



Universidad **A**utónoma del **E**stado de **H**idalgo

Instituto de **C**iencias **A**gropecuarias

Centro de Investigación en Ciencia y

Tecnología de los Alimentos

**Formulación de bioinsecticidas a base de
nematodos entomopatógenos**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Que para obtener el título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PRESENTA:

Alan García García

Dirección: Dr. Norberto Chavarría Hernández

Co-dirección: Dra. Adriana Inés Rodríguez
Hernández

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Octubre de 2006

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	II
ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	III
NOMENCLATURA	V
RESUMEN	1

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Capítulo 1 REVISIÓN DE LITERATURA	2
1.1 Agricultura y plaguicidas	2
1.2 Agricultura sostenible	5
1.3 Manejo integrado de plagas	7
1.4 Control biológico	8
1.4.1 Nematodos entomopatógenos	10
1.4.2 Ciclo de vida de los NEP steinernemátidos	11
1.4.3 Bacteria simbiote de steinernemátidos	14
1.5 Propagación de fases JI	15
1.6 Deshidratación y potencial anhidrobiótico	18
1.7 Antecedentes en la formulación de bioinsecticidas	19
1.8 Hipótesis	26
1.9 Objetivo general	26
1.9.1 Objetivos específicos	26
Capítulo 2 MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1 Especímenes	27
2.2 Formulación de bioinsecticidas	27
2.3 Determinación de la viabilidad	31
2.4 Determinación de humedad y análisis estadístico	32
Capítulo 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1 Evolución de la viabilidad JI's y contenido de humedad en las formulaciones	34
3.1.1 Formulación F1	34
3.1.2 Formulación F2	37
3.1.3 Formulación F3	43

Capítulo 4	CONCLUSIONES	46
Capítulo 5	RECOMENDACIONES	47
Capítulo 6	REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1	Ejemplos de casos y eventos notables del control biológico en México.	9
Cuadro 2	Ejemplo de especies plagas que han sido combatidas satisfactoriamente con nematodos entomopatógenos. (Shapiro-Ilan y Gaugler 2002).	11
Cuadro 3	Algunas especies de <i>Steinernema</i> y sus bacterias asociadas comercialmente disponibles.	15
Cuadro 4	Recopilación de investigaciones sobre la formulación de nematodos entomopatógenos.	20
Cuadro 5	Vida de anaquel en <i>Steinernema</i> y <i>Heterorhabditis</i> en diferentes formulaciones. (Grewal 2002).	24
Cuadro 6	Mezclas de soportes para la formulación de bioinsecticidas a base de fases JI de <i>Steinernema carpocapsae</i> .	28

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Fases juveniles infectivas del nematodo <i>Steinernema carpocapsae</i> (JI).	12

Figura 2	Diagrama del ciclo de vida de los NEP del genero <i>Steinernema</i> (basado en Grewal 2000).	14
Figura 3	Secador de aire a contracorriente, de diseño y manufactura propia en acero inoxidable.	29
Figura 4	Aspecto de la mezcla de los materiales inertes o soportes: arena de río, caolín y barro, utilizados para las formulaciones F2 y F3.	30
Figura 5	Aspecto de bioinsecticidas formulados con fases JI de <i>Steinernema carpocapsae</i> en caolín, arcilla y arena. Apariencia típica de las formulaciones F2 y F3 en un tubo de centrifuga.	31
Figura 6	a) JI en suspensión de agua destilada estéril 10X, b) Bacteria simbiote estriada durante el cultivo monoxénico.	33
Figura 7	Formulación F1. A) Aspecto del bioinsecticida antes de ser sometido al proceso de secado. B) Aspecto de la formulación después de 225 min de secado a 23°C.	35
Figura 8	Formulación F1 de fases JI de <i>S. carpocapsae</i> . a) Evolución de la pérdida de viabilidad de fases JI durante el proceso de secado. b) Evolución de la pérdida de humedad de la formulación durante el procesamiento de secado.	36
Figura 9	Distintos aspectos del bioinsecticida-formulación F2 a base de fases JI de <i>S. carpocapsae</i> , a distintos tiempos. A t=0, a) vial conteniendo bioinsecticida formulado, b) granulo de caolín, arcilla y arena con JI atrapados en su interior (1 ×), c) granulo visto con lupa (10 ×). A t=7 días, d) JI's formulados sin re-hidratar (100 ×), e) JI's recién re-hidratados (40 ×), f) JI's re-hidratados y dispersos después de 30 minutos de ser puestos en contacto con el agua (40 ×).	38
Figura 10	Formulación F2 de fases JI de <i>S. carpocapsae</i> . a) Evolución de la pérdida de humedad de la formulación durante su almacenamiento. B) Evolución de la pérdida de viabilidad de fases JI durante su almacenamiento; cada punto representa el promedio de 6 conteos individuales.	39
Figura 11	Tardígrados (a) Cuando experimentan desecación, asumen una forma de barril y permanecen así (b), inmóviles pero vivos, por periodos de hasta 100 años	41
Figura 12	Tipos de difusión de gases en tubos capilares pequeños: a) difusión de gases de Knudsen; b) difusión de gases de Fick o molecular; c) difusión de gases de transición.	42

Figura 13 Formulación F3 de fases JI de *S. carpocapsae*. a) Evolución de la pérdida de humedad de la formulación durante su almacenamiento; b) Evolución de la pérdida de viabilidad de fases JI durante su almacenamiento. 44

NOMENCLATURA

A	Arcilla
AR	Arena de río
BI	Bioinsecticidas
C	Caolín
d	Día
F	Formulación
g	Gramos
JI	Fases juveniles infectivas
L	Litro
mm	Milímetros
mL	Mililitros
NEP	Nematodo entomopatógeno
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
t	Tiempo
T	Temperatura (°C)
TM	Toneladas métricas
v/v	Volumen/volumen
VL	Volumen de operación (L)

Subíndices

0 Al tiempo cero

Símbolos griegos

α Probabilidad de cometer un error de tipo I durante la prueba de hipótesis



Resumen

El presente trabajo trata sobre la formulación de bioinsecticidas a base de fases juveniles infectivas (JI) del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae*, previamente producidas en cultivos *in vitro* usando medios líquidos. Para la elaboración de las formulaciones se probaron distintas mezclas de soportes (incluyendo harina de trigo, aserrín, arena de río-AR, caolín-C y barro-B) y distintos métodos de preparación (incluyendo secado por corriente forzada de aire). Las formulaciones F2 (en % volumen/volumen (v/v): AR, 40; C, 40; B, 20) y F3 (% v/v: AR, 40; C, 20; B, 40) fueron las mejores proporcionando micro-ambientes de forma tal que más del 80% de los nematodos originalmente formulados (F2: 110,000 JI/g; F3: 116,000 JI/g) pudieron permanecer viables por al menos 90 días. Lo anterior, sin haber utilizado agentes de control microbiano.

Es posible que una variable importante que haya determinado los resultados obtenidos en F2 y F3, haya tenido que ver con los bajos niveles de humedad alcanzados (aproximadamente del 5 % peso/volumen), hasta ahora no reportados en la literatura. Esto a su vez fortalece la idea acerca de que estos nematodos pueden resistir condiciones severas de anhidrobiosis parcial.



Capítulo 1

Revisión de literatura

1.1. Agricultura y plaguicidas

La actividad agrícola es una de las industrias más grandes del mundo. En todo el mundo, hay más gente involucrada de alguna manera en la agricultura que en todas las demás ocupaciones combinadas. Los Estados Unidos de América (EUA) es el país en el que se producen más alimentos que en cualquier otra nación del mundo y asimismo el país exportador de productos agrícolas más importante del mundo. Según una encuesta de 2002 que realizó el Servicio Nacional de Estadísticas Agrícolas del Departamento de Agricultura de EUA (USDA), hay más de 941 millones de acres usados para actividades agrícolas en EUA, con un tamaño promedio de granjas de aproximadamente 436 acres (IFIC, 2004).

Por otra parte, la topografía y las condiciones climáticas de México proporcionan tierra disponible para el cultivo de 23 millones de hectáreas, es decir, el 11.7% de la superficie total del país. La agricultura mexicana es sumamente diversa, comprendiendo productos tanto de regiones tropicales como de zonas templadas y frías y dependiendo en su mayor parte de la intensidad y la regularidad de las lluvias. En México, los seis productos agrícolas principales son: maíz, frijol, trigo, caña de azúcar, café y sorgo (CIDEIBER, 2004).



Pérdidas agrícolas asociadas con plagas

Las plagas cuestan miles de millones de dólares-EUA anuales por pérdidas de producción agrícola, y roedores e insectos que destruyen por lo menos el 10 % de las cosechas almacenadas. En 1970 las enfermedades devastaron una sexta parte de la cosecha de maíz en EUA y una plaga de gusano barrenador costó 375 millones de dólares-EUA en Texas (FAO, 2005).

El uso de plaguicidas o pesticidas en la agricultura está muy extendido, pues son considerados esenciales para lograr mayores rendimientos en los cultivos (Tierramérica, 2002).

Uso de los plaguicidas

Los pesticidas o plaguicidas son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de plagas en su sentido más amplio. El uso de pesticidas se masificó a partir de la segunda guerra mundial y está estrechamente vinculado con los cambios introducidos en los modelos de producción y cultivo que aumentaron la productividad de la agricultura respecto al resto de la economía.

El primer plaguicida utilizado en los 1940's, el Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT), fue presentado al mundo como la solución para todas las plagas sin efectos negativos para el hombre, e hizo a su inventor Paul Hermann Müller merecedor del Premio Nóbel de medicina en 1948. Su facilidad de obtención y



aplicación, la rapidez de sus resultados y su costo reducido extendieron rápidamente su uso indiscriminado, sin sospechar los efectos negativos sobre los seres vivos y el ambiente (Barrera, 2005).

Aunque los plaguicidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos indeseados como la generación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de recursos hídricos con degradación de la flora y fauna. Al aparecer resistencia en la especie a combatir se requiere el incremento de las cantidades necesarias de pesticida o la sustitución por agentes más tóxicos para lograr controles efectivos (Papale, 2006).

Según un estudio de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) desarrollado en 1988, más de 300 plagas han desarrollado resistencia a un extenso rango de productos químicos.

Existen varias clasificaciones de los plaguicidas dependiendo del blanco de ataque; por ejemplo, herbicidas, insecticidas, fungicidas, rodenticidas, etc., de acuerdo a la plaga que se pretenda controlar. Otra posibilidad es hacer una clasificación con base en las propiedades químicas de los plaguicidas (i.e., organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides) (Barrera, 2005)

Los organoclorados son un ejemplo de persistencia ambiental pues permanecen en los suelos sin degradación significativa hasta 30 años después



de ser aplicados. Esa permanencia favorece la incorporación a las cadenas tróficas, llegándose a acumular en los tejidos grasos humanos y animales.

En la actualidad se calcula que el 80 % de las ventas globales de estos productos se consume en los países desarrollados, mientras que en los países subdesarrollados se consume el 20 % restante. Paradójicamente, dentro de estos últimos se registra el 75 % de las muertes atribuidas a contaminación por agroquímicos (Papale, 2006).

Existen varias vías de intoxicación originada por agroquímicos: a) oral o por inhalación del producto, b) dérmica por penetración a través de la piel, y c) por ingesta de alimentos contaminados. En la alimentación, las hortalizas, las frutas, los cereales, carnes, huevos y lácteos pueden ser vehículos de intoxicación.

La búsqueda de soluciones profundizó la investigación de agroquímicos no tóxicos, que reduzcan los riesgos, estableciendo técnicas de prevención científicamente seleccionadas y probadas, dentro de las llamadas estrategias del “manejo integrado de plagas”.

1.2 Agricultura sostenible

El modelo actual de agricultura basado en el monocultivo intensivo es insostenible ecológicamente, sanitariamente peligroso y financieramente costoso. Este modelo, promovido por la industria petroquímica, se basa en la lucha contra la naturaleza: rompe el equilibrio de los ecosistemas, puede



reducir la diversidad genética natural, necesita cantidades enormes y crecientes de sustancias químicas, acelera la erosión del suelo y la pérdida de sus minerales, contamina las aguas subterráneas y los ríos, extermina innumerables especies de organismos vivos del suelo vitales para el equilibrio y la salud de las cosechas, etc. La resistencia creciente de los insectos y las hierbas a los insecticidas y herbicidas, respectivamente, es un problema cada vez mayor. Además está basado en un gran consumo de energía. En EUA la cantidad de energía necesaria para cultivar un acre con maíz se ha multiplicado por cuatro con la llamada “revolución verde”. El único beneficiario económico real de esta agricultura es la industria petroquímica. Los agricultores se han visto obligados a invertir recursos económicos enormes en maquinaria, combustibles fósiles, fertilizantes químicos, pesticidas y herbicidas (FAO, 2005)

Se ha demostrado que las técnicas agrícolas sostenibles producen alimentos más sanos y frescos con una concentración mayor de minerales, cosechas iguales o mayores que los métodos vigentes, menores costos de producción, gastos fiscales menores para mantener los ingresos, costes ambientales menores, mayor rentabilidad a largo plazo y menor erosión. Un uso mucho menor de sustancias químicas da lugar también a menos problemas de salud. El cambio a una agricultura sostenible es no sólo viable, sino además imprescindible. Pero debe hacerse urgentemente, antes de que la agricultura química altere los ecosistemas naturales hasta un punto tal que la agricultura sostenible sea imposible (Ruiz, 2003). Por estas razones, muchos agricultores están comenzando a implementar técnicas agrícolas en un esfuerzo por reducir



el uso de pesticidas y fertilizantes. Sus principales preocupaciones son la creciente preocupación pública por la seguridad alimentaria y el posible impacto ambiental que pueden tener ciertos productos químicos agrícolas.

Los productos químicos son los insumos de producción agrícola más caros. Si fuera posible reducir el costo de los insumos, los agricultores podrían aumentar las ganancias al producir alimentos más económicos. Esta agricultura alternativa no es algo sencillo. Las prácticas agrícolas alternativas a menudo requieren de más información, mano de obra especializada, tiempo y habilidades de administración, por unidad de producción, que la agricultura tradicional (IFIC, 2004).

1.3 Manejo integrado de plagas

El manejo integrado de plagas (MIP), actualmente base de las actividades fitosanitarias de la FAO, combina una variedad de métodos de control, comprendida la conservación de los enemigos naturales, la rotación de cultivos, los cultivos mixtos y el uso de variedades resistentes a las plagas. Los plaguicidas pueden seguir utilizándose de manera selectiva pero en cantidades mucho menores.

Cinco años después de haber sido introducido el manejo integrado de plagas en Indonesia, el rendimiento de las cosechas de arroz aumentó 13 %, y el uso de plaguicidas se redujo 60 %. Sólo en los primeros dos años el Estado Indonesio economizó 120 millones de dólares-EUA, que hubiera gastado



subsidiando sustancias químicas. En el Sudán, el control integrado de las plagas dio buenos resultados, con una reducción mayor de 50 % del uso de insecticidas. En EUA, un estudio realizado en 1987 encontró que los productores de manzanas de Nueva York y de almendras de California que utilizaban el manejo integrado de plagas habían incrementado considerablemente sus rendimientos. El gran reto es lograr niveles de excelencia de producción preservando los recursos naturales y, por consiguiente, la calidad de la vida de la población humana del planeta.

1.4 Control biológico

El control biológico es el control de plagas mediante el uso de organismos vivos o productos derivados de ellos. Los controladores biológicos más usados en EUA son parásitos, insectos predadores, predadores de ácaros y nematodos entomopatógenos (NEP) (Cranshaw et al., 1996). En Europa el control biológico ha tenido auge desde 1967 y hoy en día cuentan con 26 compañías que producen más de 80 enemigos naturales (Van Lenteren et al., 1997)

Por mucho tiempo han existido ejemplos del uso de enemigos naturales para el control de plagas, y quizá el caso más antiguo (se desconoce el tiempo exacto), es el que hace referencia al uso de hormigas por agricultores chinos; sin embargo, el control biológico surgió como un método científico a finales del siglo XIX, con el exitoso caso ocurrido en 1888 de la introducción desde Australia a California, de *R. cardinalis* contra la escama algodonosa de los cítricos *I. purchasi* (Simmonds et al., 1976). De acuerdo con lo anterior, el



control biológico como método científico es relativamente moderno, ya que tiene una edad de un poco más de 100 años. El nacimiento del control biológico se produjo, por un lado, por la aparición de nuevos conceptos relativos a la relación entre las especies, su evolución, la presión de las poblaciones y la lucha por la existencia; y por otro lado, por la urgente necesidad de soluciones a los problemas más serios que provocaban las plagas introducidas en diferentes partes del mundo (Wilson y Huffaker, 1976). El desarrollo histórico del control biológico se presenta en el Cuadro 1, donde se muestra una selección de acontecimientos notables en México, en este campo (Barrera, 2005).

Cuadro 1. Selección de casos y eventos notables de control biológico en México (Barrera, 2005).

AÑO	ACONTECIMIENTO HISTÓRICO	ENEMIGO NATURAL	ESPECIE PLAGA
1993	Inicio del control biológico del lirio acuático con curculiónidos en Sinaloa	<i>Neochetina bruchi</i> , <i>N. eichhorniae</i>	<i>Eichhornia crassipes</i>
1993	Inicia la búsqueda de hongos entomopatógenos contra la langosta	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	<i>Schistocerca piceifrons piceifrons</i>
1994	Se inicia en Veracruz la búsqueda de enemigos naturales nativos del minador de los cítricos	Predominantes: <i>Cirrospilus</i> spp.	<i>Phyllocnistis citrella</i>
1996-97	Se realiza la evaluación de liberaciones masivas de parasitoides contra moscas de la fruta en Chiapas	<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	<i>Anastrepha</i> spp.



1998	Se inaugura el laboratorio de producción masiva de parasitoides contra el picudo del algodnero en Río Bravo, Tamaulipas	<i>Catolaccus grandis</i>	<i>Anthonomus grandis</i>
2000	Se liberan parasitoides de la cochinilla rosada en Baja California Norte	<i>Maconellicoccus hirsutus</i>	<i>Anagyrus kamali</i> <i>Gyranusoidea indica</i>
2000	Se libera la catarinita japonesa contra el pulgón café en la península de Yucatán	<i>Harmonia axyridis</i>	<i>Toxoptera citricida</i>
2000	Se introduce y libera en Chiapas el parasitoide de adultos de la broca del café	<i>Phymastichus coffea</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>

1.4.1 Nematodos entomopatógenos

Los nematodos de mayor interés comercial para el control de insectos-plaga pertenecen al orden Rhabditida que incluye a varias familias de nematodos entomopatógenos (NEP), destacando por su importancia como biocontroladores las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae (Poinar, 1979).

Los nematodos son gusanos cilíndricos simples; no poseen color, sin segmentos, carentes de apéndices; pueden ser de vida libre, parásitos o depredadores. Muchas de las especies parásitas ocasionan importantes enfermedades en plantas, animales y el ser humano. Algunas especies suelen ser difíciles de producir debido a su alto costo o ciclo de vida complejo y



poseen un rango de hospederos muy específico; algunas otras, poseen una modesta virulencia (Gaugler, 1998). Algunas de las plagas que se han combatido con nematodos entomopatógenos son mencionadas en el Cuadro 2.

1.4.2 Ciclo de vida de los NEP

En las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae se han identificado ciclos de vida similares y un estado parasítico especial llamado fase juvenil infectiva (JI) (Figura 1).

Cuadro 2. Ejemplo de especies plaga que han sido combatidas satisfactoriamente con nematodos entomopatógenos (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002).

Nombre científico	Cultivo agrícola	Nematodo*
<i>Platyptilia carduidactyla</i>	Alcachofa	Sc
<i>Otiorhynchus sulcatus</i>	Arandanos, ornamentales	Hb, Hm, Hmar
<i>Sphenophorus</i> spp	Trufas	Sc
<i>Pachnaeus</i> spp	Cítricos	Hb, Hi, Sr
<i>Agrotis ipsilon</i>	Trufas, vegetales	Sc
<i>Chrysoteuchia topiaria</i>	Arandanos	Sc
<i>Diaprepes abbreviatus</i>	Cítricos	Hb, Hi, Sr
<i>Sciaridae mushrooms</i>	Invernaderos	Sf
<i>Scapteriscus</i> spp	Trufas	Sr, Ss
<i>Scarabaeidae</i>	Trufas	Hb, Sg, Sk

*Hb=*H. bacteriophora*, Hi=*H. indica*, Hm=*H. megidis*, Hmar=*H. marelatus*, Sc=*S. carpocapsae*, Sf=*S. feltiae*, Sg=*S. glaseri*, Sk=*S. kushidai*, Sr=*S. riobrave*.

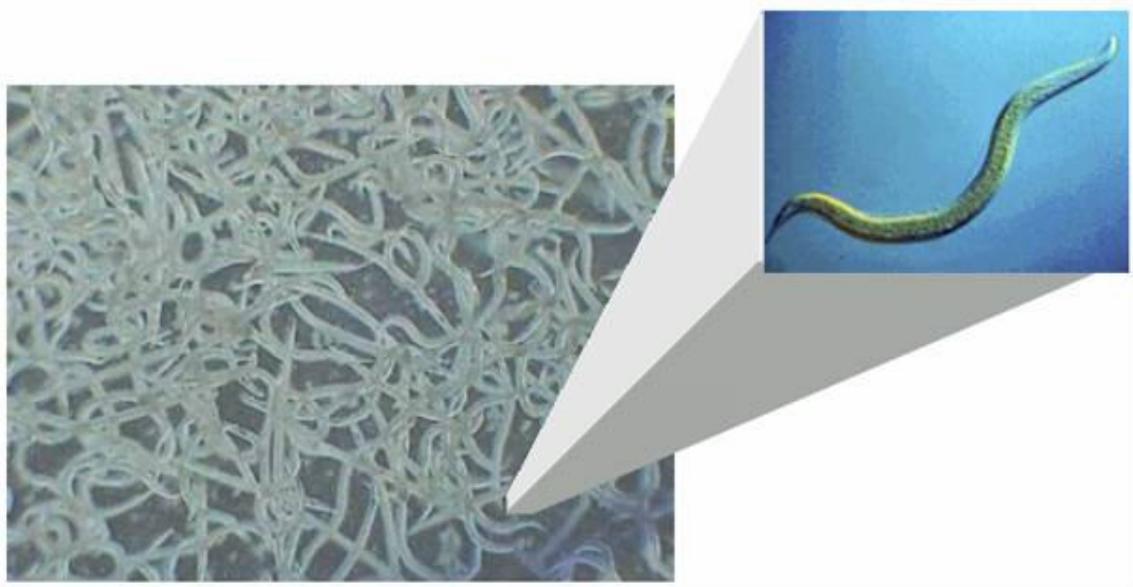


Figura 1. Fases infectivas juveniles del nematodo *Steinernema carpocapsae*.

Estos NEP's han establecido un clásico mutualismo con bacterias (i.e., *Xenorhabdus* para los steinernemátidos y *Photorhabdus* para los heterorhabdítidos). En esta asociación el nematodo necesita de la bacteria para matar al hospedero, creando un ambiente favorable para su desarrollo. Las especies de *Xenorhabdus*, desdoblan los tejidos del hospedero en nutrientes favorables y también son la principal fuente de alimento de los nematodos (Ehlers, 2001). Además producen antibióticos que limitan el desarrollo de microorganismos secundarios. Por su parte, la bacteria carece de poderes invasivos, necesita del nematodo para protegerse del medio ambiente y lograr ingresar en el hospedero. Se dice que el nematodo actúa como vector o jeringa (Alatorre, 1991).

Los JI buscan activamente insectos para infectar. Cuando su huésped ha sido localizado, los nematodos penetran en su cuerpo, usualmente a través de los



orificios naturales (boca, ano y espiráculos) o áreas blandas del insecto. Una vez dentro de su huésped, la bacteria simbiótica es liberada desde los intestinos del nematodo, la cual se multiplica rápidamente, causando la muerte del insecto por septicemia. Los nematodos juveniles se alimentan principalmente de las bacterias simbiotas, así como de los fluidos de su huésped, y maduran hasta convertirse en adultos (Gaugler, 1988).

Los JI steinernemátidos dan lugar a fases J4 (preadultos), los cuales maduran y pueden convertirse en machos o hembras de la primera generación (hembras gigantes); éstos se aparean y su progenie madura desde huevos, pasando por distintas etapas juveniles (fases J1, J2, J3 y J4) hasta adultos de segunda generación. Los adultos de la segunda generación copulan dando lugar a una nueva generación de fases juveniles (Chavarría-Hernández y de la Torre, 2001).

En esta tercera generación, el tercer estadio juvenil (J3) da lugar al estadio de resistencia o juvenil infectivo (JI) debido a que las fuentes de nutrimentos se encuentran prácticamente agotadas (Figura 2). La fase juvenil infectiva (JI) está adaptada tanto morfológica como fisiológicamente para permanecer en el medio ambiente durante largos periodos, sin alimentarse. Dentro de las adaptaciones morfológicas se encuentra el aparato digestivo el cual no es funcional, la boca y el ano están cerrados y mantiene cierto número de células de la bacteria simbiote en una cámara ventricular especial (Poinar, 1979).



Los (JI) abandonan el cadáver en busca de un nuevo hospedero. Un ciclo de reproducción de JI a JI toma alrededor de 10 días, en condiciones óptimas, periodo en el que se completan dos ciclos de vida (Woodring y Kaya, 1988).

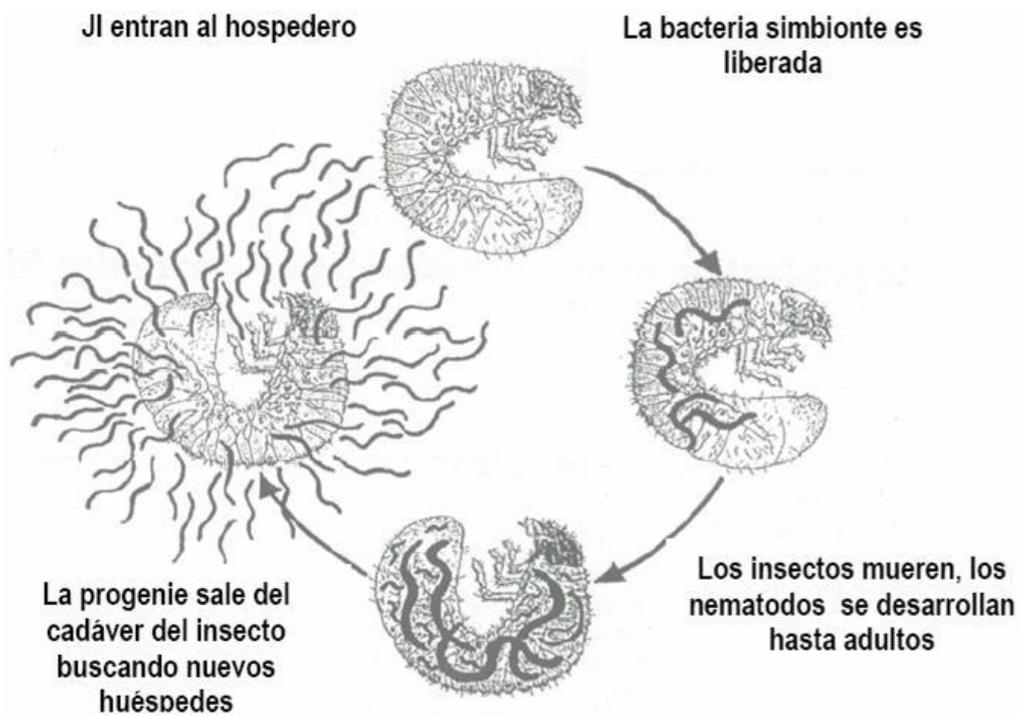


Figura 2. Ciclo de vida de nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* (basado en Woodring y Kaya, 1988).

1.4.3 Bacteria simbiote

Existen 16 especies de *Steinernema* encontradas en infecciones naturales en insectos y todas tienen una asociación mutualística con la bacteria *Xenorhabdus*, en el Cuadro 3 se muestran algunas de estas asociaciones. Las especies de *Xenorhabdus* son bacilos Gram negativos, anaerobias-facultativas que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. En *Xenorhabdus* ocurre dimorfismo y es referido como fase I o primaria y fase II o secundaria. Ambas



fases presentan diferentes características morfo-fisiológicas: la fase I produce antibióticos (Mcinerney et al., 1991), absorbe ciertos colorantes y desarrolla inclusiones intracelulares (Kaya y Gaugler, 1993). Se distingue además de la fase II en su habilidad para soportar la propagación *in vitro* de nematodos (Bedding, 1984).

Cuadro 3. Algunas especies de *Steinernema* y sus simbiontes bacterianos (Grewal, 2000)

Especie de <i>Steinernema</i>	Especie de bacteria
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>
<i>S. feltiae</i>	<i>X. bovienii</i>
<i>S. glaseri</i>	<i>X. poinarii</i>
<i>S. kushidai</i>	<i>X. japonicus</i>
<i>S. riobrave</i>	<i>X. sp.</i>
<i>S. scapterisci</i>	<i>X. sp.</i>

1.5 Propagación de fases JI

Los métodos *in vivo* son más apropiados para mantenimiento de cepas y producción de juveniles infectivos para ensayos de laboratorio y de campo a pequeña escala. Para las producciones a gran escala, los métodos *in vitro* son los más productivos (Islas-López et al., 2005).

Producción *in vivo*

Para este tipo de producción se utiliza frecuentemente *Galleria mellonella* por ser de fácil adquisición, reproducidas con pocos recursos y ser un hospedante



muy susceptible. La producción promedio de juveniles infectivos por larva de insecto oscila entre 30,000 y 50,000 JI's (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002).

Producción *in vitro*. Cultivo sólido

La producción en cultivo sólido surgió como una necesidad de hacer más económica y productiva la obtención de los nematodos. Los factores importantes de los mismos son la necesidad de que el cultivo sea monoxénico (que los nematodos y su bacteria asociada sean los únicos agentes bióticos), el uso de la fase I bacteriana, una superficie grande para que los nematodos puedan crecer, una fuente de esteroides para los nematodos y una base alimentaria para las bacterias (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002).

El método más famoso es el de Bedding (1984) que utiliza como medio de cultivo un homogenato de vísceras de aves y como soporte, placas de poliuretano colocados en frascos grandes de vidrio o bolsas que pueden ser procesadas en el autoclave. El proceso puede ser semiautomatizado, aunque sus críticos le señalan problemas en su estabilidad de producción, por la inconsistencia de los materiales usados y de fácil contaminación (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002).

Producción *in vitro*. Cultivo líquido

En la producción por fermentaciones en medio líquido se usan cultivos monoxénicos de nematodos y es la tecnología preferida para la producción comercial a gran escala (Gaugler, 1988). Tiene muchos aspectos positivos,



aunque por ser objeto de patentes de las firmas comerciales, la información está restringida. Así tenemos que son de fácil escalamiento, confiabilidad, empleo de materiales estables y uniformes; sin embargo se conoce que con los steinernemátidos está más adelantada su producción y se producen corrientemente, incluso en fermentadores de 80 mil litros (Gaugler, 1988). En las fermentaciones involucradas se realizan dos procesos, la producción de la bacteria asociada seguida del desarrollo de nematodos, que se inoculan en un momento dado durante los bioprocesos. Para la formulación de medios se han utilizado homogenatos de riñón y extracto de levadura, o medios conteniendo harina de soya, aceite de maíz y yema de huevo, entre otros ingredientes, los cuales llegan a producir rendimientos tan altos como 100,000 JI/mL (Shapiro-Ilan y Gaugler, 2002).

Recuperación y almacenamiento

La recuperación de los JI tiene como finalidad separarlos del medio de cultivo agotado, de esta manera se evitan futuros problemas de contaminación en el almacenamiento. En la producción a gran escala se pueden separar eficazmente utilizando centrífugas estándar las cuales pueden operar con un flujo continuo o por lotes utilizando velocidades máximas de centrifugado para los nematodos de 3000 rpm. De cualquier modo se debe tener especial cuidado en el proceso de separación, ya que el estrés de las fuerzas de gravedad y el bombeo puede resultar en una baja viabilidad y patogenicidad (Surrey y Davies, 1996).



Después de la recuperación los JI pueden ser almacenados a granel con agua destilada estéril en concentraciones de 1×10^6 JI/mL, o pueden ser formulados inmediatamente. Cuando los nematodos van a ser almacenados se deben considerar factores como la concentración, temperatura, aireación y control de la contaminación para así mantener una alta viabilidad y calidad. Las diferencias en la estabilidad de almacenamiento entre las diferentes especies de nematodos se atribuye a su comportamiento y adaptación a diferentes temperaturas (Grewal y Georgis, 1998).

1.6 Deshidratación y potencial anhidrobiótico

La anhidrobiosis (vida sin agua) es un estado reversible de adormecimiento y arresto fisiológico, el cual está inducido por la deshidratación. Ocurre naturalmente en nematodos y otros invertebrados como una importante estrategia de sobrevivencia ante un estrés ocasionado por la sequía. En un estado anhidrobiótico, la resistencia a cambios extremos en el medio ambiente se incrementa. Las fases JI de los NEP's sólo son capaces de una anhidrobiosis parcial. Womersley (1990), reportó que el glucógeno y las reservas de lípidos son convertidas a trealosa durante la anhidrobiosis en *S. carpocapsae* (Grewal, 2000).

Para determinar el potencial anhidrobiótico de los NEP's se debe estudiar el hábitat donde normalmente se encuentran, así como la velocidad y nivel de deshidratación que puede ocurrir en esos hábitats. Las fases juveniles infectivas de los NEP's están predominantemente asociadas con la parte



superior del suelo, donde ocurre la anhidrobiosis debido a que el estrés por deshidratación es mediano y la pérdida de agua por evaporación es lenta, por lo tanto parece ser que un secado lento es prerequisite para la deshidratación y una satisfactoria inducción a la anhidrobiosis (Womersley, 1990). La capacidad anhidrobiótica de los NEP's se ha visto como una posible ventaja para la formulación de bioinsecticidas.

1.7 Antecedentes en la formulación de bioinsecticidas a base de JI's de NEP's

La formulación se refiere a la preparación de un producto por la adición de una sustancia activa o funcional (bioinsecticida) y una no activa o inerte (soporte).

Un bajo % de sobrevivencia al almacenamiento y después de la aplicación son el mayor obstáculo para expandir el uso de los NEP's como bioinsecticidas competitivos a los métodos tradicionales de control de plagas. Ninguna formulación a base de NEP's ha llegado a los 2 años de vida de anaquel que presenta un pesticida químico. La formulación propuesta por Grewal (2000), mostró que el 90% de los JI sobrevivió después de 4 meses, siendo éste uno de los mayores logros en la vida de anaquel de los NEP's, en diferentes tipos de formulaciones. En el Cuadro 4 se presentan algunos resultados importantes de estudios realizados sobre la formulación del bioinsecticidas a base de JI's.

**Cuadro 4.** Recopilación de investigaciones sobre la formulación de nematodos entomopatógenos.

NEP utilizados	Propósito del estudio	Sistemas usados y condiciones experimentales	Resultados relevantes	Referencia
<i>S. feltiae</i> y <i>H. megidis</i>	Evaluar la sobrevivencia e infectividad de dos especies de NEP al ser almacenadas en una suspensión de sílica coloidal de cierta densidad.	Se prepararon suspensiones de sílica coloidal a tres densidades diferentes para cada especie de nematodo (1035, 1040 y 1045 mg/mL para <i>H. megidis</i> , y 1075, 1080 y 1085 mg/mL para <i>S. feltiae</i>), y fueron comparadas con una suspensión aireada. Fueron almacenados en matraces de 500 mL con 200 mL de suspensión y 10,000 JI/mL. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento y se almacenaron a 4 y 15°C. Se tomó muestra semanalmente por 16 semanas. La infectividad se midió utilizando la prueba de Dosis Letal ₅₀ (DL ₅₀) (numero de JI por caja petri necesarios para matar el 50% de los insectos en un periodo de 1 semana)	Para <i>H. megidis</i> a 15°C no hubo suficiente viabilidad para continuar el ensayo. A 4°C la suspensión de sílica 1035 mg/mL obtuvo la mejor infectividad (DL ₅₀ 4.236) y viabilidad (7000 JI/mL). <i>S. feltiae</i> almacenado a 4°C mostró la más alta patogenicidad (DL ₅₀ 3.649) con sílica 1080 mg/mL, y no hubo diferencias significativas en la viabilidad (4000 JI/mL). entre los tratamientos. A 15°C no hubo diferencia significativa en la viabilidad (3000 JI/mL) entre los tratamientos de sílica. Las suspensiones con mayor infectividad fueron 1085 y 1080 mg/mL (DL ₅₀ 4.3308 y DL ₅₀ 4.559 respectivamente)	Wilson y Ivanova (2004)



<i>S. carpocapsae</i>	Incrementar la vida de anaquel (viabilidad) de <i>S. carpocapsae</i> en formulaciones granulares	Los JI fueron encapsulados en gránulos formados por una mezcla de polvos (barro, silica, celulosa y almidón) los cuales actuaron como absorbentes. Se almacenaron a 25°C y se tomaron muestras mensualmente durante 7 meses. En cuanto a la infectividad se utilizo el bioensayo 1:1	El 90% de los nematodos sobrevivió después de 4 meses, causando el 70% de mortalidad en larvas de <i>G mellonella</i> , no hubo diferencia significativa entre los JI almacenados durante 6 meses y los producidos recientemente.	Grewal (2000)
<i>S. carpocapsae</i>	Determinar si la incorporación del formaldehído como un agente antimicrobiano a diferentes tiempos de la formulación podría extender la viabilidad de los NEP en gránulos y optimizar esta concentración. Determinar si la harina de trigo de alta proteína, se	Se trabajó con una suspensión de entre 573,000 y 620,000 JI/mL (19-21% p/p), fueron aireados a 4°C hasta ser utilizados (entre 2 semanas). Los ingredientes de la formulación consistían de harina 32 g, kaolín 4 g, bentonita 2 g, y turba 2 g. Se trabajó con harina de trigo y semolina. Se probaron varios niveles de formaldehído; fueron de 0.0, 0.1, 0.2, 0.35, 0.7 y 1.4% p/p. Además se probaron 2	Las muestras contenían un promedio de 427,000 JI/g. Los gránulos fueron elaborados bajo condiciones no estériles. Se encontró que es preferible adicionar el formaldehído a la suspensión de nematodos para asegurar mejores resultados. Ambos tipos de harina fueron convenientes para ser ocupadas en la formulación, pero factores como el costo y las propiedades de amasado en el proceso podrían ser determinantes.	Connick et al. (1994)



	puede sustituir por semolina como el ingrediente principal de la formulación.	condiciones: a) adición de formaldehído a la mezcla de sólidos, o b) a la suspensión de nematodos. Las muestras se almacenaron a 4 y 21 °C y se realizaron monitoreos cada 4 semanas por un total de 28 semanas. La infectividad se monitoreo con <i>Galleria mellonella</i> utilizando 10 JI/Larva.	El nivel de formaldehído del 0.2 % en los gránulos, proporciono el mejor tiempo de almacenamiento a 21 y 4 °C, con una concentración de 90,000 JI/g y 250,000 JI/g respectivamente. Altos niveles de formaldehído no dieron buenos resultados o fueron perjudiciales. La mortalidad en <i>G. mellonella</i> fue de 100 %. Aparentemente, el formaldehído no dañó a la bacteria simbiote.	
<i>S. carpocapsae</i>	Técnicas para formular JI usando hidrocoloides para prolongar el periodo de almacenamiento y fácil disposición.	La suspensión fue de 1×10^5 a 2×10^6 JI en 200 mL de agua. Los agentes fueron goma xantana. La mezcla pseudoplástica consistió de 0.05 a 1% p/v del agente pseudoplastificante. Como agente antimicrobiano se utilizó proxel (0.5%). El grosor de la capa fue de 0.5 – 5 mm para un adecuado	A 28°C, los JI pudieron vivir más de 1 semana. A 25°C, después de 4 meses de almacenamiento, el 93 % de los JI estaban vivos.	Pruit y Friedman (1992)



suministro de oxígeno, y sus dimensiones fueron de 20 a 40 in².

Los JI se empacaron en materiales plásticos que permiten el intercambio de oxígeno como el polietileno de baja densidad y se sellaron con calor.



Grewal (2002) publicó una revisión acerca de la formulación de JI's en distintos sistemas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Vida de anaquel en steinernemátidos y heterorhabditidos en diferentes formulaciones (Grewal, 2002)

Formulación	Especie	Vida de anaquel (meses)	
		Temperatura	
		22 –25 °C	2 – 10 °C
Movimiento activo del NEP			
Esponjas *	<i>S. carpocapsae</i>	0.03 – 0.1	2.0 – 3.0
	<i>H. bacteriophora</i>	0	1.0 – 2.0
Vermiculita *	<i>S. carpocapsae</i>	0.1 – 0.2	5.0 – 6.0
	<i>S. feltiae</i>	0.03 – 0.1	4.0 – 5.0
	<i>H. megidis</i>	0	2.0 – 3.0
Movilidad reducida			
Geles de alginato	<i>S. carpocapsae</i>	3.0 – 4.0	6.0 – 9.0
	<i>S. feltiae</i>	0.5 – 1.0	4.0 – 5.0
Geles fluidos (viscosos)	<i>S. carpocapsae</i>	1.0 – 1.5	3.0 – 5.0
	<i>S. glaseri</i>	0.03 – 0.06	1.0 – 1.5
	<i>S. scapterisci</i>	1.0 – 1.5	3.0 – 4.0
Suspensión concentrada *	<i>S. carpocapsae</i>	0.16 – 0.2	0.4 – 0.5
	<i>S. riobrave</i>	0.1 – 0.13	0.23 – 0.3
Anhidrobiosis			
Polvos (wetable powder)	<i>S. carpocapsae</i>	2.0 – 3.5	6.0 – 8.0
	<i>S. feltiae</i>	2.5 – 3.0	5.0 – 6.0
	<i>H. megidis</i>	2.0 – 3.0	5.0 – 6.0
	<i>H. zealandica</i>	1.0 – 2.0	3.0 – 4.0
Gránulos *	<i>S. carpocapsae</i>	4.0 – 5.0	9.0 – 12.0
	<i>S. feltiae</i>	1.5 – 2.0	5.0 – 7.0
	<i>S. riobrave</i>	2.0 – 3.0	4.0 – 5.0

*Formulación disponible comercialmente



Con base en los Cuadros 4 y 5, se sabe que se han logrado formulaciones de fases JI con relativo éxito. Sin embargo, los métodos siguen generando resultados con gran variabilidad de un lote a otro. Por otra parte, algunos de éstos son realmente métodos costosos (i.e., almacenamiento por varios meses en una suspensión de agua con temperaturas de refrigeración y una adecuada aireación), dando como resultado el uso limitado de NEP's en la agricultura.

Tomando en cuenta lo mencionado hasta aquí, así como otras características importantes de los NEP's (i.e., su demanda de oxígeno; sensibilidad a bajas temperaturas; susceptibilidad a contaminación microbiana y a los agentes antimicrobianos usados durante la formulación de JI's), es necesario realizar más estudios con el propósito de contar con formulaciones estables de JI's para realmente estar en posibilidades de contribuir al acceso hacia una agricultura sostenible, donde el costo de las formulaciones es un aspecto que debe ser ponderado adecuadamente, así como la entomopatogenicidad del producto.

No obstante que ha sido demostrada la efectividad de los JI como agentes biocontroladores en diversos agrosistemas, éstos aún no gozan de gran aceptación en nuestro país ni en el Estado de Hidalgo. Más aún, en México no existen plantas productoras de estos agentes de biocontrol mediante el uso del cultivo sumergido en biorreactores. Como se mencionó en la sección 1.5, ciertas especies de JI son producidas en EUA y en Europa. Por lo tanto, sería conveniente establecer estos procesos en México por las razones ya mencionadas.



El presente trabajo de investigación forma parte de las actividades programadas de los proyectos: a) CONACYT-SIZA-2002, Clave 20020801001, “Desarrollo de tecnologías de fermentación alternas para el aprovechamiento del agua-miel de maguey pulquero”, y b) FOMIX-CONACYT-HIDALGO-2002, Clave 200201-9206, “Producción y formulación de bioinsecticidas a base de nematodos biocontroladores de insectos plaga de distintos cultivos agrícolas en el Estado de Hidalgo”, que son llevados a cabo en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

1.8 Hipótesis

Fases JI del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* pueden ser almacenados viables en formulaciones por largos periodos de tiempo utilizando distintos soportes.

1.9 Objetivo general

Lograr la formulación de bioinsecticidas a base de fases JI del nematodo entomopatógeno *S. carpocapsae* usando una mezcla de soportes.

1.9.1 Objetivos específicos

- Establecer la combinación de soportes para formular bioinsecticidas a base de fases JI de *S. carpocapsae*.
- Determinar la pérdida de viabilidad de fases JI de *S. carpocapsae* en bioinsecticidas formulados.



CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Especímenes

Fases juveniles infectivas (JI) de *Steinernema carpocapsae* producidas en cultivo monoxénico sumergido de acuerdo con los métodos estandarizados en el grupo de trabajo, usando matraces agitados orbitalmente y/o biorreactor neumático (Batalla-Mayoral, 2005; Islas-López et al., 2005). Los JI producidos fueron lavados (incluyendo sedimentación y decantación) por cinco ocasiones, sanitizados con merthiolate al 0.1% p/v (Woodring y Kaya 1998) y se mantuvieron en suspensiones con agua destilada estéril a 5°C hasta su formulación (1×10^6 JI/mL).

Xenorhabdus nematophila-fase I aislada de crecimiento en placas de agar McConkey y NBTA (Akhurst, 1980) estriadas con hemolinfa de larvas muertas de *Galleria mellonella* del último instar, previamente infectadas con fases JI de *S. carpocapsae*. La bacteria simbiote fue conservada en viales con 25% v/v glicerol a -80°C (Chavarría-Hernández y de la Torre 2001).

2.2 Formulación de bioinsecticidas

El Cuadro 6 presenta las mezclas de soportes que se usaron para formular los bioinsecticidas en el presente trabajo.



Cuadro 6. Mezclas de soportes para la formulación de bioinsecticidas a base de fases JI de *Steinernema carpocapsae*.

Formulación	Harina de trigo ^a (% p/p)	Aserrín ^b (% p/p)	Arena de río ^c (% v/v)	Kaolín ^d (% v/v)	Barro ^e (% v/v)
F1	88	12	0	0	0
F2	0	0	40	40	20
F3	0	0	40	20	40

a, Marca Tres Estrellas.

b, De pino (*Pinus patula*).

c, Río *Papalote*, Villa de Tezontepec, Hgo.

d, Tulancingo, Hgo.

e, Huasca de Ocampo, Hgo.

Para la formulación de bioinsecticidas se hizo lo siguiente:

a) Formulación F1

Los ingredientes sólidos consistieron de 32 g de harina de trigo y 4 g de aserrín, fueron mezclados y posteriormente se agregaron 22 mL de una suspensión de nematodos que contenía 120,000 JI/mL. La mezcla se amasó a mano hasta formar una pasta homogénea. La pasta se extendió en una superficie horizontal hasta alcanzar un grosor de 5 mm y se partió en trozos pequeños.

Los trozos de pasta fueron secados en una corriente forzada de aire a 23°C y humedad relativa de 64%, usando un secador de diseño y manufactura propias (Figura 3). Una vez iniciado el secado, se tomaron muestras cada 45 minutos para determinar % de viabilidad de JI's y % de humedad de la formulación. Todo el experimento duró 225 min.



Figura 3. Secador de aire a contracorriente -diseño y manufactura propias- en acero inoxidable (110 cm alto, 16.5 cm diámetro interno. Se usó un soplador de secadora para cabello como generador de la convección forzada).

b) Formulación F2

Los ingredientes fueron medidos volumétricamente: 40 mL de arena de río, 40 mL de kaolín y 20 mL de barro, mezclándose orbitalmente en un frasco de vidrio de $V_T=4$ L hasta que a simple vista, la mezcla se notara homogénea (Figura 4). En este caso, la suspensión de nematodos empleada fue de 1×10^6 JI/mL. Una vez preparada la mezcla-soporte, la superficie de ésta fue aplanada y se hicieron pequeños orificios con el dedo meñique (diámetro = 10 mm y profundidad=5 mm), dentro de los cuales se colocaron gotas de 0.2 mL de



suspensión de JI. Luego, la mezcla-soporte se colocó dentro de los orificios y se taparon manualmente con más mezcla-soporte. Después de 1 min, los gránulos formados fueron “sacados” de la mezcla-soporte cuidadosamente con una espátula, colocados en un cristizador y después de 0.5 min, tubos de 1.5 mL para centrífuga fueron llenados usando 3 gránulos por tubo (0.6 mL por tubo). En la figura 5 se puede apreciar el aspecto típico del bioinsecticida formulado para F2 y F3 al tiempo cero, listos para ser almacenados en condiciones de laboratorio. Los tubos fueron tapados con papel *parafilm* para permitir el intercambio de gases y almacenados en una gaveta oscura a 23 °C y humedad relativa del 60 %.



Figura 4. Aspecto de la mezcla de los materiales inertes o soportes: arena de río, caolín y barro, utilizados para las formulaciones F2 y F3 fotografiados sobre una moneda de 10 centavos.

Se tomaron muestras de 2 tubos cada vez, cada semana durante el primer mes, y posteriormente, cada mes durante 3 meses.

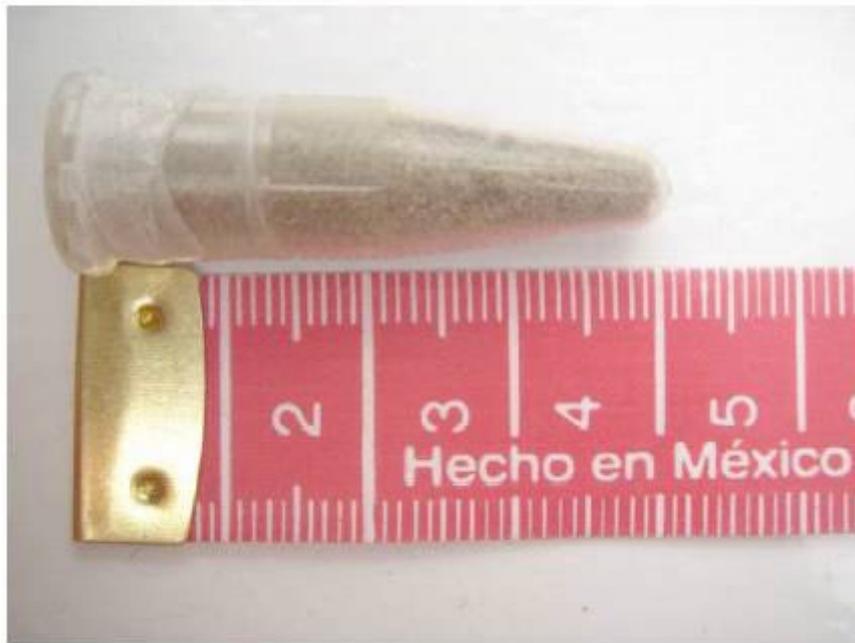


Figura 5. Aspecto de bioinsecticidas formulados con fases J1 de *Steinernema capocapsae* en kaolín, arcilla y arena. Apariencia típica de las formulaciones F2 y F3 en un tubo de centrifuga con un volumen de 1.5 mL. Formulación a tiempo $t=0$.

c) Formulación F3

Al igual que en el caso de la formulación F2, los ingredientes fueron medidos volumétricamente (40 mL de arena de río, 40 mL de barro y 20 mL kaolín). Para la realización de las formulaciones, se procedió de la misma forma que F2.

2.3 Determinación de viabilidad de fases J1 formuladas

Se tomó una cantidad de muestra conocida (1.5 g) que fue hidratada en 10 mL de agua destilada en tubos de centrífuga de 50 mL. La mezcla fue agitada en incubadora orbital a 150 rpm durante 24 h a 23 °C. Esta operación se realizó por duplicado.



Las muestras fueron diluidas (1:1000), en solución salina [0.1% (p/v) NaCl] con 0.02% (p/v) azul de metileno como colorante de contraste. Muestras diluidas de 0.1 mL fueron colocadas en cubre objetos excavados, el número total de nematodos vivos se contó bajo el microscopio óptico de luz blanca y aumento de 100 veces, esta operación se realizó por triplicado. Los JI se consideraron vivos si el azul de metileno no penetraba a sus cuerpos y además al ser tocados con una aguja de acero exhibían movimiento. La viabilidad de JI se expresó como porcentaje de nematodos vivos.

2.4 Determinación del contenido de humedad en las formulaciones

El contenido de humedad fue determinado mediante la técnica de peso seco utilizando una estufa de secado. Alrededor de 1.5 g de muestra fue puesta en una cápsula de aluminio puesta a peso constante previamente. El peso de la muestra y la cápsula fue anotado. La cápsula con muestra fue a su vez puesta en la estufa de secado (Shell lab, Mod 1380FX) por 24 horas a 100°C. La diferencia de pesos fue usada para determinar el contenido de humedad. Para cada tiempo el ensayo se hizo por duplicado.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con significancia $-\alpha-$ de 0.05.



Capítulo 3

Resultados y discusión

La Figura 6-A muestra el aspecto de las suspensiones acuosas de nematodos JI - *S. carpocapsae* sanitizados y listos para ser usados en la formulación de bioinsecticidas. Los JI se obtuvieron de cultivos *in vitro*-líquidos realizados en frascos agitados orbitalmente ($V_T=500$ mL; $V_L=50$ mL) que después de 20 días de fermentación alcanzaban más de 100,000 JI/mL. Es importante mencionar que la bacteria simbiote permaneció principalmente en fase I durante el desarrollo de los cultivos monoxénicos, lo cual es recomendable para proliferación de los nematodos (Figura 6-B).

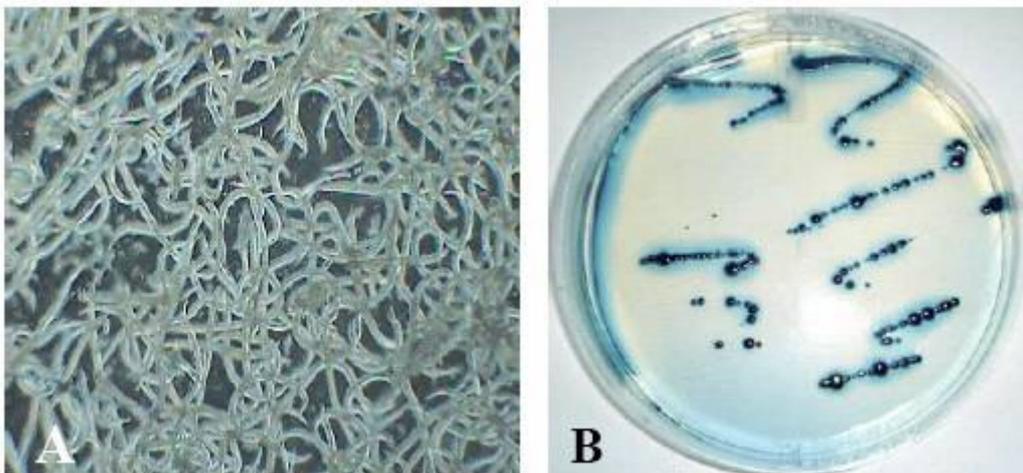


Figura 6. A) Fases JI de *Steinernema carpocapsae* suspendidas en agua destilada estéril, recuperadas de fermentaciones de 21 días, lavadas y sanitizadas antes de ser formuladas (aumento, 40 \times); B) colonias de *Xenorhabdus nematophila* desarrolladas en caja de NBTA estriada con caldo de fermentación de cultivo monoxénico de *S. carpocapsae* (48 horas de edad). Las colonias azules indican que la bacteria permaneció principalmente en fase I.



3.1 Evolución de la viabilidad de JI's y del contenido de humedad en las formulaciones de bioinsecticidas

3.1.1 Formulación F1

En la Figura 7-A se muestra el aspecto de la formulación F1 antes de ser sometida al proceso de secado. La concentración de esta formulación fue de 43,900 JI/g, y 35% de humedad. Después del tratamiento de secado ($\Delta t=225$ min a 23°C con aire a contracorriente de flujo desconocido -utilizando el soplador de una secadora para pelo-; Figura 3), el bioinsecticida formulado tenía las características de una pasta crujiente y seca (Figura 7-B). De mayor importancia fue el hecho de la grave pérdida de viabilidad de los JI, ya que esta cayó un 90% de la registrada inicialmente antes del secado. Por otra parte, la humedad final de la formulación fue del 11% (Figura 8).

A pesar de que algunos autores han reportado que fases JI de steinernemátidos pueden resistir condiciones de anhidrobiosis parcial (Grewal 2000 y 2002), durante los experimentos de la formulación F1 la pérdida de viabilidad de los NEP's fue grave, descartándose por tanto esta formulación y metodología involucradas como probables de ser usadas más adelante. Y la razón de este resultado pudo residir en la velocidad de secado a la que fueron sometidos los NEP's. Se ha reportado que la extensión de longevidad mediante anhidrobiosis es metabólicamente costosa. En particular, durante la desecación de nematodos la rapidez metabólica se incrementa de forma importante durante las primeras 24 h del proceso, posteriormente ésta descende



lentamente hasta niveles menores de los normales dentro de los 4-7 d siguientes (Grewal, 2002). Entre otros eventos destacados, la anhidrobiosis genera que el glucógeno y las reservas de lípidos sean convertidos en el carbohidrato trealosa (Womersely, 1990).

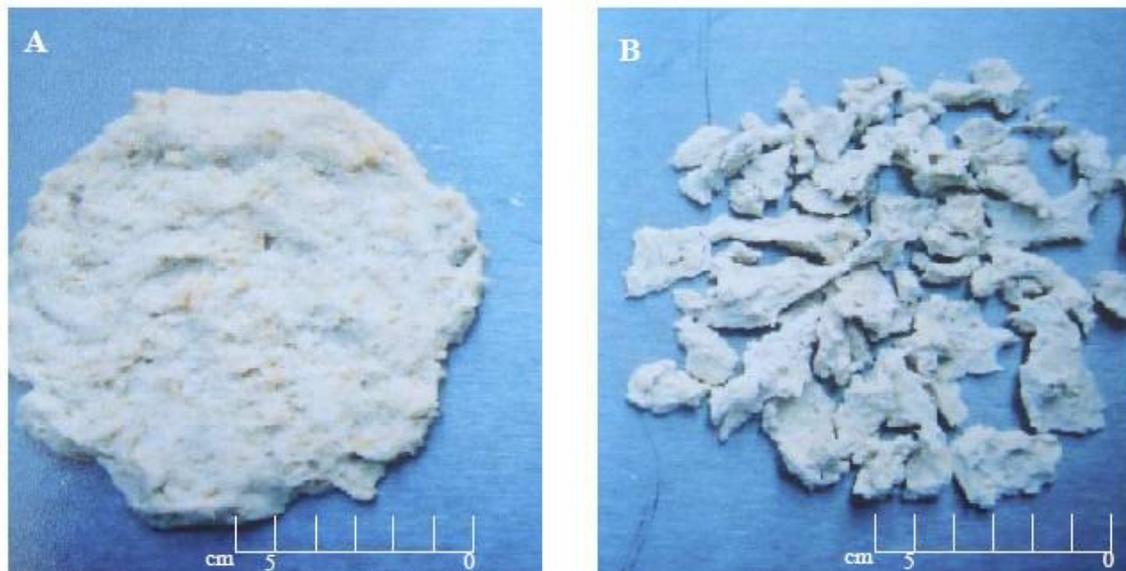


Figura 7. Formulación F1 de fases JI de *S. carpocapsae* (32 g de harina de trigo, 4 g de aserrín, 22 mL de una suspensión de nematodos que contenía 120,000 JI/mL). A) Aspecto del bioinsecticida antes de ser sometido al proceso de secado; concentración de 43,900 JI/g y 35% de humedad. B) Aspecto de la formulación después de 225 min de secado a 23 °C; humedad final de 11%.

Con base en lo anterior, dado que durante la preparación de la formulación F1 ésta fue secada en un periodo corto de 3.75 h, probablemente los JI no tuvieron el tiempo suficiente para hacer los ajustes metabólicos necesarios para la síntesis de trehalosa.

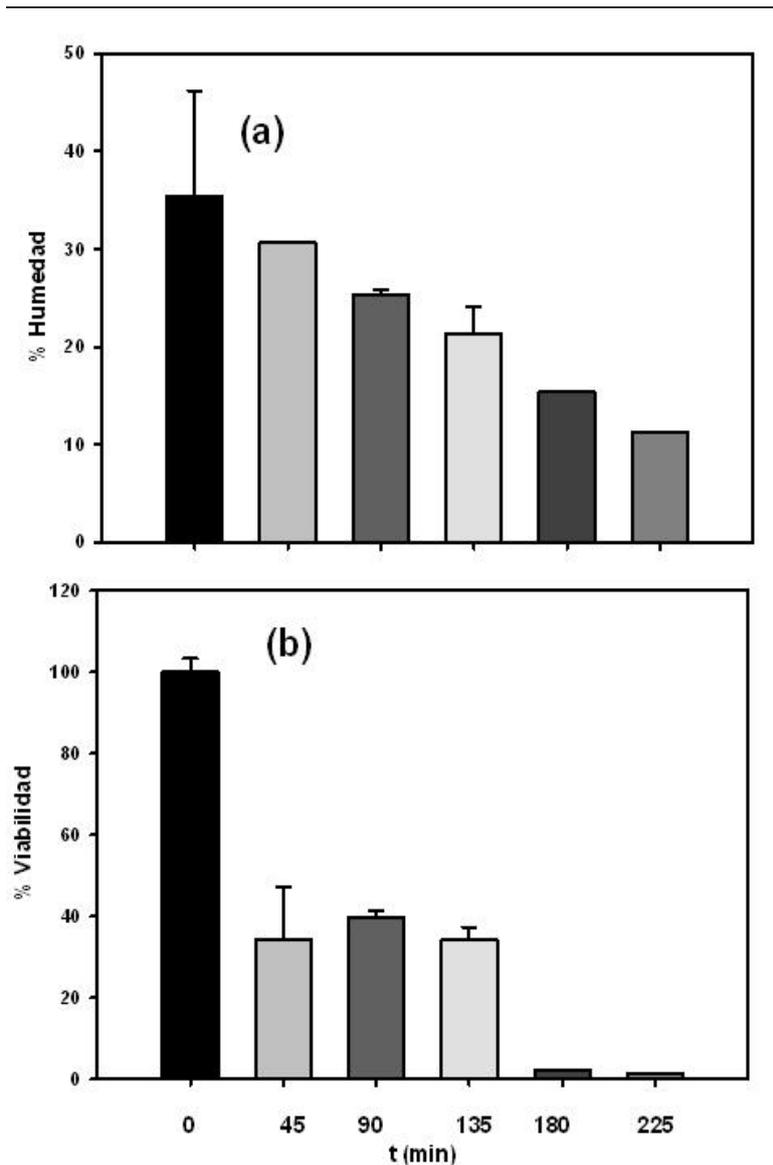


Figura 8. Formulación F1 de fases J1 de *S. carpocapsae* (32 g de harina de trigo, 4 g de aserrín, 22 mL de una suspensión de nematodos que contenía 120,000 J1/mL). a) Evolución de la pérdida de humedad de la formulación durante el procesamiento de secado. b) Evolución de la pérdida de viabilidad de fases J1 durante el proceso de secado.

En este mismo sentido, Connick et al (1994) prepararon bioinsecticidas formulados a base de fases J1 y mezclas de harinas, e involucraron procesos de secado paulatinos ($T=21^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa 65 %, durante 16 h). Como posibles causas de los resultados obtenidos para F1, es probable que el contenido de humedad final haya tenido poco que ver con la pérdida de viabilidad ya que, como se presentará más adelante, en otras formulaciones



realizadas en el presente trabajo se lograron menores pérdidas de viabilidad de fases JI involucrando simultáneamente valores de humedad notablemente menores que lo alcanzado en el caso de F1. Finalmente, debido al reducido número de nematodos viables después del secado, la formulación F1 comercialmente no sería rentable, ya que el bioinsecticida formulado tendría gran cantidad de soporte y pocos nematodos viables.

3.1.2 Formulación F2

La Figura 9 presenta distintos aspectos del bioinsecticida-F2, antes y después de ser re-hidratado para determinar la viabilidad de los nematodos JI. Por otra parte, la Figura 10 presenta la evolución tanto de la viabilidad de fases JI, como del contenido de humedad del bioinsecticida-F2 durante su almacenamiento. La concentración inicial de fases JI en la formulación F2 fue de 110,000 JI/g viables. Como puede observarse en la Figura 10-b, el % de viabilidad se mantuvo aproximadamente sin cambios durante los primeros 3 meses del experimento (i.e., viabilidad promedio, 83.8 %; desviación estándar -DE-, 7), para posteriormente disminuir drásticamente en la última etapa del mismo (i.e., viabilidad promedio, 24 %; DE, 6.6).

Por otra parte, el contenido de humedad inicial que registró la formulación F2 fue de 8.1 % y disminuyó hasta 5 % para el día 14 (Figura 10-a), mientras que a partir del día 21 hasta el final del experimento (t=120 d), la humedad varió sólo ligeramente (i.e., humedad promedio, 4.1 %; DE, 0.34).

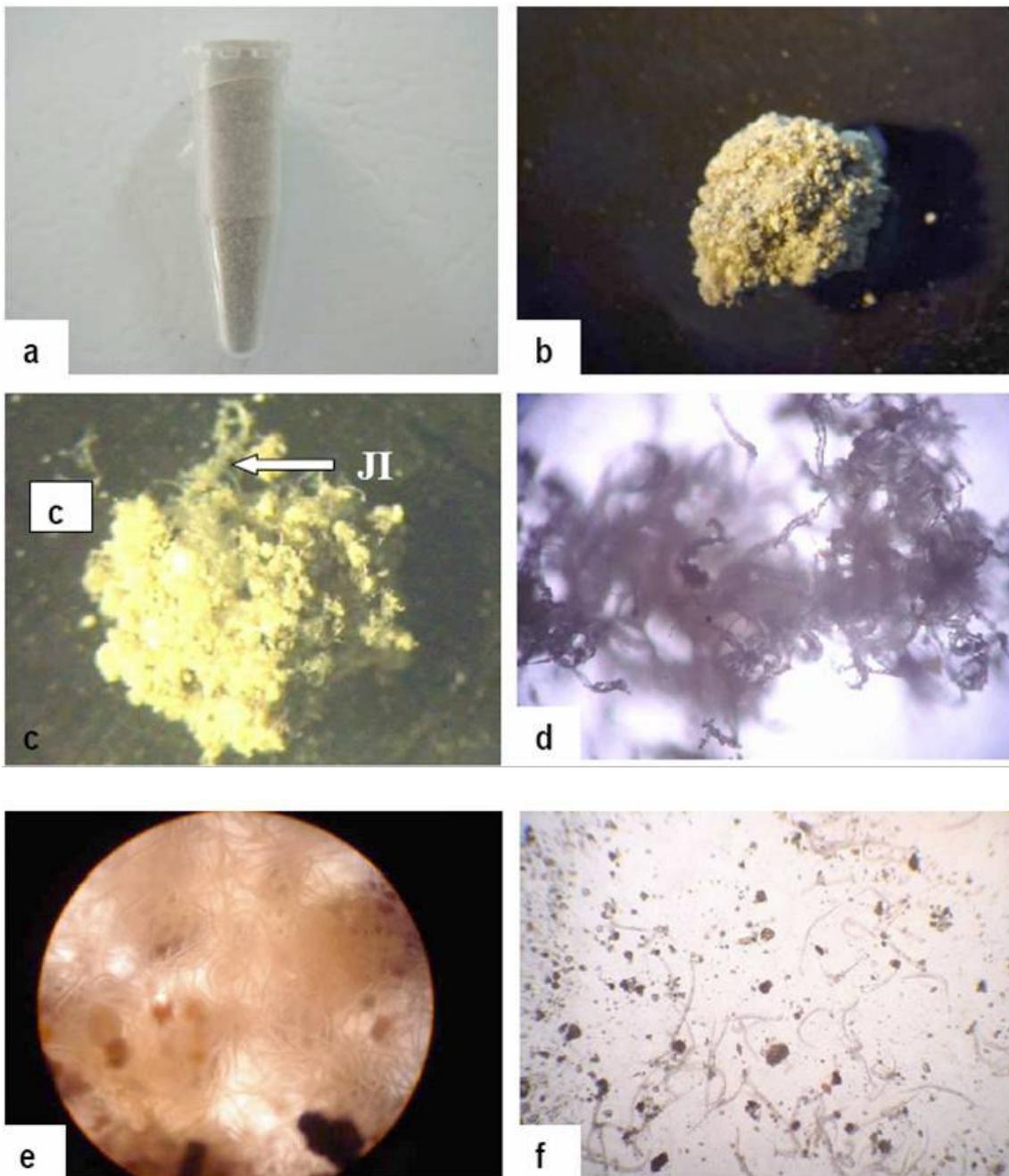


Figura 9. Distintos aspectos del bioinsecticida-formulación F2 a base de fases JI de *S. carpocapsae* (arena de río, 40 % v/v; kaolín, 40 % v/v; barro 20 % v/v), a distintos tiempos. A $t=0$, a) vial conteniendo bioinsecticida formulado, b) granulo de kaolín, arcilla y arena con JI atrapados en su interior (1 \times), c) granulo visto con lupa (4 \times). A $t=7$ días, d) JI's formulados sin re-hidratar (100 \times), e) JI's recién re-hidratados (40 \times), f) JI's re-hidratados y dispersos después de 30 minutos de ser puestos en contacto con el agua (40 \times).

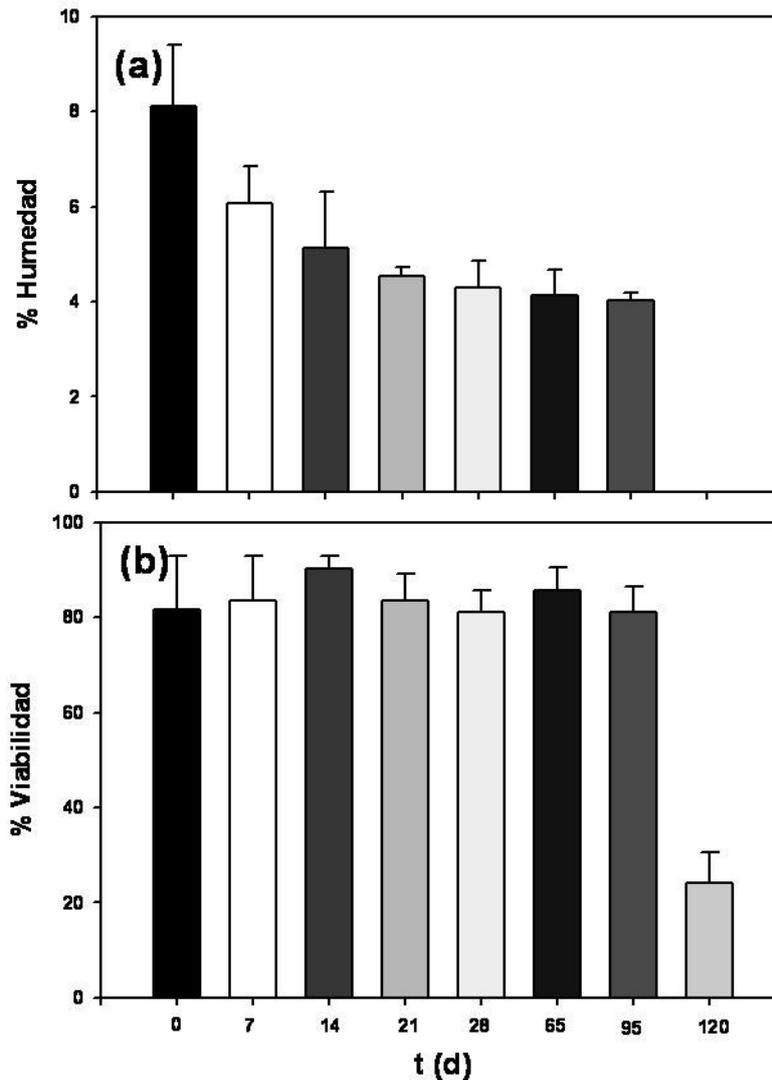


Figura 10. Formulación F2 de fases JI de *S. carpocapsae* (arena de río, 40 % v/v; kaolín, 40 % v/v; barro 20 % v/v). a) Evolución de la pérdida de humedad de la formulación durante su almacenamiento. B) Evolución de la pérdida de viabilidad de fases JI durante su almacenamiento; cada punto representa el promedio de 6 conteos individuales correspondientes a 2 viales.

Los resultados mencionados son relevantes, ya que sugieren que la mezcla ensayada de kaolín, arcilla y arena (F2 y F3), junto con la suspensión usada de fases JI, así como la metodología empleada durante la preparación de las formulaciones, fueron convenientes ya que los JI formulados pudieron permanecer con una alta viabilidad hasta por 3 meses. Además, en las



formulaciones estudiadas en el presente proyecto no se incluyó la presencia de ningún agente antimicrobiano, siendo que en la mayoría de los trabajos publicados sobre la formulación de bioinsecticidas a base de nematodos entomopatógenos, se ha involucrado el uso de agentes antimicrobianos (incluso se ha usado formaldehído; Connick et al 1994). A pesar de lo anterior, en las formulaciones ensayadas en la presente investigación no se observó la presencia evidente de desarrollo microbiano así como tampoco hubo aparición de olores que sugirieran la descomposición de materia orgánica.

Probablemente uno de los factores que determinaron los resultados obtenidos en el presente trabajo, hayan sido los bajos valores de humedad registrados en nuestras formulaciones F2. Otros autores que son reconocidos en la preparación de formulaciones de bioinsecticidas susceptibles de ser dispersadas en agua, han logrado formulaciones con valores de humedad en el intervalo de 28.5 a 43.5 % en experimentos monitoreados hasta por 7 meses (Grewal, 2000). Siendo estos valores de humedad relativamente elevados, en los citados trabajos ha sido necesario el uso de agentes antimicrobianos diversos.

Por otra parte, es probable que a las humedades logradas en el presente trabajo, se haya inducido de forma conveniente el estado de anhidrobiosis parcial en el que pueden existir los JI de acuerdo con lo mencionado en la Sección 1.6 del presente trabajo. Se sabe que el fenómeno fisiológico de resistir condiciones de escasa humedad no sólo lo presentan los nematodos, sino también algunos otros organismos multicelulares (Figura 11); no obstante,



lo que invariablemente se ha asociado con este estado fisiológico es la posibilidad de prolongar la viabilidad de los especímenes que exhiben estas propiedades.

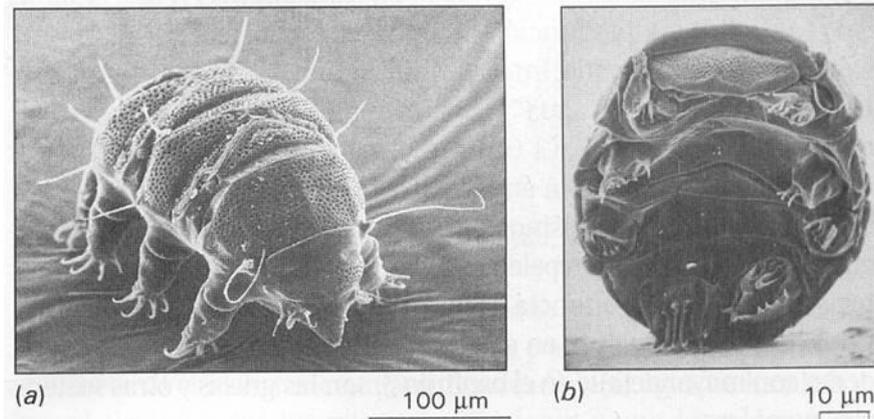


Figura 11. Los tardígrados (a), comúnmente llamados “osos de agua” son animales pequeños (menos de 1.2 mm de longitud) que normalmente viven en hábitat húmedos, como películas delgadas de agua en musgos. Cuando experimentan desecación, los tardígrados asumen una forma de barril y permanecen así (b), inmóviles pero vivos, por periodos de hasta 100 años (Solomon et al 2001)

Adicionalmente, es importante mencionar que, aunque no se realizó un estudio de transferencia de masa que considerara todas las resistencias que las moléculas de oxígeno deben superar para ser transferidas desde el seno del aire hasta finalmente llegar a los JI que lo requieren, estudio que requiere del manejo y cálculo de diversos conceptos como la difusión de Knudsen en capilares –medios porosos- o de difusividades “efectivas” (Figura 12), se puede inferir que la mezcla de soportes usados en F2 es lo suficientemente porosa que permite un intercambio gaseoso suficiente –de O_2 y CO_2 , principalmente- tal que proporciona las condiciones necesarias para mantener la viabilidad de los JI por más de tres meses. No obstante, es necesario desarrollar más



estudios en sistemas modelo que involucren la determinación de coeficientes globales de transferencia de oxígeno.

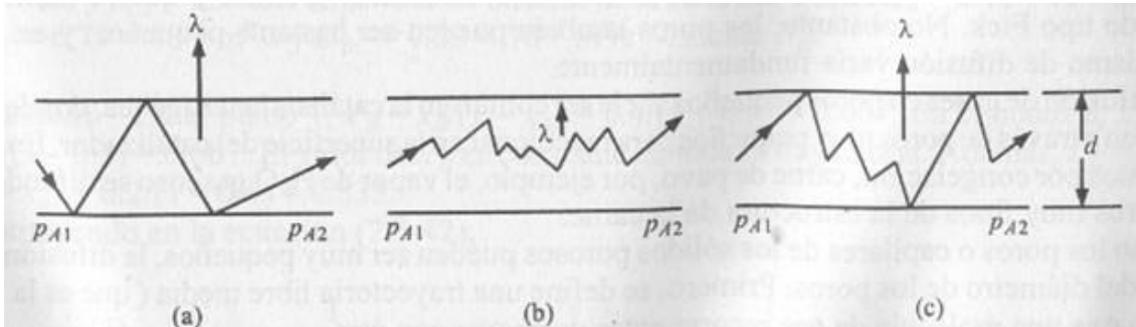


Figura 12. Tipos de difusión de gases en tubos capilares pequeños: a) difusión de gases de Knudsen; b) difusión de gases de Fick o molecular; c) difusión de gases de transición (Geankoplis, 1998)

Finalmente, no obstante que nuestros resultados de conservación de viabilidad de JI's son mejores que lo reportado por algunos autores [i.e., Connick et al. (1994) reportaron una pérdida del 100 % de viabilidad de JI's después de 56 días de formulado el bioinsecticida], aún no compiten con lo publicado por otros grupos [i.e., Grewal (2002) ha reportado formulaciones que involucran el mantenimiento de altas viabilidades de JI's por más de 6 meses]; sin embargo, es importante mencionar que en el caso de los trabajos de Grewal y su grupo de investigación, estos autores no han hecho públicas sus mezclas de ingredientes ni las metodologías empleadas para la formulación de bioinsecticidas a base de JI's, argumentando que es información confidencial perteneciente a empresas privadas. No obstante, de acuerdo con Connick et al. (1994), es probable que factores como la temperatura de almacenamiento y la humedad imperante en la formulación afecten la viabilidad de los JI's en mayor medida que los componentes de la formulación *per se*.



3.1.3 Formulación F3

La Figura 13 presenta la evolución tanto de la viabilidad de fases JI, como del contenido de humedad del bioinsecticida-F3 durante la presente investigación. La formulación F3 fue la que involucró la mayor concentración de fases JI (i.e., 116,000 JI's viables por gramo de formulación); además, como puede observarse en la Figura 13-b, el % de viabilidad se mantuvo aproximadamente constante durante los 90 días que esta formulación fue monitoreada (i.e., viabilidad promedio, 87.8 %; desviación estándar -DE-, 5.3), siendo incluso mayor que lo logrado con la formulación F2.

Por otra parte, el contenido de humedad que registró la formulación F3 se mantuvo constante hasta el día 60 (i.e. humedad promedio, 10.8 %; DE, 1.0); no obstante, a t=90 d, la humedad final fue 5.6 % (DE, 2.8). Los datos de humedad también fueron mayores que lo registrado para la formulación F2 y esto probablemente tenga que ver con el hecho de que F3 incluyó mayor cantidad de barro que F2, y debido a que este ingrediente es altamente higroscópico, pudiese esperarse por consecuencia mayor humedad en F3 –lo cual coincide con lo determinado experimentalmente-. Por otra parte, esto pudo inducir que en F3 se conservase mayor proporción de fases JI. No obstante, con relación al mejor mantenimiento de viabilidad de JI's en F3, probablemente esto último tuviese que ver con el hecho de que las mezcla-F3 pudiese generar una matriz con porosidad tal, que se favoreciera un mejor intercambio de gases que lo existente en F2, traduciéndose esto en una mejor conservación de nematodos.

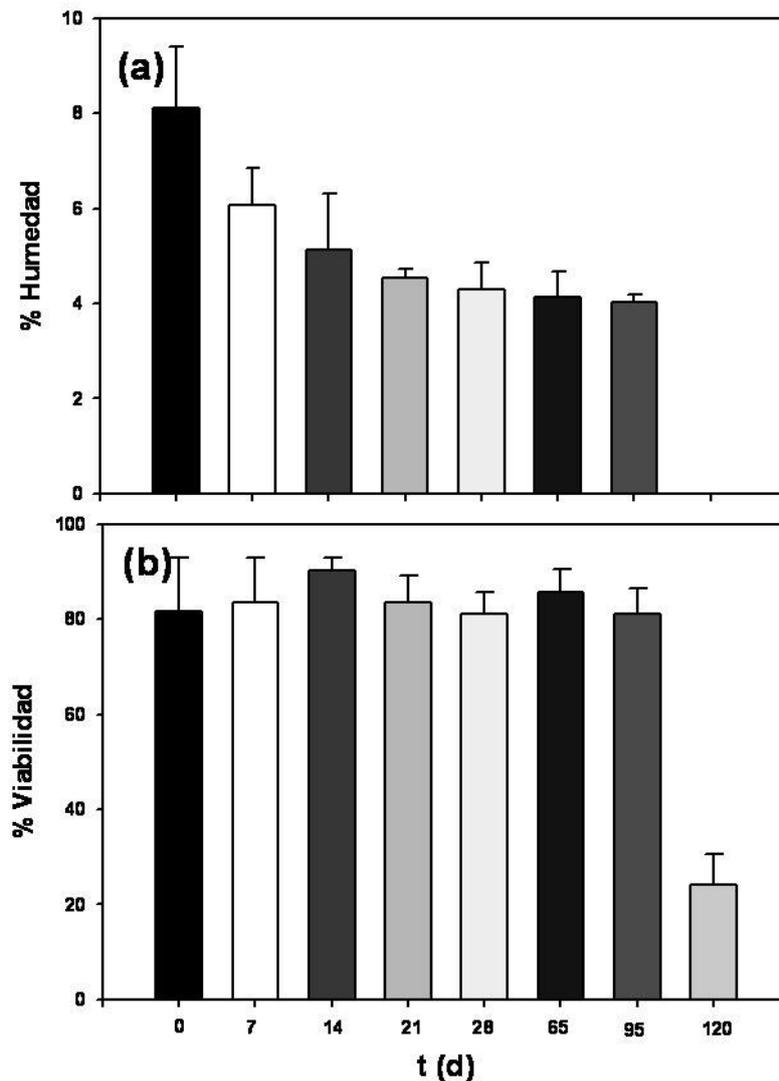


Figura 13. Formulación F3 de fases JI de *S. carpocapsae* (arena de río, 40 % v/v; kaolín, 20 % v/v; barro 40 % v/v). a) Evolución de la pérdida de humedad de la formulación durante su almacenamiento; b) Evolución de la pérdida de viabilidad de fases JI durante su almacenamiento; cada punto representa el promedio de 6 conteos individuales.

Sin embargo, como en el caso discutido anteriormente, se debieran desarrollar más estudios con enfoques de transferencia de masa para determinar si la matriz porosa en F3 fuese mejor que las otras estudiadas. También debe destacarse que las humedades en F3 fueron notablemente menores que lo reportado por Grewal (2002) y Connick et al. (1994), lo cual probablemente



permitió que no se presentaran contaminaciones microbianas evidentes en F3 –no crecimiento de micelio ni presencia de malos olores-, a pesar que como en los casos discutidos anteriormente para F1 y F2, no se utilizó ningún agente antimicrobiano en F3, lo cual por cierto también es conveniente para el acceso hacia una agricultura sustentable.



Capítulo 4

Conclusiones

Se han logrado producir dos formulaciones de bioinsecticidas (F2 y F3) a base de fases J1 de *S. carpocapsae* que proporcionan una buena conservación de la viabilidad de nematodos durante aproximadamente 100 días. Estas formulaciones involucraron el uso de materiales ampliamente disponibles en el estado de Hidalgo. Por lo tanto, esta investigación puede contribuir sólidamente al incremento de prácticas de biocontrol ya que uno de los problemas más serios para incrementar el uso de bioinsecticidas es su limitada vida de anaquel.

Además, las formulaciones ensayadas no involucraron el uso de agentes antimicrobianos –que si involucran todos los trabajos publicados en la literatura especializada- y los contenidos de humedad logrados fueron notablemente menores que lo hasta ahora reportado. Por otra parte, aparentemente la velocidad de secado es fundamental para conservar la viabilidad de J1's, siendo conveniente emplear procesos con bajas velocidades.



Capítulo 5

Recomendaciones

Para investigaciones por realizarse en el corto plazo, basadas en los resultados del presente estudio, se sugiere lo siguiente:

1. Determinar la patogenicidad de los JI formulados.
2. Incrementar la concentración de JI's en las formulaciones lo que favorecería la rentabilidad de los procesos.
3. Realizar pruebas para determinar si las formulaciones F2 y F3 permiten una fácil aplicación de nematodos en campo.
4. Sería deseable saber los efectos de distintos niveles de los factores humedad relativa ambiental, concentración de oxígeno y temperatura, sobre la pérdida de viabilidad de JI's, así como determinar los coeficientes de transferencia de gases, por ejemplo.



Capítulo 6

Referencias

- Akhurst, R.J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenohabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121:303-309.
- Alatorre R. (1991). Memorias del II Curso de Control Biológico. Cap. 13. SMCB-UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah. México.
- Barrera FJ. (2005) Introducción, filosofía y alcance del control biológico. www.controlbiologico.org.mx/Documentos/Intro_al_CB.htm Último acceso 12 de diciembre del 2005.
- Batalla-Mayoral J. (2005). Efecto de la composición de medios de cultivo complejos en la producción del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapsae* en cultivo monoxénico sumergido. Tesis de licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Bedding RA. (1984). Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* spp. Ann. Appl. Biol. 104:117-120.
- Chavarría-Hernández N., de la Torre M. (2001). Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. Biotechnol Lett 23: 311-315.



CIDEIBER-Centro de información y documentación empresarial sobre Ibero América. (2004). www.cideiber.com/infopaises/reparte1.asp?p=3. Último acceso 12 de diciembre del 2005.

Connick WJ-Jr, Nickle WR, Williams KS, Vinyard BT. (1994). Granular formulations of *Steinernema carpocapsae* (strain All) (Nematoda: Rhabditida) with improved shelf life. J Nematol 26: 352-359.

Cranshaw W., Sclar DC., Cooper D. (1996). A review of 1994 pricing and marketing by suppliers of organisms for biological control of arthropods in the United States. Biol. Control 6: 291-296.

Ehlers RU. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:623-633.

FAO-Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. El control de plagas (2005). <http://www.fao.org/focus/s/SpeclPr/spro12-s.htm>. Ultimo acceso 20 de febrero del 2006.

Gaugler R. (1988). Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernemateidae y Heterorhabditidae) in: Biological Control: A guide to natural enemies in North America. Cornell University. USA.

Geankoplis JC. (1998). Procesos de transporte y operaciones unitarias. Tercera edición. (CECSA) compañía editorial continental, S.A. pp 517- 519.

Grewal PS, Georgis R (1998). Entomopathogenic nematodes. In: Methods in Biotechnology: Biopesticides: Use and Delivery, eds F R Hall; J Menn, pp 271-299. Humana press Inc, Totowa: New Jersey.

Grewal PS. (2000). Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. Pest Manag Sci 56: 401-406.



- Grewal PS. (2002). Formulation and Application Technology. En: Entomopathogenic nematology, R Gaugler (editor). CAB Internacional. Pp 265-287.
- IFIC-International Food Information Council. Recurso sobre nutrición y seguridad de alimentos. Agricultura y producción de alimentos (2004). www.ific.org/sp/food/agriculture/index.cfm. Ultimo acceso 12 de diciembre del 2005.
- Islas-López MA., Sanjuan-Galindo R., Rodríguez-Hernández AI., Chavarría-Hernández N. (2005). Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using cultura 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.
- Kaya HK., Gaugler R. (1993). Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38:181-206.
- Mcinerney BB., Gregson RP., Lacey MJ., Akhurst RJ., Lyons GR. (1991). Biological active metabolites from *Xenorhabdus* spp. *J. Nat. Prod.* 54:114-120.
- Papale S. (2006). Plaguicidas ¿Venenos útiles?. Directorio ecológico y natural. <http://contaminacion.ecoportel.net/content/view/full/15871>. Ultimo acceso 20 de febrero del 2006.
- Poinar GO. (1979). Nematodes for biological control of insects. CRC. Press, Boca Raton. Florida. USA.
- Pruit PL., Friedman MJ. (1992). Long-term storage of infective juvenile nematodes in pseudoplastic layers. US Patent 5,170,744.



- Ruiz J. (2003). Despoblación Agricultura sostenible. http://soria-goig.com/despoblacion/despo_12.htm. Ultimo acceso 06 de marzo del 2006.
- Shapiro-Ilan., Gaugler R. (2002). Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *J Microbiol Biotechnol* 28: 137-146.
- Simmonds FJ., Franz JM., Sailer RI. (1976). History of biological control. In: Huffaker CB., Messenger PS. (eds), *Theory and practice of biological control*. Academic Press. N.Y. pp 17-39.
- Solomon E, Berg L, Martin D. (2001). *Biología*. Quinta edición. McGraw-Hill Mexico DF. interamericana. pp 35.
- Surrey MR., Davies RJ. (1996). Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *J Invertebr Pathol* 67: 92-99.
- Tierramérica. (2002). Foro social mundial. Plaguicidas, pesticidas. <http://www.tierramerica.net/2003/0112/conectate.shtml>. Ultimo acceso 20 de febrero del 2006.
- Van Lenteren J., Roskam M., Timmer R. (1997). Commercial mass production and pricing of organisms for biological control of pests in Europe. *Biol. Control* 10: 143-149.
- Wilson F., Huffaker CB. (1976). The philosophy, scope, and importance of biological control In: eds C.B. Huffaker y P.S. Messenger, *Theory and practice of biological control*. Academic Press, N.Y., pp. 3-15.
- Wilson M., Ivanova E. (2004). Neutral density liquid formulations for nematode – based biopesticidas. *Biotechnol lett* 26:1167-1171.



Womersley C. (1990). Dehydration survival and anhidrotic potential, in entomopathogenic nematodes in biological control, eds Gaugler R y Kaya HK, CRC Press, Boca raton, FL. pp 117 – 137.

Woodring JL., Kaya HK. (1988). Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. Arkansas agriculture experimental station: AK.