



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**Producción en fermentación sólida de un aislado del
nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp*
proveniente de suelo de Guasave, Sinaloa, México.**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

Alfonso Alvarez Villa

Hermosillo, Sonora

Febrero, 2014

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Control biológico de plagas.....	1
1.2 Nematodos entomopatógenos.....	1
1.3 Ciclo de vida y mecanismo de infección de <i>Heterorhabditis spp.</i>	2
1.4 Producción de nematodos entomopatógenos.....	4
1.5 Cultivo en medio sólido.....	4
II. JUSTIFICACIÓN	7
III. OBJETIVOS	8
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 Soluciones y medios de cultivo.....	9
4.2 Muestra de suelo.....	10
4.3 Aislamiento de nematodos entomopatógenos de muestras de suelo.....	10
4.4 Ciclos de infección reproducción.....	11
4.5 Conteo de nematodos entomopatógenos.....	12
4.6 Aislamiento de la bacteria simbiote <i>Photorhabdus luminescens</i>	12
4.7 Conteo de <i>Photorhabdus luminescens</i>	12
4.8 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Photorhabdus luminescens</i>	13
4.8.1 Cultivo por lote en matraz de <i>Photorhabdus luminescens</i>	13
4.8.2 Cultivo por lote en matraz de <i>Photorhabdus luminescens</i> utilizando medio A Y B.....	13
4.8.3 Cultivo por lote y lote alimentado de <i>Photorhabdus luminescens</i> en un biorreactor agitado mecánicamente.....	14
4.9 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_La). ...	14
4.10 Ajuste de datos de crecimiento de <i>Photorhabdus luminescens</i> a modelos matemáticos.....	15
4.11 Cultivo monoxénico de <i>Heterorhabditis spp</i> y <i>Photorhabdus luminescens</i> en reactor sólido estático.....	16

4.12 Ajuste de datos de crecimiento en reactor sólido estático de <i>Heterorhabditis spp</i> a modelos matemáticos.	17
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1 Recuperación de <i>Heterorhabditis spp</i> de suelo de un cultivo de maíz de Guasave, Sinaloa (25°35'49"N/108°35'48"O).	19
5.2 Producción <i>in vivo</i> de <i>Heterorhabditis spp</i>	19
5.3 Aislamiento de la bacteria simbiote <i>Photorhabdus luminescens</i>	20
5.4 Relación entre DO ₆₀₀ nm y número de bacterias de <i>Photorhabdus luminescens</i> por litro de medio.	21
5.5 Cinética de crecimiento de la bacteria <i>Photorhabdus luminescens</i> en cultivo por lote en fermentación sumergida.	21
5.6 Capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor tipo tanque agitado.	24
5.7 Producción <i>in vitro</i> en fermentación sólida del nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis spp</i>	26
VI. CONCLUSIONES	35
VII. RECOMENDACIONES	36
VIII. BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis spp</i> (Imagen modificada (Han & Ehlers, 2001)).	3
Figura 2. Larva de <i>Galleria mellonella</i> muerta por nematodos a los 10 días de colocación en el suelo.	19
Figura 3. Nematodos aislados de las trampas de White. Imágenes observadas a aumentos de 100 X.	20
Figura 4. (A) Agar Mac conkey y <i>Photorhabdus luminescens</i> en agar Mac conkey (B). (C) Agar NBTA y <i>Photorhabdus luminescens</i> en agar NBTA (D).....	20
Figura 5. DO ₆₀₀ en función de la concentración de células de <i>Photorhabdus luminescens</i>	21
Figura 6. Se muestra la evolución en el tiempo de la concentración en el medio en células por mililitro.	23
Figura 7. Ajuste lineal para la determinación del K _L a del biorreactor tanque agitado....	24
Figura 8. Cinética poblacional de <i>Heterorhabditis spp</i> diferenciada por sus estadios de desarrollo adulto, juvenil e infectivos juveniles (IJ).....	27
Figura 9. Diferentes estadios de <i>Heterorhabditis spp</i> : (A) Huevos. (B) Juveniles (J1-J2). (C) IJ. (D) J4 desprendiéndose de la cutícula. (E) J4. (F) Adultos con vulva desarrollada. (G) y (H) <i>Endotokia matricida</i>	29
Figura 10. Evolución de la concentración de <i>Heterorhabditis spp</i> en cultivo monoxénico en sólido. Datos ajustados al modelo de Gompertz.	29
Figura 11. Evolución de la concentración adimensional de <i>Heterorhabditis spp</i> (C/C ₀) en cultivo monoxénico en medio sólido. Datos ajustados al modelo de Gompertz en función de la concentración inicial.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios sobre la producción de nematodos en cultivo en medio sólido.....	5
Tabla 2. Concentraciones obtenidas de <i>Photorhabdus luminescens</i> a las 24 horas de crecimiento, de la cinética en matraz por lote.	21
Tabla 3. Parámetros cinéticos obtenidos, de la cinética de <i>Photorhabdus luminescens</i> en matraz y tanque agitado.....	23
Tabla 4. Coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno (K_La), calculados a diferentes condiciones de operación.	25
Tabla 5. Comparación de los parámetros cinéticos obtenidos en sistemas fermentativos.....	31

RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis spp* son gusanos microscópicos circulares simples, sin segmentos y carentes de apéndices. Pertenecen a una población de parásitos que pueden ser aplicados para el control biológico de plagas. Tienen la característica de transportar e introducir una bacteria simbiote con ellos, del género *Photorhabdus*. Son capaces de penetrar en el cuerpo de las larvas de insectos y son los más eficaces para el control de insectos que viven en el suelo. Por lo que en busca de soluciones para el combate de plagas, una gran alternativa son los nematodos entomopatógenos. Su creciente demanda es debido principalmente al uso de excesivo de plaguicidas químicos que ha llevado al deterioro del medio ambiente y las especies de las plagas se han vuelto resistentes y difíciles controlar. Por lo que para formular productos a base de nematodos entomopatógenos es necesario reproducirlos masivamente, ya sea en cultivos en medio sólido o líquido. Se requiere del diseño de procesos de fermentación, en los cuales se establezca un cultivo mixto nematodo/bacteria simbiote. El objetivo de este trabajo constó en establecer un cultivo en medio sólido para la reproducción masiva del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp* aislado de una muestra de suelo de Guasave, Sinaloa México. Se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* como cebo para el aislamiento de los nematodos de la muestra de suelo. Se aisló del nematodo la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* sembrando la bacteria en agar Mac Conkey y agar NBTA. Se determinaron los parámetros cinéticos de la bacteria en medio líquido en cultivos por lote en matraz y cultivo por lote alimentado en un biorreactor agitado mecánicamente. Se estableció un cultivo mixto nematodo/bacteria simbiote para la reproducción de *Heterorhabditis spp* en medio sólido, utilizando un biorreactor sólido estático. Se observó el ciclo de vida con sus diferentes fases de crecimiento y se determinaron los parámetros cinéticos. A los 12 días de crecimiento se obtuvieron valores del factor de multiplicación $(C/C_0)_{\text{máx}}$ de 52.49 y una concentración de 35434 infectivos juveniles (IJ) por gramo de medio.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Control biológico de plagas.

Ante la necesidad de controlar plagas principalmente en cultivos agrícolas, fueron desarrollados los plaguicidas químicos. Su uso ha sido una herramienta eficaz para controlar plagas. Sin embargo, el uso excesivo ha llevado al deterioro del medio ambiente y las especies de las plagas se han vuelto resistentes y difíciles controlar. Por lo que en busca de soluciones para el combate de plagas, una gran alternativa es el control biológico de plagas.

Los controladores biológicos consisten en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo. Entre los cuales se pueden utilizar bacterias, hongos, nematodos y virus (Asaff, Reyes, López, & De la Torre, 2002).

1.2 Nematodos entomopatógenos.

Los nematodos entomopatógenos son gusanos microscópicos circulares simples, que no poseen color y carecen de apéndice, pueden ser de vida libre o parásitos, los nematodos poseen sistemas digestivo, reproductivo, muscular, excretorio y nervioso; pero carecen de los sistemas visual, auditivo, circulatorio y respiratorio (Kaya & Koppernhöfer, 1999). Pertenecen a una población de parásitos de insectos principalmente del género *Steinernema* y *Heterorhabditis*, los cuales matan a su hospedero con la ayuda de bacterias que portan en su tracto digestivo. El estado infectivo juvenil (IJ) del nematodo, el cual es el único de vida libre, entra al hospedero a través de aberturas naturales, tales como la boca, ano o espiráculos (Poinar G. j., 1990). Las fases IJ no se alimentan y tienen la capacidad de buscar activamente al insecto huésped (Boemare N., 2001).

El control biológico ha mostrado ser una alternativa viable para el control de un amplio número de insectos plaga (Hajek, 2004). Específicamente el uso de las llamadas fases infectivos juveniles (IJ) de nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, ha mostrado ser efectivo en ciertos sistemas agrícolas para controlar larvas de insectos plaga como escarabajos en viñedos y pastos (i. e., *Otiorynchus*

ulcatus y *Pachnaeus* spp.)(Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002). Para que sean utilizados efectivamente los nematodos entomopatógenos, generalmente se aplican en cantidades de 2.5×10^9 /ha o mayores (Georgis & Hague, Nematodes as biological insecticides, 1991)(Georgis, Dunlop, & Grewal, 1995).

Los nematodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* están relacionados simbióticamente con bacterias específicas de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente (Pace, Pitt, & Pitt, 1986). La bacteria proporciona nutrientes a los nematodos, producen antibióticos que inhiben el crecimiento de otros microbios y mata a su hospedero por septicemia(Akhurst, 1982)(Akhurst & Boemare, 1990). La bacteria simbiote además de su función como fuente de alimento del nematodo, produce señales que influyen en el desarrollo del nematodo(Strauch & Ehlers, 1998). La función más importante que el nematodo tiene en la relación simbiótica es que sirve como vector para la bacteria(Akhurst & Boemare, 1990).

Las bacterias simbióticas de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* presentan un dimorfismo(Volgyi, Fodor, Szentirmai, & Forst, 1998). La llamada fase I de la bacteria posee varias características que se encuentran aparentemente ausentes o notoriamente reducidas en la forma variante llamada fase II, como lo son la secreción de ciertas enzimas, producción de antibióticos y la presencia de inclusiones paracrystalinas en el protoplasma(Boemare N., 2001). La fase I bacteriana es esencial para una actividad entomopatógena efectiva y para que los nematodos completen eficientemente su ciclo de vida(Woodring & Kaya, 1988). La fase II es inducida durante la fase estacionaria de crecimiento celular y su presencia ocasiona que tanto la actividad entomopatógena como la reproducción de los nematodos se vean afectadas(Boemare N., 2001).

1.3 Ciclo de vida y mecanismo de infección de *Heterorhabditis* spp.

Los ciclos de vida de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* son esencialmente similares, a excepción de que los adultos de la primera generación son machos y hembras para *Steinernema* y hermafroditas para *Heterorhabditis*(Poinar G. j., 1990). El nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* spp presenta ocho estados de desarrollo

huevo, cuatro estados juveniles (J1, J2, J3-IJ, J4), separados por mudas y adultos hermafroditas, machos y hembras. Todos los estados son morfológicamente distintos (Saenz A & López N, 2011). En la Figura 1 se representa el ciclo de vida del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp.*

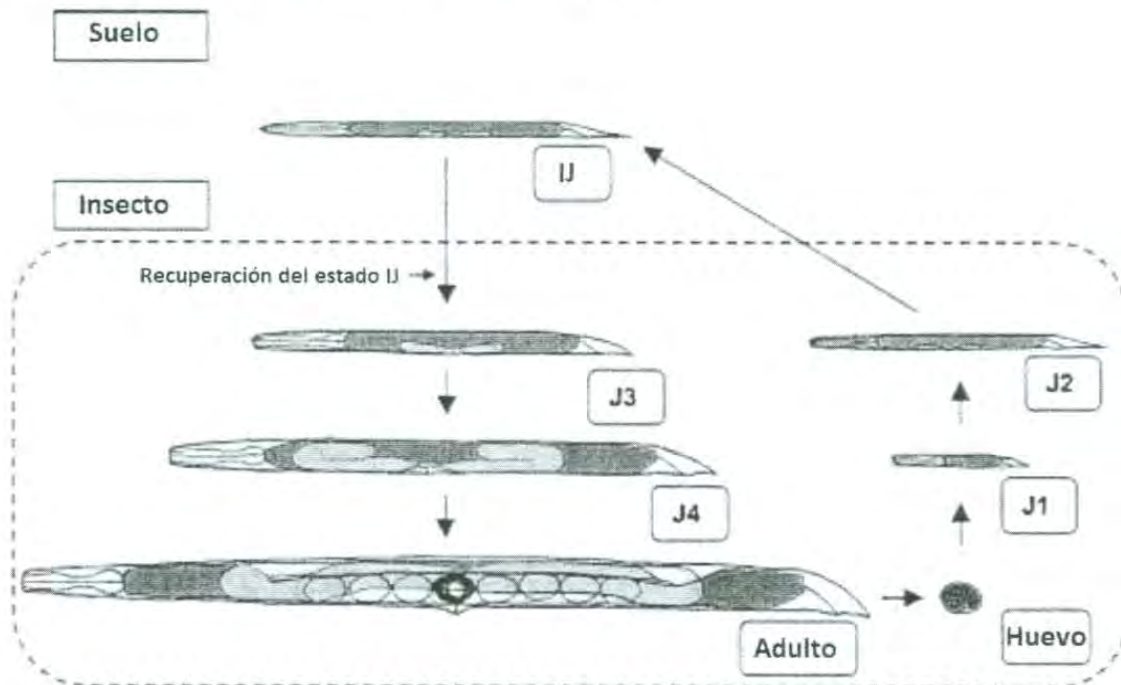


Figura 1. Ciclo de vida del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp* (Imagen modificada (Han & Ehlers, 2001)).

Como primer paso, los infectivos juveniles (IJ) (único estadio que se encuentra fuera del insecto hospedante) de *Heterorhabditis spp* penetran en el insecto a través de las aberturas naturales y liberan la bacteria simbiote en el hemocele. La bacteria provoca la muerte del insecto por septicemia en las primeras 48-72 horas y propicia que el juvenil infectivo comience a alimentarse de los tejidos desintegrados por la acción de la bacteria. Se desarrolla y da lugar a una hembra hermafrodita (Grewal & Georgis, 1999).

Este adulto hermafrodita deposita alrededor de 300 huevos, los cuales eclosionan dando lugar al primer estado juvenil que atraviesa por otros dos estados juveniles adicionales y eventualmente se desarrollan como hembras o machos.

Unas 2 o 3 generaciones de nematodos son completadas dentro del cadáver del insecto. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables o la fuente de nutrientes es escasa, el primer estado juvenil se convierte en infectivos juveniles (IJ),

los cuales abandonan el cadáver del insecto en busca de un nuevo hospedante para repetir su ciclo de vida (Grewal & Georgis, 1999)(Johnnigk & Ehlers, 1999).

1.4 Producción de nematodos entomopatógenos.

Comercializar exitosamente productos a base de nematodos depende de poder producir cantidades suficientes de nematodos a bajo costo(de la Torre, 2003). Nematodos entomopatógenos de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* pueden ser cultivados *in vivo* en insectos huésped o reproducidos *in vitro* en medios sólidos y líquidos(Poinar G. , 1979)(Friedman, Langston, & Pollitt, 1989).Cada cultivo tiene sus ventajas y desventajas en relación con el costo de producción, gastos de capital de inversión, conocimientos técnicos, escalamiento y la calidad del producto (Georgis , Dunlop, & Grewal, 1995).Los productos a base de nematodos se pueden empaquetar en variedades de sustratos sólidos como arcilla, vermiculita, geles de alginato o tierra de diatomeas(Gaugler & Han, 2002).

La reproducción masiva en cultivos *in vitro* de nematodos entomopatógenos requiere del diseño de procesos de fermentación, en los cuales se establezca un cultivo mixto nematodo/bacteria simbiote. La bacteria debe mantenerse en la fase I y el nematodo tiene que completar su ciclo biológico varias veces para alcanzar concentraciones importantes. El diseño de estos procesos involucra una serie de factores que tienen que ser considerados como son la cinética de propagación así como los efectos de las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de masa, entre otros (Lopez y lopez, Chavarria-Hernandez , Sumano-Fernandez , & de la Torre , 2000).

1.5 Cultivo en medio sólido.

El cultivo monoxénico nematodo/bacteria en medio sólido se llevó a cabo por primera vez en placas de Petri, que contenían agar con diversos medios basados en comida de perro, riñón de cerdo, sangre de ganado y otros productos de origen animal(Hara, Lindegren, & Kaya, 1981). Wouts (Wouts, 1981) desarrollo un medio mejorado (menos caro) que incluye extracto de levadura, caldo nutritivo, aceite vegetal y harina de soja. El cultivo monoxénico nematodo/bacteria en medio sólido avanzó considerablemente

con la invención de un sistema que implica el cultivo de nematodos en espuma de poliuretano(Bedding R. , 1981).

En la Tabla 1 se presentan rendimientos obtenidos de estudios realizados en cultivo monoxénico nematodo/bacteria en medio sólido de nematodos de diferentes géneros.

Tabla 1. Estudios sobre la producción de nematodos en cultivo en medio sólido.

Medio/ Referencia	Sistema de fermentación	Especie de nematodo	C Inicial (IJ)	C Final (IJ)	Rendimiento por gramo de medio (IJ/g)
Agar (Salma & Shahina, 2012)	Placa Petri(18 ml de medio)	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	50	350000	19444
Agar (Tangchitsom kid, Sontirat, & Chanpaisaeng, 1999)	Placa Petri(20 g de medio)	<i>Steinernema sp.</i>	5000	1215200	60760
Agar (Hanan & El-Sadawy, 2011)	Placa Petri(20 g de medio)	<i>Steinernema sp.</i>	4000	120000	6000
Esponja (Salma & Shahina, 2012)	Matraz de 500 ml (2g de esponja + 55g de medio)	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	1000	160000	2909
Esponja (Tabassum & Shahina, 2004)	Matraz de 500 ml (7g de esponja + 73g de medio)	<i>Heterorhabditis indica</i>	100	6250000	85616
Esponja (Anjum & Prabhuraj, 2007)	Matraz de 250 ml (1.5g de esponja + 55g de medio)	<i>Heterorhabditis indicus</i>	1000	2662000	48400

La producción de nematodos entomopatógenos en cultivo en medio sólido no ha crecido sustancialmente en las últimas dos décadas y parece ser utilizado por sólo dos empresas (una en los EE.UU. y otra en China)(Gaugler & Han, 2002). Si el cultivo en medio sólido se adoptará en escala más amplia, la eficiencia deberá incrementar al encontrar mejores métodos de mecanización con una baja inversión de capital(Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002).

II. JUSTIFICACIÓN

El uso de bioinsecticidas a base de nematodos entomopatógenos para el combate de plagas principalmente presentes en cultivos agrícolas está en aumento hoy en día. Esto puede deberse a la gran capacidad infectiva de los nematodos y a las restricciones ambientales ante el uso excesivo de plaguicidas químicos.

Por lo que con el fin de satisfacer la demanda y formular productos a base de nematodos, es necesario reproducir masivamente en sistemas de fermentación los nematodos entomopatógenos, entre los que se encuentra la especie *Heterorhabditis spp*. Estudios realizados en el aislamiento de nematodos entomopatógenos en la zona norte de México, determinaron que una de las especies que predomina es *Heterorhabditis spp*(Gallardo Espinoza, 2012), por lo que el aislamiento de especies nativas es de suma importancia, ya que repercute en la adaptación de la especie al ambiente, principalmente a las condiciones de clima y de suelo(Paula A, Sepulveda-Cano, Lopez Nuñez, & Giraldo, 2008). Una alternativa para el control biológico de plagas en la zona norte de México, es posible obteniendo un aislado regional del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp* y su bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* y reproducirlo masivamente en un cultivo *in vitro* en medio sólido.

III. OBJETIVOS

Objetivo general.

Establecer el cultivo en medio sólido para la reproducción masiva del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp* aislado de una muestra de suelo de Guasave, Sinaloa México.

Objetivos específicos.

1. Recuperar los nematodos entomopatógenos de una muestra de suelo de Guasave, Sinaloa México.
2. Aislar y purificar la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* del aislado de *Heterorhabditis spp*.
3. Determinar los parámetros cinéticos de un cultivo en medio líquido de la bacteria simbiote aislada *Photorhabdus luminescens*.
4. Producir el aislado del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp* en cultivo en sólido y determinar sus parámetros cinéticos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Soluciones y medios de cultivo.

Agar Mac Conkey (AMC)

- AMC 50 g
- Agua destilada 1000 mL

Agar NBTA(Akhurst, 1980)

- Agar nutritivo 23 g
- Azul de Bromotimol 0.375 g
- Cloruro de trifeniltetrazolio 0.04 g
- pH 8.5
- Agua destilada 1000 mL

Agar Aceite de Maíz modificado(Wouts, 1981)

- Agar nutritivo 23 g
- Nutrient broth (Difco) 8 g
- Aceite de maíz 10.8 mL
- Tween 80 1 mL
- Agua destilada 1000 mL

Medio A (Buecher & Popiel, 1989)

- Caldo de soya tripticaseina 30 g
- Extracto de levadura 5 g
- Agua destilada 1000 mL

Medio B modificado(Ehlers, Lunau, Krasomil-Osterfeld, & Osterfeld, 1998)

• Caldo de soya tripticaseína	10 g	
• Nutrient broth (Difco)	10 g	
• Extracto de levadura	5 g	
• Peptona de caseína	5 g	
• KCl	0.35 g	
• CaCl ₂ 0.21 g		
• NaCl	5 g	
• Aceite de maíz	30 mL	
• Tween 80		1 mL
• Agua destilada		1000 mL

Solución para lote alimentado de glicerol:

• Glicerol	150 mL
• Agua destilada	1000 mL

Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave a 120°C y una presión de 15 lb/in² por 15 min.

4.2 Muestra de suelo.

Se utilizó una muestra de 1 Kg de suelo de Guasave, Sinaloa, México (25°35'49"N/108°35'48"O), que dieron positivas a la presencia de nematodos de entomopatógenos (Gallardo Espinoza, 2012).

4.3 Aislamiento de nematodos entomopatógenos de muestras de suelo.

Se agregó 300 g de muestra de suelo en un recipiente de 1 litro y 10 larvas de *Galleria mellonella* como cebo, más agua destilada estéril solo para humedecer la muestra (Bedding & Akhurst, 1975).

Al transcurso de los primeros 10 días se observó el número de larvas muertas, así como las que presentaron características de haber sido infectadas por nematodos. Al ser infectadas por especies de la familia *Heterorhabditidae* las larvas de *Galleria mellonella* presentan características como cuerpo flácido y coloración roja o vino tinto(Saenz A & López N, 2011).

Las larvas infectadas se colocaron en trampas de White(White, 1927) para la obtención de infectivos juveniles (IJ). Las trampas constaron en colocar 5 porta objetos de vidrio colocados uno sobre el otro en una caja de Petri de 15 cm de diámetro, se colocó papel filtro sobre el porta objetos de vidrio superior. Se colocó encima del papel filtro una larva de *Galleria mellonella* y se añadió agua destilada estéril hasta que tocara los bordes del papel filtro.

En el caso que las larvas de *Galleria mellonella* estuvieran infectadas por nematodos entomopatógenos. Las fases infectivas juveniles saldrían del cadáver de la larva y migrarían por el papel filtro hacia el agua. Por lo que a los tres días se observaron en el microscopio cada trampa colocando 10 μ L de muestra en un porta objetos. Las trampas que dieron positivas a nematodos, se vació su volumen de líquido en frascos para cultivo celular de 600 ml y se refrigeraron a 4°C.

4.4 Ciclos de infección reproducción.

Con el fin de reproducir los nematodos obtenidos de las muestras de suelo,se utilizó la metodología descrita(Dutky, Thompson, & Cantwell, 1964). Consto en colocar papel filtro en el fondo y 10 larvas de *Galleria mellonella* en una placa de Petri de 15 cm de diámetro. Se añadió 1 mL de concentrado de nematodos obtenidos de las muestras de suelo y se añadió un poco más de agua hasta humedecer el papel filtro. Se incubaron a 25°C durante 10 días.

Las larvas que presentaron características de infección se colocaron en trampas de White(White, 1927) para la obtención de infectivos juveniles (IJ). Las trampas que dieron positivas a nematodos, se vació su volumen de líquido en frascos para cultivo celular de 600 mL y se refrigeraron a 4°C.

4.5 Conteo de nematodos entomopatógenos.

Utilizando un microscopio Carl Zeiss (Axiostar plus) se realizó la cuenta directa de nematodos a 100 X de aumento. Se colocaron 10 µL de muestra en un porta objetos y se contó el número total de nematodos presentes identificándolos por Juveniles (J1, J2 y J3), infectivos juveniles (IJ), J4 y adultos.

4.6 Aislamiento de la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens*.

Existen varios métodos para realizar el aislamiento de la bacteria, pero los más comunes se basan en la siembra en agar Mac Conkey o agar NBTA, de la hemolinfa de larvas muertas o de nematodos esterilizados superficialmente, que vierten la bacteria al medio de cultivo in vitro (Boemare & Ackhurst, 1988) (Ehlers, Stoessel, & Wyss, 1990). *Photorhabdus luminescens* para su fase I presenta características de bioluminiscencia y la coloración roja en agar Mac Conkey y marrón en agar NBTA para la fase I (Inman III, Singh, & Holmes, 2012).

Para aislar y purificar la bacteria, se tomó con una jeringa de 1mL, 100 µL de concentrado de nematodos obtenidos de los ciclos de infección reproducción, con el fin de romper los nematodos y que liberen la bacteria simbiote. Se sembró de forma directa, diluciones de 1/10 y 1/100 en agar Mac Conkey y NBTA.

Se incubaron a 25 °C y se observó crecimiento de la bacteria. Se seleccionaron colonias aisladas y se sembraron por estría cruzada en agar Mac Conkey para purificarlas. Las colonias aisladas con la morfología típica se sembraron masivamente en el mismo medio y cuando el crecimiento tenía un color rojo intenso, se guardaron las cajas en refrigeración a 4°C.

4.7 Conteo de *Photorhabdus luminescens*.

El conteo se realizó en cámara de Neubauer, con el fin de obtener la concentración en el medio en células por mililitro. Se utilizó un microscopio Carl Zeiss (Axiostar plus) a 400 X de aumento.

4.8 Cultivo *in vitro* de *Photorhabdus luminescens*.

4.8.1 Cultivo por lote en matraz de *Photorhabdus luminescens*.

El cultivo por lote en matraz se realizó duplicado en un matraz de 125 mL con 25 mL de medio A, la inoculación del medio con la bacteria *Photorhabdus luminescens* se hizo tomando con un asa crecimiento de la bacteria aislada en agar Mac Conkey. Se incubaron a 25°C y 150 rpm en un agitador modelo G25 New Brunswick por 24 horas. Se tomaron muestras cada 6 horas para medir densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro modelo Beckman DU530 Life Science UV/Vis.

A partir de los datos experimentales del cultivo por lote en matraz de *Photorhabdus luminescens*, se realizó un ajuste lineal de los datos de densidad óptica a 600 nm vs cuenta de bacterias por litro de medio.

4.8.2 Cultivo por lote en matraz de *Photorhabdus luminescens* utilizando medio A Y B.

Con el fin de comparar el medio A y B, en el cultivo de *Photorhabdus luminescens*. El cultivo se llevó a cabo en matraz de 125 mL, el primero con 40 ml de medio A y el segundo con 40 mL de medio B. La inoculación de los medios se hizo tomando con un asa crecimiento de la bacteria aislada en agar Mac Conkey y se incubaron a 25°C y 150 rpm en un agitador modelo G25 New Brunswick por 24 horas. Se tomó muestra a las 24 horas de crecimiento y se midió densidad óptica a 600 nm.

Se determinó el peso seco de *Photorhabdus luminescens* por mL de medio, a las 24 horas de crecimiento se realizó conteo de células por mL y se tomaron muestras por triplicado de 2 mL de los cultivos en medio A y B respectivamente. El volumen de cada muestra se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifugaron en una centrifuga Eppendorf 5415 C durante 10 minutos a 9000 rpm. Se vació el sobrenadante de las muestras y se secaron en un horno a 60°C por 8 horas. Se pesaron las muestras ya secas y se determinó la relación de número de células por gramo de células de *Photorhabdus luminescens*.

4.8.3 Cultivo por lote y lote alimentado de *Photobacterium luminescens* en un biorreactor agitado mecánicamente.

El cultivo por lote y lote alimentado fue llevado a cabo en un Biorreactor Applikon® con un volumen nominal de 3000 mL, acoplado a una bioconsola ADI 1025 y un biocontrolador ADI 1010. El cultivo por lote y lote alimentado con glicerol se realizaron con las mismas condiciones de operación. El volumen de operación fue de 1000 mL, se agregaron 900 mL de medio B y se inoculó con 100 mL de medio B con bacterias de *Photobacterium luminescens* con 24 horas de crecimiento. Para el lote alimentado, la alimentación de la solución de glicerol se realizó a una velocidad de 50 mL/hutilizando una bomba peristáltica modelo Masterflex® L/S® con manguera de 13 pulgadas. Las condiciones de operación fueron 600 rpm, 4.5 vvm y 25°C. El pH fue monitoreado con un electrodo el cual es calibrado y posteriormente esterilizado junto al biorreactor. La bioconsola mantuvo los niveles de pH mediante la adición de ácido fosfórico (H₃PO₄ 4M) y base (NaOH 4M), los cuales eran suministrados por bombas peristálticas utilizando mangueras de 16 pulgadas. Para controlar la formación de espuma, era necesaria la adición manual de Antiespumante A de Sigma; 1 mL al principio de la fermentación y durante el transcurso cuando fuera necesario. Se tomó muestra del medio cada hora y se midió la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro modelo Beckman DU530 Life Science UV/Vis.

4.9 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_La).

Utilizando la técnica de método dinámico (Taguchi & Huphrey, 1966), se calculó el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_La) para evaluar la capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor. Los niveles de oxígeno disuelto en el líquido fueron medidos por un electrodo polarográfico. Los datos de concentración de oxígeno disuelto en el biorreactor a diferentes tiempos se ajustaron linealmente a la ecuación (1).

$$\ln \left(\frac{C^* - C_L}{C^* - C_0} \right) = -K_L a(t) \quad (1)$$

C^* = Concentración de equilibrio gas – líquido de oxígeno disuelto $\left(\frac{mg}{L}\right)$.

C_0 = Concentración inicial de oxígeno disuelto en el líquido en $t = 0$ $\left(\frac{mg}{L}\right)$.

C_L = Concentración de oxígeno disuelto en el líquido $\left(\frac{mg}{L}\right)$.

$K_L a$ = Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (h^{-1}).

t = Tiempo (h).

4.10 Ajuste de datos de crecimiento de *Photorhabdus luminescens* a modelos matemáticos.

Los datos obtenidos en los cultivos in vitro de *Photorhabdus luminescens* por lote en matraz, en biorreactor y lote alimentado en biorreactor se ajustaron a un modelo logístico de Verhulst-Pearl mediante la ecuación (2) utilizando el programa NCSS 2007. El ajuste se utilizó para obtener los valores de los parámetros cinéticos de $X_{m\acute{a}x}$ (Células/ml) y velocidad específica de crecimiento máxima $\mu_{m\acute{a}x}$ (Horas⁻¹).

$$X(t) = \frac{X_{m\acute{a}x}}{1 + \left(\frac{X_{m\acute{a}x}}{X_0} - 1\right) e^{(-\mu t)}} \quad (2)$$

Donde:

$X(t)$ = Concentración de microorganismos en el tiempo t $\left(\frac{C\acute{e}lulas}{mL}\right)$.

X_0 = Concentración inicial de microorganismos $\left(\frac{C\acute{e}lulas}{mL}\right)$.

X_0 = Concentración máxima de microorganismos $\left(\frac{C\acute{e}lulas}{mL}\right)$.

$\mu_{m\acute{a}x}$ = Velocidad específica de crecimiento máxima (h^{-1}).

$t =$ Tiempo de crecimiento (h).

4.11 Cultivo monoxénico de *Heterorhabditis spp* y *Photorhabdus luminescens* en reactor sólido estático.

Con el fin de reproducir masivamente y determinar el comportamiento de la cinética de crecimiento del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp*, se estableció un cultivo monoxénico en medio sólido. Se utilizó un reactor sólido estático (placa de Petri) con dimensiones 9 cm de diámetro y 1.5 cm de altura. Se realizó conteo total de nematodos identificándolos por sus diferentes estadios cada 2 días durante los 12 días de duración de la cinética. El conteo se realizó por triplicado, por lo que se cultivaron un total de 18 reactores sólidos estáticos.

El medio sólido utilizado en el cultivo consistió en agar aceite de maíz, a cada reactor sólido estático se le agregaron 20 g de medio y 1 mL de cultivo de la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* en medio A con 24 horas de crecimiento y una concentración de $7.48 \text{ células/mL} \times 10^9$.

El reactor sólido estático se incubó por 24 horas con el medio y la bacteria. A las 24 horas de incubación se agregó 1 mL del inóculo de infectivos juveniles (IJ), con una concentración inicial de 13500 IJ/mL y se incubó a 25°C. A los 6 días de cultivo, se agregó a cada reactor 1 mL de agua destilada para mantener la humedad en el medio y ayudar a la movilidad de los nematodos.

El conteo de nematodos totales en cada reactor sólido estático se realizó de la siguiente manera:

1. Se agregaron 5 mL de agua destilada en la superficie del medio de cultivo (Agar), con un asa de Drigalsky triangular se extendió el agua por toda la superficie con el fin de facilitar la extracción de los nematodos. Con la ayuda del asa de Drigalsky triangular se aglomeraron los nematodos que se encontraban en toda la superficie y se formó un concentrado de nematodos.

2. El concentrado de nematodos se depositó en un vaso precipitado de 50 mL, se midió su volumen utilizando una micropipeta de 1000 μ L pasando el concentrado a otro vaso precipitado de 50 mL.
3. Al conocer el volumen del concentrado de nematodos, se tomó una muestra de 10 μ L si fuere necesario se hicieron diluciones de 1/10 y 1/100 para realizar el conteo en el microscopio y así obtener la concentración de nematodos por mililitro.
4. El número de nematodos totales presentes en el reactor sólido estático se obtuvo multiplicando la concentración del concentrado de nematodos por el volumen medido.

4.12 Ajuste de datos de crecimiento en reactor sólido estático de *Heterorhabditis spp* a modelos matemáticos.

Estudios que describen el crecimiento de nematodos en cultivo sumergido, reportan que tiene un comportamiento de una curva de forma sigmoideal (Han R. , 1996). Con el fin de obtener una expresión matemática del crecimiento poblacional de *Heterorhabditis spp* en cultivo en medio sólido, los datos obtenidos en la cinética de crecimiento se ajustaron utilizando el programa NCSS 2007 a un modelo de Gompertzreparametrizado (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van't Riet, 1990), mostrado en la ecuación (3).

$$C = (C)_{m\acute{a}x} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{[dC/dt]_{m\acute{a}x} \exp[1]}{(C)_{m\acute{a}x}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3)$$

Donde:

C = Concentración de nematodos en el tiempo t (Nematodos totales).

$(C)_{m\acute{a}x}$ = Concentración máxima de nematodos (Nematodos totales).

$\frac{[dC/dt]_{m\acute{a}x}}{(C)_{m\acute{a}x}} = \mu_{m\acute{a}x}$ = Velocidad específica de crecimiento máxima (días^{-1}).

$\lambda = \text{Fase lag (días)}$.

$t = \text{Tiempo de crecimiento (días)}$

Para poder comparar los resultados obtenidos en el cultivo en medio sólido, con estudios de cultivos de nematodos entomopatógenos ajustados a modelos matemáticos, los datos experimentales se ajustaron en relación con la concentración inicial de nematodos utilizando el programa NCSS 2007 a un modelo de Gompertz reparametrizado (Zwietering, Jongenburger, Rombouts, & van't Riet, 1990), mostrado en la ecuación (4).

$$\frac{C}{C_0} = \left(\frac{C}{C_0}\right)_{\text{máx}} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{[d(C/C_0)/dt]_{\text{máx}} \exp[1]}{(C/C_0)_{\text{máx}}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (4)$$

Donde:

$C = \text{Concentración de nematodos en el tiempo } t \text{ (Nematodos totales)}$.

$C_0 = \text{Concentración inicial de nematodos (Nematodos totales)}$.

$[d(C/C_0)/dt]_{\text{máx}} = \text{Máxima razón de cambio (días}^{-1}\text{)}$.

$(C/C_0)_{\text{máx}} = \text{Factor de multiplicación máximo}$.

$\lambda = \text{Fase lag (días)}$.

$t = \text{Tiempo de crecimiento (días)}$.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Recuperación de *Heterorhabditis* spp de suelo de un cultivo de maíz de Guasave, Sinaloa (25°35'49"N/108°35'48"O).

El 50% de las larvas de *Galleria mellonella* utilizadas como trampas presentaron síntomas de infección por nematodos, como coloración purpura (Figura 2) y flacidez. De cuatro larvas infectadas, se recuperaron en trampas de White y se obtuvieron en promedio 47 500 IJ, es decir 11 875 IJ/larva.

Figura 2. Larva de *Galleria mellonella* muerta por nematodos a los 10 días de colocación en el suelo.



En base a la coloración típica de *Galleria mellonella* por infección de *Photorhabdus luminescens*, se corrobora que el nematodo entomopatógeno presente en el suelo pertenece a la especie de *Heterorhabditis* spp. (Gallardo Espinoza, 2012).

Se obtuvo un rendimiento de 11,875 IJ por larva, comparado con estudios realizados (Boff, Wieggers, Gerritsen, & Smits, 2000) con la especie *Heterorhabditis megidis* obtuvieron un rango de rendimiento de 10,142 a 39,272 IJ por larva. Por lo que el rendimiento obtenido en el presente estudio se encuentra dentro del rango reportado anteriormente.

5.2 Producción *in vivo* de *Heterorhabditis* spp.

Para la reproducción del inóculo del nematodo mediante ciclos de infección reproducción, se utilizaron 50 larvas de *Galleria mellonella*. Se observó que 32 larvas estaban infectadas con nematodos y a partir de ellas se obtuvieron 175 000 IJ (Figura 3), lo que corresponde a un rendimiento de 5 468 IJ /larva.



Figura 3. Nematodos aislados de las trampas de White. Imágenes observadas a aumentos de 100 X.

5.3 Aislamiento de la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens*.

A partir del concentrado de nematodos obtenidos de los ciclos de infección reproducción, se aisló purificó una población bacteriana con características de morfológicas de *Photorhabdus luminescens* en agar Mac Conkey y NBTA. Las colonias presentaron coloración rojiza en agar Mac Conkey (Figura 4(B)) y marrón en agar NBTA (Figura 4(D)), lo que indica que la bacteria se encuentra en la fase I (fase infectiva).

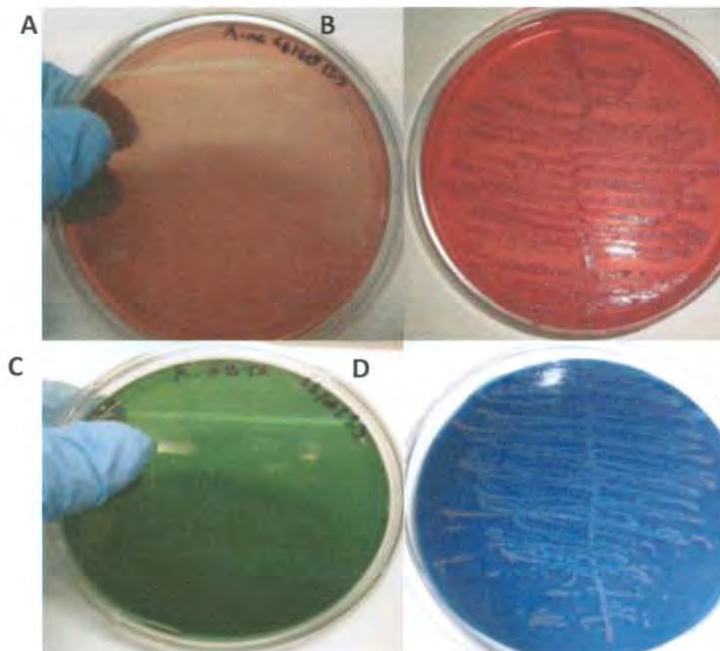


Figura 4. (A) Agar Mac conkey y *Photorhabdus luminescens* en agar Mac conkey (B). (C) Agar NBTA y *Photorhabdus luminescens* en agar NBTA (D).

La bacteria aislada del nematodo presentó las características de morfología colonial en agar Mac conkey y NBTA reportadas por Inman III y colaboradores (Inman III, Singh, &

Holmes, 2012), para *Photorhabdus luminescens* que corresponde a la fase I, es decir la fase infectiva de la bacteria.

5.4 Relación entre $DO_{600\text{ nm}}$ y número de bacterias de *Photorhabdus luminescens* por litro de medio.

La DO es una función lineal del número de células por ml (Figura 5) y se representa por la ecuación: $DO_{600\text{ nm}} = 0.8351 \cdot (\text{Células/L} \times 10^{12})$ con una R^2 de 0.9346.

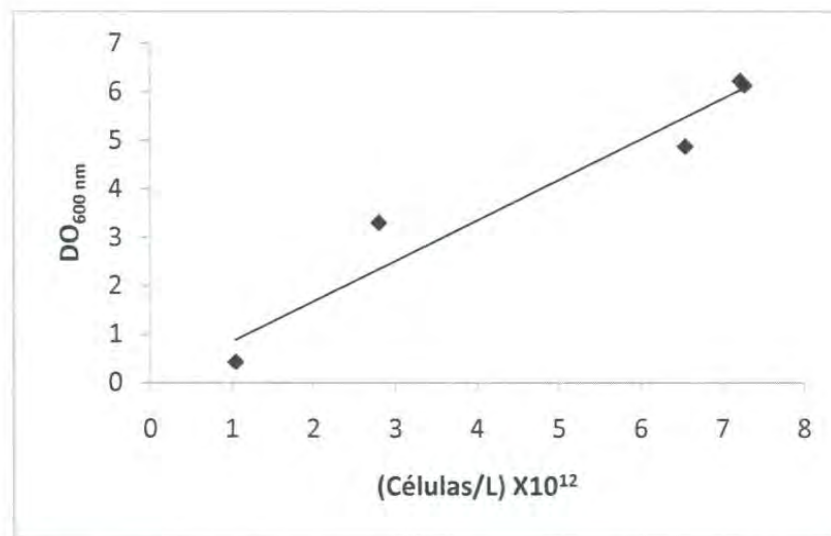


Figura 5. $DO_{600\text{ nm}}$ en función de la concentración de células de *Photorhabdus luminescens*.

5.5 Cinética de crecimiento de la bacteria *Photorhabdus luminescens* en cultivo por lote en fermentación sumergida.

Se realizaron fermentaciones del medio A y B en lote de la bacteria *Photorhabdus luminescens*, en matraz agitado a iguales condiciones de operación. Los resultados obtenidos a las 24 horas de crecimiento se muestran en la Tabla 2. En base a los resultados de peso seco, se obtuvo un valor del número de células por gramo de células de 1.6×10^{12} .

Tabla 2. Concentraciones obtenidas de *Photorhabdus luminescens* a las 24 horas de crecimiento, de la cinética en matraz por lote.

Biorreactores	X_{máx} ((Células/L) X10¹²)	X_{máx} (g células/L)
Matraz agitado (125 mL) Medio A	9.45	5.87
Matraz agitado (125 mL) Medio B	4.42	2.74

Al comparar el medio A y B en cultivo por lote en matraz a iguales condiciones de operación, se obtuvieron 2.1 veces más células por volumen de medio en el medio A que en medio B. El incremento en la producción de células se pudo deber a que el medio B contenía 3% (v/v) de aceite de maíz, lo que pudo haber afectado a la transferencia de oxígeno al medio ya que aumentó el número de fases líquidas en el sistema. Estudios (Yoo, Brown , & Gaugler, 2000) determinaron que al incrementar la concentración de lípidos en el medio es perjudicial para el crecimiento bacteriano. Por lo que para aumentar el rendimiento en la producción de bacterias en el medio B, es necesario aumentar la transferencia de oxígeno utilizando sistemas de fermentación con agitación y aireación.

Se realizaron fermentaciones en lote de la bacteria *Photorhabdus luminescens*, en matraz agitado del medio A y en reactor tipo tanque agitado del medio B (Figura 6). También se realizó una fermentación por lote alimentado de glicerol en reactor tipo tanque agitado utilizando el medio B. La evolución del número de bacterias en función del tiempo se ajustó al modelo descrito en la ecuación (2), se obtuvieron valores de R² para la cinética en matraz de 0.99, para la cinética en tanque agitado por lote de 0.99 y para la cinética por lote alimentado de 0.99. Los parámetros cinéticos correspondientes se muestran en la Tabla 3.

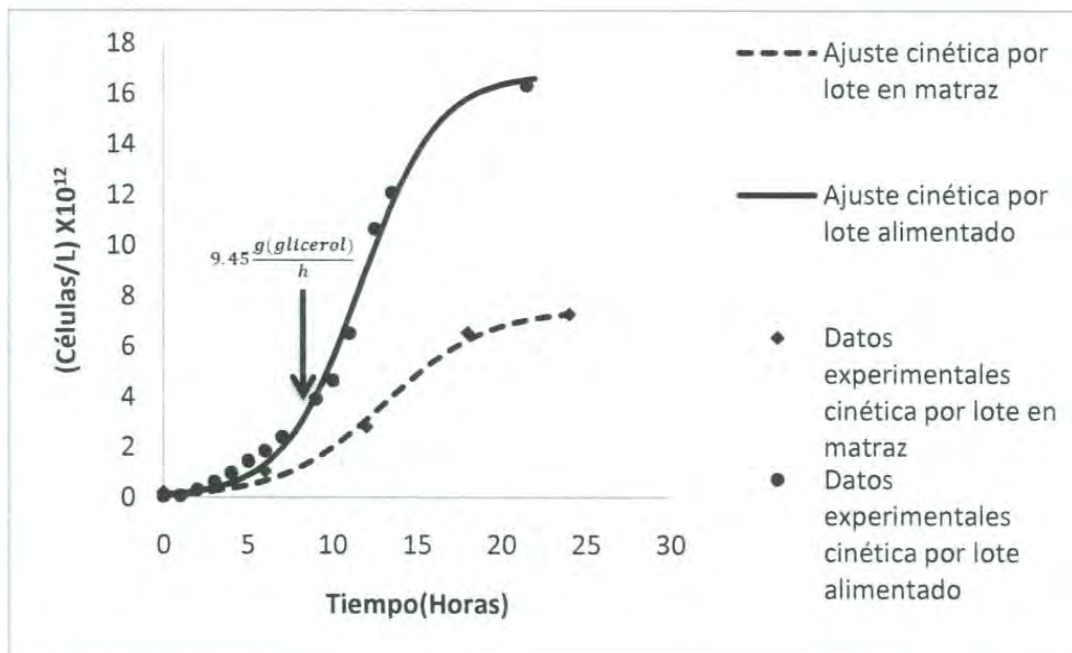


Figura 6. Se muestra la evolución en el tiempo de la concentración en el medio en células por mililitro.

Tabla 3. Parámetros cinéticos obtenidos, de la cinética de *Photorhabdus luminescens* en matraz y tanque agitado.

Biorreactores	$X_{m\acute{a}x}$ ((Células/L) X10 ¹²)	$X_{m\acute{a}x}$ (g células/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (Horas ⁻¹)
Matraz agitado (125 ml) cultivo por lote Medio A	7.48	4.64	0.32
Tanque agitado mecánicamente cultivo por lote Medio B	5.81	3.61	0.48
Tanque agitado mecánicamente cultivo por lote alimentado Medio B	16.45	10.22	0.53

La velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración máxima de células ($X_{M\acute{a}x}$) en el cultivo por lote en matraz, son similares a la obtenida en el cultivo por lote en el tanque agitado por lo que el medio, las condiciones de aireación y agitación del tanque

agitado no influyeron significativamente en los valores de los parámetros cinéticos obtenidos. Reportes de crecimiento de *Photorhabdus luminescens* en cultivo por lote en tanque agitado obtuvieron una velocidad específica de crecimiento de 0.36 h^{-1} (Sunita, Moreau, Inman, & Holmes D., 2012), que coincide con el valor de 0.48 h^{-1} obtenido en el presente estudio.

En el cultivo por lote alimentado utilizando glicerol como fuente de carbono, se obtuvieron 2.2 veces más células por volumen de medio y prácticamente se duplicó la velocidad de crecimiento respecto a la fermentación por lote en matraz y tanque agitado. Estudios realizados por Jeffke et al. (Jeffke, Jende, Mätje, Ehlers, & Berthe-Corti, 2000), demostraron que al adicionar glucosa en un cultivo por lote alimentado de *Photorhabdus luminescens*, el rendimiento de concentración de bacterias se incrementa casi el doble.

5.6 Capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor tipo tanque agitado.

A partir de la pendiente de la recta de la Figura 7. Se obtuvo un valor de K_{La} de 56.21 h^{-1} para el reactor a una velocidad de agitación de 600 rpm, con una velocidad de aireación de 4.5 vvm (STP) y un volumen de líquido de un litro.

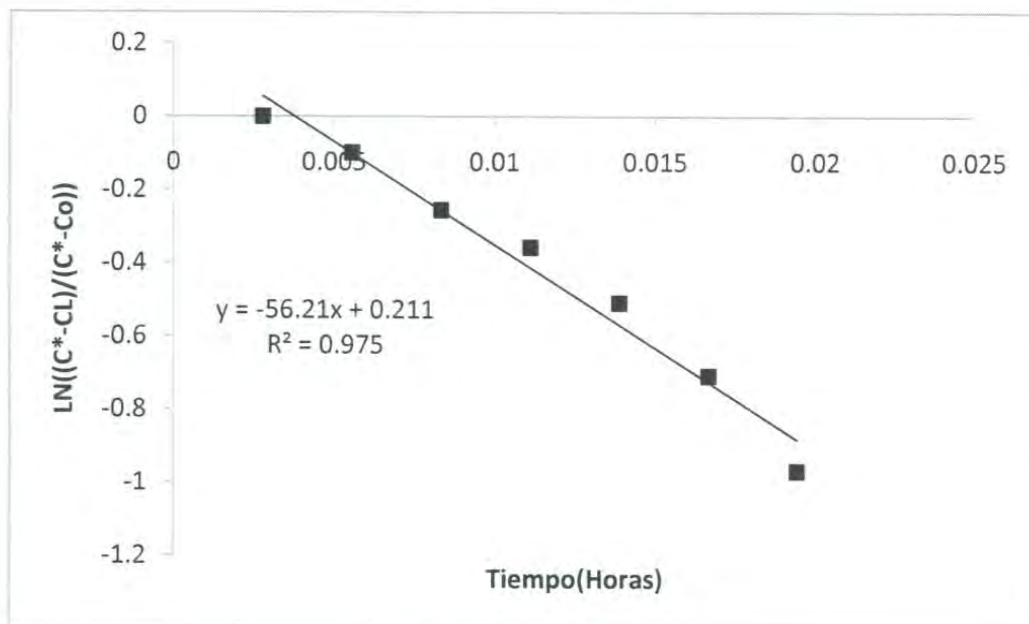


Figura 7. Ajuste lineal para la determinación del K_{La} del biorreactor tanque agitado.

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) que se calculó del biorreactor se encuentra dentro del rango de valores que calcularon (Erazo E. & Cárdenas R., 2001) utilizando agua destilada como medio a diferentes rpm, los cuales se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno (K_{La}), calculados a diferentes condiciones de operación.

Biorreactor	Condiciones de operación T (°C), RPM, VVM.	Velocidad superficial de aireación (m/s)	H_L/D (Altura del líquido entre diámetro del biorreactor)	$K_{La}(h^{-1})$
Tanque agitado (Erazo E. & Cárdenas R., 2001)	30, 500, 1.0.	3.6×10^{-3}	1.00	40.70
Tanque agitado (Erazo E. & Cárdenas R., 2001)	30, 800, 1.0.	3.6×10^{-3}	1.00	80.90
Tanque agitado Presente estudio	27, 600, 4.5.	5.6×10^{-3}	0.63	56.21

Los valores de los coeficientes reportados en la Tabla 4 muestran como aumenta el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) en relación a la velocidad de agitación en rpm. Se observa que el valor del coeficiente no se ve influenciado mayormente por las condiciones de aireación. Ya que comparando los resultados mostrados en la Tabla 2, la velocidad superficial de aireación es mayor en el presente estudio y las dimensiones de los biorreactores son similares.

Conocer el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}) del biorreactor es de suma importancia, ya que para mantener un crecimiento eficiente de *Photorhabdus luminescens* es necesario tener una concentración de oxígeno disuelto en el medio por arriba de la concentración crítica. Estudios realizados (Jeffke, Jende, Mätje, Ehlers, & Berthe-Corti, 2000), obtuvieron un valor de consumo de oxígeno por hora de *Photorhabdus luminescens* de $0.39 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a las 16 horas de fermentación, con una concentración de 5 g/L en un cultivo por lote alimentado con condiciones similares al realizado en el presente estudio. Considerando el consumo de oxígeno de la bacteria reportado (Jeffke, Jende, Mätje, Ehlers, & Berthe-Corti, 2000) y relacionarlo con el valor calculado de K_{La} de 56.21 h^{-1} , es necesario mantener un porcentaje de saturación de oxígeno disuelto por encima 13.27 ya que por debajo se limitaría el crecimiento.

Por lo que el K_{La} calculado en el presente estudio en relación con las condiciones de operación, no limita el crecimiento de *Photorhabdus luminescens* ya que siempre se mantuvieron porcentajes de saturación de oxígeno disuelto por encima del 70%.

5.7 Producción *in vitro* en fermentación sólida del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis* spp.

La evolución en función del tiempo de la población de los diferentes estadios del nematodo cultivado en sustrato sólido se muestra en la Figura 8.

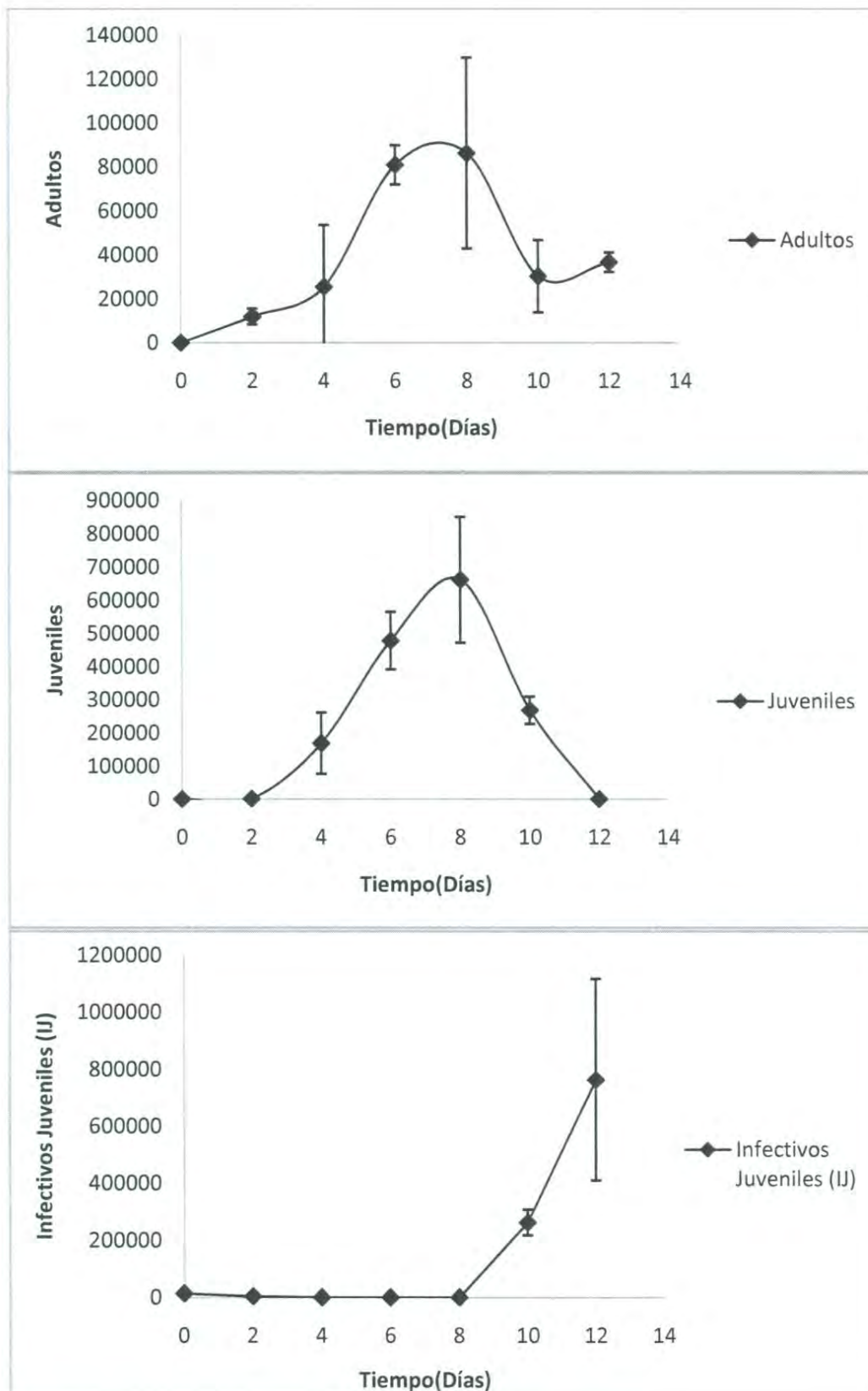


Figura 8. Cinética poblacional de *Heterorhabdists spp* diferenciada por sus estadios de desarrollo adulto, juvenil e infectivos juveniles (IJ).

Observando en el microscopio óptico las fases adultas se obtuvo un promedio de 62 huevos dentro de cada hembra grávida. A continuación se presentan las siguientes imágenes de los diferentes estadios de *Heterorhabditis spp* en medio sólido, observados con el microscopio óptico con lente ocular de 10 Xy con lente objetivo de 10 X, a excepción de la Figura 9(A) la cual se observó con lente objetivo de 40 X.

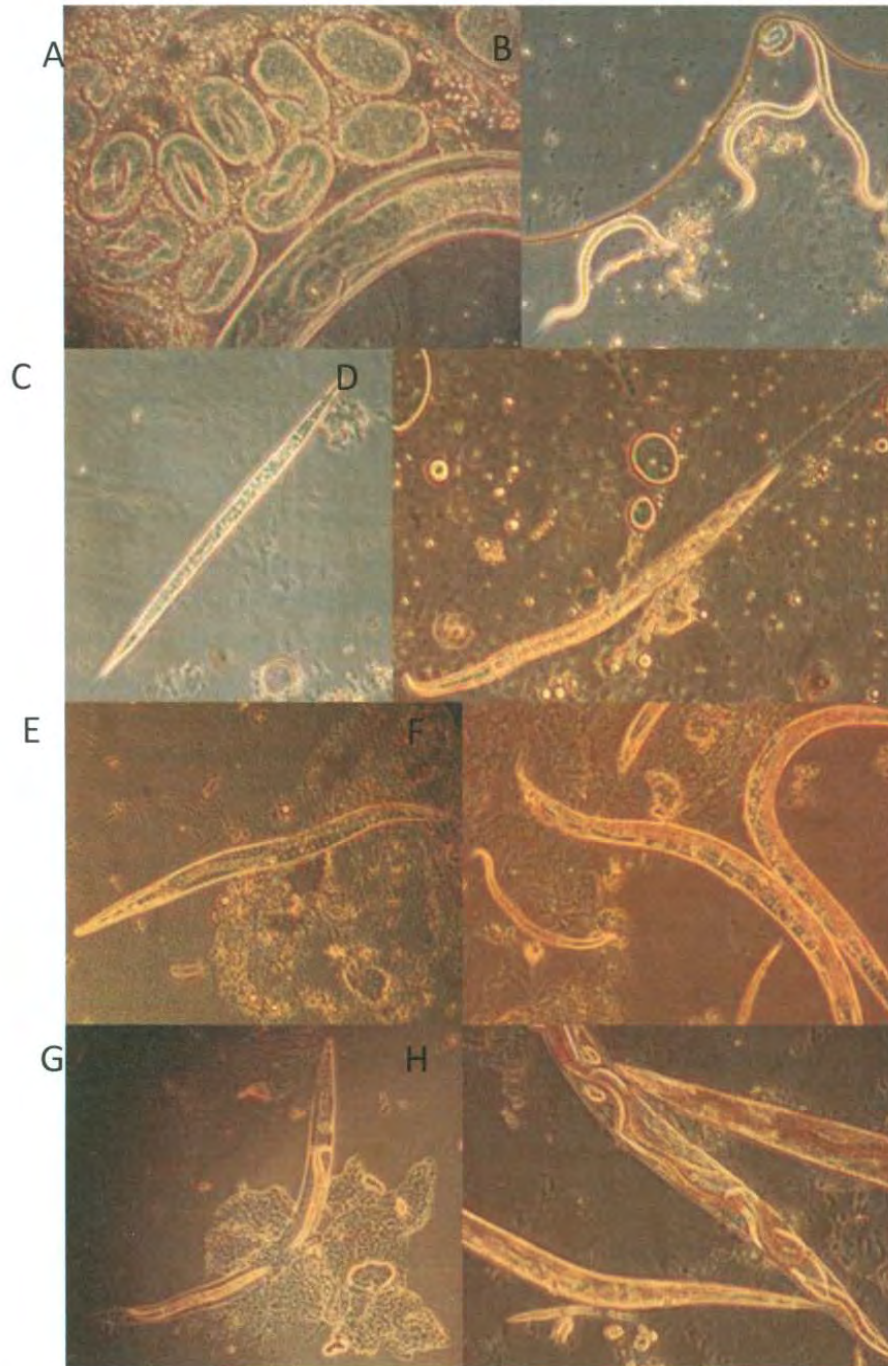


Figura 9. Diferentes estadios de *Heterorhabditis spp*: (A) Huevos. (B) Juveniles (J1-J2). (C) IJ. (D) J4 desprendiéndose de la cutícula. (E) J4. (F) Adultos con vulva desarrollada. (G) y (H) *Endotokia matricida*.

Se siguió la cinética poblacional de la sumatoria de todos los estadios de nematodos (Figura 10). Los datos fueron ajustados al modelo de Gompertz, donde se obtuvo un valor para R^2 de 0.949, una $C_{\text{máx}}$ de 708 685 nematodos/caja y una $\mu_{\text{máx}}$ (Días⁻¹) de 0.33.

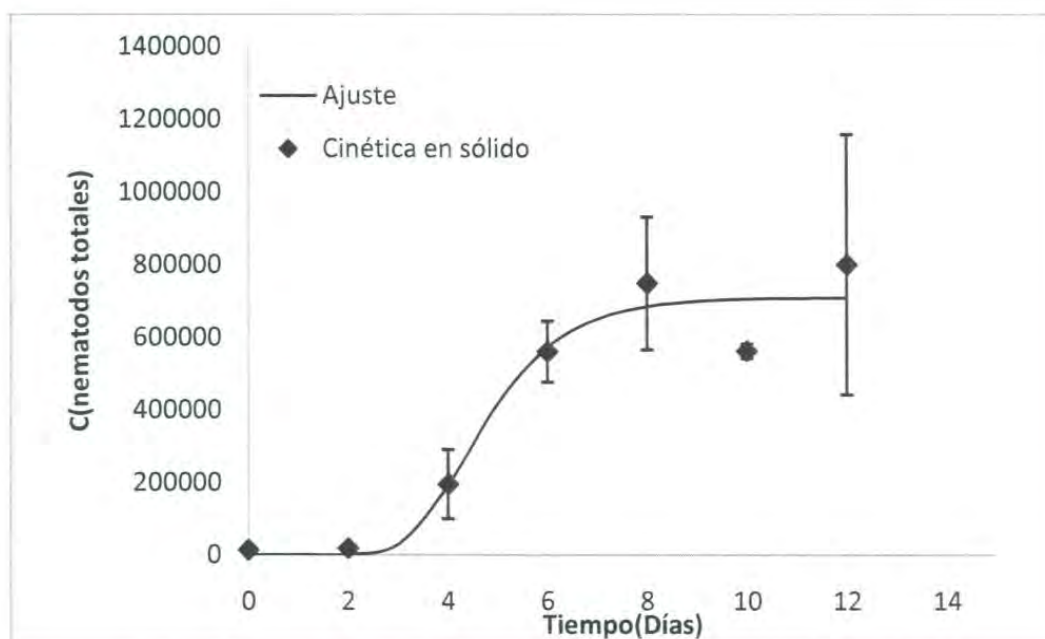


Figura 10. Evolución de la concentración de *Heterorhabditis spp* en cultivo monoxénico en sólido. Datos ajustados al modelo de Gompertz.

Los datos obtenidos en la cinética poblacional se ajustaron también al modelo de Gompertz reparametrizado (Figura 11) con un valor de R^2 de 0.949. Los parámetros cinéticos obtenidos fueron de λ (Días) de 3.29, una $d[C/C_0/dt]_{\text{máx}}$ (Días⁻¹) de 17.39 y un $(C/C_0)_{\text{máx}}$ de 52.49.

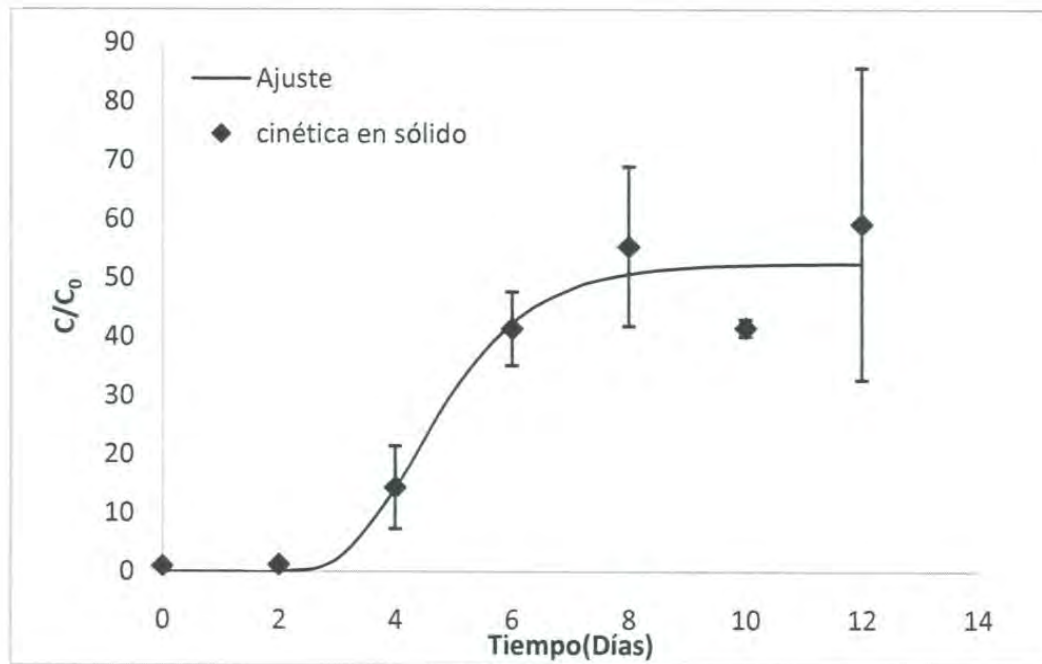


Figura 11. Evolución de la concentración adimensional de *Heterorhabditis spp* (C/C_0) en cultivo monoxénico en medio sólido. Datos ajustados al modelo de Gompertz en función de la concentración inicial.

El 88% del inoculo inicial de infectivos juveniles (IJ) se diferenciaron a su estado J4 a los dos días de reproducción y por completo a su estado adulto a los cuatro días de reproducción. Se observó que la primera generación de adultos se diferenciaron a hermafroditas y en la segunda generación los adultos se diferenciaron a hembras y machos. La diferenciación a juveniles infectivos de las nuevas generaciones de nematodos se dio al día 12 de haber iniciado la reproducción. El ciclo de vida de *Heterorhabditis spp* observado en el presente estudio coincide con el ciclo de vida de *Heterorhabditis bacteriophora* estudiado por Zioni et al. (Zioni, Glazer, & Segal, 1992).

Comparando la producción de nematodos con trabajos de otros autores, en la producción en medio líquido de *Steinernema feltiae* en biorreactores obtuvieron los parámetros cinéticos mostrados en la Tabla 5 obtenidos del ajuste al modelo de Gompertz reparametrizado.

Tabla 5. Comparación de los parámetros cinéticos obtenidos en sistemas fermentativos.

Biorreactor	Especie	λ [Días]	$d[C/C_0/dt]_{\text{máx}}$ [Días ⁻¹]	$(C/C_0)_{\text{máx}}$
Frasco con agitación orbital(Chavarría, 2001)	<i>Steinernema feltiae</i>	4.00	89.00	228.00
Columna burbujeante (Adame García, 2005)	<i>Steinernema feltiae</i>	4.22	64.57	100.91
Reactor sólido estático	<i>Heterorhabditis spp</i>	3.29	17.39	52.49
Presente estudio				

Analizando los parámetros cinéticos y compararlos con las dos referencias, se obtuvo que la fase λ fue de aproximadamente 4 días en las tres cinéticas. Lo que indica que la fase de adaptación, que en este caso corresponden al tiempo requerido para la diferenciación de IJ a adultos, el apareamiento y la reproducción es similar para *Steinernema feltiae* y el aislado de *Heterorhabditis spp* estudiado en este trabajo. Además de que los datos sugieren que este tiempo puede no depender mayormente del sistema de fermentación.

La velocidad máxima de crecimiento corresponde al periodo de mayor eclosión de fases de huevos al estado J1. La obtenida en este estudio es menor que la de *Steinernema feltiae* tanto en frascos con agitación orbital como en un reactor de columna burbujeante. Tanto la velocidad de crecimiento como el factor de multiplicación $(C/C_0)_{\text{máx}}$ se pueden ver influenciados por los siguientes tres factores:

- Componentes del medio

- Sistema de fermentación (Transferencia de oxígeno y Condiciones hidrodinámicas)
- Condiciones y especie del nematodo a reproducir

Debido a que los diferentes componentes del medio proveerán de energía a los diferentes estadios del nematodo y determinaran la cantidad de células bacterianas, es importante saber que componentes son esenciales para su desarrollo. Estudios realizados por Chavarría et al. (Chavarría-Hernández & de la Torre, 2001) indican que la presencia de yema de huevo y extracto de levadura en el medio, proporcionan nitrógeno orgánico que ayuda a aumentar el crecimiento de *Steinernema feltiae*. Reportes(Dunphy & Webster, 1989) indican que medios con extracto de levadura son una fuente de nitrógeno que estimula la reproducción de los nematodos.

Otro factor importante a considerar en los componentes nutrimentales del medio es la presencia de ácidos grasos. Ya que el 60% de la energía total de las fases infectivas (IJ) se deriva del metabolismo de lípidos(Selvan, Gaugler, & Lewis, 1993). Fuente de lípidos en medio ricos en ácidos grasos monoinsaturados o insaturados (i.e., canola, oliva y cártamo), producen rendimientos significativamente más altos que medios ricos en ácidos grasos saturados(Yoo, Brown , & Gaugler, 2000). En cuanto a la composición de lípidos en los nematodos, estudios realizados por diferentes autores indican que las fases de infectivos juveniles (IJ) de *H. bacteriophora* contienen 39% de lípidos mayormente triglicéridos(Selvan, Gaugler, & Lewis, 1993)(Barret & Wright, 1999) y el 45% de los ácidos grasos son monoinsaturados(Abu Hatab & Gaugler, 1999).

En el medio utilizado en el presente estudio, la peptona 1% (p/v) y extracto de carne de res 0.6% (p/v) contenidos en el agar nutriente son la principal fuente de nitrógeno. Como fuente de ácidos grasos se utilizó aceite de maíz 1.08% (v/v) el cual contiene 23% de ácidos grasos monoinsaturados. Por lo que es posible enriquecer el medio con más fuentes de nitrógeno y ácidos grasos monoinsaturados para aumentar la reproducción de los nematodos, y por ende el rendimiento.

Al día 6 de crecimiento de *Heterorhabditis spp*, se observó la presencia del desarrollo de nematodos en su estado juvenil (J1, J2 y J3) dentro del cuerpo de la madre, este fenómeno es conocido como *endotokia matricida*(Johnigk & Ehlers, 1999). El fenómeno puede ser originado por una limitada fuente de nutrientes en el medio, ya que los nematodos aseguran su reproducción y supervivencia dentro de la madre(Baliadi, Yoshiga, & Kondo, 2001). Considerando que se llevaron a cabo dos generaciones de reproducción en la cinética de crecimiento, el rendimiento por hembra fue de 9.88 IJ. Estudios en cultivo en medio líquido obtuvieron un rendimiento por adulto hermafrodita de 59 IJ(Strauch & Ehlers, 2000). Comparando el menor rendimiento obtenido, un factor importante a considerar es que probablemente por falta de nutrientes las fases adultas no pudieron completar una tercera generación, impactando en el rendimiento final de IJ. Relacionando la producción 59 de IJ por adulto hermafrodita(Strauch & Ehlers, 2000), el promedio obtenido en el presente estudio de 62 huevos dentro de cada hembra grávida coincide ampliamente.

El sistema de fermentación (Reactor sólido estático) utilizado le proporciona al nematodo el oxígeno que requiere para reproducirse ya que el nematodo se reproduce en la superficie del sólido la cual está en contacto con el aire. También al no haber agitación del medio, disponen de amplio contacto entre nematodos para reproducirse. Estudios realizados (Chavarría, 2001) indican que en cultivo líquido en biorreactores agitados las condiciones de turbulencia afectaron la reproducción de los nematodos, mientras que aumentos en la eficiencia de aireación favorecieron en un mejor rendimiento del proceso.

En cuanto a las condiciones del nematodo, un factor importante a considerar es la actividad entomopatógena de los nematodos. Estudios realizados(Hopper, Roush, & Powell, 1993), encontraron que Las fases IJ que emergen de cadáveres de hospederos *in vivo* tienen mayor actividad, que los obtenidos en cultivos *in vitro*. Por lo tanto, repetidos pases de los nematodos en cultivos *in vitro* pueden afectar la virulencia, adaptación en el ambiente o capacidad de reproducción(Shapiro, Glazer, & Segal, 1996)(Stuart & Gaugler, 1996). En el presente estudio después de la reproducción *in*

vivo del inoculo de *Heterorhabditis spp*, se llevaron a cabo 10 pases *in vitro*. El número de pases *in vitro* es un factor a considerar para tener mejores rendimientos.

Comparando los rendimientos de concentración final de nematodos obtenidos en cultivos en medios sólidos, estudios realizados (Salma & Shahina, 2012) utilizando agar como medio sólido, obtuvieron un rendimiento de 19444 IJ por gramo de medio en la reproducción de *Heterorhabditis bacteriophora*. En producción de nematodos del genero *Heterorhabditis* en esponjas como medio sólido, diversos estudios (Tabla 1) reportan rendimientos que van de un rango aproximado de 30000 a 80000 IJ por gramo de medio, en los rendimientos más altos se utilizaron medios que contenían entre harina de soja, vísceras de pollo y croquetas para perro como principales aportadores de nutrientes. En el presente estudio se obtuvo un rendimiento máximo de 708685 IJ por caja inoculada y una relación de 35434 IJ por gramo de medio en la producción de *Heterorhabditis spp*. Por lo que la producción de IJ por gramo de medio obtenido, es de los más altos en la reproducción de nematodos entomopatógenos del genero *Heterorhabditis* en agar como medio sólido y se encuentra dentro del rango de producción de cultivos en esponja como medio sólido.

VI. CONCLUSIONES

Se recuperó un aislado del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp* proveniente de suelos del norte de México. El aislado podría ser más eficaz para el control de plagas de insectos nativos, en comparación con aislados exóticos.

Se pudo aislar y purificar la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens*. Se determinaron los parámetros cinéticos de los cultivos en medios líquidos y se logró duplicar la concentración de bacteria obtenida en un cultivo por lote en matraz, utilizando un biorreactor agitado mecánicamente con un cultivo por lote alimentado.

El ciclo de vida del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp* se pudo apreciar durante el desarrollo de la cinética de crecimiento en el cultivo en medio sólido. Se apreciaron las distintas fases de crecimiento y se observó la presencia de endotokia matricida.

Se diseñó una tecnología para la producción masiva del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis spp* en cultivo en medio sólido. Logrando obtener mayor concentraciones de infectivos juveniles (IJ) en comparación con las ya reportadas en cultivo en medio sólido.

VII. RECOMENDACIONES

Establecer medios de cultivo monoxénicos en medio sólido, con los componentes del medio establecidos para desarrollar generaciones de nematodos definidas en base a la cantidad de nutrientes, ya sea una, dos o tres generaciones. Esto se propone con el fin de evitar que las fases adultas por falta de nutrientes no tengan progenie y que las fases J3 al tener disponibilidad de nutrientes se desarrollen a adultos en lugar de diferenciarse a infectivos juveniles (IJ).

Hacer pruebas de virulencia de *Heterorhabditsis spp* aislado de suelos del norte de México en diferentes tipos de plagas, para determinar en qué plagas tiene mayor efectividad y saber qué cantidad de infectivos juveniles (IJ) es necesario aplicar en los campos agrícolas.

Diseñar un sistema de fermentación en medio sólido, en el cual la fase sólida sea reutilizable y se le puedan agregar los nutrientes en forma líquida como pueden ser materiales súper absorbentes. El oxígeno es muy importante para obtener cultivos monoxénicos eficientes, por lo que el sistema de fermentación en medio sólido debe tener suficiente área de transferencia y a la vez ocupar el menor espacio posible, por lo cual se propone implementar un cultivo en columna empacada.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abu Hatab, M., & Gaugler, R. (1999). Lipids of in vivo and in vitro cultured Heterorhabditis bacteriophora. *Biol Control*, 15:113-118.
- Adame García, M. B. (2005). Producción de *Steinernema feltiae* en cultivo monoxénico sumergido en una columna burbujeante . *Tesis de licenciatura*.
- Akhurst, R. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol*, 121: 303-309.
- Akhurst, R. (1982). Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families *Heterorhabditidae* and *Seteinernematidae*. *J Gen Microbiol*, 128: 3061-3065.
- Akhurst, R., & Boemare, N. (1990). Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. *In: Entomopathogenic nematodes in biological control. (Eds: Gaugler,R; Kaya,HK) CRC Press, Boca Raton, FL., 75-87.*
- Anjum, S., & Prabhuraj, A. (2007). Mass production of *Heterorhabditis indicus* in different artificial media. *Karnataka J. Agric. Sci.*, 20(4): 859-860.
- Asaff, A., Reyes, Y., López, E., & De la Torre, M. (2002). Guerra entre insectos y microorganismos: Una estrategia para el control de plagas . *Avance y Perspectiva*, 21: 291-295.
- Baliadi, Y., Yoshiga, T., & Kondo, E. (2001). Development of endotokia matricida and emergence of originating infective juveniles os steinernematid and heterorhabditid nematodes. *J. Nematol*, 31(1/2): 26-36.

- Barret, J., & Wright, D. (1999). Intermediary metabolism. In: Perry RN, Wright DJ (eds) *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes*. CABI Publishing, New York, 331-353.
- Bedding, R. (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., & Akhurst, R. (1975). A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica*, 21:109-110.
- Boemare, N. (2001). WG4: *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. Report 1994-2000. *En COST Action 819. Agriculture and Biotechnology. Entomopathogenic nematodes*. Burnell A, Mulder R (editores) Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Boemare, N., & Ackhurst, R. (1988). Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp (Enterobacteriaceae). *J Gen Microbiol*, 134: 751-761.
- Boff, M., Wieggers, G., Gerritsen, L., & Smits, P. (2000). Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. *Nematology*, 2(3) 303-308.
- Buecher, E., & Popiel, I. (1989). Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont . *J. Nematol*, 21: 500-504.
- Chavarría, N. (2001). Efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la propagación del nemátodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* en cultivo monoxénico sumergido. *Tesis de doctorado*.
- Chavarría-Hernández, N., & de la Torre, M. (2001). Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Letters*, 23: 311-315.

- de la Torre, M. (2003). Challenges for mass production of nematodes in submerged culture. *Biotechnology Advances*, 21: 407-416.
- Dunphy, G., & Webster, J. (1989). The monoxenic culture of *Neoaplectana Carpocapsae* DD 136 and *Heterorhabditis Heliothidis*. *Revue de Nematologie*, 12:113-123.
- Dutky, S., Thompson, J., & Cantwell, G. (1964). A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of insect pathology*, 6:417-422.
- Ehlers, R.-U., Lunau, S., Krasomil-Osterfeld, K., & Osterfeld, K. (1998). Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium-complex *Heterorhabditis megidis*/*Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol*, 43:77-86.
- 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.
- Erazo E., R., & Cárdenas R., J. (2001). Determinación experimental del coeficiente de transferencia de oxígeno (KLa) en un biorreactor batch. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím.*, 22-27.
- Friedman, M., Langston, S., & Pollitt, S. (1989). Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. *International Patent Application*, WO 89/04602.
- Gallardo Espinoza, E. (2012). Aislamiento de Nematodos Entomopatogenos En El Estado De Sonora Y En La Zona Norte De Sinaloa. *Tesis de licenciatura*.
- Gaugler, R., & Han, R. (2002). Production Technology. In: Gaugler R (ed) *Entomopathogenic nematology*. *CAB International, Cambridge*, 289-310.
- Georgis, R., & Hague, N. (1991). Nematodes as biological insecticides. *Pestic Outlook*, 2: 29-32.

- Georgis , R., Dunlop, D., & Grewal, P. (1995). Formulation of entomopathogenic nematodes. In: *FR Hall and JW Barry (Eds.), Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. American Chemical Society, Washington, DC, 197-205.*
- Grewal, P., & Georgis, R. (1999). Entomopathogenic Nematodes. In: *Biopesticides. Use and Delivery. F. R. Halla & J. J. Menn (Eds.) Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 271-299.*
- Hajek, A. (2004). Natural enemies. *An introduction to biological control. Cambidge University Press, USA.*
- Han, R. (1996). The effects of inoculum size on yield of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in liquid culture. *Nematologica*, 42: 546-553.
- Han, R., & Ehlers, R. (2001). Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on thenin vivo and in vitro development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(3): 239-247.
- Hanan, A., & El-Sadawy. (2011). Mass production of *Steinernema* spp. on in-vitro Developed Solid Medium. *World Applied Sciences Journal*, 14(6): 803-813.
- Hara, A., Lindegren, J., & Kaya, H. (1981). Monoxenic mass production of the entomogenous nematode *Neoaplectana capocapsae* Weiser on dog food/agar medium. *USDA Advances in Agriculture W*, 16: 8 pp.
- Hopper, K., Roush, R., & Powell, W. (1993). Management of genetics of biological-control introductions. *Annu Rev Entomol*, 38: 27-51.
- Inman III, F., Singh, S., & Holmes, L. (2012). Mass Production of the Beneficial Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* ans its Bacterial Symbiont *Phothorhabdus luminescens*. *Indian J Microbiol*, 52(3):316-324.

- Jeffke, T., Jende, D., Mätje, C., Ehlers, R.-U., & Berthe-Corti, L. (2000). Growth of *photorhabdus luminescens* in batch and glucose fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54: 326-330.
- Johnigk, S., & Ehlers, R. (1999). *Endotokia matricida* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology*, 1: 717-726.
- Johnigk, S., & Ehlers, R.-U. (1999). Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematology*, 1: 717-726.
- Kaya, H., & Koppernhöfer, A. (1999). Biology and ecology of insecticidal nematodes. *In optimal use of insecticidal nematodes in pest management. Polavarapu S (Editor)*, 1-8.
- Lopez y lopez, Chavarria-Hernandez, N., Sumano-Fernandez, P., & de la Torre, M. (2000). Fermentation Processes for Bioinsecticide Production. *An overview. Recent Res. Devel. Biotechnol & eng.*, 3:1-20.
- Pace, G., Pitt, D., & Pitt, J. (1986). Liquid culture of nematodes. *International Patent Application. WO 86/01074*.
- Paula A, Sepulveda-Cano, Lopez Nuñez, J., & Giraldo, A. (2008). Efecto de dos nematodos entomopatógenos sobre *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Dryophthoridae). *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1): 62-67.
- Poinar, G. (1979). *Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press, Boca Raton, Florida*.
- Poinar, G. j. (1990). Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In: Gaugler R and HK Kaya (Eds), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press*, 23-62.