1. Aislamiento del simbiote bacteriano.....	37
Aislamiento de <i>Photorhabdus</i> sp. a partir hemolinfa de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas con <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco).....	37
Aislamiento del simbiote bacteriano <i>Photorhabdus</i> sp. a partir de juveniles infectivos de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco).....	37
3.2.2. Almacenamiento y conservación de <i>Photorhabdus</i> sp.	39
3.2.3. Patogenicidad de <i>Photorhabdus</i> sp. <i>G. mellonella</i>	39
3.2.4. Establecimiento de cultivo monoxénicos de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) en medio sólido.	40
3.2.5. Ciclo de vida de <i>Heterorhabditis</i> sp (Tumaco).....	41
3.2.6. Medición de la patogenicidad de JI producidos en cultivo <i>In vitro</i> contra <i>G. mellonella</i> L.....	42
3.3. Resultados.....	43
3.3.1. Aislamiento de <i>Pothorhabdus</i> sp. simbiote bacteriano de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco).....	43
3.3.2 Almacenamiento y conservación de <i>Photorhabdus</i> sp.	43
3.3.3. Establecimientos de cultivos monoxénicos de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) en medio sólido.	44

3.3.3.1. Cultivos monoxénicos inoculados con huevos extraídos de hermafroditas de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco).....	44
3.3.3.2. Cultivos monoxénicos inoculados con JI de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco).....	45
3.3.4. Ciclo de vida de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) medio sólido.....	47
3.3.5. Patogenicidad de <i>Photorhabdus</i> sp. en <i>G. mellonella</i>	49
3.3.6. Patogenicidad <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) producido en cultivo <i>In vitro</i> contra <i>G. mellonella</i> L.	51
3.4. Bibliografía.....	52
4. CAPITULO 4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL SUSTRATO SOBRE EL RENDIMIENTO DE <i>Heterorhabditis</i> sp (Tumaco) EN CULTIVO SEMISÓLIDOS.....	54
4.1. Introducción.....	54
4.2. Metodología.....	54
4.2. Resultados.....	56
4.3. Bibliografía.....	58
5. CAPITULO 5. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA AGITACIÓN, LA GEOMETRÍA DEL FERMENTADOR Y LA COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO SOBRE EL DESARROLLO DEL NEMATODO ENTOMOPATÓGENO <i>Heterorhabditis</i> sp. (TUMACO) A NIVEL DE MATRAZ.....	60
5.1. Metodología.....	60
5.2. Resultados.....	63
5.3. Bibliografía.....	66
6. CAPITULO 6. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE AGITACIÓN Y OXIGENACIÓN EN EL DESARROLLO DEL COMPLEJO NEMATODO-BACTERIA EN SUSTRATO LÍQUIDO EN BIORREACTORES DE LABORATORIO.....	67
6.1. Introducción.....	67
6.2. Metodología.....	67
6.3. Resultados.....	71
6.4. Bibliografía.....	84

Resumen

Los nematodos entomopatógenos (NEP) constituyen una herramienta potencial en programas de control biológico aumentativo, no obstante una limitante para su implementación es la disponibilidad comercial. Se hace necesario implementar tecnologías novedosas que permitan optimizar la producción de estos biocontroladores con fines comerciales. El objetivo del presente estudio fue determinar parámetros de fermentación líquida en la producción del nematodo entomopatógeno, *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) para el control de insectos barrenadores de la palma de aceite. El nematodo se aisló de plantaciones comerciales de palma de aceite con incidencia de *Rhynchophorus palmarum* y *Sagalassa valida* en el occidente del departamento de Nariño, Colombia. Para la multiplicación *In vitro* se evaluaron dos medios de cultivo (en cajas Petri): ANH, formulado con hígado de pollo (10 % p/v), aceite de maíz (2,0 % v/v), agar nutritivo (2,3 % p/v) y ANY, formulado con yema de huevo deshidratada (1,25 % p/v), extracto de levadura (2,3 % p/v), NaCl (0,5 % p/v), aceite de maíz (2 % v/v), agar nutritivo (2,3 % p/v). En todos los casos se inoculó el simbiote bacteriano 48 h antes de inocular los JI o huevos en estado de mórula (100 por caja Petri). El medio ANH, inoculado con JI, permitió expresar el mayor potencial reproductivo, el ciclo de vida se desarrolló en dos ciclos cortos cada uno de siete días, con factor de multiplicación 1:100, se realizaron cinco cultivos sucesivos en el tiempo, en cada uno se inoculó con JI producidos en el cultivo anterior al mismo. Se observó un progresivo decrecimiento en la tasa de multiplicación, pero la patogenicidad de los JI sobre larvas de *Galleria mellonella* L. se mantuvo constante. Con los resultados obtenidos se escaló el sistema a unidades plásticas de 1 L en cultivo semisólido, el medio se formuló con: hígado de pollo 10 % (p/v), carboximetilcelulosa 1 % (p/v), aceite de maíz 4 % (v/v), caldo nutritivo 1,3 % (p/v), trozos de espuma de poliuretano 5,6 % (p/v). Cada unidad se inoculó con crecimiento bacteriano (16 % v/v) y 48 horas después se adicionaron 200.000 JI. Después de ocho días se obtuvieron en promedio $3'500.000 \pm 500.000$ JI, equivalente a 21.340 JI/gr de medio. Los JI producidos causaron 100 % de mortalidad en larvas de *G. mellonella* en último instar. Los medios sólidos se modificaron a medios líquidos y se evaluó cada uno en tres recipientes: matraz de 250 ml, frascos cilíndricos de 7 cm x 4,5 cm y de 10,4 cm x 5,8, agitación de 130 y 180 rpm. El medio compuesto de yema de huevo, en los recipientes de 7 cm x 4,5 cm y 180 rpm, permitió obtener un rendimiento de 17.800 JI por ml en 25 días. Para el escalado se utilizó un fermentador de 1,3 L, con un volumen efectivo de trabajo de 0,9 L; se evaluó el efecto combinado de la agitación, la aireación en el desarrollo del complejo nematodo-bacterias. La interacción; 250 rpm (durante el crecimiento de las bacterias) -200 rpm (después de adicionar los JI) y aireación de 1 Lpm, permitió el crecimiento de *Photorhabdus* sp. en fase I durante 144 h, no obstante se limitó el desarrollo de los nematodos. Los avances fueron promisorios, y generan la base para estudios posteriores.

Palabras clave. Cultivo *In vitro*, biocontroladores nativos, biorreactor, palma de aceite.

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (basado en Chice <i>et al.</i> , 2006).....	9
Figura 2. A) Cambios morfológicos que se producen durante la recuperación de juveniles infectivos de <i>Heterorhabditis</i> spp. (Strauch y Ehlers, 1998); B) Inclusiones protoplásmicas (cristal) en <i>Photorhabdus temperata</i> . Escala de la barra = 0.5 µm. (Boemare, 2002).....	16
Figura 3. Aislamiento de nematodos entomopatógenos: A) Submuestra de suelo procesada con adición de 5 larvas de <i>G. mellonella</i> de último instar; B) Larva infectada, obtenida de muestra de suelo.	32
Figura 4. Multiplicación de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco). A) sistema de multiplicación, B) Emergencia de J1.....	34
Figura 5. Esquema para el aislamiento de <i>Photorhabdus</i> sp. a partir de J1 de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco).....	38
Figura 6. Ensayo de patogenicidad. Tubos de centrifuga (2 ml) con arena estéril y una larva de <i>G. mellonella</i> de ultimo instar.....	42
Figura 7. A) Aislamiento de <i>Photorhabdus</i> sp. en NBTA, B) colonia en fase I C) colonia en fase II.....	47
Figura 8. Huevos de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) en estado de mórula (400 x).....	45
Figura 9. Medio de cultivo solido ANH (Agar Nutritivo-Hígado) A) sin inocular; B) 48 horas después de inoculados.....	46
Figura 10. Estados de desarrollo de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) en cultivo sólido. A) Hermafroditas grávidos; B) colonización del medio; C) trampa White modificada.	46
Figura 11. Producción de J1 de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) en diferentes medios sólidos.....	47
Figura 12. Estados de desarrollo de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) A) J1 a punto de eclosionar, B) J1 y huevo desarrollado, C) J2, D) J3, E) J1, F) J4, G) Adulto hermafrodita grávido, H) Desarrollo de J2 y J3 por endotoquia matricida.....	49

Figura 13. Patogenicidad de <i>Photorhabdus</i> sp. en larvas de <i>G. mellonella</i> . 1) Tratamiento control; 2) larvas inyectadas con la bacteria; 3) larvas inyectadas sin la bacteria; 4) larvas infectadas con NEP.....	50
Figura 14. Patogenicidad de <i>Photorhabdus</i> sp. en larvas de <i>G. mellonella</i> . 1) Tratamiento control; 2) larvas inyectadas con la bacteria -aislada de larvas previamente infectadas-; 3) larvas inyectadas con la bacteria, aislada de larvas infectadas con NEP.....	51
...	
Figura 15. Rendimiento de JI por caja Petri en ciclos consecutivos de producción en medio de cultivo solido (ANH) monoxénico.	53
Figura 16. Unidades de producción para el cultivo en sólido del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco). A) Medio de cultivo antes de ser inoculado con <i>Photorhabdus</i> sp. B); C) Medio de cultivo con 48 horas de inoculado con <i>Photorhabdus</i> sp. Las flechas indican los puntos de intercambio gaseoso.....	56
Figura 17. Aspecto del medio inoculado con <i>Photorhabdus</i> sp.	57
Figura 18. Producción de JI en unidades experimentales, en tres experimentos realizados en diferentes periodos de tiempo.....	58
Figura 19. Frascos cilíndricos. Izquierda frasco 1 (7 cm x 5.8 cm), derecha frasco 2 (10,4 cm x 4.5 cm).....	61
Figura 20. Dinámica poblacional de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) en cultivo líquido monoxénico líquido.....	63
Figura 21. Crecimiento exponencial de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) en cultivo líquido monoxénico líquido.....	64
Figura 22. A) Disposición de ensayos en agitador orbital, B) Estados de desarrollo de los nematodos durante el proceso, C) crecimiento de <i>Photorhabdus</i> sp., en fase I y fase II.....	65
Figura 23. Biofermentador utilizado en el proceso A-B) Dimensiones y aditamentos del vaso del fermentador; C) Vista general del fermentador.....	70
Figura 24. Comportamiento de variables del proceso; pH y O ₂ disuelto.....	71
Figura 25. Comportamiento de variables del proceso; pH y O ₂ disuelto.....	72
Figura 26. Fermentación de <i>Heterorhabditis</i> sp. en medio líquido A) Coloración del caldo después de 120 horas. B) Coloración del medio después de 360 horas.....	73
Figura 27. Comportamiento de variables de proceso pH y O ₂ disuelto.....	74
Figura 28. Juveniles Infeccivos (JI) de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) observados al microscopio (100 x) después de 192 h de proceso en fermentación líquida.....	75

Figura 29. Comportamiento del pH y O ₂ durante el proceso.....	76
Figura 30. Comportamiento de variables de proceso en la fermentación líquida del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. y su simbiote bacteriano. A) pH; B) O ₂ disuelto.....	77
Figura 31. Fermentación líquida del simbiote bacteriano <i>Photorhabdus</i> sp. A) 24 horas después de inoculado con el simbiote; B) 250 horas después de inoculado con el simbiote.....	78
Figura 32. Aspecto del cultivo monoxénico sumergido del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco); A) Caldo de cultivo antes de inocular; B) Caldo de cultivo después de 24 h de inoculado con <i>Photorhabdus</i> sp.; C) Caldo de cultivo con 48 h de fermentación; D) Caldo de cultivo con 96 h de fermentación.....	79
Figura 33. Cinética de crecimiento de <i>Photorhabdus</i> sp. recuento de células viables (UFC/ml) en medio NBTA.....	80
Figura 34. Variación de la fase de <i>Photorhabdus</i> sp. en fermentación líquida (medio CNH), A) Fase I, durante las primeras 144 h de fermentación; B) Fase II, a partir de las 144 h de fermentación.....	81
Figura 35. Comportamiento de variables de proceso en la fermentación líquida del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. y su simbiote bacteriano. A) pH; B) O ₂ disuelto.....	82

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Especies de nematodos entomopatógenos descritas en la familia Heterorhabditidae y sus respectivos simbiontes bacterianos (género <i>Photorhabdus</i>).....	6
Tabla 2. Parámetros que influyen en la recuperación de juvenil infectivos (JI).....	16
Tabla 3. Eclosión de huevos en agar nutritivo extraídos de hermafroditas grávidas.....	45
Tabla 4. Ciclo de vida de <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) en cultivo monoxénico (Agar Nutritivo-Higado).....	48
Tabla 5. Diseño experimental utilizado en el objetivo 4.....	60
Tabla 6. Parámetros cinéticos de crecimiento poblacional del nematodo <i>Heterorhabditis</i> sp. (Tumaco) en cultivo monoxénico.....	65
Tabla 7. Diseño experimental utilizado en el objetivo 5.....	68

Introducción

El uso de agentes de control biológico (bacterias, virus, hongos y nematodos) en artrópodos plaga es una herramienta con gran potencial, respaldada en múltiples investigaciones a nivel mundial. Aspectos como la resistencia a los insecticidas, facilidad para masificación en laboratorio, alto rendimiento, persistencia en campo e inocuidad a mamíferos, entre otros, hacen que estos organismos patógenos de insectos se consideren una alternativa para la producción agrícola sustentable.

La presente investigación se justifica por la necesidad de generar una alternativa sostenible para el control de insectos plaga en palma de aceite, la cual se enmarca por los retos de la normativa de la Mesa Redonda de Aceite de Palma Sostenible (RSPO por su sigla en inglés), de la cual hace parte la Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite (Fedepalma) desde 2004. La normativa RSPO enfatiza en la aplicación de técnicas reconocidas en el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE), incorporando métodos culturales, biológicos, mecánicos y físicos para minimizar el uso de productos de síntesis química, procurando emplear especies nativas para el control biológico, siempre que sea posible.

Es de mencionar que la principal limitante en cultivo de la palma de aceite en Colombia se atribuye a factores fitosanitarios. La actual propuesta de investigación se focaliza en generar tecnología para la producción masiva de nematodos entomopatógenos nativos, para el manejo de algunas plagas de importancia económica de la palma de aceite, como son: *Sagalassa valida* (Lepidoptera: Glyphipterigidae), *Eupalamides guyanensis* (Lepidoptera: Castniidae), *Strategus aloeus* (Coleoptera: Scarabaeidae), *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Dryophthoridae), *Haplaxius crudus* (Hemiptera: Cixiidae) y *Leucothyreus femoratus* (Coleoptera: Scarabaeidae).

A escala mundial el interés por el uso de nematodos entomopatógenos se ha incrementado en las dos últimas décadas, la evidencia registrada en múltiples trabajos de investigación,

los presentan como agentes promisorios para el control de insectos, moluscos y nematodos de patógenos de plantas. No obstante, la aplicación masiva de estos organismos es limitada debido a la escasa oferta en el mercado, debido a los altos costos de producción en sistemas artesanales (*In vivo*), una alternativa viable para la producción masiva es el desarrollo de procesos en cultivo líquido a nivel de biorreactor.

Los nematodos entomopatógenos son patógenos obligados de insectos, se asocian simbióticamente con bacterias específicas, que son transportadas en el intestino de tercer estadio de desarrollo de los nematodos (JI). Las especies de nematodos entomopatógenos más promisorias, se encuentran dentro de las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae. Esta última consta de un género, *Heterorhabditis*, las especies que lo componen se asocian con bacterias del género *Photorhabdus* (excluyendo a *P. asymbiotica*), esta asociación nematodo-bacteria, causa patogenicidad en artrópodos. En condiciones naturales los nematodos penetran en el insecto a través de la boca, el ano, los espiráculos y en algunos casos traspasan directamente la cutícula, alcanzan el hemocele y libera sus bacterias simbiotes, el insecto muere por septicemia entre las 24 y 48 horas siguientes.

En procesos de producción de nematodos entomopatógenos (NEP) *In vitro*, se debe aislar y multiplicar previamente a los simbiote bacterianos. Los medios de cultivo a utilizar deben ser incubados con las bacterias 48 h antes de la inoculación con los juveniles infectivos (JI). Los JI inician su desarrollo (recuperación) en respuesta a una señal de alimentación (aún no descrita) la cual es producida y secretada al medio por las bacterias. Un aspecto importante en la producción *In vitro* es mantener a las bacterias en su fase patogénica (Fase I), la cual se caracteriza por una alta tasa reproductiva, degradación del medio, liberación de antimicrobianos y factores de virulencia; en esta fase se observan al microscopio con forma de bacilos. Factores de estrés y agotamiento de nutrientes pueden hacer que la bacteria pase a una fase estable (Fase II) de baja actividad metabólica, al microscopio se observan como cocos. Esta fase no es deseable en el proceso de desarrollo y reproducción de los nematodos.

HIPÓTESIS

El nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) y su bacteria simbiote *Photorhabdus* sp., responderán favorablemente a las condiciones de fermentación líquida, y a los sustratos evaluados, resultando en productividades de juveniles infectivos (JI) superiores a los rendimientos reportados en la literatura.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar parámetros de fermentación líquida en la producción del nematodo entomopatógeno, *Heterorhabditis* sp. (Tumaco).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar nematodos entomopatógenos a partir de plantaciones comerciales de palma de aceite.
2. Establecer el ciclo de vida, rendimiento y patogenicidad de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en cultivo monoxénico sólido.
3. Evaluar el efecto del sustrato sobre el rendimiento de *Heterorhabditis* sp. en cultivo semisólido.
4. Determinar el efecto de la agitación, la geometría del fermentador y la composición del sustrato sobre el desarrollo del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en medio líquido a nivel de matraz.
5. Evaluar el efecto de las condiciones de agitación y oxigenación en el desarrollo del complejo nematodo-bacteria en sustrato líquido en un biorreactor de laboratorio.

Capítulo 1

MARCO CONCEPTUAL

1.1. Clasificación y filogenia de los nematodos entomopatógenos

Los nematodos pertenecen al clado metazoo (metazoarios) también conocido como Ecdysozoa, o animales que mudan (Aguinaldo *et al.*, 1997; Lewis y Clarke 2012), se agrupan filogenéticamente en el phylum Nematoda, el cual se considera altamente diverso y abundante (Wall y Virginia, 2000; Wall *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2006), con un rango de especies entre 400.000 y 10.000.000 (Hammond *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 2006).

Los nematodos asociados con insectos son filogenéticamente diversos, pertenecen a 13 subórdenes diferentes del phylum Nematoda (Blaxter, 2011), no obstante solo dos familias: Steinernematidae y Heterorhabditidae, son agentes potencialmente útiles para el control biológico de plagas (Lacey *et al.*, 2015; Grewal *et al.*, 2005; Zioni *et al.*, 1992).

La familia Heterorhabditidae contiene un solo género, *Heterorhabditis* Poinar (Adams *et al.*, 2006), con 17 especies actualmente reconocidas (Tabla 1) (Lewis y Clarke 2012).

1.2. Generalidades del género *Photorhabdus*

El género *Photorhabdus* (familia Enterobacteriaceae), está compuesto por tres especies: *Photorhabdus luminescens*, *P. temperata* y *P. asymbiotica* (Joyce *et al.*, 2006). Las dos primeras especies establecen simbiosis obligada con nematodos entomopatógenos de la familia Heterorhabditidae, mientras que la tercera especie se ha aislado de heridas humanas (Hinchliffe *et al.*, 2010; Rodou *et al.*, 2010). Las células de *Photorhabdus* spp. son bacilos asporógenos (0,5-2 x 1-10 µm), Gram negativos, y móviles por medio de flagelos peritricos. Son anaerobios facultativos, que tiene tanto respiración como un metabolismo fermentativo. La temperatura óptima de crecimiento es por lo general 28 °C; algunas cepas crecen a 37 - 38 °C. Todas las cepas son catalasa positiva y no reducen el nitrato. Fermentan la glucosa sin producción de gas. También fermentan la fructosa, D-manosa, maltosa, ribosa, y N-acetilglucosamina. La fermentación a partir de glicerol es débil. El fumarato, glucosamina, L-glutamato, L-malato, L-prolina, succinato y L-tirosina se utilizan como fuentes de carbono y energía (Boemare, 2002).

Tabla 1. Especies de nematodos entomopatógenos descritas en la familia Heterorhabditidae y sus respectivos simbioses bacterianos (género *Photorhabdus*)

Especies de Nematodos	Especies/subespecies de bacterias
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Desconocida
<i>H. bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i> subesp. kayaii, <i>P. luminescens</i> subesp. laumondii, <i>P. luminescens</i> subesp. caribbeanensis, <i>P. temperata</i> subesp. khanii, <i>P. temperata</i> subesp. thracensis.
<i>H. baujardi</i>	Desconocida
<i>H. brevicaudis</i>	Desconocida
<i>H. downesi</i>	<i>P. temperata</i> subesp. Cinérea
<i>H. floridensis</i>	Desconocida
<i>H. georgiana</i>	<i>P. luminescens</i> subesp. akhurstii
<i>H. gerrardi</i>	<i>P. asymbiotica</i> kingscliffe
<i>H. indica</i>	<i>P. luminescens</i> subesp. akhurstii
<i>H. marelatus</i>	Desconocida
<i>H. megidis</i>	<i>P. temperata</i> subesp. cinerea
<i>H. mexicana</i>	Desconocida
<i>H. poinari</i>	Desconocida
<i>H. safricana</i>	Desconocida
<i>H. sonorensis</i>	Desconocida
<i>H. taysearae</i>	Desconocida
<i>H. zealandica</i>	<i>P. temperata</i> subesp. tasmaniensis

Una característica de *Photorhabdus* spp. y otros géneros de simbioses asociados a NEP es la variación fenotípica. La fase primaria (FI) es aislada de Juveniles infectivos e insectos con infección tempranas, mientras que la fase secundaria (FII) se encuentra a veces durante las últimas etapas del desarrollo de los NEP en cadáveres de insectos y durante

sub-cultivos de la FI (Akhurst, 1980). La FII tiene un tamaño de célula más pequeñas, colonias morfológicamente diferentes, carece de una variedad de proteínas y metabolitos secundarios (Boemare y Akhurst, 1988; Smigielski *et al.*, 1994), no interactúa simbióticamente con el nematodo (J3), pero sigue siendo patógena (Akhurst, 1980). Las células de la FI producen un pigmento rojo y las colonias absorben el rojo neutral o el azul de bromotimol del agar McConkey y agar NBTA (agar nutritivo, azul de bromotimol y cloruro de trifetil tetrazolio) respectivamente. Las colonias de la FII son de color amarillo y no absorbe colorantes de los medios (Akhurst, 1980, Johnigk *et al.*, 2004). En el género *Photorhabdus*, la reversión de la fase es poco frecuente o ausente. El papel de las variantes de fase secundarias en los ciclos de vida de EPN es poco claro (Ciche *et al.*, 2006).

1.3. Complejo nematodo-bacteria

Los NEP causan enfermedades a los insectos por transmisión de bacterias patogénicas en el hemocele de insectos (Lewis y Clarke 2012) susceptibles.

Los JI de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar transmiten aproximadamente 130 unidades formadoras de colonia (UFC), las cuales se ubican predominantemente en la porción anterior del intestino del nematodo, pero extendiéndose en diferentes grados a lo largo del intestino. Una vez los JI alcanzan el hemocele del insecto liberan a los simbioses bacterianos a través de la boca mediante un proceso sugestivo de regurgitación (Ciche y Ensign. 2003). En insectos susceptibles tres células de *Photorhabdus luminescens* son suficientes para causar la mortalidad (Poinar *et al.*, 1977).

El ciclo de vida de los NEP está determinado por relaciones mutualistas con los simbioses bacterianos, estas interacciones pueden diferenciarse en tres fases: forética, patogénica, y saprófita.

- **Fase forética**

La fase forética corresponde a la etapa de vida libre (JI) de los NEP, se caracteriza por la quiescencia de la bacteria y la actividad del nematodo que funciona como vector para el simbiote bacteriano. Las bacterias están bien protegidas del ambiente circundante en el intestino del JI hasta su liberación en el hemocele de los insectos hospederos (Poinar, 1966; Poinar *et al.*, 1977; Ciche *et al.*, 2006). El mecanismo para la colonización específica

de los simbioses bacterianos en el intestino de los JI no se conoce (Ciche *et al.*, 2006). Una hipótesis es que la función digestiva en el intestino del JI se reduce durante la segunda etapa juvenil pre-infectivo (J2) y por lo tanto las células bacterianas sobreviven en el intestino en lugar de ser digeridas (Ciche *et al.*, 2006).

- **Fase patogénica**

En la fase patogénica los JI, transportan a sus simbioses bacterianos hacia un huésped potencial. Una vez que el JI ingresa en el hemocele del insecto, el complejo nematodo-bacteria enfrenta la defensa humoral y celular del insecto (Peters y Ehlers, 1997). Si bien, la contribución de las bacterias simbioses para matar insectos está bien establecida, en algunos casos, el simbiote y el nematodo cada uno contribuye de forma sinérgica hacia la virulencia, como se reportó para el complejo *S. feltiae* - *X. bovienii* en larvas de tipulidos (Ehlers *et al.*, 1997; Ciche, *et al.*, 2006). En otros casos, el simbiote bacteriano no parece contribuir en absoluto a la virulencia. Por ejemplo, *Xenorhabdus poinarii* Akhurst Boemare no causa septicemia en las larvas de *G. mellonella*, no obstante el nematodo es el causante de la mortalidad (Akhurst, 1983; Ciche, *et al.*, 2006). Por último, hay ejemplos en los que el nematodo depende completamente de su simbiote bacteriano para matar al insecto, que suele ser el caso de *Heterorhabditis* spp. (Gerritsen y Smits, 1993; Han y Ehlers, 2000; Ciche, *et al.*, 2006).

- **Fase saprófita**

Una vez que el insecto huésped está muerto, inicia la fase saprófita, durante la cual los nematodos y sus bacterias se alimentan y reproducen en el cadáver (Ciche, *et al.*, 2006). Al interior del insecto ocurre la mayor parte del ciclo de vida del nematodo (Ciche, *et al.*, 2006). El agotamiento de nutrientes induce la diferenciación de los J3 en JI, éstos emergen del insecto cerrando el ciclo e iniciando nuevamente una fase forética.

1.4. Ciclo de vida de los nematodos entomopatógenos

Las especies de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* presentan un ciclo de vida heterogónico (alternan etapas parasíticas con etapas de vida libre), para el caso de *Heterorhabditis* spp. y *Steinernema hermafroditum* Stock, el desarrollo de las etapas infectivas que colonizan el insecto se diferencian en hermafroditas (es decir, automictica) y la primera generación es anfimíctica (machos y hembras), no obstante, los modos de reproducción parecen ser regulados con el medio ambiente (Strauch *et al.*, 1994; Kehel-

Raifer y Glazer, 2000). La capacidad automictica de *Heterorhabditis* spp. permite obtener generaciones anfimicticas de nematodos a partir de un JI que haya infectado un hospedero (Fig. 1) (Han y Ehlers, 2000).

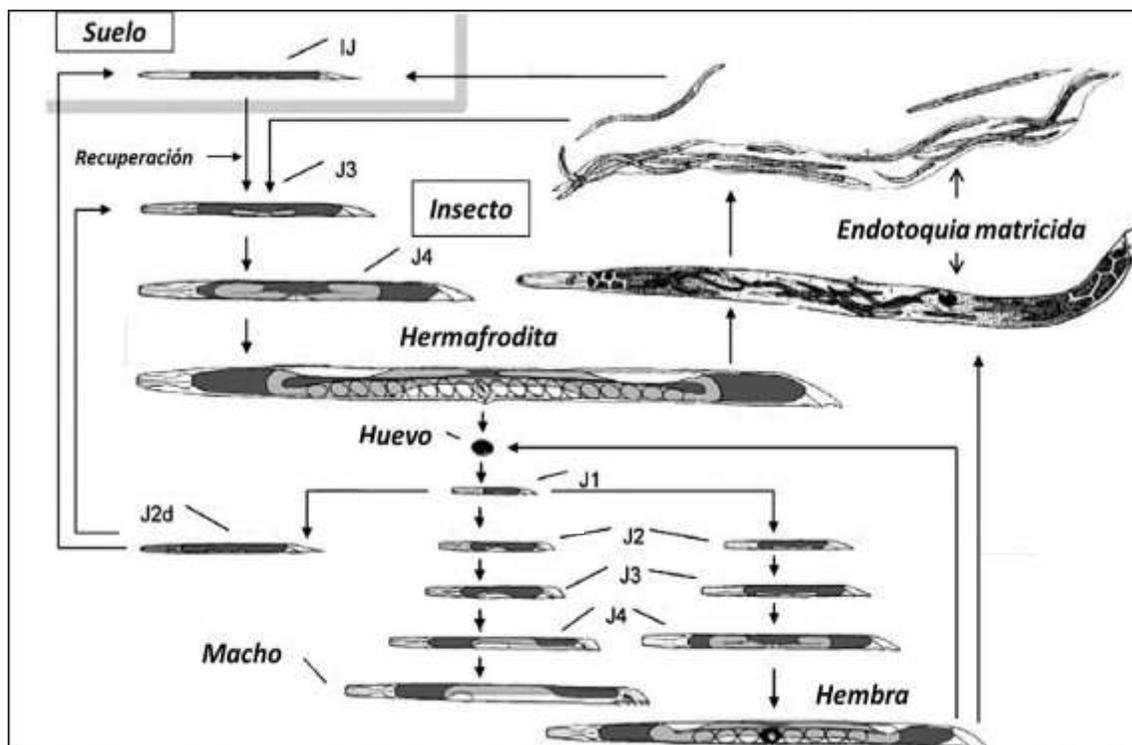


Figura 1. Ciclo de vida de *Heterorhabditis bacteriophora*. (Basado en Chiche *et al.*, 2006).

Los juveniles infectivos (IJ) son la única etapa del ciclo de la vida en la que los NEP sobreviven fuera del huésped, también son el producto comercial utilizado en los programas de control biológico, aunque hay algunas formulaciones basadas en cadáveres de insectos infectados (Lewis y Clarke 2012). Los JI son un tercer estado de desarrollo con doble cutícula (conserva la cutícula del segundo estadio), el cual es especializado y es análogo a la etapa "dauer" del nematodo *Caenorhabditis elegans* (altamente estudiado). El término "Dauer" significa perdurable (Lewis y Clarke, 2012) y es altamente utilizado en la literatura de la lengua inglesa. Los JI ubican y penetran al hospedero a través de las aberturas naturales (boca, ano y espiráculos), y en algunos casos como en las especies del género *Heterorhabditis*, presentan un diente apical que les permite hacer un orificio en la cutícula y penetrar directamente, no obstante algunos Steinernematidos también lo pueden hacer (Lewis y Clarke 2012). Una vez en el hemocele del insecto, los nematodos liberan sus simbiontes bacterianos, los cuales son responsables de matar al insecto por

septicemia, entre las 24 y 48 h después del ingreso (Dowds y Peters, 2002; Lacey *et al.*, 2015). Al interior del insecto los JI recuperan el desarrollo y se reanuda el crecimiento. Este proceso se denomina recuperación y es el primer resultado de la interacción huésped-parásito (Moshayov *et al.*, 2013). Los nematodos mudan y completan hasta tres generaciones, y finalmente se diferencian en JI, estos salen del cadáver (emergen) para ubicar nuevos anfitriones (Kaya y Gaugler, 1993). Todos los nematodos expresan seis estados de desarrollo: huevo, cuatro estadios juveniles y adulto (Fig. 1). En presencia de suficientes nutrientes y bacterias simbiotes, los JI que infectan el insecto se desarrollarán en J4 y luego en adultos reproductivos, que son hermafroditas en el caso de *Heterorhabditis* spp., estos pueden liberar los huevos o permitir que los juveniles de la primera etapa (J1) eclosionen en el interior del útero y se desarrollen hasta JI, mientras consumen la cavidad interna del cuerpo de la madre, provocando finalmente un matricidio (endotoquia matricida; Johnigk y Ehlers, 1999).

1.5. Potencialidades en el control biológico de artrópodos plaga

La eficacia de los nematodos entomopatógenos en la supresión de poblaciones de insectos plaga depende de una selección adecuada del nematodo en el objetivo biológico (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002). Un candidato adecuado debe poseer un alto nivel de virulencia hacia el anfitrión (Shapiro-Ilan *et al.*, 2014). El nematodo debe ser capaz de evadir las defensas del huésped e iniciar la patogénesis. La capacidad de los NEP para persistir en el medio ambiente también puede ser criterio de selección como biocontrolador (Shapiro-Ilan *et al.*, 2014).

La persistencia en campo de los NEP depende de la especie o cepa del nematodo, hospederos, densidad poblacional, y lo más importante; los factores ambientales (por ejemplo la temperatura y la humedad del suelo; Shapiro-Ilan *et al.*, 2006; Shapiro-Ilan *et al.*, 2014). Los NEP son altamente sensibles a la desecación y a la luz ultravioleta. Por lo tanto, las aplicaciones hechas al suelo u otros hábitats crípticos (durante las primeras horas de la mañana o en la noche) tienden a ser más exitosas (Shapiro-Ilan *et al.*, 2014).

El potencial de una especie de NEP para controlar un objetivo biológico en particular, también puede depender de la estrategia de forrajeo del nematodo (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002; Lewis y Clarke, 2012). Los NEP expresan estrategias de forrajeo que van de emboscadores a cruceros. El hábito emboscador tiende a utilizar una estrategia de “espera”: por lo general los JI reposan sobre sus colas (nictitante) y esperan hasta que un anfitrión se acerque. El hábito crucero, en general, busca activamente a sus anfitriones y

sigue ciertos compuestos volátiles, antes de ponerse en contacto con el anfitrión (Shapiro-Illan *et al.*, 2014). Los emboscadores pueden ejercer mayor control de insectos móviles o que estén cerca de la superficie del suelo, mientras que los cruceros pueden tener mayor éxito en insectos sésiles que habitan bajo la superficie del suelo (Shapiro-Illan *et al.*, 2014). No obstante se pueden presentar excepciones.

1.6. Tecnologías para la producción de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotas

1.6.1. Sistemas *In vivo*

La producción *In vivo* de NEP se basa en el método propuesto por Dutky *et al.* (1964), el cual consta de una adaptación de la trampa White (White, 1927), con algunas modificaciones (Gaugler y Han, 2002). Esta última consiste en ubicar cadáveres de insectos infectados por nematodos en una base que reposa en un volumen de agua, el método aprovecha la tendencia migratoria de los JI, estos estados abandonan los cadáveres del anfitrión, concentrándose en el volumen de agua, la cual se colecta y se decantan los JI. Este sistema es apropiado para la producción de inóculo o experimentos de laboratorio, pero por su naturaleza de mano de obra hace que sea ineficaz para producción a gran escala (Gaugler y Han, 2002).

La implementación de la producción *In vivo* ha consistido en proporcionar trampas White de mayor tamaño, lo que reduce la eficiencia de extracción mediante el aumento de la distancia de migración del JI al depósito de agua (Gaugler *et al.*, 2002), estos sistemas requieren espacio para la ubicación de las unidades de producción (bandejas) en estantes (Shapiro *et al.*, 2012; Gaugler, 2002).

Un factor determinante en la producción *In vivo* es la elección del insecto hospedero, este influye directamente en el rendimiento, la calidad y la eficiencia de la producción. Debido a su alta susceptibilidad a la mayoría especies y cepas de NEP, la facilidad en la crianza, amplia disponibilidad, y la capacidad de producir altos rendimientos, el último estadio de la polilla mayor de la cera, *Galleria mellonella*, es el anfitrión de insectos comúnmente utilizado (Woodring y Kaya, 1988; Shapiro-Illan *et al.*, 2014). Sólo unas pocas especies de NEP exhiben un bajo rendimiento en *G. mellonella* (especificidad de huésped), tales como

S. kushidai y *Steinernema scarabaei* Stock y Koppenhöfer (Mamiya, 1989; Nguyen y Smart, 1990; Kaya y Stock, 1997; Grewal *et al.*, 1999; Koppenhöfer y Fuzy, 2003).

El proceso de producción *In vivo* consta de cinco etapas; inoculación, cosecha, concentración, limpieza (Shapiro *et al.*, 2012) y almacenamiento. En la primera etapa se inoculan los insectos con JI en bandejas con papel absorbente. Después de 2-5 días, los insectos infectados son transferidos a trampas White modificadas (Shapiro *et al.*, 2012; Realpe *et al.*, 2007; Moreno *et al.* 2012). El periodo de cosecha es determinado por la concentración del inóculo, las condiciones ambientales proporcionadas, ciclo de vida del nematodo entre otros parámetros a estandarizar. Una vez los nematodos se diferencian en IJ emergen y migran al agua que rodea la trampa, esta agua es transferida a Erlenmeyers o vasos de precipitados, donde los JI se decantan, se extrae el agua de desecho y se adiciona nuevamente agua destilada estéril o solución salina, se contabilizan y se almacenan en espumas de poliuretano estéril (Realpe *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2012).

Gaugler y Han. (2002), generaron un sistema automatizado para la producción masiva de *Heterorhabditis bacteriophora*, el sistema permite cosechar el 97 % de los JI, ofreciendo un aumento en la eficiencia con respecto al método convencional de trampa White con reducción de mano de obra y espacio.

1.6.2. Sistemas *In vitro*

Un requisito previo para el uso de enemigos naturales en programas de control biológico es su producción masiva a bajo costo. El proceso de producción en masa de NEP *In vivo* es altamente laborioso, generando altos costos de producción (Ehlers, 2001), en contraste, la producción en cultivo líquido permite obtener altos rendimientos de JI a menor costo en procesos sistematizados.

La tecnología para la producción de JI *In vitro* consta de tres alternativas: cultivos monoxénicos sólidos o bidimensionales (medios nutritivos solidificados con agar); cultivos monoxénicos semisólidos o tridimensionales (medios nutritivos embebidos en espumas de poliuretano) y cultivos monoxénicos líquidos. En el primer caso, se producen JI a baja escala y se implementa para producción de inóculo y mantenimiento de cepas en laboratorio. La segunda alternativa presenta varias ventajas, entre ellas; poca inversión en

equipos y, el riesgo de fracaso del proceso se divide en varias unidades pequeñas de producción (Ehlers, 2001). En los países en desarrollo, este sistema sigue siendo superior a la tecnología de cultivo líquido (Bedding, 1990; Ehlers *et al.* 2000). Sin embargo, cuando se trata de producción a gran escala, las desventajas son abrumadoras (Ehlers, 2001). Para la última alternativa se han presentado avances considerables, ha habido un interés por la mejora de medios de cultivo líquidos (Gil *et al.*, 2002; Islas-López *et al.*, 2005 y Chavarría-Hernández *et al.*, 2006) y una mayor comprensión de la biología y dinámica poblacional de los NEP, como de los parámetros físicos al interior del biorreactor (Chavarría-Hernández y De la Torre, 2001; Han y Ehlers, 2001; Neves *et al.*, 2001; Johnigk *et al.*, 2004; Chavarría-Hernández *et al.*, 2008; Hirao y Ehlers, 2010; Hirao *et al.*, 2010 y Belur *et al.*, 2013).

Cultivos semisólidos monoxénicos

La producción comercial de NEP en sustrato sólido está basada en cultivos monoxénicos tridimensionales; un medio de cultivo líquido es mezclado con trozos de esponja de poliuretano, esterilizado en autoclave, y luego inoculados con las bacterias simbiotes, seguido de los nematodos. La cosecha de los JI se realiza entre dos y cinco semanas después de la inoculación (Bedding, 1981, 1984; Shapiro-Ilan *et al.*, 2014) para ello se transfieren los trozos de esponja a tamices sumergidos en agua.

Inicialmente los medios de cultivo para este sistema se basaron en productos animales como; riñón de cerdo y despojos de pollo, pero más tarde estas formulaciones se mejoraron, incluyendo diversos ingredientes, por ejemplo: peptona, extracto de levadura, huevo, harina de soja, y manteca de cerdo (Han *et al.*, 1992, 1993). Posteriormente el enfoque se amplió a bolsas autoclavables con aire filtrado y bombeado al interior (Bedding, 1984) y recipientes de cultivo que comprenden una bandeja con paredes laterales y tapas de solapamiento que permiten el intercambio de gases a través de una capa de espuma (Shapiro-Ilan *et al.*, 2014).

Los rendimientos en cultivos semisólidos dependen de la capacidad reproductiva innata de la especie o cepa del nematodo de interés (Shapiro-Ilan *et al.*, 2014). Por ejemplo, *H. bacteriophora* cepa HbNJ produce en promedio $1,4 \times 10^9$ JI por bolsa (Gaugler y Han, 2002), mientras una cepa de *S. scapterisci* produce en promedio $4,8 \times 10^8$ JI por bolsa (Bonifassi *et al.*, 1999).

Cultivos líquidos monoxénicos

Un aspecto importante en el desarrollo exitoso de las fermentaciones líquidas es la fase del simbionte bacteriano. La FII reduce significativamente los rendimientos en los cultivos *In vitro*, (Ehlers *et al.*, 1990; Han y Ehlers, 2001), por esta razón se debe evitar el desplazamiento de la fase (Johnigk *et al.*, 2004).

Otro factor a considerar es la composición de los medios de cultivo. Los simbiontes bacterianos asociados a nematodos entomopatógenos expresan un alto potencial para metabolizar gran variedad de medios proteicos, esta versatilidad hace que la selección de medios de cultivo se base en criterios económicos (Ehlers, 2001). Un medio estándar para la producción de JI debe contener una fuente de carbono (glucosa o glicerol), una variedad de proteínas de origen animal y vegetal, extracto de levadura y lípidos de origen animal o vegetal (Pace *et al.*, 1986; Friedman *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1993; Surrey y Davies 1996; Ehlers *et al.* 1998). No obstante, *H. bacteriophora* produce descendencia en un medio líquido sin adición de los lípidos al medio (Han y Ehlers, 2001). El cultivo *In vitro* y la composición del medio también pueden influir en el tamaño de los nematodos, los JI producidos *In vivo* alcanzan mayor volumen (Nguyen y Smart, 1995).

Los cultivos líquidos de NEP son altamente vulnerables a la contaminación por microorganismos no simbiontes, este factor reduce significativamente los rendimientos y limita el escalado del proceso (Ehlers, 2001). Los JI producidos *In vivo* y usados como inóculo son desinfectados superficialmente, son una fuente de contaminación cuando son inoculados en los cultivos líquidos, porque este procedimiento no puede excluir la presencia de contaminantes en las estrías de la cutícula del JI. La desinfección de los JI se realiza a través lavados repetidos con agua destilada o soluciones preparadas con compuestos químicos, tales como; peróxido de hidrógeno, glutaraldehído, antibióticos (Penicilina, estreptomycin y ampicilina) o antisépticos (hipoclorito de sodio o mertiolate) (Woodring y Kaya, 1988; Lunau *et al.*, 1993; Suárez-Sánchez *et al.*, 2012). Esta limitante es superada inoculando con huevos (Ehlers, 2001; Lunau *et al.*, 1993; Han y Ehlers, 1998), estos se obtienen por hidrólisis de hembras o hermafroditas grávidas (Ehlers y Strauch, 1994, citado por Suárez-Sánchez *et al.*, 2012; Heungens *et al.*, 1996). Los huevos de nematodos producidos mediante este método se llaman huevos axénicos (Suárez-Sánchez *et al.*, 2012).

La concentración de los inóculos (bacterias y nematodos) influye directamente en la duración del proceso fermentativo. En el caso del simbiote bacteriano una relación óptima del inóculo está en el rango del 0,5 % y 1 % (v/v) del volumen total del medio de cultivo en una concentración de células correspondiente a 10^9 /ml, en contraste la concentración de los nematodos a inocular se debe definir para cada especie o cepa, no obstante pueden adicionarse entre el 5 % y 10 % (v/v) (Pace *et al.*, 1986; Ehlers, 2001). Los rendimientos máximos de *Heterorhabditis bacteriophora* se alcanzan con una densidad de 4.000 hermafroditas por ml aproximadamente (Ehlers 2001).

Los equipos evaluados en los bioprocesos corresponden a sistemas tradicionales, con resultados satisfactorios. Los reactores que permiten aumentar el volumen del proceso y, consecuentemente, la producción de JI corresponden a reactores de bucle interno, columna de burbujas y *airlift* (Ehlers, 2001). No obstante el cultivo líquido de especies del género *Heterorhabditis* ha sido de difícil explotación comercial porque los rendimientos son inestables y el tiempo del proceso es prolongado (Ehlers, 1996; Strauch y Ehlers, 1998).

Recuperación de JI en cultivo líquido monoxénico

La recuperación se produce cuando los juveniles infectivos, después de ser inoculados en el sustrato (o penetrar en el insecto) reanudan la alimentación, el crecimiento y el desarrollo; en un proceso que es activado por una "señal de alimento" (Strauch y Ehlers, 1998; Gaugler y Han, 2002). En las especies del género *Heterorhabditis* la señal de alimento es producida y excretada al medio por sus bacterias simbiotes (*Photorhabdus* spp). La producción máxima de la señal se produce durante la fase exponencial tardía de las bacterias. La Recuperación de *H. bacteriophora* se observa en presencia de bacterias con proteínas de inclusión (Fig. 2B) (Bintrim y Ensign, 1998; Gaugler y Han, 2002).

Al interior de insectos, la recuperación de los JI es de aproximadamente 95 %, en lapso de 24 horas. En cultivos líquidos de *P. luminescens* la recuperación es repartida en varios días y varía entre el 0 y el 81 % e implica cambios fisiológicos y morfológicos en los JI (Fig. 2A) (Strauch y Ehlers, 1998).

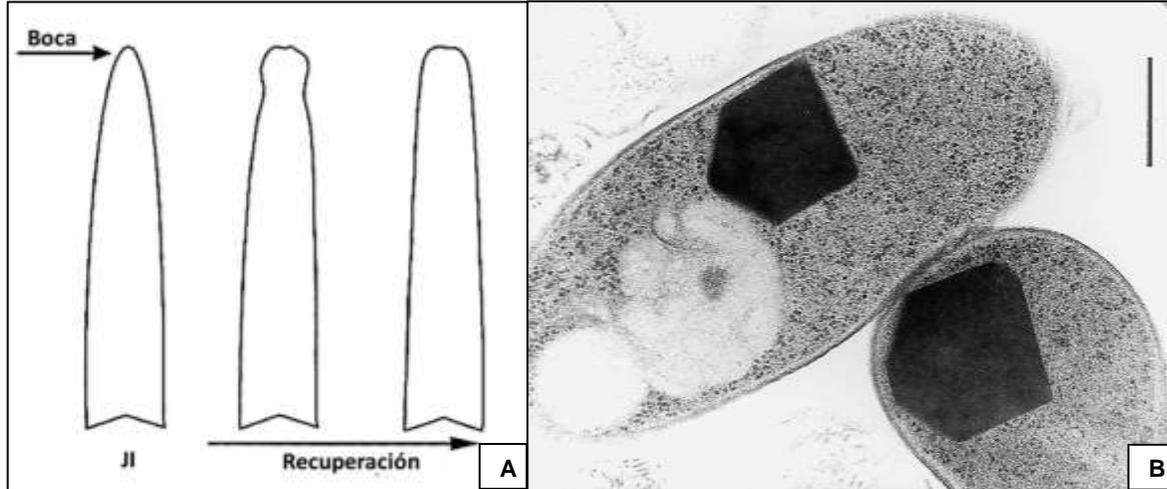


Figura 2. **A)** Cambios morfológicos producidos durante la recuperación de juveniles infectivos de *Heterorhabditis* spp. (Strauch y Ehlers, 1998); **B)** Inclusiones protoplásmicas (cristal) en *Photorhabdus temperata*. Escala de la barra = 0.5 μm . (Boemare, 2002).

Una alta inestabilidad de los procesos *In vitro* es causada por una baja y no sincronizada recuperación de los JI (Strauch y Ehlers, 1998). Todos los parámetros del proceso de fermentación deben propender por la rápida recuperación de los JI inoculados. Algunas variables que inducen la recuperación de los JI se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros que influyen en la recuperación de juvenil infectivos (JI).
Basado en Ehlers, 2001.

Parámetro de Proceso / condición de cultivo	Efecto sobre la recuperación de JI
Señal de alimento por hemolinfa del insecto	++
Señal de alimentos por simbionte bacteriano	+
Compuestos en medios artificiales	-
Alta densidad bacteriana	+
Cultivo del simbionte en fase estacionaria	+
pH entre 6,5 y 9,0	+
pH < 6,5	-
Aumento de la concentración de CO ₂	+

Jl originados de huevos	+
Jl originados a partir de endotoquia matricida	-
Edad de los Jl	Variable
Reservas lipídicas de los Jl	Variable

1.7. Parámetros adicionales para la fermentación líquida de nematodos entomopatógenos

El balance de oxígeno y las condiciones hidrodinámicas constituyen parámetros que se deben considerar en el desarrollo de los procesos de fermentación líquida, en aras de obtener metodologías estandarizadas. Otros parámetros a considerar son:

Espuma

Una consecuencia negativa de la agitación intensa para mejorar la transferencia de oxígeno es la generación de espuma, que puede conducir a taponamientos de los filtros de salida de aire y la acumulación de presión en el fermentador (Gaugler y Han, 2002). El control de la espuma es un elemento esencial de la operación de biorreactores con suministro de aire por burbujas, ejemplo airlift. Como alternativa para la reducción de la espuma, es de amplio uso la adición de antiespumantes, no obstante, es posible una toxicidad potencial en las bacterias o nematodos, además perturbación de la transferencia de oxígeno, previamente se deben considerar aspectos para una adecuada selección de los agentes antiespumante (Gaugler y Han, 2002). Por ejemplo, agentes de silicona se utilizan ampliamente en la industria para control de la espuma, pero pueden reducir los rendimientos de *Heterorhabditis* spp. (Gaugler y Han, 2002).

Dióxido de Carbono

Bajas tasas de aireación propician acumulación de CO₂, llegando a ser perjudicial para el cultivo de NEP (Strauch y Ehlers, 2000). Sin embargo, los efectos son variables, una concentración alta de CO₂ también puede estimular la recuperación de los Jl (Jessen *et al.*, 2000). Estos parámetros no están definidos y pueden ser variables para cada especie o cepa de nematodos entomopatógenos.

Temperatura

La temperatura debe ser ajustada de forma precisa, tanto para las bacterias como para los nematodos (Gaugler y Han, 2002). Debido a que las temperaturas óptimas de crecimiento del nematodo y su simbionte bacteriano no coinciden, es aconsejable coordinar la temperatura del biorreactor con la fase de crecimiento exponencial del complejo nematodo-bacteria (Gaugler y Han, 2002). El ajuste de la temperatura bifásica también puede mejorar la sincronía del cultivo (Gaugler y Han, 2002). Este parámetro puede relacionarse con la recuperación de los JI, Ehlers *et al.* (2000), observaron que la salida de la etapa infecciosa (recuperación) es influenciada por la temperatura del cultivo.

Osmolaridad

Una baja osmolaridad puede inducir a la variación de fase de los simbiontes bacterianos (Krasomil Osterfeld, 1995). El desplazamiento de fase conlleva a efectos adversos sobre el rendimiento de los NEP, cuando la osmolaridad del cultivo no es regulada (Gaugler y Han, 2002). Este parámetro tiende a ser ignorado o estar mal supervisado (Gaugler y Han, 2002). Al componer la concentración de los diferentes compuestos y minerales, la fuerza osmótica del medio no debe superar los 600 miliosmoles/kg (Ehlers, 2001).

Viscosidad

La producción *In vitro* de *Heterorhabditis* spp., incluso con métodos *In vivo*, da lugar a un aumento de la viscosidad media (Gaugler y Han, 2002). Esto se atribuye a la síntesis de una “cápsula de polisacárido” sintetizada por las bacterias simbiontes (Young *et al.*, 1998), la viscosidad aparente también puede aumentar por sustancias provenientes del contenido interno del cuerpo de los nematodos muertos, así como de las cutículas de los nematodos degradados (Chavarría-Hernández *et al.*, 2003). En cultivos líquidos, la alta viscosidad reduce la transferencia de oxígeno (Gaugler y Han, 2002).

El manejo de la viscosidad es uno de los varios desafíos que no ha sido bien estudiado y que contribuye en gran medida a que *Heterorhabditis* spp. generalmente sea más difícil de producir en forma fiable, en contraste a la mayoría de los Steinernemátidos (Gaugler y Han, 2002).

1.8. Estado del arte

El interés por los nematodos entomopatógenos y su aplicación en el control biológico de plagas inició con el descubrimiento de los mismos. El primer nematodo entomopatógeno lo describió Steiner como *Aplectana kraussei* (ahora *Steinernema kraussei*) en 1923 y en ese momento se consideró no más que una curiosidad cuya posición sistemática era problemática (Steiner, 1923; Poinar y Grewal, 2012).

El primer reporte de la presencia de estos microorganismos fue realizado por Glaser y Fox (1930), quienes encontraron larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*) infectadas con nematodos parásitos en un campo de golf en el estado de Nueva Jersey, Estados Unidos.

Los primeros esfuerzos encaminados al cultivo de nematodos entomopatógenos *In vitro* se iniciaron en 1930 con el descubrimiento de *Neoplectana glaseri* (ahora *Steinernema glaseri*). El primer reporte fue realizado por Glaser (1940), quien logró obtener nematodos en cultivos axénicos, el método consistió en adicionar nematodos en tubos inclinados que contenían una formulación estéril de riñón de ternera y agar dextrosa. Dos años después Glaser *et al.* (1942), propusieron un medio simple para la producción de una especie no descrita de *Neoplectana*, la formulación del medio fue: 20 g de riñón o hígado de ternera, 100 ml de agua, 0,5 g de cloruro de sodio y 0,5 g de agar. El medio se esterilizó y los nematodos se adicionaron directamente. Esta formulación fue la base para las investigaciones posteriores.

Las observaciones experimentales realizadas por Glaser (1940), evidenciaron el desarrollo de “bacterias de vida libre” en los medios de cultivo, estas bacterias se asociaron al crecimiento poblacional de los nematodos. Dutky (1959), notó por primera vez las propiedades antibióticas de las bacterias asociadas con *S. carpocapsae*. Años después, Poinar y Thomas (1966), dilucidaron la importancia de la bacteria *X. nematophilus* en la reproducción de *S. carpocapsae*. Este estudio sentó las bases para la producción *In vitro* (Ehlers, 2001).

En 1976 se describió el género *Heterorhabditis* y en 1979 se caracterizó la especie bacteriana *Xenorhabditis luminescence* como simbiote de *H. bacteriophora* (Poinar, 1976; Thomas y Poinar, 1979).

Akhurst (1980) descubrió que en el cultivo de *Xenorhabdus* spp. se presentaban dos (o más) variaciones de fase, genéticamente idénticos y que diferían en la morfología y color de las colonias, como en actividad antimicrobiana.

Una innovación al cultivo *In vitro* se presentó con la publicación del trabajo investigativo de Bedding (1981). Los resultados evidenciaron el desarrollo y crecimiento poblacional de *Steinernema* spp. en cultivos tridimensionales a escala de matraces, usando una esponja de poliuretano o poliéster como portador inerte del medio nutritivo.

La primera patente sobre la producción de nematodos entomopatógenos en cultivo líquido, usando un biorreactor estándar de 10 L fue presentada por Pace *et al.* (1986).

La primera aplicación comercial de la tecnología del cultivo líquido fue hecha por la empresa Biosys (Palo Alto, California). La empresa fue constituida en 1987 y pronto comenzó a producir cultivos líquidos. En 1992, comenzó la producción de *S. carpocapsae* a gran escala y fue ampliada a volúmenes de 80 000 L (Ehlers, 2001).

1.9. Bibliografía

AGUINALDO, A. M. A., TURBEVILLE, J. M., LINFORD, L. S., RIVERA, M. C., GAREY, J. R., RAFF, R. A., & LAKE, J. A. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*. 489-49.

ADAMS, B. J.; FODOR, A.; KOPPENHÖFER, H.S.; STACKEBRANDT, E.; STOCK, P.; KLEIN, M.G. 2006. Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37 32–49.

AKHURST, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphisms in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121, 303–309.

AKHURST, R.J. 1983. *Neoplectana* species: specificity of the association with bacteria of the genus *Xenorhabdus*. *Exp. Parasitol.* 55, 258–263.

BEDDING, R.A. 1981. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27:109–114.

BEDDING, R.A. 1984. Large scale production, storage, and transport of the insect-parasitic nematode *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Ann. Appl. Biol.* 104, 117–120.

BEDDING, R.A. 1990. Logistics and strategies for introducing entomopathogenic nematode technology into developing countries. In: Gaugler R, Kaya HK (eds) *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Boca Raton. 233-248-

BELUR, P.D., INMAN III, F.L., HOLMES, L.D., 2013. Determination of specific oxygen uptake rate of *Photorhabdus luminescens* during submerged culture in lab scale bioreactor. *Biocontrol Sci. Technol.* 23, 1458–1468.

BINTRIM, S.B.; and ENSIGN, J.C. 1998. Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* results in mutations with pleiotropic phenotypes. *Journal of Bacteriology* 180, 1261–1269.

BLAXTER, M. 2011. Nematodes: the worm and its relatives. *PLoS Biol.* 9.

HAMMOND, P.M., HAWKSWORTH, D.L., KALIN-ARROYO, M.T., 1995. Magnitude and distribution of biodiversity: 3.1. The current magnitude of biodiversity. In: Heywood, V.H. (Ed.), *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 113–138.

BOEMARE, N.E. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Pp. 35–56 in R. Gaugler, ed. *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, UK: CABI Publishing.

BOEMARE, N.E., AKHURST, R. 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae). *J. Gen. Microbiol.* 134, 751–756.

BONIFASSI, E.; FISCHER-LE SAUX, M.; BOEMARE, N.; LANOIS, A.; LAUMOND, C.; SMART, G. 1999. Gnotobiological study of infective juveniles and symbionts of *Steinernema scapterisci*: a model to clarify the concept of the natural occurrence of monoxenic associations in entomopathogenic nematodes. J. Invertebr. Pathol. 74, 164–172.

CICHE, T.A. and ENSIGN, J.C. 2003. For the insect pathogen, *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? Appl. Environ. Microbiol. 69, 1890–1897.

CICHE, T.A.; DARBY, C.; EHLERS, R-U., FORST, S.; GOODRICH-BLAIR, H. 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. Biological Control. 38: 22-46

CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N. and DE LA TORRE, M. 2001. Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. Biotechnology Letters 23, 311-315.

CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.I.; PÉREZ-GUEVARA, F.; DE LA TORRE, M. 2003. Evolution of Culture Broth Rheological Properties during Propagation of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae*, in Submerged Monoxenic Culture. Biotechnol. Prog. 19, 405-409

CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N., ESPINO-GARCIA, J.-J., SANJUAN-GALINDO, R., RODRIGUEZ-HERNANDEZ, A.-I., 2006. Monoxenic liquid culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using a culture medium containing whey kinetics and modeling. J. Biotechnol. 125, 75–84.

CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N., ISLAS-LÓPEZ, M.-A., VERGARA-MACIEL, G., GAYOSSO-CANALES, M., RODRIGUEZ-HERNANDEZ, A.-I. 2008. Kinetics of infective juvenile production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in submerge monoxenic culture. Bioprocess Biosyst. Eng. 31, 419–426.

DOWDS, B.C.A.; PETERS, A. 2002. Virulence mechanisms. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology. CABI, Wallingford, UK. 79–98.

DUTKY, S. R. 1959. Insect Microbiology. *Advances in Applied Microbiology* 1:175–200.

DUTKY, S.R., THOMPSON, J.V., CANTWELL, G.E., 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J. Insect Pathol.* 6:417–422.

EHLERS, R-U.; STOESSEL, S.; WYSS, U. 1990. The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Rev Nematol* 13:417–424.

EHLERS, R.U.; O. STRAUCH. 1994. Establishment of axenic and monoxenic cultures summary of a practical workshop session. *In*: Burnell. A.M., Ehlers, R.U., and Masson, J. P. (eds.). Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complex. European commission directorate-general XII, science, research and development environment research program, Luxemburg, 204 pp.

EHLERS, R.-U.; WULFF, A.; PETERS, A. 1997. Pathogenicity of axenic *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii*, and the bacto-helminthic complex to larvae of *Tipulaa oleracea* (Diptera) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 69, 212–217.

EHLERS, R-U.; LUNAU, S.; KRASOMIL-OSTERFELD, K.C.; OSTERFELD, K.H. 1998. Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium complex *Heterorhabditis megidis/Photorhabdus luminescens*. *BioControl* 43:77–86.

EHLERS, R-U.; NIEMANN, I.; HOLLMER, S.; STRAUCH, O.; JENDE, D.; SHANMUGASUNDARAM, M.; MEHTA, U.K.; EASWARAMOORTHY, S.K.; BURNELL, A. 2000. Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica* – *Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Sci Technol* 10:607–616

EHLERS, R-U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56: 623–633.

FRIEDMAN, M.; LANGSTON, S.; POLLITT, S. 1989. Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. Int Patet WO 89/04602, US Patent 5,023,183.

GAUGLER, R. and HAN, R. 2002. Production Technology. En R. GAUGLER (Ed.), Entomopathogenic nematology (pp 289-355). United Kingdom: CAB International.

GERRITSEN, L.J.M.; SMITS, P.H. 1993. Variation in pathogenicity of recombinations of *Heterorhabditis* and *Xenorhabdus luminescens* strains. Fundam. Appl. Nematol. 16, 367–373.

GIL, G.H.; CHOO, H.Y.; GAUGLER, R., 2002. Enhancement of entomopathogenic nematode production in in-vitro liquid culture of *Heterorhabditis bacteriophora* by fed-batch culture with glucose supplementation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 751–755.

GLASER, R. W.; FOX, H. 1930. A nematode parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). Science, 71, 16-17.

GLASER R. W. 1940. The bacteria - free culture of a nematode parasite. Proc Soc Exp Biol Med 43: 512 – 514.

GLASER, R. W.; McCoy, E. E., GIRTH, H. B. 1942. The biology and culture of *Neoplectana chresima*, a new nematode parasitic in insects. J. Parasitol. 28(2): 123-126.

GREWAL, P.S.; CONVERSE, V.; GEORGIS, R. 1999. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two ambush foragers (Nematoda: Steinernematidae). J. Invertebr. Pathol. 73, 40–44

GREWAL, P.S.; EHLERS, R-U.; D.I. SHAPIRO-ILAN (Eds.). 2005. Nematodes as Biocontrol Agents, CABI, Wallingford, UK. 505 pp.

HAN, R.; CAO, L.; LIU, X. 1992. Relationship between medium composition, inoculum size, temperature and culture time in the yields of *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes. Fundam. Appl. Nematol. 15, 223–229.

HAN., R.C.; CAO, L.; LIU, X. 1993. Effects of inoculum size, temperatura and time on in vitro production of *Steinernema carpocapsae* Agriotos. *Nematologica* 39:366–375

HAN, R.C.; EHLERS, R-U. 1998. Cultivation of axenic *Heterorhabditis* spp. dauer juveniles and their response to non-specific *Photorhabdus luminescens* food signals. *Nematologica* 44, 425-435.

HAN, R.; EHLERS, R.-U. 2000. Pathogenicity, development, and reproductio of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsa* under axenic in vivo conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 55–58.

HEUNGENS, K.; MUGNIÉRY, D., VAN MONTAGU, M.; GHEYSEN, G.; NIEBEL, A. 1996. A method to obtain disinfected *Globodera* infective juveniles directly from cyst. *Fundam. Appl. Nematol.* 19: 91-93.

HIRAO, A., EHLERS, R.-U., 2010. Influence of inoculum density on population dynamics and dauer juvenile yields in liquid culture of biocontrol nematodes *Steinernem carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda: Rhabditida). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 507–515.

HIRAO, A., EHLERS, R.-U., STRAUCH, O., 2010. Life cycle and population development of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltia* (Nematoda, Rhabditida) in monoxenic liquid culture. *Nematology* 12, 201–210.

HINCHLIFFE, S.J.; HARES, M.C.; DOWLING, A.J.; FFRENCH-CONSTAN, R.H. 2010. Insecticidal Toxins from the Photorhabdus and Xenorhabdus Bacteria. *The Open Toxinology Journal.* 3: 83-100.

ISLAS-LÓPEZ, M.-A., SANJUAN-GALINDO, R., RODRIGUEZ-HERNANDEZ, A.-I., CHAVARRIA-HERNANDEZ, N., 2005. Monoxenic production of the entomopathogen nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulquero (*Agave* spp.) effects of the contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 91–97.

JESSEN, P.; STRAUCH, O.; WYSS, U.; LUTTMANN, R. A.; EHLERS, R.-U. 2000. Carbon dioxide trigger dauer juvenile recovery of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis* spp.) Nematology. 2, 310–324.

JOHNIGK, S.-A.; EHLERS, R.-U. 1999. *Endotokia matricida* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of food supply. Nematology. 1, 717–726.

JOHNIGK, S.-A.; ECKE, F., POEHLING, M., EHLERS, R.-U. 2004. Liquid culture mass production of biocontrol nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida) improved timing of dauer juvenile inoculation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 651–658.

JOYCE S.A., WATSON R.J., CLARKE D.J. 2006. The regulation of pathogenicity and mutualism in *Photorhabdus*. Curr. Opin. Microbiol. 9:127–132.

KAYA, H.K, GAUGLER, R. 1993. Entomopathogenic nematode. Annu. Rev. Entomol., 38: 181–206

KAYA, H.K.; STOCK, S.P. 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology, Academic Press, San Diego, pp. 281–324.

KRASOMIL OSTERFELD, K. 1995. Influence of osmolarity on phase shift in *Photorhabdus luminescens*. Applied Environmental Microbiology 61, 3748–3749.

KOPPENHÖFER, A.M.; FUZY, E.M. 2003. Ecological characterization of *Steinernema scarabaei*, a scarab-adapted entomopathogenic nematode from New Jersey. J. Invertebr. Pathol. 83, 139–148.

KEHEL-RAIFER, H.; GLAZER, I. 2000. Environmental factors affecting sexual differentiation in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. J. Exp. Zool. 287, 158–166.

LACEY, L.A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*. 132:1–41.

LUNAU, S.; STOESSEL, S.; SCHMIDT-PEISKER, A.J.; EHLERS R-U. 1993. Establishment of monoxenic inocula for scaling up in vitro cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp and *Heterorhabditis* spp. *Nematologica* 39:385–399.

LEWIS, E.E.; CLARKE, D.J. 2012. *Nematode Parasites and Entomopathogens*. Insect Pathology Second edition. San Diego, USA. Elsevier Inc.

MAMIYA, Y. 1989. Comparison of infectivity of *Steinernema kushidai* (Nematoda: Steinernematidae) and other steinernematid and heterorhabditid nematodes for three different insects. *Appl. Entomol. Zool.* 24, 302–308.

MORENO SALGUERO, C.A.; BUSTILLO, A.E.; LÓPEZ, J.C.; CASTRO VALDERRAMA, U.; RAMÍREZ SÁNCHEZ, G.D. 2012. Virulencia de nematodos entomopatógenos para el control del salivazo *Aeneolamia varia* (Hemiptera: Cercopidae) en caña de azúcar. *Revista Colombiana de Entomología* 38 (2): 260-265.

MOSHAYOV, A.; KOLTAI H.; GLAZER, I. 2013. Molecular characterisation of the recovery process in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *International Journal for Parasitology* (43) 843–852.

NEVES, J.M.; TEIXEIRA, J.A.; SIMOES, N.; MOTA, M. 2001. Effect of airflow rate on yield of *Steinernema carpocapsae* Az 20 in liquid culture in an external-loop airlift bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 369–373.

NGUYEN, K.B.; SMART JR, G.C. 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae). *J. Nematol.* 22, 187–199.

NGUYEN, K.B.; SMART, G.C. 1995. Morphometrics of Infective Juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). *J. Nematol.* 27, 206-212.

PACE, G.W.; GROTE, W.; PITT, D.E.; PITT, J.M. 1986. Liquid culture of nematodes. Int Patent WO 86/01074.

PETERS, A.; EHLERS, R.-U. 1997. Encapsulation of the entomopathogenic nematode *Steinnema feltiae* in *Tipula oleracea*. J. Invertebr. Pathol. 69, 218–222.

POINAR, GO JR.; THOMAS, G.M. 1966. Significance of *Achromobacte nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-13 (*Neoaplectana* sp., Steinernematidae). Parasitology 56:385-390.

POINAR, G.O.; THOMAS, G.M.; HESS, R. 1977. Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora*. Nematol 23:97–102.

POINAR, GO, JR., GREWAL, P.S. 2012. History of Entomopathogenic Nematology. Journal of Nematology 44(2):153–161.

REALPE, F. J.; BUSTILLO, A. E.; LÓPEZ, J. C. 2007. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. Revista Cenicafe 58 (2): 142-157.

RODOU, A.; ANKRAH, D.O., STATHOPOULOS, C. 2010. Toxins and Secretion Systems of *Photorhabdus luminescens*. Toxins (Basel). 2(6): 1250–1264.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; GOUGE, D.H.; KOPPENHÖFER, A.M. 2002. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic Nematology, CABI, Wallingford, pp. 333–355.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; GOUGE, G.H.; PIGGOTT, S.J.; PATTERSON FIFE, J. 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. Biol. Control 38, 124–133.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; HAN, R.; DOLINKSI, C. 2012. Entomopathogenic Nematode Production and Application Technology. Journal of Nematology 44(2):206–217.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; HAN, R.; QIU, X. 2014. Chapter 10 - Production of Entomopathogenic Nematodes, In: J.A., Morales-Ramos; M., Guadalupe-Rojas; D.I., Shapiro-Ilan, Editor(s). Mass production of beneficial organisms. Invertebrates and Entomopathogens. Academic Press. San Diego. Pages 321-355.

SMIGIELSKI, A.J., AKHURST, R.J., BOEMARE, N.E. 1994. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*: differences in respiratory activity and membrane energization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 120–125.

STEINER, G. 1923. *Aplectana kraussei* n. sp., einer in der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematodenform, nebst Bemerkungen über das Seitenorgan der parasitischen nematoden. *Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 59:14–18.

STRAUCH, O.; STOESSEL, S.; EHLERS, R.-U. 1994. Culture conditions define automictic or amphimictic reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*. *Fundam. Appl. Nematol.* 17, 575–582.

STRAUCH, O.; EHLERS, R.-U. 1998. Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 50: 369-374.

STRAUCH, O.; EHLERS, R.-U. 2000. Influence of the aeration rate on the yields of the biocontrol nematode *Heterorhabditis megidis* in monoxenic liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 9–13.

SUÁREZ-SÁNCHEZ, J.; ALATORRE-ROSAS, R.; POGGI-VARALDO, H.M.; BARRERA-CORTÉS, J. 2012. Effect of the inoculum size on the axenic *in vitro* production of *Steinernema carpocapsae*. *Cien. Inv. Agr.* 39(1):137-145.

SURREY, M.R.; DAVIES, R.J. 1996. Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *J Invertebr Pathol* 67:92–99.

WALL, D.H.; ADAMS, G.; PARSONS, A.N. 2001. Soil biodiversity. In: Chapin, F.S., Sala, O.E. (Eds.), *Global Biodiversity in a Changing Environment: Scenario for the 21st Century*. Springer, NY. 47–82

WALL, D.H., VIRGINIA, R.A., 2000. The world beneath our feet: soil biodiversity and ecosystem functioning. In: Raven, P.H., Williams, T. (Eds.), *Nature and Human Society: The Quest for a Sustainable World. Proceedings of the 1997 Forum on Biodiversity*. National Academy Press, Washington, DC. 225–241.

WHITE, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

WOODRING, J.L., KAYA, H.K., 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331 Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AR.

YOUNG, J.M.; DUNNILL, P.; PEARCE, J.D. 1998. Physical properties of liquid nematode cultures and the design of recovery operations. *Bioprocess Engineering* 19, 121–127.

ZIONI, S.; GLAZER, I.; SEGAL, D. 1992. Life Cycle and Reproductive Potential of the Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Strain H P881. *Journal of Nematology* 24(3):352-358.

Capítulo 2

AISLAMIENTO Y MULTIPLICACIÓN DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS ASOCIADOS AL AGROECOSISTEMAS DE LA PALMA DE ACEITE.

2.1. Introducción

Un aspecto importante en la implementación de programas de control biológico, lo determina la procedencia del enemigo natural, se deben considerar implicaciones de adaptabilidad, eficiencia, especificidad y facilidad para la producción masiva del agente de control biológico de interés, de acuerdo a lo mencionado se deben caracterizar previamente los enemigos naturales nativos, y medir su potencial controlador, antes de introducir especies foráneas. La presente investigación se justifica en el interés de utilizar enemigos naturales endémicos, para el establecimiento de programas de control biológico aumentativo, específicamente de nematodos entomopatógenos nativos, aislados y aplicados masivamente en plantaciones de palma de aceite para controlar poblaciones de insectos barrenadores plaga.

2.2. Metodología

Con la finalidad de aislar nematodos entomopatógenos con mayor potencial virulento y mejor adaptación a condiciones agroclimáticas, se realizaron muestreos de suelo en plantaciones comerciales de palma de aceite en las zonas productoras; suroccidental (Tumaco, Nariño), y central (Villa nueva, Casanare), cada sitio de muestreo fue georreferenciado. Todas las muestras de suelo se llevaron al laboratorio y se procesaron siguiendo la metodología del insecto trampa (Beeding y Akhurst, 1975), este método es el más usado para extraer nematodos entomopatógenos (Stock y Goodrich-Blair, 2012), el cual permite procesar y analizar numerosas muestras de suelo en periodos cortos de tiempo. Cada muestra fue tamizada y dividida en dos contenedores plásticos desechables de 710 cm³, generando 2 submuestras de 250 gr las cuales se humedecieron con agua estéril y se les adicionaron a cada una, 5 larvas de *G. mellonella* en último instar (Fig. 3A). Siete días después se retiraron las larvas muertas con signos de infección por nematodos

y se ubicaron en Trampas White (White, 1927), esperando posible emergencia (abandono del cadáver) de los JI. El proceso de ubicar larvas en las submuestras de suelo se realizó dos veces en el tiempo. Los criterios de selección de NEP en laboratorio fueron: alta virulencia en *G. mellonella* con alto rendimiento en juveniles infectivos (JI por larva).

Del total de submuestras procesadas, una proveniente de la plantación Central Manigua (Tumaco), presentó nematodos entomopatógenos, evidenciándose en los signos de enfermedad de una de las 5 larvas de *G. mellonella* depositadas en la submuestra. La larva afectada (flacidez, coloración rojo intenso), fue aislada, lavada con agua destilada estéril y llevada a una trampa White modificada (Fig. 3B), a los 5 días se observó emergencia de nematodos, se confirmó la infectividad aplicando los postulados de Koch, los nematodos entomopatógenos, expresaron características que identifican a especies del género *Heterorhabditis*. La cepa se conservó con el rotulo de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco).

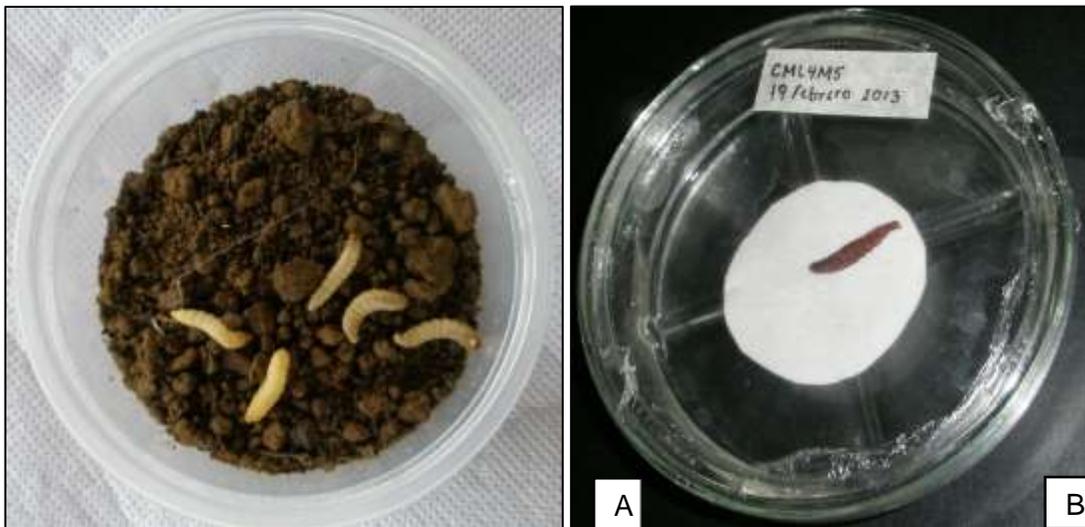


Figura 3. Aislamiento de nematodos entomopatógenos: A) Submuestra de suelo procesada con adición de 5 larvas de *G. mellonella* de último instar; B) Larva infectada, obtenida de muestra de suelo.

2.2.1. Multiplicación del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. (Tumaco)

El proceso productivo de la especie aislada inició con la infestación de larvas de *G. mellonella* en último instar, para esto se utilizaron bandejas de plástico (30 cm x 15 cm x 10 cm), con papel absorbente, sobre el cual se colocaron en promedio 250 larvas, posteriormente se les asperjó una suspensión de 10 ml de agua estéril, que contenía 5.000

Jl. Dos días después de la infección, se retiraron las larvas muertas por los nematodos (con visualización de signos de infección) y se colocaron en trampas White modificadas. Esta modificación consistió en las mismas bandejas de plástico, conteniendo una malla sobre la cual se ubicaron las larvas infectadas. A cada bandeja se le adicionaron 20 ml de agua destilada estéril. Las unidades se mantuvieron en estanterías hasta el momento de la cosecha (emergencia de Jl). Después de nueve días de infestadas las larvas, se inició la cosecha de los Jl, la cual se realizó cada dos días, durante seis días.

2.3. Resultados

2.3.1. Aislamiento del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp (Tumaco)

De 150 muestras de suelo procesadas y analizadas, el 0,67 % presentó nematodos entomopatógenos. Estos resultados son variables y dependientes de múltiples factores, entre ellos ambientales y ecológicos, investigaciones realizadas en diferentes regiones de todo el mundo evidencian esta variabilidad, diversos autores reportan un rango del 2 % al 30 % de muestras positivas para nematodos entomopatógenos (Mason et al., 1996, Mdituri et al., 1997, Constant et al., 1998, Tangchitsomkid y Sontirat, 1998, Stock et al., 1999, Griffin et al., 2000, Rosa et al., 2000, Hazir et al., 2003 y Canhilal et al., 2006, Morton y García Del Pino, 2009).

2.3.2. Multiplicación *In vivo* y mantenimiento de nematodos entomopatógenos

La multiplicación de la cepa *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en larvas de *G. mellonella* (Fig. 4A, B) permitió obtener un rendimiento acumulado de 63.000 ± 20.000 Jl por larva, con un valor máximo de 180.000 Jl por larva. El almacenamiento de los Jl se realizó en esponjas de poliuretano (10 cm x 10 cm x 2 cm) en una concentración de $5\,000.000 \pm 600.000$ de Jl por esponja y mantenidos a 17 ± 3 °C y HR del 75 ± 5 . El rendimiento estimado para esta cepa, como el reportado para otras especies, es afectado, por el potencial reproductivo del nematodo, el potencial del insecto para permitir el desarrollo de los nematodos, los parámetros de inoculación (dosis, edad del inoculo, entre otros), condiciones ambientales (Shapiro-Ilan et al., 2014), y generalmente el tamaño del insecto hospedero (Blinova e Ivanova, 1987; Flanders et al., 1996). La variación del rendimiento entre las especies de nematodos, también se atribuye al tamaño de los Jl, siendo este inversamente proporcional al rendimiento (Grewal et al., 1994; Hominick et al., 1997; Shapiro-Ilan et al., 2014). A menor

tamaño de los JI, mayor es el rendimiento. Aunque algunas especies simplemente tienen alta capacidad reproductiva de manera innata (como *H. indica* y *S. riobrave*). Por ejemplo, los rendimientos de *S. riobrave* (longitud corporal promedio JI = 622 μm) puede ser superior a 300.000 IJ por larva de *G. mellonella* L., mientras que para *S. glaseri* (longitud corporal promedio IJ = 1,133 μm) los rendimientos no exceden los 50.000 JI en el mismo hospedero (Grewal *et al.*, 1994; Stock y Hunt, 2005; Shapiro-Ilan *et al.*, 2014).

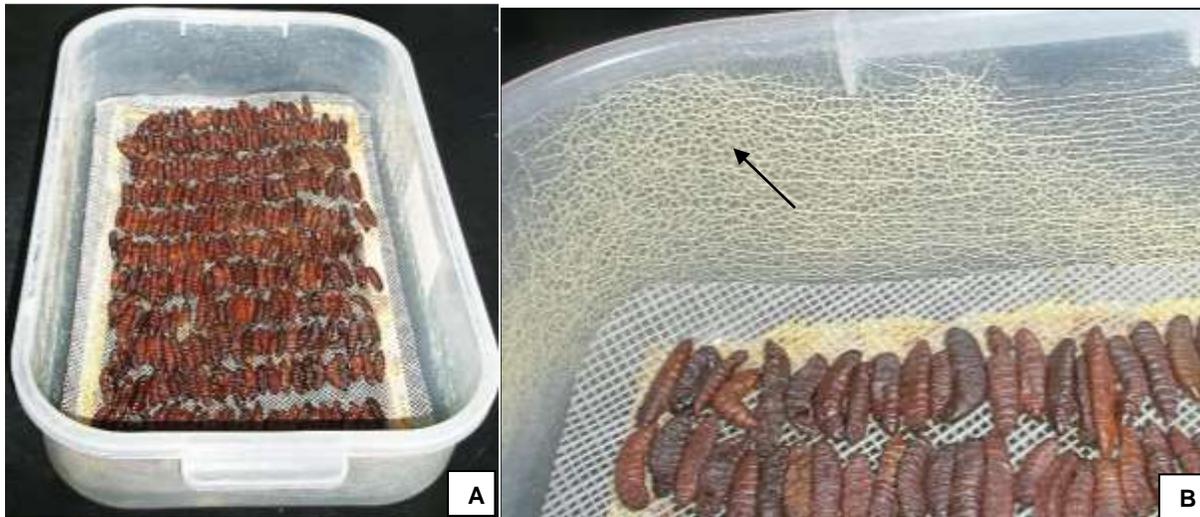


Figura 4. Multiplicación de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco). A) Sistema de multiplicación, B) Emergencia de juveniles infectivos (JI) nueve días después de la infestación.

2.4. Bibliografía

BEEDING, R. A.; AKHURST, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* (Holanda) 21: 109 - 110.

BLINOVA, S.L.; IVANOVA, E.S. 1987. Culturing the nematode-bacterial complex of *Neoplectana carpocapsae* in insects. In: Sonin, M.D. (Ed.), *Helminths of Insects*, American Publishing Co., New Delhi, pp. 22–26.

CANHILAL, R., REID, W., KUTUK, H., EL-BOUHSSINI, M. 2006. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Syrian soils. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 2, 493–497.

CONSTANT, P., MARCHAY, L., FISCHER-LE SAUX, M., BRIAND-PANOMA, S., MAULEON, H., 1998. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe islands. *Fund. Appl. Nematol.* 21, 667–672

FLANDERS, K.L.; MILLER, J.M.; SHIELDS, E.J. 1996. In vivo production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil inhabiting insects in temperate regions. *J. Econ. Entomol.* 89, 373–380.

GREWAL, P.S.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes— niche breadth for infection, establishment and reproduction. *J. Therm. Biol.* 19, 245–253.

GRIFFIN, C.T., CHAERANI, R., FALLON, D., REID, A.P., DOWNES, M.J. 2000. Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp., and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. *J. Helminthol.* 74, 143–150.

HAZIR, S., KESKIN, N., STOCK, P., KAYA, H.K., ÖZCAN, S. 2003. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Turkey. *Biodivers. Conserv.* 12, 375–386.

HOMINICK, W.M.; BRISCOE, B.R.; DEL PINO, F.G.; HENG, J.; HUNT, D.J.; KOZODOY, E.; MRACEK, Z.; NGUYEN, K.B.; REID, A.P.; SPIRIDONOV, S.; STOCK, P.; STURHAN, D.; WATURU, C.; YOSHIDA, M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols, and definitions. *J. Helminthol.* 71, 271–298.

MASON, J.M., RAZAK, A.R., WRIGHT, D.J. 1996. The recovery of entomopathogenic nematodes from selected areas within Peninsular Malaysia. *J. Helminthol.* 70, 303–307

MIDITURI, J.S., WAEYENBERGE, L., MOENS, M. 1997. Natural distribution of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditidae* and *Steinernematidae*) in Belgian soils. *Russ. J. Nematol.* 5, 55–65.

MORTON, A.; GARCÍA DEL PINO, F. 2009. Ecological characterization of entomopathogenic nematodes isolated in stone fruit orchard soils of Mediterranean areas. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102 (3): 203–21.

ROSA, J.S., BONIFAASSI, E., AAMARL, J., LACEY, L.A., SIMOES, N., LAUMOND, C. 2000. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernema, Heterorhabditis) in the Azores. *J. Nematol.* 32, 215–222

STOCK, S.P., PRYOR, B.M., KAYA, H.K. 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. *Biodivers. Conserv.* 8, 535–549.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; HAN, R.; QIU, X. 2014. Chapter 10 - Production of Entomopathogenic Nematodes, In: J.A., Morales-Ramos; M., Guadalupe-Rojas; D.I., Shapiro-Ilan, Editor(s). *Mass production of beneficial organisms. Invertebrates and Entomopathogens*. Academic Press. San Diego. Pages 321-355.

STOCK, S.P. and GOODRICH-BLAIR, H. 2012. Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. In: *MANUAL OF TECHNIQUES IN INVERTEBRATE PATHOLOGY*, 2nd ed. Yakima, Washington, USA: LAWRENCE A. LACEY, p.384.

TANGCHITSOMKID, N., SONTIRAT, S. 1998. Occurrence of entomopathogenic nematodes in Thailand. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 32, 347–354.

WHITE, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.

Capítulo 3.

CICLO DE VIDA, RENDIMIENTO Y PATOGENICIDAD DE *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) EN CULTIVO MONOXÉNICO SÓLIDO.

3.1. Introducción

Los nematodos entomopatógenos expresan un alto potencial en la supresión de poblaciones de insectos plaga. Múltiples trabajos de investigación evidencian su eficacia en programas de control biológico aumentativo, no obstante una limitante para su implementación es la disponibilidad comercial. Ante esta limitante surge la necesidad de desarrollar metodologías alternas que permitan masificar la producción de estos biocontroladores nativos bajo condiciones locales. El argumento mencionado justifica la necesidad de desarrollar investigación básica que conlleve al conocimiento de la interacción del nematodo y sus simbiontes bacterianos en cultivos in vitro. El objetivo del presente estudio fue establecer el ciclo de vida y rendimiento de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en cultivo monoxénico sólido y evaluar la patogenicidad de los JI producidos.

3.2. Metodología

3.2.1. Aislamiento del simbionte bacteriano

Para aislar los simbiontes bacterianos se evaluaron dos métodos: extracción a partir de hemolinfa de larvas infectadas (Ehlers *et al.*, 1990), y aislamiento de bacterias a partir de juveniles infectivos.

3.2.1.1. Aislamiento de *Photorhabdus* sp. a partir hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* infectadas con *Heterorhabditis* sp. (Tumaco)

En una caja Petri con papel filtro estéril se ubicaron 20 larvas de *G. mellonella* en último instar, las cuales se asperjaron con 500 JI de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) concentrados en 1 ml de agua destilada estéril. Se seleccionaron cinco larvas muertas de 24, 36 y 48 horas postinfestación. Los cinco cadáveres fueron sumergidos en una solución de Formaldehído al 0,02 % durante 1 minuto y enjuagados con agua destilada estéril. A cada larva se le realizó un corte sagital medio, y con una jeringa estéril, se extrajo la hemolinfa

de la cual se sembró una gota en cajas con agar nutritivo 2 % p/v; azul de bromotimol 0,025 % p/v y cloruro de trifetil tetrazolio 0,04 % p/v (NBTA) pH: 8,1. Las cajas se incubaron por 36 horas a 28 °C, inspeccionando a las 12 y 24 horas, con la finalidad de constatar la fase del crecimiento bacteriano.

3.2.1.2. Aislamiento del simbiote bacteriano *Photorhabdus* sp. a partir de juveniles infectivos de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco)

Se trabajó en una cabina con flujo laminar de aire, la cabina previamente fue sanitizada con alcohol al 70 % y luz UV durante 30 min. Se utilizaron juveniles infectivos (JI) de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) con 24 horas de emergencia conservados en agua destilada estéril, de la cual se extrajeron 40 µl que fueron puestos sobre un portaobjetos estéril. Bajo observación al estereoscopio y con la ayuda de un alfiler entomológico al cual se le curvó la punta (0,5 mm), se tomaron individualmente 20 JI, que se colocaron en una gota de NaClO al 1 % (p/v); Transcurridos 2 min se extrajeron nuevamente, y se lavaron con dos gotas de agua destilada estéril. Se tomaron nuevamente los JI y se colocaron en una gota de caldo Soya Tripticaseina 1,3 % p/v y extracto de levadura 0,5 % p/v (CST), y se maceraron con un bisturí para ser transferidos a tres cajas Petri que contenían cada una 8 ml de CST (Fig.5). Las cajas se sellaron con parafilm.

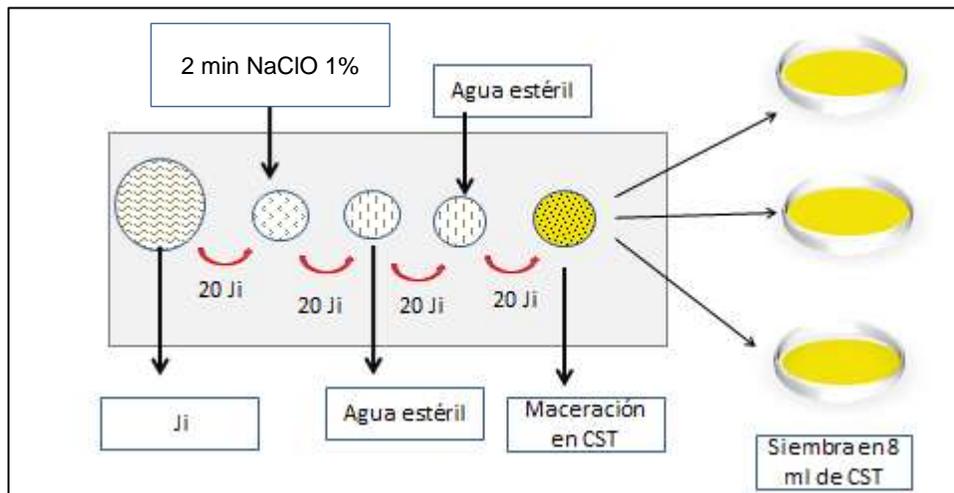


Figura 5. Esquema para el aislamiento de *Photorhabdus* sp. a partir de JI de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco).

Las cajas Petri se incubaron a 28 °C, durante 48 h, tiempo en el cual se observó turbidez del medio, En seguida se tomó una alícuota y se esparció en cajas Petri con medio NBTA y se incubaron nuevamente a 28 °C durante 48 horas.

3.2.2. Almacenamiento y conservación de *Photorhabdus* sp.

Para el almacenamiento y conservación de las bacterias se tomaron 4 colonias con 30 h de crecimiento (fase I) en medio NBTA y se sembraron individualmente en matraces Erlenmeyer de 250 ml y 50 ml de CST. Los matraces se incubaron a 30 °C en un agitador orbital (180 rpm). 48 horas después se registró el pH y se adicionó a cada matraz 15 ml de glicerol estéril al 30 % (v/v), se mezcló y dosificó en tubos Eppendorf estériles (viales de conservación) de 2 ml, enseguida se refrigeraron por 1 h a 7 °C, posteriormente se llevaron a un congelador durante 2 h a -14 °C, finalmente se almacenaron en un ultra congelador a -80 °C (New Brunswick - U101 Innova. Inglaterra) (Ehlers, 2001).

3.2.3. Patogenicidad de *Photorhabdus* sp. en *G. mellonella*

Para determinar la patogenicidad de los simbioses aislados se estableció una prueba sobre larvas de *G. mellonella* en último instar. El experimento se realizó en una placa multipozos (24), a la cual se le abrieron agujeros en la tapa y se cubrieron con una malla metálica para permitir el paso de aire. Se dispuso de un diseño unifactorial con arreglo completamente al azar, Se establecieron 4 tratamientos y 6 repeticiones, cada unidad experimental fue constituida por una larva por pozo y papel absorbente, los tratamientos fueron: 1) 100 células de *Photorhabdus* sp., inyectadas a cada Larva; 2) inyección de solución Ringer a larvas; 3) 10 Juveniles infectivos (JI) por larva y 4) un control (larvas sin disrupción). La variable de respuesta fue la mortalidad de las larvas. Para el primer tratamiento fueron seleccionadas colonias en fase I (cultivadas en NTBA) y diluidas individualmente y contabilizadas en 5 ml de solución Ringer. Con una jeringa estéril de 1 ml se inyectaron 100 µl, en el noveno segmento abdominal de cada larva. El segundo tratamiento consistió en repetir el anterior procedimiento sin la inyección de células bacterianas, esto con la finalidad de corregir la posible mortalidad causada por el daño físico de la aguja.

Después de 36 horas de realizadas las infecciones se seleccionaron dos larvas de los tratamientos con *Photorhabdus* sp. y nematodos. A cada larva se le extrajo nuevamente la hemolinfa y se sembró en NTBA. Con estos aislados se realizó un segundo ensayo: Se

utilizó una placa multipozos con 3 tratamientos y con 6 repeticiones de cada uno. El primer tratamiento consistió en inyectar células bacterianas aisladas en NBTA de larvas infectadas en el anterior experimento; en el segundo tratamiento se inyectaron colonias provenientes de larvas infectadas por nematodos y el tercer tratamiento consistió en inyectar las larvas sin las bacterias (control). La variable de respuesta fue la mortalidad de las larvas.

3.2.4. Establecimiento de cultivo monoxénicos de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en medio sólido.

Se evaluaron dos medios nutritivos: 1) agar nutritivo-hígado (ANH); formulado con hígado de pollo (10 % p/v), agar nutritivo (2,3 % p/v), aceite de maíz (4,0 % v/v), y 2) agar nutritivo-yema de huevo (ANYH) formulado con extracto de levadura (2,3 % p/v), yema de huevo (1,25 % p/v), NaCl (0,5 % p/v), aceite de maíz (4 % v/v), agar nutritivo (2,3 % p/v). El experimento se estableció con un diseño completamente al azar, con dos factores (medios de cultivo) y un nivel (una concentración de JI). En cada tratamiento se utilizaron 10 cajas Petri estériles y 5 ml de medio por caja. Se realizaron dos repeticiones en el tiempo. La variable de respuesta fue el rendimiento (JI por caja).

La inoculación de los cultivos sólidos se realizó en condiciones asépticas (cabina de flujo laminar). Para esto fue retirado un vial de conservación del ultra congelador (-80 °C), que contenía células bacterianas de *Photorhabdus* sp. y se permitió su descongelación a temperatura ambiente, enseguida se vació la totalidad del volumen del vial en 20 ml de medio CST, contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. El matraz se cerró con un tapón de algodón, se incubó a 30 °C y se agitó a 180 rpm durante 24 h. Transcurrido este tiempo se midió el pH y se inoculó cada caja Petri con 200 µl del caldo fermentado que contenía crecimiento bacteriano en FI. Después de 48 horas se adicionaron a las cajas, juveniles infectivos o huevos en estado de mórula extraídos de hembras grávidas, ambos estados se adicionaron en una concentración de 100 individuos por caja Petri. Los JI fueron previamente desinfectados, para esto se tomó una suspensión de nematodos y se re suspendió en una solución de NaClO 0.1 % (v/v) durante una hora con agitación de 150 rpm, posteriormente se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril.

Para la obtención de huevos en mórula de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco), se diseccionaron larvas de *Galleria mellonella* con 5 días de infección por el nematodo, se extrajeron 120

hermafroditas grávidas y se suspendieron en solución salina (NaOH al 0,1 %) durante 6 horas, lo que causó liberación de los huevos por lisis del hermafrodita. Inmediatamente se recuperaron los huevos en estado de mórula, se desinfectaron con NaClO 0,1 % y se procedió a transferir 1000 huevos en 10 cajas Petri (100 huevos por caja Petri), las cuales contenían el medio de producción colonizado con su simbionte bacteriano. Después de tres días se contabilizaron los nematodos eclosionados. Un experimento previo consistió en poner los huevos en agar nutritivo, contenido en tapas de tubos Eppendorf de 1,5 ml, diariamente se verificó el crecimiento de contaminantes y la eclosión de los nematodos. Cuando se observó desarrollo de JI, todas las unidades experimentales se ubicaron en trampas White, lo que permitió recuperar y cuantificar los JI producidos.

Se realizaron observaciones diarias identificando estados de desarrollo y cuantificación de JI producidos por caja Petri.

3.2.5. Ciclo de vida y rendimiento de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco)

El ciclo de vida de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) se estableció el medio ANH. Se utilizaron 10 cajas Petri de vidrio (50 mm de diámetro) estériles y 2,5 ml de medio por caja. La inoculación de los medios se realizó en cabina de flujo laminar, para esto fue retirado un vial de conservación del ultra congelador (-80 °C) y se permitió su descongelación a temperatura ambiente, enseguida se vació la totalidad del volumen en 20 ml de medio CST, contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y cerrado con un tapón de algodón. El matraz se incubó a 30 °C y agitación de 150 rpm durante 24 h. Transcurrido este tiempo se midió el pH y se inoculó cada caja Petri con 200 µl del caldo fermentado. Después de 48 horas se adicionó una suspensión de 100 JI por caja Petri en un volumen de 50 µl de agua destilada estéril, a partir de ese momento los medios se mantuvieron a temperatura ambiente (28 °C, HR: 65 %) hasta que se obtuvieron nuevamente JI. El experimento se repitió tres veces en el tiempo. Como variables de respuesta se midió el rendimiento de JI y el ciclo de vida del nematodo en el medio sólido, para esto se realizaron observaciones cada 24 horas y se contabilizó el número de individuos por estado de desarrollo.

3.2.6. Medición de la patogenicidad de JI producidos en cultivo *In vitro* contra *Galleria mellonella* L.

Para medir la patogenicidad de JI obtenidos durante cinco ciclos de producción *in vitro*, se realizaron cinco experimentos, en cada uno se utilizaron 5 repeticiones siguiendo la metodología del numeral 9.1.7, al final de cada ciclo de producción se determinó el rendimiento (JI por caja Petri), 500 JI se destinaron para el siguiente ciclo productivo y otros 75 JI se utilizaron para la prueba de virulencia, ese procedimiento se realizó 5 veces. Para las pruebas de virulencia se utilizaron 18 tubos de centrifuga estériles de 2 ml, a cada tubo se le adicionó 2.5 g de arena estéril y una larva de *G. mellonella* en ultimo instar. 6 tubos se utilizaron como testigo, a los cuales se les adicionaron 250 μ l de agua destilada (Fig.6). A 6 tubos se les adicionaron 15 JI producidos in vivo, obtenidos de larvas de *G. mellonella* y a los 6 tubos restantes se les adicionaron 15 JI producidos en el medio ANH. Los 18 tubos, se almacenaron a condiciones de laboratorio a 25 ± 3 °C, HR: 65 % por 3 días. Posteriormente, se extrajeron las larvas de *G. mellonella*, y se lavaron con agua estéril. Tres larvas por cada tratamiento se diseccionaron y se contabilizó el número de nematodos que penetraron.

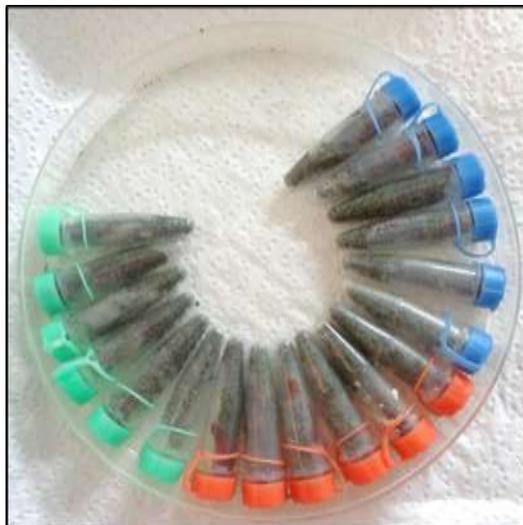


Figura 6. Ensayo de patogenicidad. Tubos de centrifuga (2 ml) con arena estéril y una larva de *G. mellonella* en último instar.

3.3. Resultados

3.3.1. Aislamiento de *Photorhabdus* sp. simbiote bacteriano de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco)

En la selección del método para el aislamiento de las bacteria simbiotes se encontró que la extracción de hemolinfa a partir de larvas infectadas favoreció la contaminación con otros microorganismos, no se logró obtener cultivos puros en ninguno de los estados de postinfección (24, 36 y 48 h) evaluados. Este resultado pudo atribuirse a una deficiente desinfestación de las larvas, las cuales no provenían de una dieta estéril. No obstante, otras investigaciones evidencian el éxito de la técnica (Akhurst, 1980; Strauch y Ehlers, 1998). Susurluk *et al.* (2013), aislaron y multiplicaron seis cepas de simbiotes bacterianos en FI, a partir de seis cepas de *H. bacteriophora*.

El aislamiento a partir de JI permitió obtener cultivos puros en fase I (Fig. 7A, B), las colonias se observaron 48 h después de sembradas en NBTA, las cuales se caracterizaron por la absorción del azul de bromotimol dando lugar a colonias verde oscuro, mientras que la fase II no absorbió este colorante, además redujo el cloruro de trifenil tetrazolio, dando lugar a colonias rojas (Fig. 7C) (Akhurst, 1980).

3.3.2. Almacenamiento y conservación de *Photorhabdus* sp.

El pH inicial del medio CST se registró en 7,34. Después de 48 horas de inoculado se observó turbidez en los medios, con valores promedio de pH: $8,02 \pm 0,4$ Este valor se considera un parámetro de calidad en el proceso, y se ajusta al rango óptimo (6,5-9,0) descrito por Ehlers (2001). La concentración final de *Photorhabdus* sp. en almacenamiento fue 1×10^7 UFC por ml. Se almacenaron 400 viales de conservación.

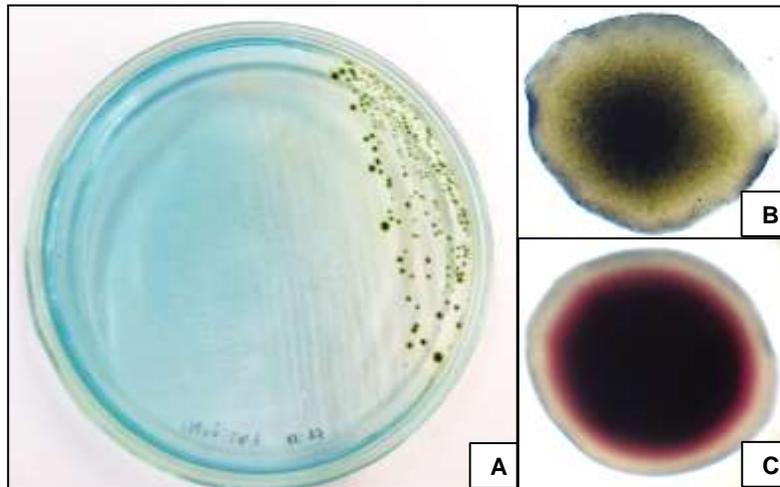


Figura 7. A) Aislamiento de *Photorhabdus* sp. en NBTA; B) colonia en fase I (100 x); C) colonia en fase II (100 x).

3.3.3. Establecimientos de cultivos monoxénicos de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en medio sólido.

- **Cultivos monoxénicos inoculados con huevos extraídos de hermafroditas de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco)**

Después de tres días de inoculados los huevos (Fig.8) en agar nutritivo, se observó eclosión de 26 ± 6 % (Tabla.3). El proceso de extracción pudo haber influido en el resultado, se observó que en los huevos no eclosionados se detuvo la división celular, los cuáles 6 días después continuaron en estado de mórula. En las unidades experimentales no se observó crecimiento de microorganismos contaminantes.

En la evaluación de huevos sobre medios de cultivo (ANH y ANY), se encontró que los nematodos completaron su ciclo productivo en el medio ANH en 12 días, momento en el cual se observó el desarrollo de J1 y continuó hasta el día 16. Se obtuvieron rendimientos acumulados de 4.000 J1 por caja Petri.

Tabla 3. Eclosión de huevos en agar nutritivo extraídos de hermafroditas grávidas de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco)

Repetición	J1 Eclosionados
1	30
2	40
3	23
4	20
5	24
6	21
7	18
8	25
9	27
10	29
Media	25,7 ± 6,3

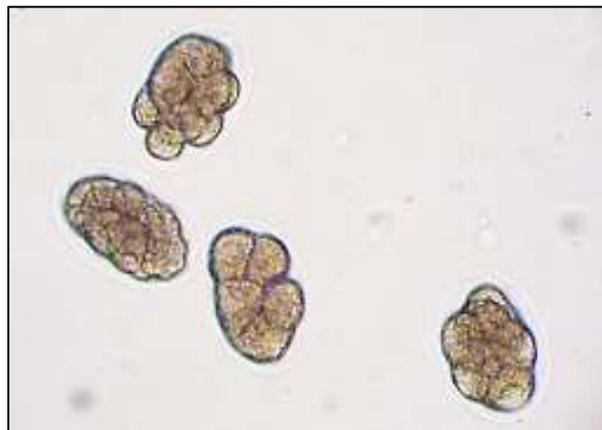


Figura 8. Huevos de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en estado de mórula (400 x)

▪ **Cultivos monoxénicos inoculados con J1 de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco)**

En las evaluaciones de desarrollo con J1 de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) sobre medios nutritivos se encontró que, 30 horas después de inocularse con *Photorhabdus* sp. el medio se tornó rojo oscuro (Fig. 9 A, B). A las 96 horas se observó desarrollo del 100 % de la población en estado adulto (Fig.10 A, B). El medio Agar Nutritivo-Hígado presentó el mayor

rendimiento de JI (Fig.11), se registró una producción de 430.000 JI por caja Petri, la emergencia de los JI inició al séptimo día y finalizó entre los días 11 y 12. El medio 2 (agar nutritivo-yema de huevo) presentó menor rendimiento (340.000 JI por caja), la emergencia inició al día 7 y terminó al día entre los días 11 y 12 (Fig. 11).

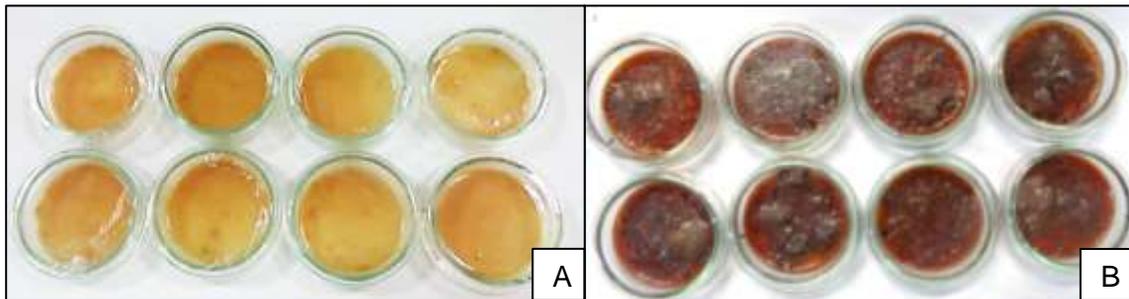


Figura 9. Medio de cultivo sólido ANH (Agar Nutritivo-Hígado) A) sin inocular; B) 48 horas después de inoculados.

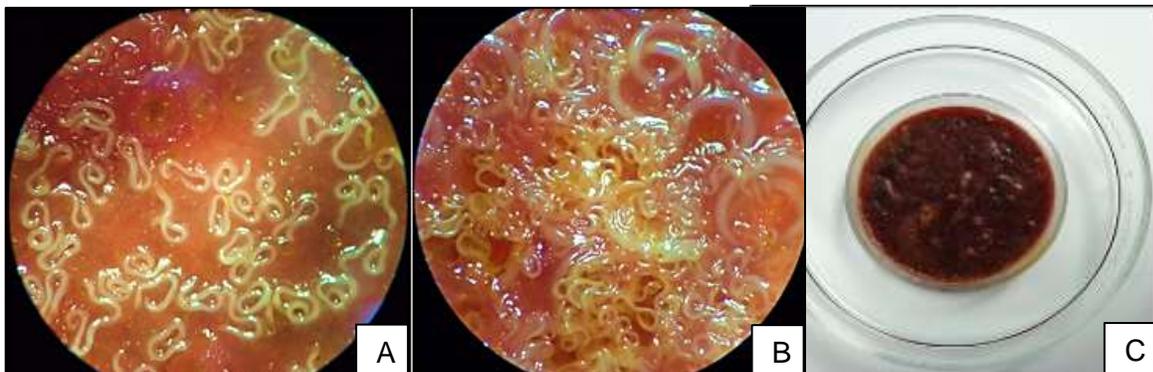


Figura 10. Estados de desarrollo de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en cultivo sólido. A) Hermafroditas grávidos; B) Colonización del medio; C) Trampa White modificada.

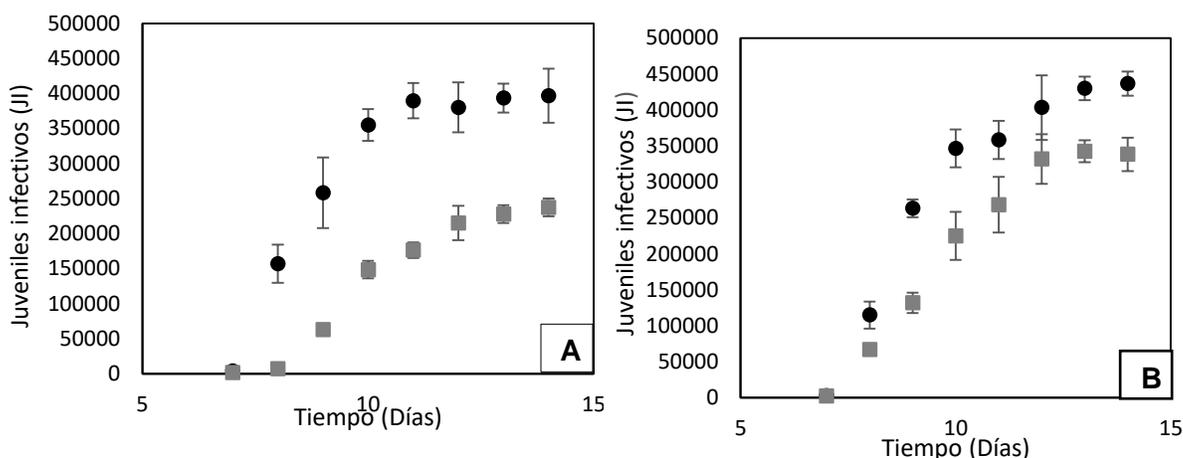


Figura 11. Producción de JI de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en diferentes medios sólidos, los círculos corresponden al medio Agar nutritivo hígado, los rectángulos corresponden al medio Agar nutritivo huevo. A) Experimento 1; B) Experimento 2.

Con los resultados obtenidos se seleccionó la inoculación con JI, se evidenció la eficiencia del método, dada la facilidad de obtener JI, la desinfestación de los nematodos fue eficaz, debido a que no se presentó contaminación en los cultivos. El mayor potencial reproductivo se alcanzó con el medio agar nutritivo-hígado (ANH).

3.3.4. Ciclo de vida de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en medio sólido.

Se encontró que *Heterorhabditis* sp. (Tumaco), cumple dos ciclos de vida cortos en el medio sólido (ANH), cada uno con una duración de siete a ocho días (tabla 4). La emergencia de JI inició al día 9 y culminó al día 13.

A las 24 horas de inoculados los JI en los medios se observó recuperación del 95 % de los individuos, 48 horas después se diferenciaron en J4, a las 72 horas se observaron adultos hermafroditas y hermafroditas grávidos a las 96 h (Fig. 12C, 12G). Los huevos se desarrollaron y eclosionaron al interior del hermafrodita (endotoquia matricida) y emergieron del cadáver a las 120 horas en estados de J1 y J2 (Fig. 12H), a las 144 horas la población se compuso de J2 Y JI (Fig. 12B, C), a las 168 horas se observó que la población estaba dominada por JI (Fig. 12E).

Tabla 4. Ciclo de vida de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en cultivo monoxénico (Agar Nutritivo-Hígado)

Tiempo después de la inoculación (h)	Estado de Desarrollo
0	J1
24	Recuperación
48	J4
72	Adultos Hermafroditas
96	Hermafroditas grávidos
120	J1/J2
144	J2/J1
168	J1

Los resultados son atribuidos a múltiples factores, entre ellos, la composición del medio, las condiciones ambientales, y el potencial reproductivo del nematodo. La duración del ciclo de vida y el número de generaciones de los nematodos depende de la densidad poblacional de la primera y segunda generación, disponibilidad de alimento y tamaño del hospedero (Sáenz y Luque 2000; Sáenz y López. 2011).



Figura 12. Estados de desarrollo de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) A) J1, a punto de eclosionar (400 x), B) J1 y huevo desarrollado (400 x), C) J2 (400 x), D) J3 (100 x), E) J4. Las flechas indican los pliegues de la doble cutícula (100 x), F) J4 (100 x), G) Adulto hermafrodita grávido (100 x), H) Desarrollo de J2 y J3 por endotoquia matricida (100 x).

3.3.5. Patogenicidad de *Photorhabdus* sp. en *G. mellonella*

Se encontró que, a las 16 horas de haber inoculado las bacterias en las larvas, el 100 % de los insectos habían muerto, en contraste, las larvas en las que se pusieron J1 obtuvieron mortalidad del 100 % a las 24 horas. La sintomatología en ambos tratamientos fue similar (Fig. 13). En el tratamiento control y en las larvas inyectadas sin la bacteria no se presentó mortalidad. 24 horas después fueron retiradas todas las larvas muertas a causa de la infección por NEP e inyección de las bacterias. Los cadáveres fueron desinfectados como se indicó anteriormente. La hemolinfa extraída de los cadáveres desinfectados, mostraron crecimiento de colonias después de 36 horas de siembra en NBTA, se observó crecimiento

de colonias en fase II, a partir de larvas infectadas con la bacteria y colonias en fase I para el caso de larvas infectadas por NEP.

En el segundo experimento se observó que después de 15 horas de la infección se presentó mortalidad del 100 % en las larvas inoculadas con las bacterias, en el tratamiento control no se presentó mortalidad (Fig. 14).



Figura 13. Patogenicidad de *Photorhabdus* sp. en larvas de *G. mellonella*. 1) Tratamiento control; 2) larvas inoculadas con la bacteria; 3) larvas inyectadas sin la bacteria; 4) larvas infectadas con nematodos.

Las larvas inoculadas con colonias provenientes de larvas infectadas con las bacterias presentaron un color café oscuro, en contraste, las larvas infectadas con colonias obtenidas de larvas infectadas con nematodos presentaron una coloración rojiza (Fig. 14). En insectos susceptibles como *G. mellonella* basta con tres células de *Photorhabdus luminescens* para causar la mortalidad del insecto (Poinar *et al.*, 1977).



Figura 14. Patogenicidad de *Photorhabdus* sp. en larvas de *G. mellonella*. 1) Tratamiento control; 2) larvas inyectadas con la bacteria -aislada de larvas previamente infectadas-; 3) larvas inyectadas con la bacteria, aislada de larvas infectadas con NEP.

3.3.6. Patogenicidad de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) producido en cultivo *In vitro* contra *Galleria mellonella* L.

Los ciclos consecutivos de producción no tuvieron un efecto sobre la patogenicidad en larvas de *G. mellonella* (100 % de mortalidad), pero si en la tasa de multiplicación, dónde el ciclo 1 presentó diferencia significativa (prueba de Tukey) con los siguientes ciclos de producción (Fig. 15).

En las larvas infestadas con JI producidos *In vitro* se presentó penetración del 22 % de los nematodos y en las larvas infestadas con JI producidos *In vivo* se encontró penetración del 27 %. Estos valores se encuentran en el rango del 10 – 80 % reportado por Sáenz y López (2011), pero mayor al rango 2,7-12,3 % obtenido por Caroli *et al.* (1996), con JI producidos *in vivo*.

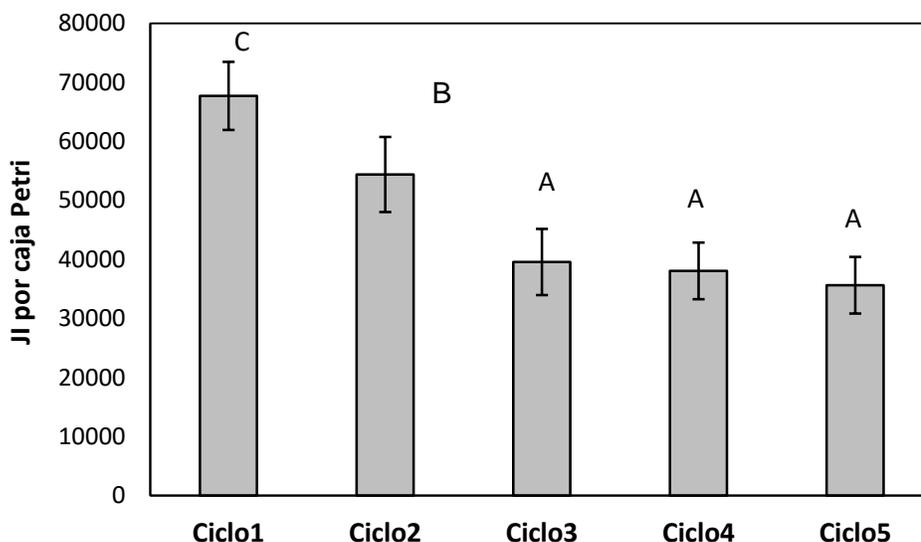


Figura 15. Rendimiento de JI por caja Petri en ciclos consecutivos de producción en medio de cultivo sólido (ANH) monoxénico. Las barras indican el error estándar, letras iguales en la parte superior no difieren significativamente. Tukey ($p < 0,05$).

Estos resultados son consecuentes con los obtenidos por Susurluk *et al.* (2013), quienes evaluaron la virulencia de seis cepas de *H. bacteriophora* producidas *in vivo* e *in vitro* contra *G. mellonella*, el contraste estadístico no evidenció diferencia estadística entre cinco de las seis cepas evaluadas.

3.4. Bibliografía

AKHURST, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphisms in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121, 303–309.

CAROLI, L.; GLAZER, I.; GAUGLER, R. 1996. Entomopathogenic nematode infectivity assay: comparison of penetration rate into different hosts. Biocontl. Sci. Technol. 6, 227–233.

EHLERS, R-U.; STOESSEL, S.; WYSS, U. 1990. The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of

entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Rev Nematol* 13:417–424.

EHLERS, R-U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56: 623–633.

POINAR, G.O.; THOMAS, G.M.; HESS, R. 1977. Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora*. *Nematol* 23:97–102.

SÁENZ, A. A.; LUQUE, J. E. 2000. Cicle de vida del entomonematodo nativo *Steinernema feltiae* Filipjev. *Agronomía Colombiana*. 17: 17-24.

SÁENZ A.A.; Y LÓPEZ, J.C. 2011. Ciclo de vida y patogenicidad del aislamiento nativo *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Revista Colombiana de Entomología* 37 (1): 43-47.

STRAUCH, O.; EHLERS, R-U. 1998. Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 50: 369-374.

SUSURLUK, I.A.; KONGU, Y.; ULU, T.C. 2013. Quality control of *in vitro* produced *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strains isolated from Turkey. *Türk. entomol. derg.* 37 (3): 283-291.

Capítulo 4

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL SUSTRATO SOBRE EL RENDIMIENTO DE *Heterorhabditis sp* (Tumaco) EN CULTIVO SEMISÓLIDOS

4.1. Introducción

El potencial de los nematodos entomopatógenos en el control de plagas agrícolas ha generado un avance significativo en el sistemas de masificación de los mismos, en la actualidad, el sistema de producción mediante fermentación líquida es ampliamente utilizado en países industrializados. En contraste, la mayor parte de países no industrializados exploraran métodos de producción menos tecnificados, particularmente el sistema de producción in vivo. Si bien este último permite obtener nematodos de buena calidad, se limita a bajos volúmenes de producción, dada la alta inversión en mano de obra.

Una tecnología intermedia entre los sistemas anteriormente mencionados es el sistema en cultivos semisólidos, el cual permite obtener volúmenes para el abastecimiento de mercados regionales. La implementación de esta metodología puede constituir un paso previo al establecimiento de la tecnología de producción en cultivo líquido, en aras de abastecer una mayor demanda. El objeto principal de esta investigación fue evaluar el efecto de dos sustratos semisólidos sobre el rendimiento del nematodo *Heterorhabditis sp* (Tumaco).

4.2. Metodología

Se evaluó el desarrollo de *Heterorhabditis sp.* (Tumaco) en dos medios semisólidos: 1) **CABA01** (formulación reservada): desarrollado para la producción de *Steinernema spp.* (CABA, México) y **CNH**, formulado con: hígado de pollo 10 % (p/v), carboximetilcelulosa 1 % (p/v), aceite de maíz 4 % (v/v), caldo nutritivo 1,3 % (p/v), trozos de espuma de poliuretano 5,6 % (p/v). El experimento se organizó bajo un diseño completamente aleatorio, con dos tratamientos (medios de cultivo) y cinco repeticiones de cada tratamiento. La unidad experimental se conformó con un matraz Erlenmeyer de 250 ml, al cual se le adicionó 25 ml de cada medio, cubierto con un tapón de algodón. Cada matraz

se inoculó con 10 % (v/v) de la bacteria *Photorhabdus* sp. y se incubó a 28 °C durante 96 horas. Transcurrido este tiempo a cada matraz se le adicionó 20 000 JI previamente desinfectados, suspendidos en 500 µl de lactato de Ringer. El experimento permaneció en condiciones de laboratorio (26 ± 4 °C, HR: 65 ± 10 %) hasta su finalización. Las variables de respuesta fueron el rendimiento y la virulencia de los JI sobre *G. mellonella*.

Con los resultados del anterior experimento se seleccionó el medio CNH, se repitió el experimento, esta vez se cambió el matraz por un frasco cilíndrico 10,4 cm × 5,8 cm, tapada su boca con una lámina de algodón prensado y se inoculó siguiendo la metodología del experimento anterior.

Un experimento final consistió en escalar a unidades de mayor volumen. Se utilizaron recipientes plásticos con capacidad de un litro, a los cuales se le abrió un agujero rectangular en un costado y otro circular en la tapa (Fig. 16A), este último se cubrió con una lámina de algodón prensado. A cada recipiente (unidad experimental) se adicionó 4 gr de esponja de poliuretano cortada en tiras (180 mm × 20 mm × 0,5 mm) y 160 ml de medio CNH (Fig. 16A). Cada unidad se cubrió con una bolsa autoclavable a la cual se le abrió un orificio que posteriormente se cubrió con una lámina de algodón prensado (Fig. 16C), lo que permitió el intercambio gaseoso en el sistema. Se establecieron cinco unidades, las cuales se autoclavaron (121 °C, 15 psi) durante 15 min. Para la inoculación se adicionaron 16 ml de crecimiento bacteriano (CST) y 48 horas después se adicionaron 200.000 JI. El experimento se mantuvo en condiciones constantes (28 °C y HR: 60 %). El experimento se realizó tres veces en el tiempo.

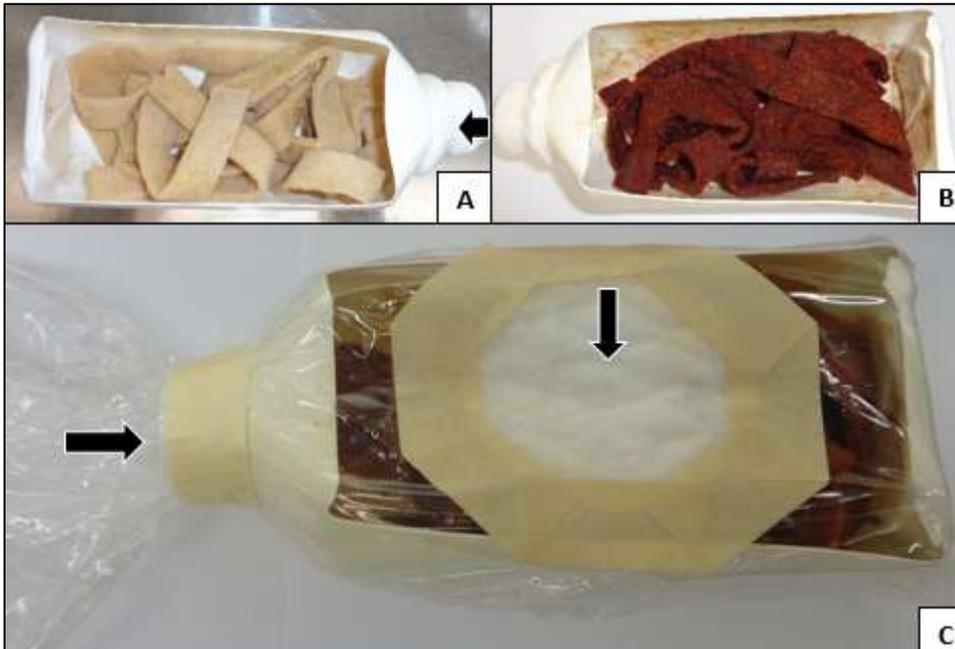


Figura 16. Unidades de producción para el cultivo en sólido del nematodo *Heterorhabditis* sp. (Tumaco). **A)** Medio de cultivo antes de ser inoculado con *Photorhabdus* sp. **B), C)** Medio de cultivo con 48 horas de inoculado con *Photorhabdus* sp. Las flechas indican los puntos de intercambio gaseoso.

4.3. Resultados

En la evaluación se encontró que el medio CABA01 no permitió el desarrollo de los nematodos, no se observó cambio de color después 96 horas de inoculados con la bacteria. En contraste, el sustrato CNH, se tornó de color rojo después de 24 horas de inoculados con las bacterias (Fig. 17 A, B, C). Después de 96 horas de inoculados los JI, se observó desarrollo de los nematodos, pero no se observó descendencia. El experimento se repitió tres veces en el tiempo, con resultados similares.

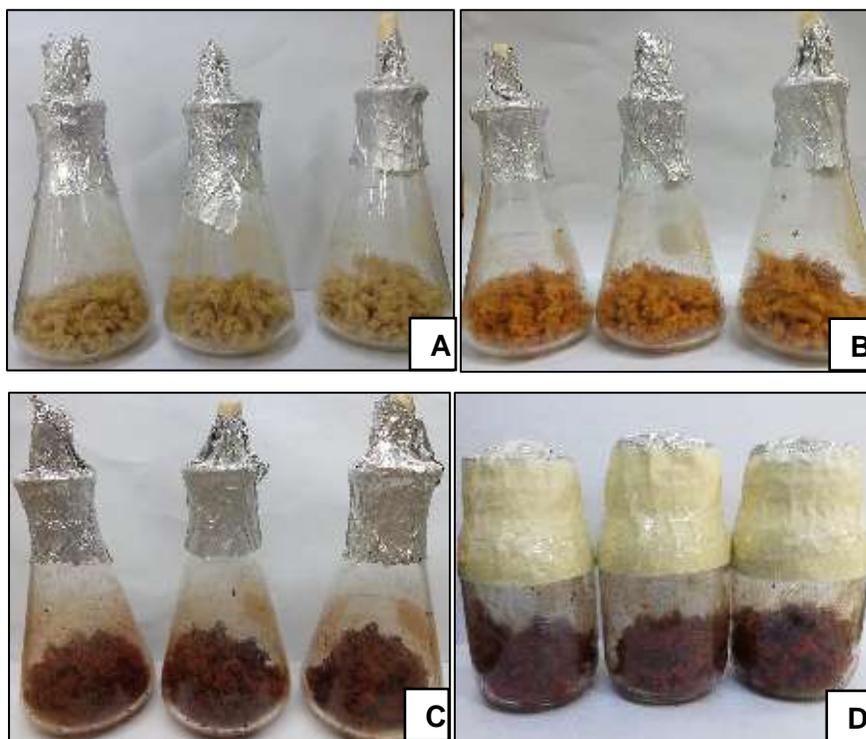


Figura 17. Aspecto del medio CNH inoculado con *Photorhabdus* sp. A) 0 horas, B) 24 h, C, D) 72 h.

En el experimento establecido con los frascos cilíndricos de 10,4 cm × 5.8 cm (Fig. 17D) se encontró que después de 18 días de inoculados con los JI se obtuvo un rendimiento de $1'6500.00 \pm 300.000$ JI por frasco.

En el escaldado de las unidades experimentales se encontró que cada unidad produjo en promedio $3'500.00 \pm 500.000$ JI (Fig.18) equivalente a 21.340 JI por gramo de medio, en un periodo de ocho días. Los JI producidos causaron 100 % de mortalidad en larvas de *G. mellonella* en último instar. Los resultados encontrados fueron inferiores a los reportados por Bedding *et al.* (1997), quienes reportaron rendimientos de 332.200 JI y 286.920 JI por gramo de medio, con las cepas *Heterorhabditis heliothidis* CI y *Heterorhabditis* sp. NZ respectivamente. El rendimiento de JI al final del proceso puede ser afectado por la ineficiente dispersión del inoculo en el sistema y adecuada aireación (Bedding *et al.*, 1997), este último factor pudo influir directamente el rendimiento de los nematodos, considerando que las unidades experimentales no permanecieron con Inyección de aire.

El método de Bedding, tiene el potencial de producir entre 30 y 50 millones de JI de *Heterorhabditis* sp. o *Steinernema* sp. en un matraz de 500 ml conteniendo entre 80 y 100 g de medio formulado con vísceras de pollo, no obstante, los rendimientos varían desde muy pocos JI hasta superar los 100 millones por matraz (Bedding, 1986). Esta variabilidad coincide con reportes de Tabassum y Shahina (2004), quienes evaluaron bajo las mismas condiciones el desarrollo y rendimiento en matraz de cuatro especies. Después de 2 semanas de incubación, obtuvieron, 6'250.000 JI de *S. pakistanense*; 4'500.000 JI de *S. asiaticum*; 1'500.000 de *S. feltiae* y 6'250.000 JI de *H. indica*.

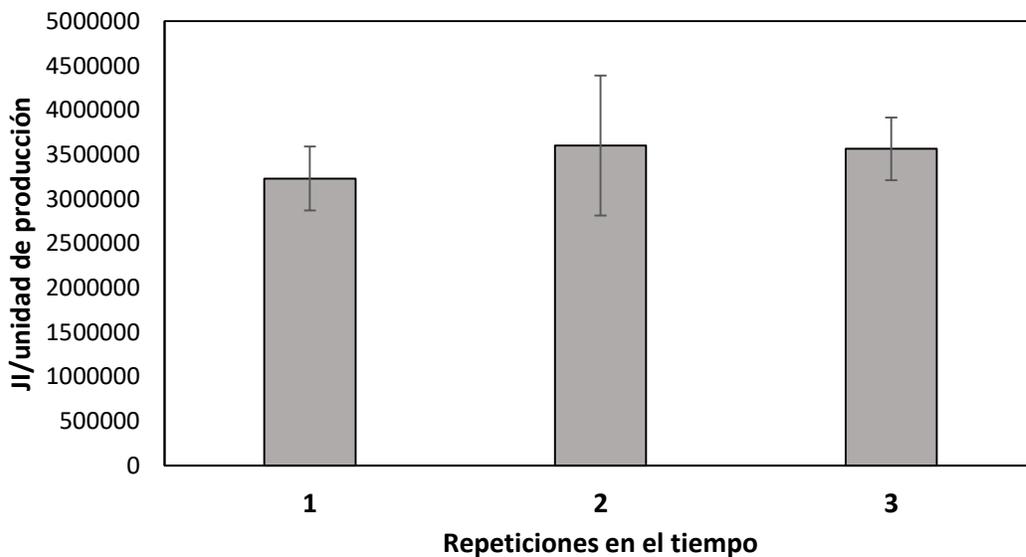


Figura 18. Producción de JI en unidades experimentales, en tres experimentos realizados en diferentes periodos de tiempo

4.4. Bibliografía

BEDDING, R.A.; STANFIELD, M.A.; CROMPTON, G.W. 1997. Apparatus and methods for rearing nematodes, fungi, tissue cultures and the like, and for harvesting nematodes. European Patent. Office. WO 91/15569.

BEDDING, R.A. 1986. Mass rearing, storage and transport of entomopathogenic nematodes. Fundam. Appl. Aspects Invert. Pathol. (Proc. 4th int. Colloq. Invert. Pathol.), Veldoven, The Netherlands. 308-31.

TABASSUM, K.A and SHAHINA. F. 2004. In vitro mass rearing of different species of entomopathogenic nematodes in monoxenic solid culture. Pak. J. Nematol. 22(2): 167-175.

Capítulo 5

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA AGITACIÓN, LA GEOMETRÍA DEL FERMENTADOR Y LA COMPOSICIÓN DEL SUSTRATO SOBRE EL DESARROLLO DEL NEMATODO ENTOMOPATÓGENO *Heterorhabditis* sp. (TUMACO) A NIVEL DE MATRAZ

5.1. Metodología

Se evaluó el desarrollo de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) como respuesta a la interacción de tres factores: agitación, geometría del recipiente y el medio de cultivo. En un agitador orbital Heidolph unimax 1010, se establecieron dos condiciones de agitación; 130 y 180 rpm, la geometría fue dada por dos frascos cilíndricos de 7 cm x 5,8 cm y 10,4 cm x 4,5 cm, respectivamente (Fig.19) y dos medios de cultivo: **CNH**; hígado de pollo (10 % p/v), aceite de maíz (4,0 % v/v), caldo nutritivo (1,3 % p/v) Y **CNY**; Yema de huevo deshidratada (1,25 % p/v), extracto de levadura (1,3% p/v), NaCl (0,5 % p/v), aceite de maíz (4 % v/v), caldo nutritivo (1,3 % p/v). Se realizaron 16 tratamientos (tabla 5), las unidades experimentales consistieron en un recipiente de vidrio con 10 ml de medio de cultivo, cerrado con un disco de algodón prensado sujetado con cinta de papel y papel aluminio. Se establecieron en un diseño completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento.

Tabla 5. Diseño experimental utilizado en el objetivo 4.

Variables Independientes	Niveles	Variables Dependientes	Variables Controladas
Dimensiones del frasco (fermentador)	7 cm x 5.8 cm 10,4 cm x 4.5 cm		
Sustrato (medio de cultivo)	CNH CNY	Rendimiento (JI por ml)	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura • Evaporación
Agitación	130 rpm 180 rpm		

Para inocular los medios de cultivo con el simbiote bacteriano (*Photorhabdus* sp.), se utilizó un Erlenmeyer de 250 ml en el cual se prepararon 50 ml de CST y se inoculó con un vial criopreservado de 2 ml de *Photorhabdus* sp., se agitó a 180 rpm y se incubó a 28 °C durante 48 h, transcurrido este tiempo se midió y registró el pH, cuando este registró alcalinidad (>7,9) se procedió a inocular cada unidad experimental, las cuales se agitaron a 180 rpm y 28 °C durante 48 h, transcurrido este tiempo a cada unidad se adicionaron 5.000 JI (500/ml de medio), previamente desinfectados con NaClO (0,1 % v/v).



Figura 19. Frascos cilíndricos. Izquierda frasco 1 (7 cm x 5.8 cm), derecha frasco 2 (10,4 cm x 4.5 cm).

A cada unidad experimental se le registró el peso y cada 48 horas se repuso el agua perdida por evaporación. Con la finalidad de registrar la fase en la que entraba la bacteria se tomaron muestras y se sembraron en NBTA. La variable de respuesta fue el desarrollo de los nematodos, para esto se tomó una alícuota de 100 µl, se contabilizaron los nematodos vivos y se registró el estado de desarrollo.

Con las condiciones seleccionadas se estableció otro experimento al cual se le duplicó la concentración de JI inoculados (1.200/ml). Para ambos experimentos se graficaron los resultados y se calcularon parámetros cinéticos de fermentación. Utilizando la ecuación calculada en la fase exponencial de crecimiento microbiano ($y = mx + b$), se calcularon los siguientes parámetros cinéticos de fermentación:

- Velocidad específica de crecimiento (μ), mediante la ecuación 1

$$\mu = m \text{ (Ec. 1)}$$

- Duración de la fase de latencia (λ), mediante la ecuación 2

$$\lambda = (Y_{\min} - b) / m \text{ (Ec. 2)}$$

Dónde: Y_{\min} = Nivel inicial de inoculación

- Final de la fase exponencial (ϵ), utilizando la ecuación 3

$$\epsilon = (Y_{\max} - b) / m \text{ (Ec. 3)}$$

Dónde: Y_{\max} = Máxima densidad poblacional

- Duración de la fase exponencial (α), a través de la ecuación 4. :

$$\alpha = \epsilon - \lambda$$

5.2. Resultados

Los ensayos se establecieron en condiciones de laboratorio: 26 ± 4 °C y HR: 65 ± 10 %, en cada unidad experimental (frasco) se registró una evaporación promedio de 0,5 ml/día. De los factores evaluados, la interacción 180 rpm, frasco 1 (7 cm x 5.8 cm) y el medio CNY; permitieron el desarrollo de los nematodos hasta alcanzar el estado infectivo (JI) con ambos inóculos (500 y 1200 JI por ml). Los demás tratamientos presentaron mortalidad del 100 % de los JI días después de inoculados, lo que no permitió hacer un contraste estadístico. La interacción que permitió el desarrollo del nematodo duró 480 h (25 días), se obtuvo un rendimiento de 10.680 juveniles por ml (Fig. 20). A las 183 horas inició la fase exponencial, la cual se mantuvo hasta las 465 h. (Fig. 20), a partir de este momento se observó decrecimiento poblacional. Lo anterior se pudo atribuir a la densidad poblacional, agotamiento del recurso y alta viscosidad del sustrato, lo que ocasionó disminución de la tasa de transferencia de oxígeno.

La fase I de *Photorhabdus* sp. se mantuvo hasta el día 12, cuando se observó crecimiento bacteriano de color rojo (Fase II) en el medio NBTA (Fig. 22C), durante el proceso el pH del medio no fue ajustado, se mantuvo intrínsecamente por encima de 7,9.

En la evaluación del ensayo con inóculo alto (1.200 JI/ml) se observó un acelerado crecimiento exponencial, no obstante, presentó menor rendimiento 16 600 nematodos por ml, de los cuales 12.500 fueron JI, en contraste al inóculo bajo, este rendimiento fue mayor al encontrado con el inóculo bajo (10.680/ml).

Los parámetros cinéticos de crecimiento mostraron diferencia en los dos ensayos (Tabla 6), en el caso del inoculo bajo se presentó la menor tasa de crecimiento (0,0039 Log Nematodos.ml-1.hora-1), la duración de la fase de latencia en este último fue mayor (183 h), similar comportamiento se presentó en la duración de la fase exponencial (Fig. 21).

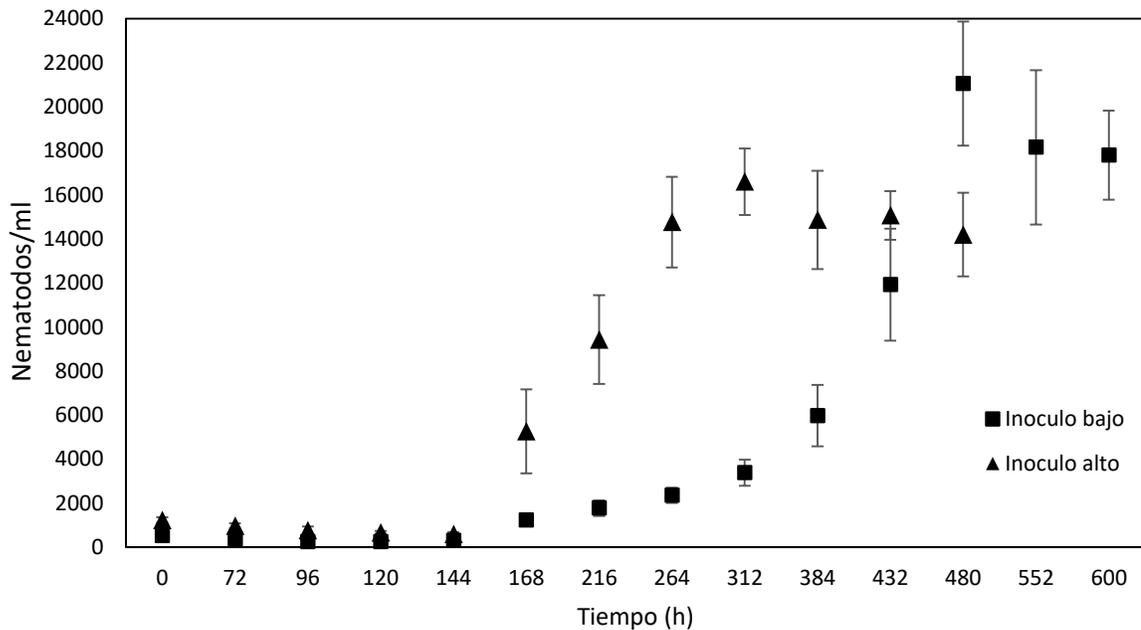


Figura 20. Dinámica poblacional de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en cultivo líquido monoxénico. El inoculo bajo corresponde a 500 JI por ml y el inoculo alto a 1200JI por ml.

La señal de alimento es un parámetro clave en la recuperación de los JI, en los medios de cultivo artificiales esta señal induce un menor porcentaje de recuperación (18-90 %), en contraste, la recuperación *In vivo* alcanza el 100 % (Ehlers *et al.*, 1998). Este fenómeno, entre otros, explica el aumento del tiempo en la fase estacionaria y el descenso poblacional al inicio del proceso.

La pérdida de agua (evaporación) en las unidades experimentales, pudo tener un efecto en la osmolaridad del medio. Baja osmolaridad puede inducir en variación de la fase de las bacterias simbiotas (Krasomil Osterfeld, 1995). La rápida variación de la fase influye directamente en la producción de JI al final del proceso. La determinación del ciclo de vida

del nematodo fue limitada por la heterogeneidad de los estados de desarrollo en la población (Fig. 22B).

Con el aumento del tiempo, en las unidades experimentales se expresó un incremento significativo de la viscosidad del medio (parámetro no medido). Esta característica se asocia al crecimiento poblacional de *Heterorhabditis* spp. y se atribuye a un polisacárido de la cápsula, sintetizado por las bacterias simbióticas (Young *et al.*, 1998). En cultivos monoxénicos del complejo *S. carpocapsae* -*X. nematophilus*, se evidenció un aumento significativo de la viscosidad aparente (4,5 a 46,6 mPa.s) en el tiempo de fermentación (27 días). Este cambio de la viscosidad aparente se atribuyó principalmente por sustancias que incluían el contenido interno del cuerpo de nematodos degradados, así como cutículas de los nematodos degradados (Chavarría-Hernández *et al.*, 2003). No obstante la viscosidad reduce la transferencia de oxígeno limitando el desarrollo poblacional de los NEP.

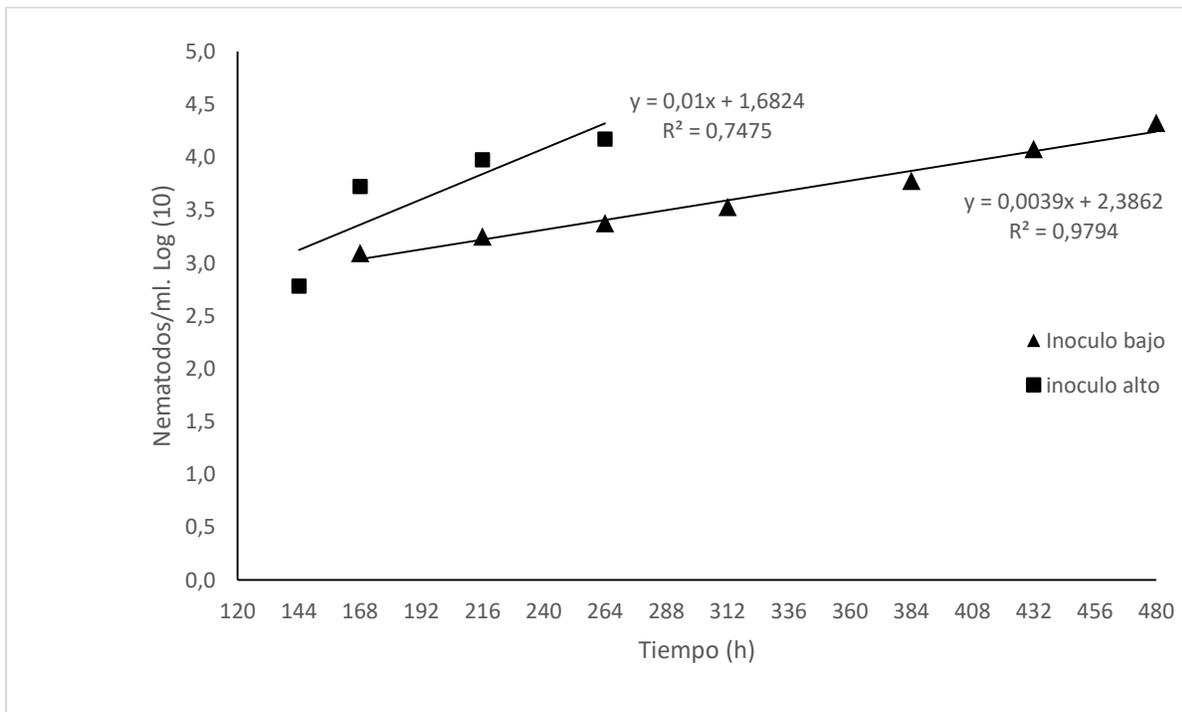


Figura 21. Crecimiento exponencial de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en cultivo líquido monoxénico líquido.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de crecimiento poblacional del nematodo *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) en cultivo monoxénico.

Parámetros cinéticos de crecimiento	Inoculo alto	Inoculo bajo
Velocidad específica de crecimiento (Log Nematodos.ml ⁻¹ .hora ⁻¹)	0,01	0,0039
Duración de la fase de latencia (horas)	105,76	183
Final de la fase exponencial (horas)	248,76	465.1
Duración de la fase exponencial (horas)	143	282.1

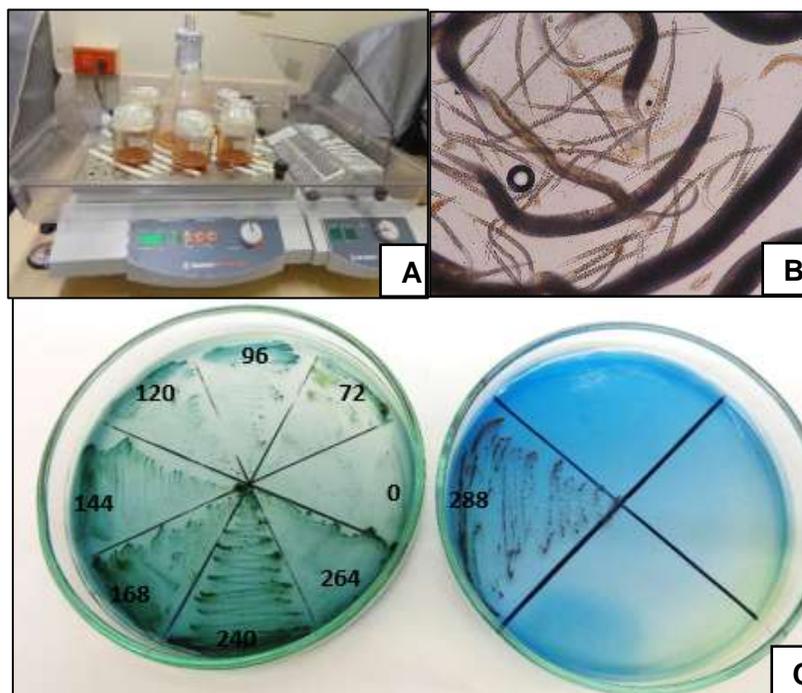


Figura 22. A) Disposición de ensayos en agitador orbital, B) Estados de desarrollo de los nematodos durante el proceso (40 x), C) crecimiento de *Photorhabdus* sp., en fase I

(izquierda) y fase II (derecha), la numeración indica el tiempo (h) después de inocular el medio de producción, el 0 corresponde al medio (CST) con el cual se inoculó.

5.3. Bibliografía

CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.I.; PÉREZ-GUEVARA, F.; DE LA TORRE, M. 2003. Evolution of Culture Broth Rheological Properties during Propagation of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae*, in Submerged Monoxenic Culture. *Biotechnol. Prog.* 19, 405-409

EHLERS, R-U.; LUNAU, S.; KRASOMIL-OSTERFELD, K.C.; OSTERFELD, K.H. 1998. Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium complex *Heterorhabditis megidis/Photorhabdus luminescens*. *BioControl* 43:77–86.

KRASOMIL OSTERFELD, K. 1995. Influence of osmolarity on phase shift in *Photorhabdus luminescens*. *Applied Environmental Microbiology* 61, 3748–3749.

YOUNG, J.M.; DUNNILL, P.; PEARCE, J.D. 1998. Physical properties of liquid nematode cultures and the design of recovery operations. *Bioprocess Engineering* 19, 121–127.

Capítulo 6

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE AGITACIÓN Y OXIGENACIÓN EN EL DESARROLLO DEL COMPLEJO NEMATODO-BACTERIA EN SUSTRATO LÍQUIDO EN BIORREACTORES DE LABORATORIO

6.1. Introducción

La producción masiva de nematodos entomopatógenos es viable económicamente cuando se establece mediante fermentación líquida. El éxito de este sistema implica tener amplio conocimiento de la biología y el comportamiento del nematodo, de su bacteria simbiote y de la interacción de ambos organismos (López, 2008), como de la influencia del diseño de biorreactores y la determinación de parámetros para bioprocesos más estables (Ehlers, 2001). La producción masiva de NEP en fermentación líquida se ha convertido en un reto importante para la comercialización. Los adelantos más significativos han sido realizados por empresas particulares lo que ha generado un acceso limitado a los detalles del proceso y por tanto se dificulta implementar esta tecnología a nuevos productores (Inman *et al.*, 2012), principalmente en países no industrializados.

En Colombia como en el resto de países de Suramérica, no se cuenta con una tecnología desarrollada para la producción de NEP a escala industrial, usando biorreactores, que permita abastecer la demanda en el mercado (Kaya *et al.* 2006). Se hace evidente la necesidad de realizar experimentación a pequeña escala, que permita innovar en procesos eficientes y eficaces en la producción de NEP, para posterior escalamiento que permita cubrir necesidades locales, regionales y nacionales.

6.2. Metodología

Las fermentaciones se realizaron en un Biofermentador (New Brunswick Bioflo 115, USA) con un vaso de fermentación de 1,3 L, con un volumen efectivo de trabajo de 0,9 L (Fig. 23C). Inicialmente se establecieron cuatro experimentos, para determinar el efecto combinado de la agitación, la aireación y la densidad del inóculo (Juveniles

infectivos) mediante un diseño factorial (Tabla 7). Las magnitudes de la agitación y la aireación se establecieron en una relación inversamente proporcional. La concentración del inóculo fue de 1000 JI por ml de sustrato.

Tabla 7. Diseño experimental.

Experimento	Variables Independientes		Variables Dependientes	Variables Controladas
	Agitación (rpm)	Aireación (Lpm)		
1	50	1,5	• pH	
2	100	1,3	• O ₂ Disuelto	• Temperatura
3	150	1,0	• Rendimiento	• Evaporación
4	200	0,7	(JI por ml)	

El análisis preliminar de los resultados generó dos experimentos adicionales:

- Experimento 5: Agitación constante de 250 rpm y aireación de 1 Lpm.
- Experimento 6: Agitación variable; 250 rpm (durante el crecimiento de las bacterias) -200 rpm (después de adicionar los JI) y aireación de 1,5 Lpm.

Para cada experimento se estableció la siguiente metodología:

Reactivación *Photorhabdus* sp.

Para cada fermentación (experimento) se tomó un vial de 2 ml que contenía la cepa crioconservada (-50 °C). La reactivación se llevó a cabo en caldo CST, agitación 150 rpm y temperatura constante de 28 °C durante 48 horas. Adicionalmente, se verificó viabilidad de la bacteria empleando siembra masiva en placa de agar NBTA.

Formulación del medio de producción

Para cada fermentación se prepararon 900 ml del medio de cultivo, formulado con: hígado de pollo (10 % p/v), aceite de soya (4 % v/v) y caldo nutritivo (1,3 % p/v). Se llevó a una licuadora previamente sanitizada y se licuó hasta obtener una mezcla homogénea.

Preparación del Biofermentador

Previo al proceso de esterilización del medio de cultivo, contenido en el vaso de fermentación, se realizó la calibración de los sensores (pH, O₂ disuelto). La esterilización del sistema se realizó en autoclave (Sturdy SA-300VS Taiwan) por 15 minutos a 121 °C y 15 PSI.

Fermentación

El medio de cultivo se inoculó con *Photorhabdus* sp. (1,5% v/v) activada previamente en caldo CST. El proceso fermentativo se estableció en condiciones controladas: temperatura de 28 °C, regulada a través de manta calefactora, para la agitación se utilizó un impulsor tipo própela marina. El proceso fue monitoreado empleando el software BioCommand ®, instalado en un computador portátil.

Inoculación con Nematodos Entomopatógenos

Se utilizaron JI de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) producidos en larvas de *G. mellonella*. Los JI fueron desinfestados con hipoclorito de sodio al 0,1 %, durante una hora a 120 rpm, en un agitador orbital (Incubating Orbital Shaker VWR, USA) y lavados con agua destilada estéril. Seguidamente fueron inoculados en el medio de cultivo. La adición de los JI se realizó después de la inoculación con *Photorhabdus* sp. Previa inoculación de los JI se consideró el pH (cerca de 8.0) y coloración rojiza del medio. Posteriormente se tomaron muestras cada 48 horas para verificar viabilidad, concentración y estado de desarrollo de los nematodos, los conteos de los nematodos se realizaron con un aumento de 40 x empleando un microscopio electrónico (Leica CME, India).

Ajustes metodológicos durante las fermentaciones

A partir del experimento 1, se dispuso de un recipiente con agua destilada estéril, alimentada a través de una bomba peristáltica para compensar la disminución del nivel de medio de cultivo por evaporación, diariamente y hasta finalizar el proceso se adicionaron 5 ml de agua destilada estéril.

Para el establecimiento del experimento 4 se acondicionó dentro del vaso un difusor (Fig. 23A, B) de acuario (pómez), esto con la finalidad de aumentar la transferencia de oxígeno, mediante la emisión de micro burbujas. Durante la fermentación se ajustó la agitación; en

la fase de crecimiento de las bacterias se estableció en 250 rpm, después de inocular los JI se mantuvo en 200 rpm hasta la finalización del proceso.

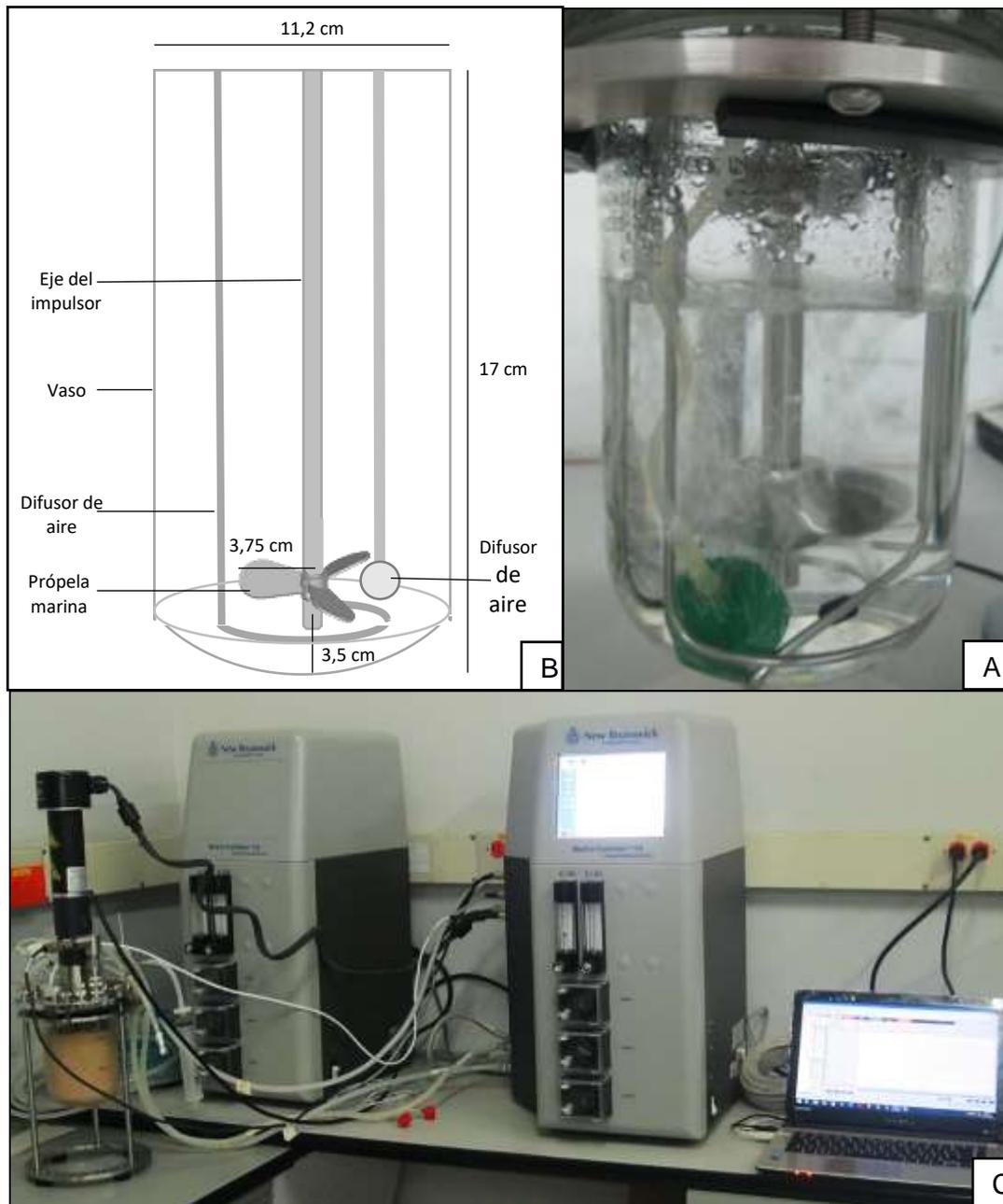


Figura 23. Biofermentador utilizado en el proceso A y B) Dimensiones y aditamentos del vaso del fermentador; C) Vista general del fermentador.

6.3. Resultados

EXPERIMENTO 1: Agitación de 50 rpm, aireación de 1, 5 Lpm.

Se registró un pH inicial de 6,2, el cual se mantuvo constante. La concentración inicial de O₂ disuelto fue del 65 %, este valor osciló entre 56 y 10 %, las muestras tomadas no evidenciaron el crecimiento de *Photorhabdus* sp, durante las 120 horas del proceso. Este resultado puede ser atribuido a una homogenización deficiente durante el proceso.

EXPERIMENTO 2: Agitación de 100 rpm y aireación de 1, 3 Lpm.

El pH inicial se registró en 6,4. Después de 10 horas de fermentación se presentó una disminución del valor inicial del pH, el cual se mantuvo hasta las 120 horas del proceso (Fig. 24)). La concentración inicial de O₂ disuelto fue del 40 %, este valor descendió durante la primera hora del proceso y se mantuvo por debajo del 2%. Las siembras realizadas en placas de agar no evidenciaron el crecimiento de *Photorhabdus* sp. Este resultado puede ser atribuido a la insuficiencia de oxígeno disuelto como consecuencia de una inadecuada homogenización al interior del fermentador.

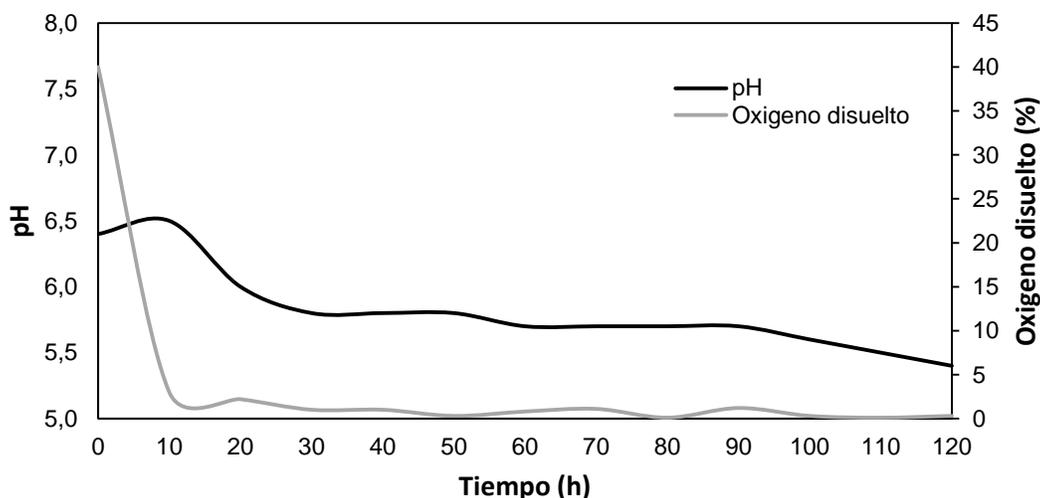


Figura 24. Comportamiento de variables del proceso; pH y O₂ disuelto.

EXPERIMENTO 3: Agitación de 150 rpm, aireación de 1 Lpm.

El valor de pH en el momento de inocular las bacterias fue de 6,84. La concentración inicial de O₂ disuelto fue del 70 %, sin embargo, se observó que a partir de la hora 3, los niveles de O₂ disuelto disminuyeron hasta registrar concentraciones cercanas al 0 % (Fig. 25). Lo

anterior se puede atribuir a la acumulación de sólidos en el sensor de O_2 , provocando una posible obstrucción del mismo, lo que impidió tomar la lectura.

Durante las primeras 48 horas se registró un pH de 7,2. Se tomó una muestra del medio y se sembró en agar NBTA y se comprobó que las bacterias se encontraban en fase I. Después de 120 horas de proceso, se verificó la operación de biofermentador. Se encontró que el valor del pH fue 7,3. No se observó cambio en la coloración del caldo de cultivo, este último parámetro indicó un crecimiento inadecuado del simbiote bacteriano. Bajo condiciones favorables las bacterias de género *Photorhabdus* liberan pigmentos (antraquinonas) que tiñen el medio con tonos rojos a pardos. Además, se percibió un olor no característico (putrefacción), posiblemente por contaminación con microorganismos no simbióticos. Por lo anterior, se decidió no adicionar los JI y repetir el experimento. En la figura 24 se observa el comportamiento de las variables del proceso.

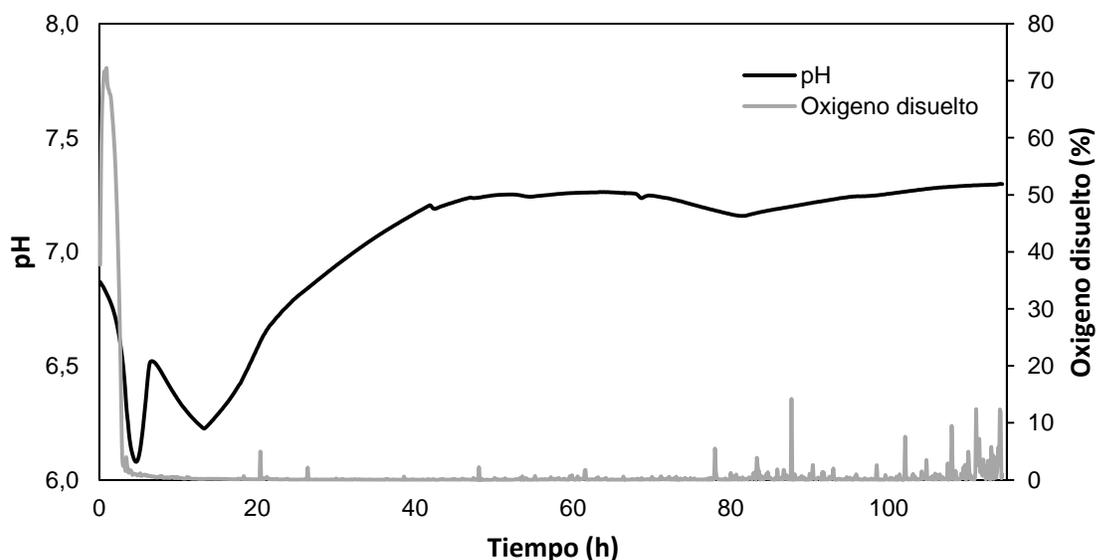


Figura 25. Comportamiento de variables del proceso; pH y O_2 disuelto.

Repetición del experimento 3

El pH inicial de medio fue de 6,73. Durante la primera hora de operación, la concentración del O_2 disuelto alcanzó un máximo de 71,08 %. A partir de este tiempo, se evidenció similar comportamiento del experimento anterior, se registraron valores cercanos al 0 %.

A las 48 horas se verificó el crecimiento de la bacteria en agar NBTA. Las colonias se expresaron en FI. En el medio de cultivo se incrementó el pH, con un valor de 7,18. A las 120 horas de proceso, se registró un pH de 7,7. Se observó que el caldo de fermentación tomó tonalidades de color rojo claro. En la superficie del medio se observó una tonalidad oscura (Fig. 26A). Se atribuyó a una baja transferencia de O₂ e inadecuada homogenización.

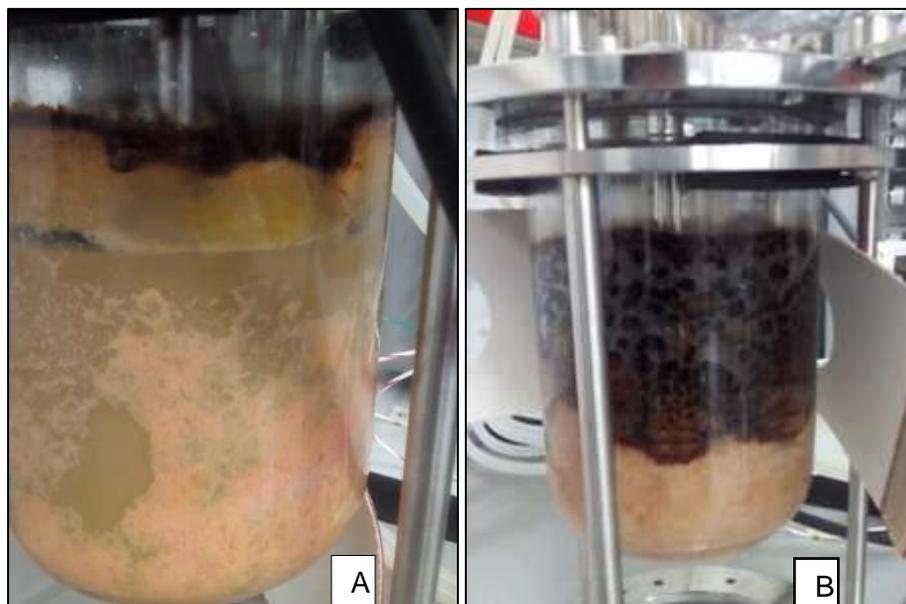


Figura 26. Fermentación de *Heterorhabditis* sp. en medio líquido **A)** Coloración del caldo después de 120 horas. **B)** Coloración del medio después de 360 horas.

Se decidió modificar el nivel de aireación, aumentándolo hasta 1,5 Lpm. El caldo de fermentación no presentó olor asociado a microorganismos contaminantes, y se observó disminución progresiva del volumen del medio ocasionado a la evaporación del mismo. Después de 168 horas de proceso, se observó una disminución en el valor del pH. Se registró un valor de 7,4. Continuó la disminución en volumen del caldo de fermentación. Las siembras en NBTA evidenciaron que el cultivo permaneció axénico.

Después de 336 horas, se observó evaporación de aproximadamente 0,5 L del caldo de fermentación. El olor fue característico y se observó coloración oscura en la superficie. Se decidió adicionar los JI. A las 384 horas se tomó una muestra para verificar estado y concentración de los nematodos. No se observó diferenciación de los JI. El conteo de los

nematodos se registró en una concentración de 12 JI por ml. La evaporación total del medio fue de 600 ml con pH al final de 7,21.

Transcurridas 408 horas de proceso, el pH registró un valor de 7,86. Se observó una disminución de más del 80% del volumen de caldo de fermentación y coloración de color oscura adherida en la pared del vaso del biofermentador (Fig. 26B).

Pasadas 450 horas, se tomó una muestra para verificar concentración de NEP. No se detectaron nematodos vivos. Se percibió olor putrefacto. El volumen final del caldo de cultivo fue aproximadamente de 200 ml y pH final con un valor de 7,57. El oxígeno disuelto presentó valores de aproximadamente 90 %, debido a la disminución en el nivel del caldo de fermentación, en el cual el sensor de O₂ no hacia contacto con el medio. Se concluyó que la muerte de los NEP pudo haber sido ocasionada a la concentración excesiva del medio de cultivo, exponiendo a los NEP a un medio hipertónico con un gradiente de concentración elevado. En la figura 27, se observa el comportamiento de las variables de proceso.

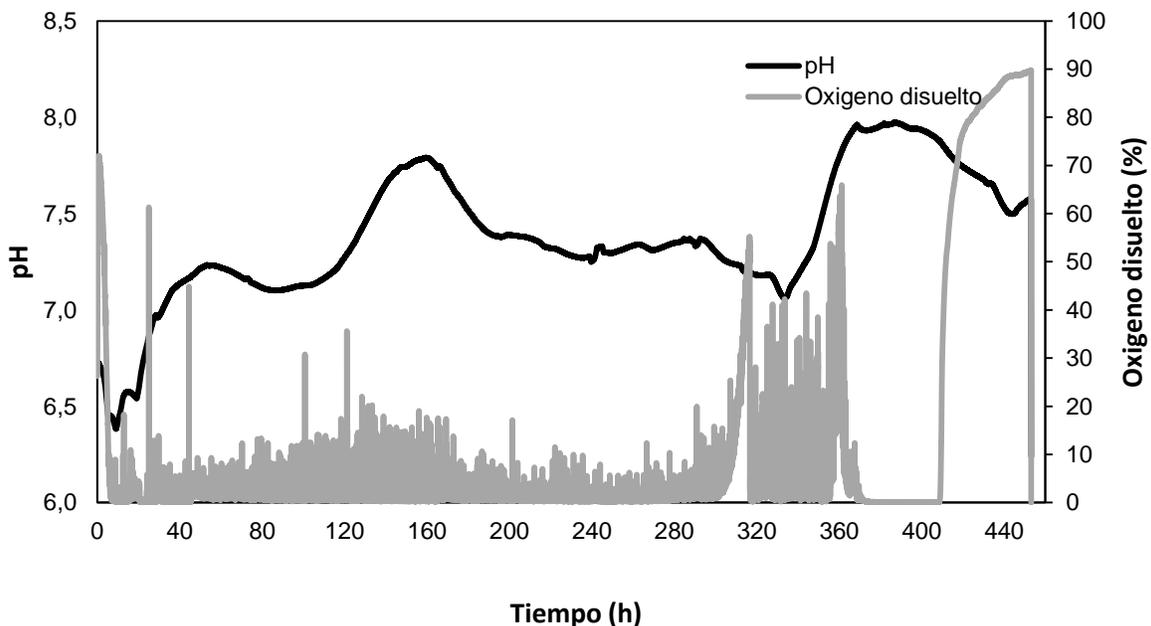


Figura 27. Comportamiento de variables de proceso pH y O₂ disuelto.

EXPERIMENTO 4: Agitación de 200 rpm, aireación de 0,7 Lpm.

El pH inicial del medio de cultivo fue de 6,72. La concentración de O₂ disuelto durante los primeros 30 minutos, alcanzó un máximo de 58,86 % (Fig. 29), a partir de ese momento, se evidenció un comportamiento similar a los experimentos anteriores (valores de O₂ cercanos a 0 %).

A las 24 horas de proceso, se registró un aumento de pH, registrándose en 7,08. Pasadas 96 horas, se observó un incremento del pH hasta 7,68. El O₂ disuelto registró valores entre 0,2 y 0,7 %. Se observó disminución en el volumen del caldo de fermentación, por lo cual se agregaron 50 ml de agua estéril a través de una bomba peristáltica.

A las 120 horas del proceso se registró un valor de pH de 7,91. Se observaron cambios en color de caldo de fermentación, presentándose coloración rojiza. En ese instante se decidió proceder con la inoculación de los JI previamente desinfectados.

Después de 192 horas de proceso se tomó una muestra para observar el desarrollo de los nematodos inoculados. Se observó que los nematodos continuaban como JI (Fig. 28), el conteo de los mismos permitió estimar una concentración de 550 JI por ml, equivalente a una mortalidad del 63 %.



Figura 28. Juveniles Infeccivos (JI) de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) observados al microscopio (100 x) después de 192 h de proceso en fermentación líquida.

Después de 288 horas de proceso se registró el pH en 8.0. En los conteos de los nematodos se observó 100 % de mortalidad.

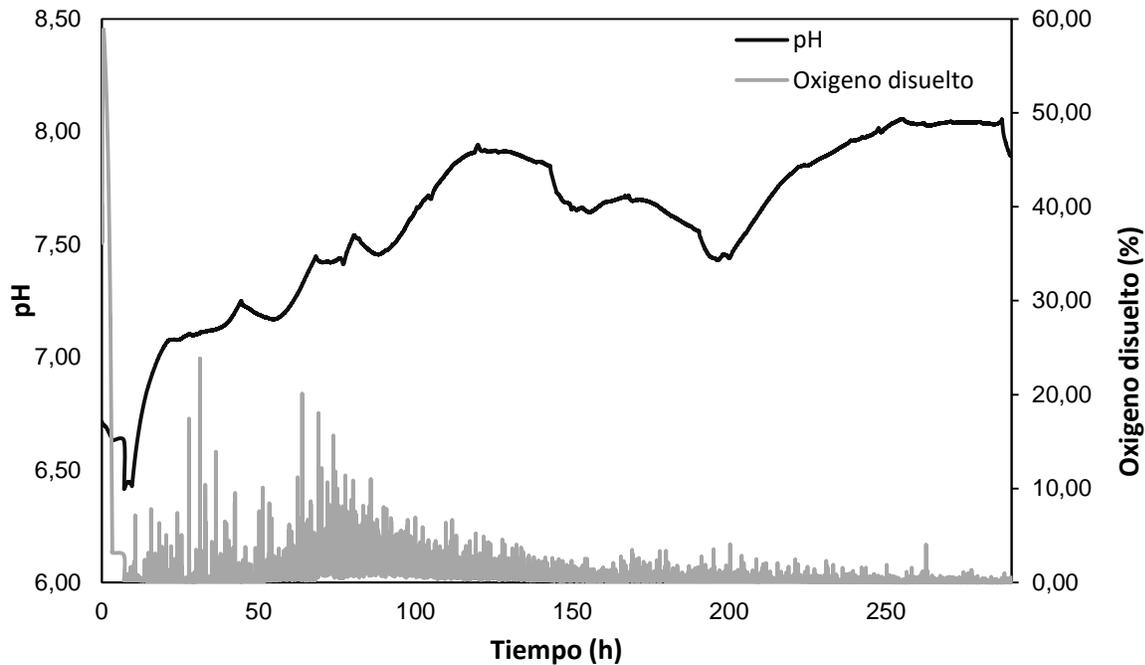


Figura 29. Comportamiento del pH y O₂ durante el proceso.

EXPERIMENTO 5: Agitación de 250 rpm, aireación de 1 Lpm.

Después de autoclavar el medio de cultivo se registró un pH de 5,98. El cual incrementó constantemente hasta 7,8, en la hora 37, después de este lapso de tiempo se presentó disminución en los valores de pH (6,81). En la hora 65 el pH incrementó gradualmente hasta alcanzar 8.42 al final del proceso (Fig. 30A).

Posterior a la inoculación del fermentador con el simbiote bacteriano se registró la máxima concentración del O₂ disuelto (42 %). Entre las horas 2 y 8 se observó una disminución drástica de la concentración de O₂ disuelto (4 %), a partir de ese lapso registraron valores inferiores al 1 % (Fig. 30B).

Cada 48 horas se verificó el crecimiento de la bacteria en agar NBTA. Las colonias se expresaron en FI hasta las 250 h de fermentación se observó que el caldo de fermentación tomó tonalidades de color marrón a rojo claro (Fig. 31).

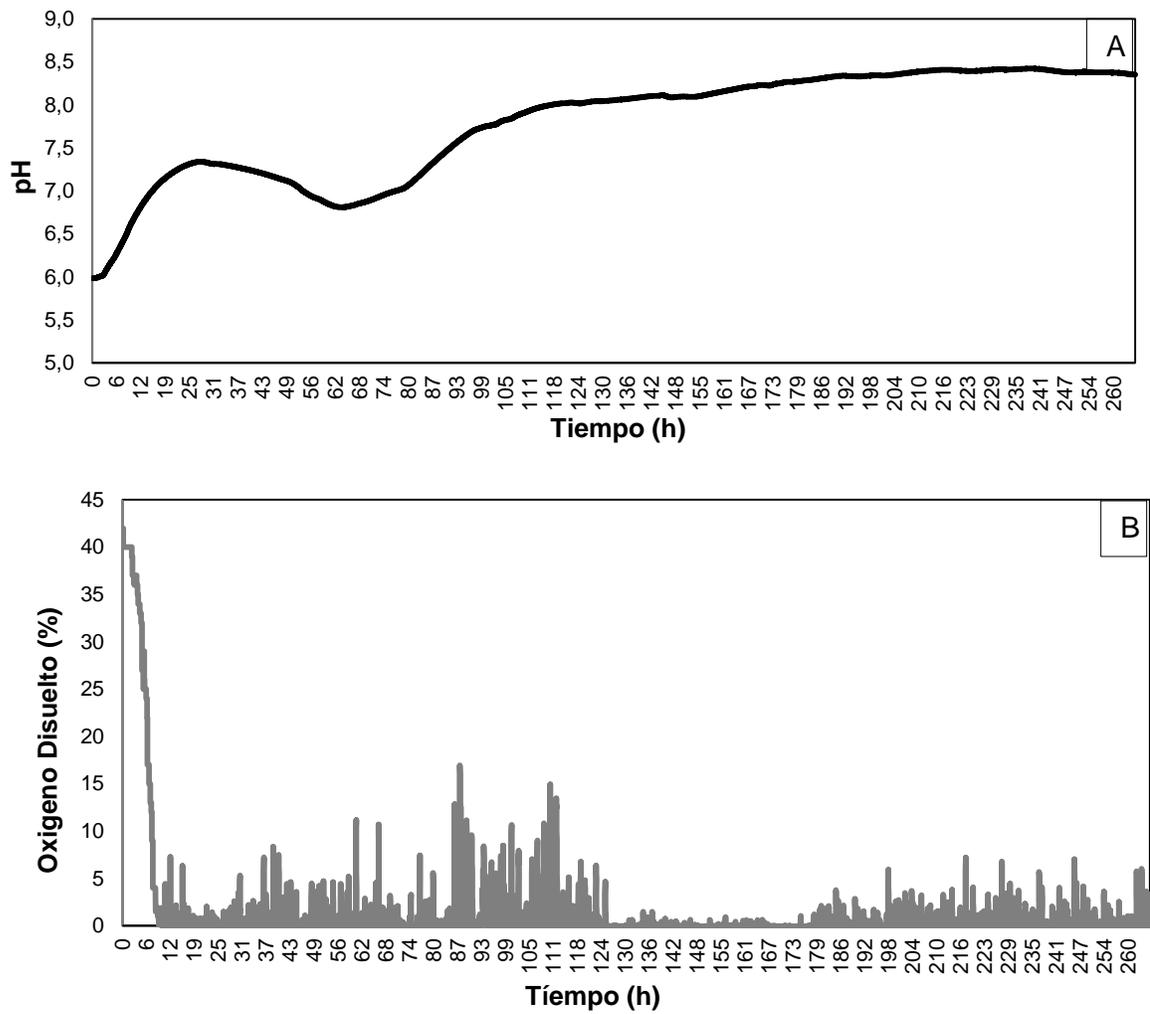


Figura 30. Comportamiento de variables de proceso en la fermentación líquida del nematodo *Heterorhabditis* sp. y su simbiote bacteriano. A) pH; B) O₂ disuelto.



Figura 31. Fermentación líquida del simbiote bacteriano *Photorhabdus* sp. A) 24 horas después de inoculado con el simbiote; B) 250 horas después de inoculado con el simbiote.

EXPERIMENTO 6: Agitación variable (200-250 rpm), aireación de 1.5 Lpm.

Después de 24 horas de inoculadas las bacterias en el fermentador se observó variación de color del medio de cultivo (Fig. 32A, B). A las 48 horas el medio se tornó de color rojo (Fig. 32C) y con aspecto homogéneo a las 96 h (Fig. 32D). La pigmentación del medio es un indicio del crecimiento de la bacteria, no obstante esta varía con la composición de los medios de cultivo y el pH (Inman y Holmes, 2012).

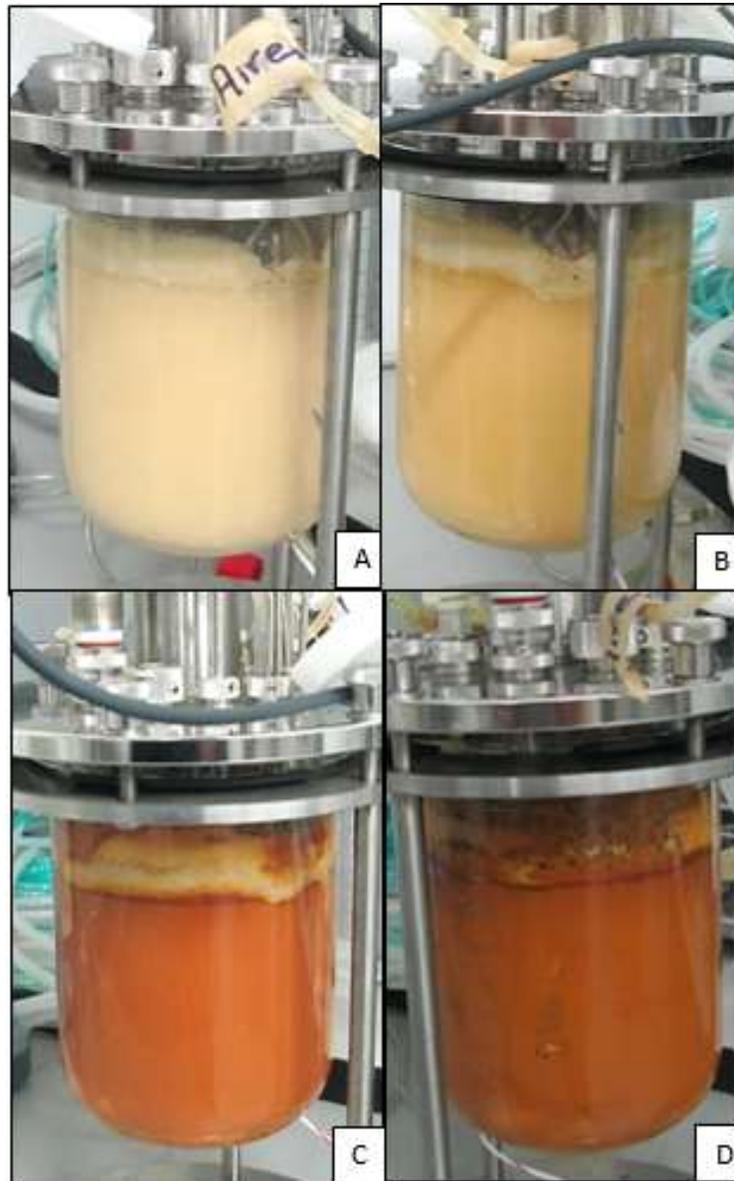


Figura 32. Aspecto del cultivo monoxénico sumergido del nematodo *Heterorhabditis* sp. (Tumaco); A) Caldo de cultivo antes de inocular; B) Caldo de cultivo después de 24 h de inoculado con *Photorhabdus* sp.; C) Caldo de cultivo con 48 h de fermentación; D) Caldo de cultivo con 96 h de fermentación.

Los JI se adicionaron al medio fermentado a las 120 h. Después de 48 h de inoculados se cuantificó la población, se encontró 15 % de recuperación, el restante continuó en estado JI, 24 horas después se observó mortalidad del 90 % de la población. No obstante se decidió continuar con la fermentación en aras de generar la cinética de crecimiento de las bacterias.

En la determinación de la cinética de crecimiento de *Photorhabdus* sp. se evidenció que durante las primeras 48 horas se presentó el crecimiento exponencial de la población. A las 144 horas las bacterias presentaron variación de fase (Fig. 33), evidenciándose en las siembras realizadas en NBTA (Fig. 34A, B). A partir de las 48 horas se observó el inicio de la fase estacionaria, la cual se alteró a partir de las 120 horas. Esta variación se pudo atribuir a la adición de los JI, los cuales liberan sus simbiositos al medio, aumentando la población media registrada y, dado que estos no se desarrollaron, se incorporaron al sistema como sustrato para las bacterias. La fermentación duró 168 h, el proceso inició con una concentración de $3,7 \times 10^3$ UFC/ml y culminó con 4×10^{13} UFC/ml. El crecimiento poblacional de las bacterias a las 24 h fue de $9,6 \times 10^8$ con aireación de 1 Lpm (Fig. 33). Strauch *et. al.*, (2000), obtuvieron concentraciones de $1-5 \times 10^9$ células de *P. luminescens* por ml, al alcanzar la fase exponencial (24 h después de inoculadas), con tasas de aireación de 0,3 a 0,7 vvm, sin presentarse diferencia estadística entre ambos parámetros. Martínez (2010), reportó concentraciones $1,7 \times 10^{13}$ células viables de *X. bovienii* por ml, después de 120 horas de fermentación en caldo CST.

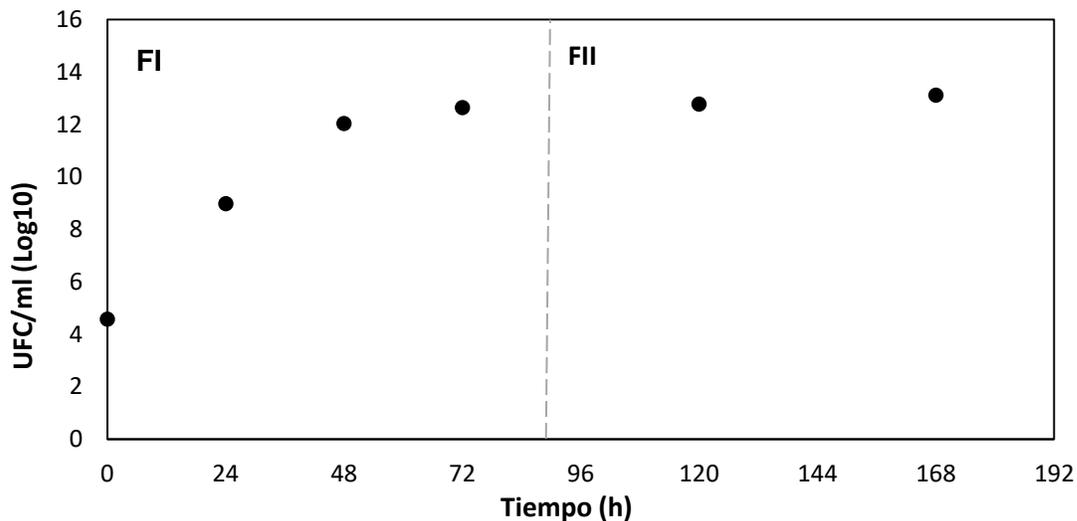


Figura 33. Cinética de crecimiento de *Photorhabdus* sp., recuento de células viables (UFC/ml) en medio NBTA.

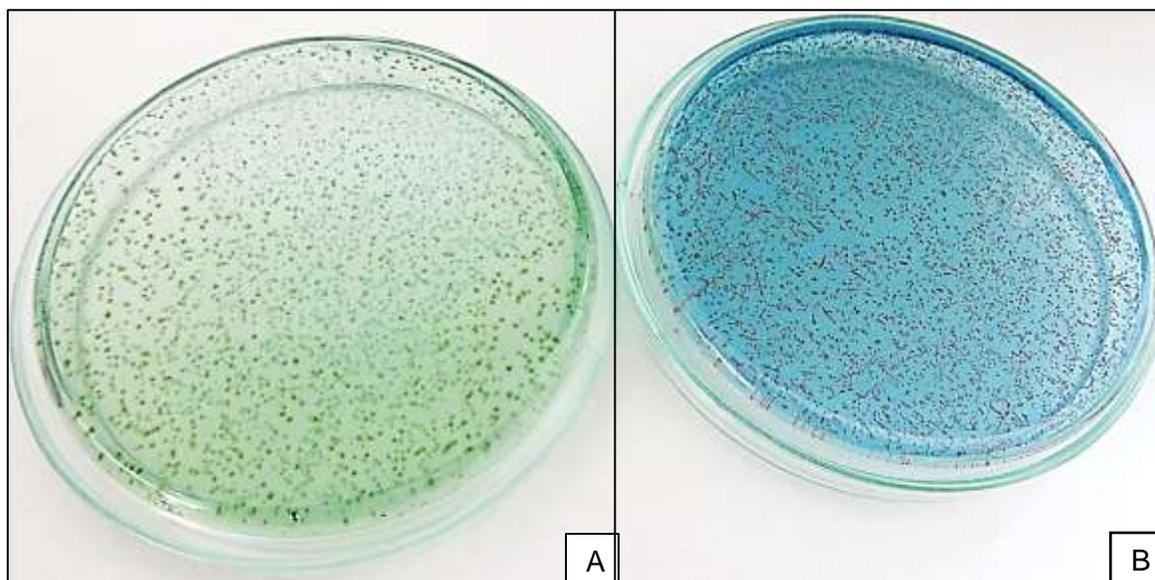


Figura 34. Variación de la fase de *Photorhabdus* sp. en fermentación líquida (medio CNH), A) Fase I, durante las primeras 144 h de fermentación; B) Fase II, a partir de las 144 h de fermentación.

En el monitoreo de los parámetros se encontró que, el pH inicial del medio fue de 7,53. Después de 11 horas de inoculadas las bacterias se registró un aumento en pH, el cual alcanzó un valor máximo de 8,7 a las 58 h del proceso, a partir de este tiempo se presentó disminución con oscilaciones, el valor mínimo fue de 7,21 a las 157 h (Fig. 35A). Esta tendencia de alcalinización del sustrato es inherente a estas enterobacterias. Desde que se inoculan las bacterias, hasta la cosecha de nematodos, el pH estará en constante aumento; y los intentos de controlar el pH a 7,0 siempre tienen una influencia negativa sobre el rendimiento de los nematodos (Ehlers, 2001).

El oxígeno disuelto inició en 64 %, con oscilación entre el 90 y 0 % durante las primeras 129 horas. A partir de esta fecha se registraron valores inferiores al 1% (Fig. 35B). Esta variación pudo ser atribuida a una distribución heterogénea del aire inyectado al sistema, y acumulación de sólidos en el sensor de O₂ disuelto.

La determinación de la concentración del O₂ disuelto en el sistema es un aspecto determinante en el éxito del proceso. Algunos trabajos de investigación sugieren que el oxígeno disuelto debe ser alto, aproximadamente del 40 % (Strauch y Ehlers, 2000) y se acerca al 60 % para los estados adultos (Inman *et al.*, 2012), en contraste Burman y Pye

(1980) reportaron que los requisitos de oxígeno de los nematodos son insignificantes. Sin embargo en el presente trabajo no fue posible registrar tasas constantes de O₂ disuelto, en todos los experimentos se registraron valores inferiores al 10 %, horas después de adicionar los nematodos.

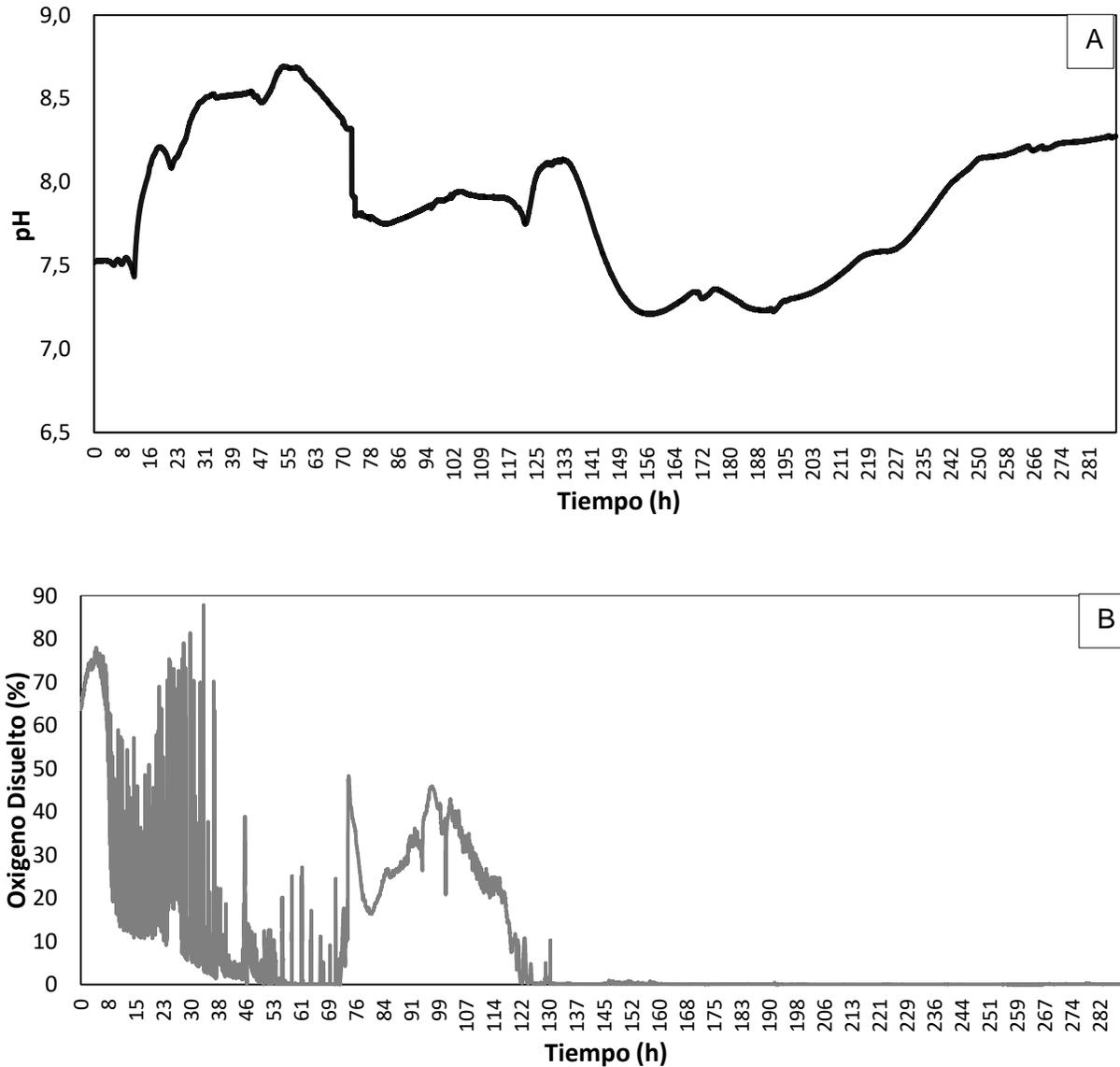


Figura 35. Comportamiento de variables de proceso en la fermentación líquida del nematodo *Heterorhabditis* sp. y su simbionte bacteriano. A) pH; B) O₂ disuelto.

Los resultados obtenidos en este último experimento permitieron estandarizar parámetros para el crecimiento de *Photorhabdus* sp. Los JI inoculados no se desarrollaron, no obstante

estos se adicionaron en la fase estacionaria de la cinética de crecimiento de las bacterias. Strauch y Ehlers (1998), reportaron que la fase exponencial tardía de la cinética de crecimiento de las bacterias es el punto óptimo para inocular los nematodos, dado que en esta fase se presenta la máxima producción de la señal de alimento, aspecto determinante para la recuperación de los JI.

La agitación ejerce un papel importante en la integridad de los nematodos, Strauch y Ehlers (2000) sugieren que la agitación debe ser menor a 200 rpm durante el desarrollo de los nematodos. Este parámetro puede disminuir hasta 60 rpm (Inman *et al.*, 2012). En el presente trabajo de investigación se evidenció que 200 rpm es el valor mínimo para mantener el una distribución relativamente homogénea del sistema utilizado.

El efecto de la concentración del inóculo de nematodos sobre el rendimiento final no se pudo determinar, dado que los JI no se desarrollaron, sin embargo las concentraciones evaluadas están dentro del rango de 300 - 4 000 nematodos por mililitro, registrado por Inman *et al.* (2012). Estas concentraciones constituyen un parámetro a determinar para cada especie o cepa, por ejemplo Strauch y Ehlers (2000), establecieron fermentaciones liquidadas *H. megidis* con concentraciones de inóculo (JI) que variaron dese 1.600 a 7.300/ml, sin embargo la densidad del inóculo no tuvo un efecto en el rendimiento final. En contraste la aireación influyó considerablemente en el rendimiento de los JI.

Pace *et al.* (1986), correlacionaron parámetros para la producción de *S. carpocapsae* en un fermentador de 10 L ellos adicionaron JI en una concentración de 2.000/ml, en un medio inoculado 24 h antes con *X. nematophilus*. Cuando los nematodos se adicionaron, se redujo la temperatura de 28 °C a 23 °C y la velocidad del impulsor se fijó en 180 rpm para mantener 20 % de saturación de oxígeno. Después de 10 días, el cultivo produjo 40.000 JI por ml. Este trabajó constituyó la primera patente para la producción de NEP en fermentadores. No obstante cada especie o cepa requiere condiciones particulares, aspecto que limita la aplicación de metodologías estandarizadas para la producción de aislamientos no comerciales.

6.4. Bibliografía

BURMAN, M.; PYE, A.E. 1980. *Neoplectana carpocapsae*: respiration of infective juveniles. *Nematologica* 26: 214-219.

EHLERS, R-U.; NIEMANN, I.; HOLLMER, S.; STRAUCH, O.; JENDE, D.; SHANMUGASUNDARAM, M.; MEHTA, U.K.; EASWARAMOORTHY, S.K.; BURNELL, A. 2000. Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica* – *Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Sci Technol* 10:607–616

EHLERS, R-U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 56: 623–633.

INMAN, FL III.; HOLMES LD. 2012. The effects of trehalose on the bioluminescence and pigmentation of the phase I variant of *Photorhabdus luminescens*. *J Life Sci* 5:454–465

INMAN, FL. III; SINGH, S.; HOLMES. L.D. 2012. Mass Production of the Beneficial Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and Its Bacterial Symbiont *Photorhabdus luminescens*. *Indian J Microbiol*. 52(3):316–324.

KAYA,H. K.; AGUILLERA, M. M.; ALUMAI, A.; HO YUL CHOO; DE LA TORRE, M.; FODOR, A.; GANGULY, S.; HAZIR, S.; LAKATOS,T.; PYE, A.; WILSON, M.; YAMANAKA, S.; YANG, H.; EHLERS, R.-U. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control*. 38: 134-155.

LÓPEZ, J. C. 2008. Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. FNC – Cenicafé Nematodos para el control de insectos plagas. Chinchiná (Colombia). Editor BUSTILLO PARDEY, Alex Enrique. Capítulo 10, p. 150 -183.

PACE, G.W.; GROTE, W.; PITT, D.E.; PITT, J.M. 1986. Liquid culture of nematodes. Int Patent WO 86/01074.

STRAUCH, O.; EHLERS, R.-U. 1998. Food signal production of *Photobacterium luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 50: 369-374.

STRAUCH, O.; EHLERS, R.-U. 2000. Influence of the aeration rate on the yields of the biocontrol nematode *Heterorhabditis megidis* in monoxenic liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 9–13.

7. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos y considerando la discusión de los mismos, se presenta evidencia para rechazar la hipótesis de investigación. Las magnitudes de las variables evaluadas para la fermentación líquida (en biorreactor), del complejo nematodo-bacteria no permitieron obtener rendimientos de JI superiores a los reportados en la literatura.

Las condiciones evaluadas en los cultivos sólidos permitieron establecer el ciclo de vida del nematodo, demostraron que es posible producir JI viables en periodos cortos de tiempo (8 días), el medio de cultivo formulado con hígado permitió expresar el mayor potencial reproductivo (mayor rendimiento). Los JI de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) producidos en cultivo In vitro fueron patogénicos. Los ciclos de producción continua In vitro, no afectaron la virulencia de los JI, evaluada contra *G. mellonella*. En contraste, se disminuyó el potencial reproductivo. Se sugiere que el inóculo del nematodo se debe producir In vivo.

La formulación del sustrato para la producción de *Heterorhabditis* sp (Tumaco) en cultivo semisólido tuvo efecto sobre el rendimiento de los JI. La formulación basada en hígado de pollo permitió obtener JI viables. La metodología desarrollada permitirá continuar con procesos de escalado con fines comerciales.

La agitación, la geometría del fermentador (frasco) y la composición del sustrato influyeron sobre el desarrollo de *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) producido a nivel de matraz. La mejor correlación permitió obtener JI con rendimiento inferior a los reportes de la literatura con otras especies de NEP, sin embargo, estos resultados son los primeros documentados en Colombia.

Las magnitudes de las variables evaluadas en las fermentaciones líquidas (biorreactor), correspondieron a las reportadas en la literatura, algunas permitieron el crecimiento de las bacterias simbiotas (*Photorhabdus* sp.) sin embargo, no fueron favorables para el desarrollo del nematodo nativo *Heterorhabditis* sp. (Tumaco). Con los resultados obtenidos se evidencia la necesidad de establecer otras magnitudes que permitan el desarrollo y multiplicación del complejo nematodo-bacterias mediante fermentación líquida.

Los resultados del actual trabajo de investigación demostraron el potencial del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. (Tumaco) y sus bacterias simbiotas para

establecerse en cultivos monoxénicos sólidos y aportan al conocimiento para el desarrollo de procesos con fines de masificación.