



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ÁREA ACADÉMICA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL Y
ALIMENTOS
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Evolución de las propiedades físicas de los caldos de fermentación en la producción del nemátodo entomopatógeno *Steinernema colombiense*, en cultivo sumergido.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

M en C. Sixto Josué Pérez Campos

Dirección:	Dr. Norberto Chavarría Hernández.
Asesor:	Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández.
Asesor:	Dra. Ma. del Rocío López Cuellar
Asesor:	Dr. René Sanjuán Galindo
Asesor:	Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Junio 2019.



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Acta de reunión del Comité de Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "*Evolución de las propiedades físicas de los caldos de fermentación en la producción del nemátodo entomopatógeno Steinernema colombiense, en cultivo sumergido*", que desarrolló el estudiante Sixto Josué Pérez Campos, No. Matrícula 114169.

Asistentes:

- Dr. Norberto Chavarría Hernández
- Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández
- Dra. Ma. del Rocío López Cuellar
- Dr. René Sanjuan Galindo
- Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando a Sixto Josué oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

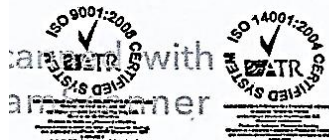
B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de doctorado respectivo.

ATENTAMENTE
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
 Tulancingo de Bravo, Hidalgo, a 31 de Mayo de 2019.

- Dr. Norberto Chavarría Hernández
- Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández
- Dra. Ma. del Rocío López Cuellar
- Dr. René Sanjuan Galindo
- Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

ccp. Archivo.



Rancho Universitario.
 Av. Universidad Km. 1
 Ex-Hda. de Aquetzalpa AP 32 CP 43600
 Tulancingo, Hgo.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, institución que me permitió realizar mis estudios de licenciatura, maestría y doctorado. En segunda estancia, agradezco al Instituto de Ciencias Agropecuarias por ser mi casa de estudios, donde forjé los conocimientos y ética profesional necesaria para ser un profesionista. Agradezco que también se me permitiera realizar las actividades y experimentos necesarios para la formación del presente trabajo.

Agradezco a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca (412344) que me otorgó durante los 3 ½ años que duraron mis estudios. Gracias a esta beca pude enfocarme al 100% en mis estudios y en la realización de este trabajo.

Agradezco a los apoyos y proyectos con los cuales se logró consolidar este proyecto de tesis:

Red PROMEP: Biotecnologías basadas en biomoléculas funciones para el sector agroalimentario, 2011-2017.

CONACyT Investigación Científica Básica 2014, Clave 238359.

CONACyT Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2014, Clave 230138.

Proyecto “Bioingeniería básica para la producción de nematodos entomopatógenos en cultivo sumergido en fermentadores” proyecto de ingeniería básica CONACYT 2015.

CONACyT Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica 2015, Clave 254437.

Agradezco al Dr. Norberto Chavarría Hernández, por dirigir el presente trabajo de investigación y permitirme aprender de este fascinante mundo de los bioinsecticidas, en particular de los nemátodos entomopatógenos.

Agradezco a la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, por la paciencia y el tiempo invertido durante el presente trabajo de investigación e introducirme desde hace muchos años, al fascinante mundo de la Ciencia de la Reología.

Agradezco al Dr. René Sanjuán Galindo, el tiempo y los consejos que me permitieron resolver los problemas que se suscitaban en el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco a la Dra. Ma. del Roció López Cuellar, por dedicar tiempo y esfuerzo al fortalecimiento del presente trabajo. Agradezco de igual forma, los comentarios que me permitieron tener una perspectiva diferente al afrontar los problemas técnicos del trabajo de investigación.

Agradezco a la Dra. Martha Gayosso Canales, por algunos consejos microbiológicos, que resultaron en avances importantes del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez, por su apoyo y consejos que siempre me permitían ver enfoques diferentes y áreas de oportunidad en el presente trabajo.

Agradezco al Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval, por la amistad y consejos que fortalecieron mi carácter profesional durante la realización del presente trabajo.

Agradezco a la Dr. Norma Güemes Vera y Dr. Javier Piloni Martini, por el apoyo y amistad durante la realización de mis estudios de Doctorado en el Instituto de Ciencias Agropecuarias.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel Miguez Escorcía, por la amistad, apoyo y facilidades para realizar mis estudios experimentales en el Instituto de Ciencias Agropecuarias.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por la oportunidad de darme un gran angelito que siempre me cuida desde el momento que nací, mi madre; María del Socorro Campos García. Y a ti mamá, nunca encontraré las palabras correctas de decirte cuanto te quiero y cuanto te debo, Gracias por todo.

A mi padre Elpidio, los dos somos personas con caracteres fuertes, ni modo teníamos que ser padre e hijo. Por eso no me asombran nuestras diferencias, pero sabes: “Te quiero y aprecio mucho”.

A las personas que han dejado huellas imborrables en mi corazón y ya no están con nosotros, Jesús Campos García, Evangelina García y Gerarda Romero. Son parte de mi corazón y mi ser, gracias por los consejos que me dieron en vida, nunca los olvidaré.

A Eva Rossina Aguilar Lugo Gerez, que el poco tiempo que llevamos de conocernos siempre has mostrado tu cariño y aprecio, que agradezco desde el corazón, gracias amor.

A la familia Aguilar Lugo Gerez, por brindarme su apoyo y amistad, que en cualquier problema, han mostrado su apoyo hacia mi persona, que agradezco infinitamente.

A mis hermanos y sus familias: Víctor, José Alberto, Edith, Esperanza, sobrinos y sobrinas, gracias por su cariño y apoyo.

Dedico este trabajo finalmente a toda mi familia: mi tía María, mi tía Lidú, mi tía Vicky, mi tía Teresa, Israel Robledo, Raúl Chávez, a todos mis tíos, tías y primos, que gracias a Dios son muchos, saben muy bien que me falta mucho papel para nombrarlos a todos, pero espero que siempre sepan que los llevo en el corazón. “Gracias a todos por confiar en mí y demostrarme su amor”.

PUBLICACIONES

Pérez-Campos, S.-J., Rodríguez-Hernández, A.-I., del-Rocío López-Cuellar, M., Zepeda-Bastida, A., & Chavarría-Hernández, N. (2018). *In-vitro* liquid culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense*, in orbitally shaken flasks. *Biocontrol Science and Technology*, 28(9), 901-911. doi: 10.1080/09583157.2018.1499872.

Pérez-Campos, S.-J., Rodríguez-Hernández, A.-I., del-Rocío López-Cuellar, M., Sanjuan-Galindo, R., & Chavarría-Hernández, N.. 2019. Producción de nemátodos entomopatógenos en medio líquido, perspectivas y retos a vencer. *Frontera Biotecnológica*. ISSN 2448-8461. No. 12. Pp. 10-18.

Congresos

Presentaciones exposiciones orales

Coloquio de Investigación de Ingeniería y Ciencia de los Materiales, organizado por la red de biotecnología basada en biomoléculas funcionales para el sector agroalimentario, Tema “Evolución de las propiedades físicas de los caldos de fermentación en la producción del nemátodo entomopatógeno *Steinernema colombiense*”, Tecnológico de Zacatepec, 7 y 8 de septiembre de 2017, Zacatepec, Morelos.

Presentaciones en cartel

XX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, IX Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica ,XIV Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular, Tema cartel “Producción del nemátodo entomopatógeno *Steinernema colombiense* en cultivo sumergido.” del 16 a18 Marzo 2016, Veracruz, México.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
REFERENCIAS.....	6
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10

CAPÍTULO 1

PRODUCCIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS EN MEDIO LÍQUIDO, PERSPECTIVAS Y RETOS A VENCER

RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. FENOTIPOS DE LAS BACTERIAS SIMBIONTES DE LOS NE	14
3. CICLO DE VIDA DE LOS NE	15
4. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE NE	16
4.1 Producción “in vivo”	16
4.2 Producción “in vitro” en medio sólido	18
4.3 Producción “in vitro” en medio líquido	18
5. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE NE EN MEDIO LÍQUIDO	21
5.1 Efecto de las propiedades fisicoquímicas en la producción de NE	22
6. CONCLUSIÓN.....	26
7. REFERENCIAS	26

CAPÍTULO 2

CULTIVO LÍQUIDO *IN-VITRO* DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO, *STEINERNEMA COLOMBIENSE*, EN FRANCOS AGITADOS ORBITALMENTE

ABSTRACT	33
1. INTRODUCCIÓN.....	34
2. MATERIALS AND METHODS.....	35
2.1 <i>Biological specimens</i>	35
2.2 <i>Culture media</i>	36
2.3 <i>In-vitro liquid cultures</i>	36
2.3 <i>Determination of the viable nematode concentration, C</i>	37
2.4 <i>Modelling of the EPN population growth curve</i>	38
2.5 <i>Statistical analysis</i>	38
3. RESULTS AND DISCUSSION	38
REFERENCES	45

CAPÍTULO 3
CULTIVO LÍQUIDO DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO, *STEINERNEMA*
***COLOMBIENSE*: EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL NEMÁTODO,**
FRACCIÓN VOLUMÉTRICA DE LAS PARTÍCULAS, PROPIEDADES
REOLÓGICAS Y TENSIÓN SUPERFICIAL

ABSTRACT	51
1. INTRODUCTION	52
2. MATERIALS AND METHODS.....	54
2.1 <i>Biological specimens</i>	54
2.2 <i>Culture media</i>	54
2.3 <i>Liquid cultures</i>	55
2.3.1 <i>Determination of the viable nematode concentration</i>	55
2.2.3 <i>Determination of the size of CEYP particles.</i>	56
2.2.4 <i>Determination of the volume fractions (Φ)</i>	56
2.3.5 <i>Determination of rheological properties</i>	57
2.3.6 <i>Surface tension (σ) determinations</i>	57
2.3.7 <i>Statistical analysis</i>	57
3. RESULTS AND DISCUSSIONS	58
4. CONCLUSION	69
REFERENCES	70
CONCLUSIONES GENERALES	78

Índice de Figuras

CAPÍTULO 1

PRODUCCIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS EN MEDIO LÍQUIDO, PERSPECTIVAS Y RETOS A VENCER.

Figura 1 Evolución del crecimiento de <i>S. colombiense</i> y su simbiote <i>Xenorhabdus</i> sp. en matraces cilíndricos con agitación orbital.	17
Figura 2 Trampa White (<i>Galleria mellonella</i> infectada con <i>S. colombiense</i>)	17

CAPÍTULO 2

CULTIVO LIQUIDO *IN-VITRO* DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO, *STEINERNEMA COLOMBIENSE*, EN FRANCO AGITADOS ORBITALMENTE.

Figure 1. Cylindrical flasks used for the in-vitro liquid culture of the entomopathogenic nematode, <i>Steinernema colombiense</i>	37
Figure 2. Aspect of the growth of <i>Xenorhabdus</i> sp. in NBTA plates after 2 days of incubation at 30°C.	39
Figure 3. Evolution of the population of the EPN, <i>Steinernema colombiense</i> , in presence of its symbiotic bacterium, <i>Xenorhabdus</i> sp. Cultures were carried out in medium PM in two cylindrical bottles	40
Figure 4. Physical aspects of some developmental stages of the EPN, <i>Steinernema colombiense</i> , in cultures with its symbiont, <i>Xenorhabdus</i> sp., in cylindrical flasks, in medium MP at 28°C and 130 rpm.	40
Figure 5. Time course of the dimensionless <i>Steinernema colombiense</i> -concentration (C/C_0) in liquid cultures in medium PM in two cylindrical bottles at 28°C and 130 rpm	43

CAPÍTULO 3

CULTIVO LÍQUIDO DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO, *STEINERNEMA COLOMBIENSE*: EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL NEMÁTODO, FRACCIÓN VOLUMÉTRICA DE LAS PARTÍCULAS, PROPIEDADES REOLÓGICAS Y TENSIÓN SUPERFICIAL.

Figure. 1 Evolution of the concentration of the EPN, <i>Steinernema colombiense</i> , in presence of its symbiotic bacterium, <i>Xenorhabdus</i> sp. Cultures were carried out in medium PM at 28 °C and 130 rpm.	59
Figure. 2 Ligth microphotographs of samples of culture broths of liquid cultures of <i>Steinernema colombiense</i> at different times.	60

Figure. 3 Evolution of the volume fraction of solid particles (Φ), wet base, during the production of <i>Steinernema colombiense</i> , in presence of its symbiotic bacterium, <i>Xenorhabdus</i> sp.....	61
Figure. 4 Scanning electron microscope (SEM) image of coagulated egg yolk particles of the culture medium used for the liquid culture of <i>Steinernema colombiense</i> in presence of its symbiotic bacterium, <i>Xenorhabdus</i> sp.	62
Figure. 5 Evolution of the distribution of suspended coagulated egg yolk particles during the liquid culture of <i>Steinernema colombiense</i> in presence of its symbiotic bacterium, <i>Xenorhabdus</i> sp.	63
Figure. 6 Time course of the rheological parameters, consistency index (K) and flow behavior index (n) of the Oswald-de Waele model (Eq. 1), during the liquid culture of <i>Steinernema colombiense</i> and <i>Xenorhabdus</i> sp.	65
Figure. 7 Time course of the surface tension of the culture broths during the production of <i>Steinernema colombiense</i> in presence of its symbiotic bacterium, <i>Xenorhabdus</i> sp.	68

Índice de tablas

CAPÍTULO 1 PRODUCCIÓN DE NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS EN MEDIO LÍQUIDO, PERSPECTIVAS Y RETOS A VENCER.

Tabla 1 Trabajos sobre la producción de nemátodos entomopatógenos <i>in vitro</i> en medio líquido usando biorreactores.	20
---	----

CAPÍTULO 2 CULTIVO LIQUIDO *IN-VITRO* DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO, *STEINERNEMA COLOMBIENSE*, EN FRANCOS AGITADOS ORBITALMENTE.

Table 1. Some reports concerning the <i>in-vitro</i> liquid culture of <i>Steinernema</i> species in orbitally shaken bioreactors.	42
Table 2. Kinetic parameters for the <i>in-vitro</i> liquid culture of <i>Steinernema colombiense</i> in both B1 and B2 orbitally shaken bioreactors, on the basis of a re-parameterized Gompertz model of 3-parameters (Eq. 1).	44

CAPÍTULO 3 CULTIVO LÍQUIDO DEL NEMÁTODO ENTOMOPATÓGENO, *STEINERNEMA COLOMBIENSE*: EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL NEMÁTODO, FRACCIÓN VOLUMÉTRICA DE LAS PARTÍCULAS, PROPIEDADES REOLÓGICAS Y TENSIÓN SUPERFICIAL.

Table. 1 Mean body length and width of developmental stages of <i>Steinernema colombiense</i> in liquid culture, in presence of <i>Xenorhabdus</i> sp. (Standard deviation is in parenthesis).....	61
Table. 2 Apparent viscosity (η_a) of whole culture broths and their supernatants, during the liquid culture of <i>Steinernema colombiense</i> in presence of its symbiont, <i>Xenorhabdus</i> sp.....	66

Resumen

En el mundo se están buscando tecnologías amigables con el medio ambiente que permitan minimizar el impacto del uso de compuestos químicos en la agricultura. Los agentes de control biológico, son una alternativa para minimizar el impacto ambiental. En los próximos años, el control biológico representará una derrama económica importante a nivel mundial. Los nemátodos entomopatógenos (NE), han demostrado ser especies que pueden ser utilizadas para el control biológico, por lo cual el estudio de la producción masiva de éstos, será un tema relevante en los próximos años.

El presente trabajo es un estudio de la producción del NE *Steinernema colombiense* en medio líquido, usando reactores agitados orbitalmente. En una primera etapa, *S. colombiense* fue producido en dos tipos de matraces a 130 rpm y 28 °C, con volumen de operación de 10 y 20 mL en un medio de cultivo complejo. Para el décimo día, la concentración de NE no mostró diferencias significativas entre las cinéticas de crecimiento en ambos tipos de matraces. El crecimiento de la población de nemátodos fue modelado mediante la ecuación remasterizada de Gompertz de tres parámetros.

En una segunda etapa, se realizaron estudios de las propiedades reológicas y tensión superficial de caldos de cultivo, considerado los caldos de cultivo como suspensiones sólido-líquido, por la presencia del NE *S. colombiense*, su bacteria simbiote *Xenorhabdus. sp.*, y partículas de sólidos suspendidos del medio de cultivo (yema de huevo). Los caldos de cultivo presentaron un comportamiento reo-fluidificante a la cizalla, el cual fue modelado con la ecuación de Oswald-de Waele, donde la principal evolución de los caldos de cultivo, se presentó durante la fermentación del medio de cultivo por la bacteria simbiote. La fracción volumétrica de los sólidos suspendidos fluctuó entre 0.15 y 0.07 durante todo el proceso, siendo la contribución de los NE menor a 0.035. La tensión superficial exhibió un promedio de 34.53 mN/m durante todo el proceso.

Abstract

The world is looking for environmentally friendly technologies that minimize the impact of the use of chemical compounds in agriculture. The biological control agents are an alternative to minimize the environmental impact. In the next few years, biological control will represent an important economic sprawl worldwide. The entomopathogenic nematodes (EN) have proven to be species that can be used for biological control, so the study of the massive production of these will be a relevant issue in the coming years.

The present work is a study of the production of EN *Steinernema colombiense* in liquid medium, using reactors stirred orbitally. In a first stage, *S. colombiense* was produced in two types of flasks at 130 rpm and 28 ° C, with an operation volume of 10 and 20 mL in a complex culture medium. By the tenth day, the concentration of EN did not show significant differences between the growth kinetics in both types of flasks. The growth of the nematode population was modeled by the remastered Gompertz equation of three parameters.

In a second stage, studies were carried out on the rheological properties and surface tension of culture broths, considered the culture broths as solid-liquid suspensions, by the presence of EN *S. colombiense*, its symbiont bacterium *Xenorhabdus. sp.*, and suspended solids particles from the culture medium (egg yolk). The culture broths presented a reo-fluidifying behavior to the shear, which was modeled with the Oswald-de Waele equation, where the main evolution of the culture broths, was presented during the fermentation of the culture medium by the symbiont bacterium. The volumetric fraction of the suspended solids fluctuated between 0.15 and 0.07 during the whole process, being the contribution of the EN less than 0.035. Surface tension exhibited an average of 34.53 mN / m throughout the process.

Introducción general

El término pesticida cubre una amplia gama de compuestos que incluyen insecticidas, fungicidas, herbicidas, compuestos que matan roedores, musgos y nemátodos (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009). Aunque su uso ha sido efectivo en las últimas décadas para combatir plagas, también se ha demostrado que los plaguicidas pueden generar resistencia al paso de los años y son responsables de contaminar el agua y suelo. Para disminuir su impacto en el planeta, se han creado programas por organizaciones internacionales como la FAO, ésta creó el programa llamado Manejo integrado de plagas (IPM, por sus siglas en inglés), que propone usar cantidades menores de plaguicidas utilizando otras tecnologías y métodos, por ejemplo, variedades de cultivos resistentes a plagas, bioinsecticidas (control biológico), trampas, y la rotación de cultivos. De tal forma que los plaguicidas se seguirían usando, pero en cantidad mucho más moderadas (Bruinsma, 2003).

Los nemátodos entomopatógenos (NE) tienen varias ventajas como agentes de control biológico. Un mismo nemátodo entomopatógeno puede controlar varios tipos de plagas, por lo que se les considera de amplio espectro. Son capaces de ser transportados por el agua y su presencia en los cultivos es mayor a la de los productos químicos (Ehlers, 2001). Presentan un estadio conocido como infectivo juvenil (IJ), siendo esta etapa particular la única que puede sobrevivir fuera del huésped y tiene la capacidad de encontrar e infectar nuevas presas (Tanada y Kaya, 1993)

Las principales familias utilizadas para el control biológico son *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, estos nemátodos están asociados con bacterias simbióticas, *Xenorhabdus* sp. para *Steinernema*, y *Photorhabdus* sp. para *Heterorhabditis* (Popiel & Hominick, 1992). Las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* han sido recuperadas de muchas regiones el mundo y sus bacterias simbiotas *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, son patógenas para una amplia variedad de larvas de insectos, una dosis < 5 unidades formadoras de colonias (UFC) inyectadas

directamente en el sistema sanguíneo de la larva de insecto, es suficiente para matarla de 48 a 72 h. (Goodrich-Blair & Clarke, 2007). En 2008, se identificó de un nuevo nemátodo entomopatógeno en Colombia, denominado *Steinernema colombiense*, que permite crear un campo nuevo de estudio y observación de este nemátodo, y sus posibles aplicaciones industriales como agente de control biológico (López-Núñez, Plichta, Góngora-Botero, & Stock, 2008). *Xenorhabdus nematophila*, es la bacteria comúnmente asociada simbióticamente con NE de la familia *Steinernematidae*. Esta bacteria es patógena para una amplia gama de insectos que pertenecen al orden Lepidoptera, Coleoptera y Diptera (Khandelwal, Bhatnagar, Choudhury, & Banerjee, 2004).

Los NE pueden producirse de forma masiva usando métodos de cultivo "*in vivo*" o "*in vitro*". La producción "*in vitro*" en medio líquido es la forma más rentable para producir NE (Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002). Las fermentaciones líquidas se están convirtiendo en una forma industrial común para producir diversas especies de NE. La rentabilidad de estos procesos está basada en la producción final de IJs/IJs inoculados, la virulencia y el tiempo de proceso Shapiro-Ilan, Han, & Qiu, 2014). Existen factores que pueden influir en la producción de NE, como es la temperatura, la concentración y tipo de grasas, la fuente de nitrógeno, y la concentración de carbohidratos (Chavarria-Hernandez & de la Torre, 2001; Hirao, 2009; Hirao & Ehlers, 2009a, 2009b; Islas-López, Sanjuan-Galindo, Rodríguez-Hernández, & Chavarría-Hernández, 2005; Yoo, Gaugler, Brown, & Cohen, 2001). La contaminación por microorganismos no simbiotes, es otro factor importante en la producción en medio líquido (Han, Cao, & Liu, 1992). La concentración de la bacteria simbiote antes de la inoculación de IJs en el medio de producción, es un factor determinante en la productividad de IJs, se ha recomendado concentraciones mayores de 10×10^{10} bacterias/mL (Hirao & Ehlers, 2009b). Entre los parámetros que favorecen el cultivo líquido de NE está el pH, la concentración de CO₂, la temperatura, la velocidad de relación de la agitación/aireación y la resistencia osmótica del medio no debe superar los 600 miliosmol/kg (Ehlers, 2001).

Aunque la producción industrial de algunas especies de nemátodos entomopatógenos ya se está realizando, ésta sigue siendo empírica. Falta un mayor entendimiento de todo el proceso, mucha de esta información se encuentra en patentes, por lo cual no está disponible para todo el público. Un ejemplo claro de esta problemática, es la información de la cinética de propagación de los NE en cultivos axénicos y monoxénicas, al igual que los requerimientos de oxígeno de los diferentes estadios de crecimiento. Se sabe que la operación de un biorreactor, depende de muchos factores, entre ellos está la cinética de crecimiento, las fuerzas de cizalla generadas durante el mezclado y el coeficiente global de transferencia de oxígeno (López-y-López, Chavarría-Hernández, Sumano-Fernández, & de-la-Torre, 2000).

Entre los problemas que se tienen que resolver en producción de NE en medio líquido, tenemos que, no existen publicaciones que mencionen los efectos causados por la población de los NE en las condiciones hidrodinámicas de los cultivos líquidos, así como de la transferencia de oxígeno al medio. Los caldos de cultivo generados durante la producción de NE en medio líquido son muy complejos, ya que tienen partículas dispersas de gran tamaño, como son los agregados proteicas del medio de producción, la bacteria simbiote y los mismos nemátodos (Chavarría-Hernández, Rodríguez-Hernández, Pérez-Guevara, & de la Torre, 2003; Nuñez-Ramírez, Medina-Torres, Calderas, & Sánchez-Olivares, 2015). Esto ha dificultado la medición de propiedades fisicoquímicas, como son la viscosidad y tensión superficial, temas que serán abordados en los próximos capítulos.

La utilización de reactores agitados orbitalmente en muchos procesos biotecnológicos se da desde principios de siglo XX, su uso extensivo se debe a su simplicidad, bajo costo y fácil operación. En la industria bioquímica, representa el primer paso de un proceso de producción, es muy importante usar este tipo de sistemas antes de escalarlo a nivel industrial, razón por la cual se aborda en este trabajo de investigación.

Referencias

- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2(1), 1-12. doi:10.2478/v10102-009-0001-7
- Bruinsma, J. (2003). *World agriculture: towards 2015/2030: an FAO perspective*: Earthscan.
- Chavarría-Hernández, N., & de la Torre, M. (2001). Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Letters*, 23(4), 311-315. doi:Doi 10.1023/A:1005694709366
- Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Hernández, A. I., Pérez-Guevara, F., & de la Torre, M. (2003). Evolution of culture broth rheological properties during propagation of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Progress*, 19(2), 405-409. doi:10.1021/bp025569d
- Ehlers, R.U. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 623-633.
- Goodrich-Blair, H., & Clarke, D. J. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol Microbiol*, 64(2), 260-268. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05671.x
- Han, R., Cao, L., & Liu, X. (1992). Relationship between medium composition, inoculum size, temperature and culture time in the yields of *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes (Vol. 15).
- Hirao, A. (2009). *Life cycle and development of entomopathogenic nematodes Steinernema carpocapsae and S. feltiae in monoxenic liquid culture*. (Erlangung des Doktorgrades), Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel.
- Hirao, A., & Ehlers, R. U. (2009a). Effect of temperature on the development of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84(6), 1061-1067. doi:10.1007/s00253-009-2035-3

- Hirao, A., & Ehlers, R. U. (2009b). Influence of cell density and phase variants of bacterial symbionts (*Xenorhabdus* spp.) on dauer juvenile recovery and development of biocontrol nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda: Rhabditida). *Appl Microbiol Biotechnol*, *84*(1), 77-85. doi:10.1007/s00253-009-1961-4
- Islas-López, M.-A., Sanjuan-Galindo, R., Rodríguez-Hernández, A.-I., & Chavarría-Hernández, N. (2005). Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulquero (*Agave* spp). Effects of the contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(1), 91-97. doi:10.1007/s00253-004-1818-9
- Khandelwal, P., Bhatnagar, R., Choudhury, D., & Banerjee, N. (2004). Characterization of a cytotoxic pilin subunit of *Xenorhabdus nematophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *314*(4), 943-949. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.187
- López-Núñez, J. C., Plichta, K., Góngora-Botero, C. E., & Stock, S. P. (2008). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), from Colombia. *Nematology*, *10*(4), 561-574.
- López-y-López, E., Chavarría-Hernández, N., Sumano-Fernández, P., & de-la-Torre, M. (2000). Fermentation processes for bioinsecticide production. An overview. *Recent Research Developments in Biotechnology & Bioengineering*, *3*, 1-20.
- Núñez-Ramírez, D. M., Medina-Torres, L., Calderas, F., & Sanchez-Olivares, G. (2015). Properties of the Entomoparasitic Nematodes (*Heterorhabditis bacteriophora*) Liquid Culture using a Helicoidal Ribbon Agitator as Rheometric System. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, *05*(02). doi:10.4172/2155-9821.1000207

- Popiel, I., & Hominick, W. M. (1992). Nematodes as Biological Control Agents: Part II. 31, 381-433. doi:10.1016/s0065-308x(08)60025-1
- Shapiro-Ilan, D., & Gaugler, R. (2002). Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 137 – 146. doi:10.1038/sj/jim/7000230
- Shapiro-Ilan, D. I., Han, R., & Qiu, X. (2014). Production of entomopathogenic nematodes *Mass production of beneficial organisms* (pp. 321-355): Elsevier.
- Tanada, Y., & Kaya, H. K. (1993). *Insect Pathology*. USA: Academic Press, Inc.
- Peer Review Only.
- Yoo, S.-K., Gaugler, R., Brown, I., & Cohen, N. (2001). Medium Concentration Influencing Growth of the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and its Symbiotic Bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 644-648.

Justificación

Aunque la producción industrial de algunas especies de nemátodos entomopatógenos ya se está realizando, esta tecnología aún presenta inconvenientes que deben mejorarse, como la formulación del medio de cultivo, el diseño del fermentador, las condiciones de operación y el modelado del proceso, entre otros. Y existen pocos estudios que reportan las propiedades físicas de los caldos de cultivo, aunque estos afectan directamente los procesos de fermentación aeróbica. Reportes sobre las propiedades reológicas de los caldos de cultivo durante producción de los NE son limitados, las especies estudiadas fueron *S. feltiae* y *H. megidis* (Young, Dunnill, & Pearce, 1998) y *S. carpocapsae* (Chavarría-Hernández, Rodríguez-Hernández, Pérez-Guevara, y de-la-Torre, 2003), donde encontraron un comportamiento pseudoplástico de los caldos de cultivo.

Entre los retos a vencer para tener una adecuada caracterización de las propiedades reológicas, tenemos que los caldos de cultivo NE son suspensiones complejas de cilindros flexibles (nemátodos), que además contienen otras partículas en suspensión (ejemplo, yema de huevo coagulada) y grasas presentes de la formulación del medio de cultivo.

La fracción volumétrica de partículas sólidas Φ (volumen total de las partículas dividido por el volumen de la dispersión) influye directamente en las propiedades físicas de la suspensión (Tadros, 2011); sin embargo, no hay informes de esta en los caldos de cultivo en la producción de NE. Otra propiedad importante a considerar en estos procesos, es la tensión superficial (σ ; N m^{-1}), debido a que afecta al área interfacial a través de la cual el oxígeno se difunde desde las burbujas de aire al caldo de cultivo, lo que permite la respiración tanto de los NE como de sus bacterias simbióticas (Belur, Inman, & Holmes, 2013; Chavarría Hernández, Pérez-Pérez, Chavarría-Hernández, Barahona-Pérez, y Rodríguez-Hernández, 2014; Villadsen, et al., 2011). Sin embargo, hasta ahora, no hay informes sobre σ y su evolución durante el cultivo líquido de los NE.

El presente trabajo trata sobre el cultivo líquido de *Steinernema colombiense*, en presencia de su bacteria simbiótica, *Xenorhabdus* sp. en un medio que contiene yema de huevo, donde los caldos de cultivo son suspensiones de partículas complejas. Se informa sobre la evolución de las concentraciones y fracciones de volumen de las partículas suspendidas (es decir, nemátodos y partículas de yema de huevo coaguladas), las propiedades reológicas y la tensión superficial de los caldos de cultivo.

Objetivos

Objetivo general

Contribuir al mejoramiento de las tecnologías de producción del nemátodo entomopatógeno *Steinernema colombiense* en reactor agitado orbitalmente, a través de un mayor entendimiento de los procesos básicos de transferencia de momento y masa, en suspensiones complejas de partículas flexibles en sistemas multifásicos inherentes a estas tecnologías de producción.

Objetivos específicos

- Determinar la cinética de crecimiento de nemátodo entomopatógeno *Steinernema colombiense* en medio líquido, considerando efectos diferenciados por estadio de desarrollo.
- Caracterizar reológicamente los caldos de fermentación durante la producción de *Steinernema colombiense*, a través de pruebas de cizalla simple estacionaria.
- Determinar la evolución de la tensión superficial de los caldos de fermentación en la producción del nemátodo entomopatógeno *Steinernema colombiense*.

Capítulo 1

Producción de nemátodos entomopatógenos en medio líquido, perspectivas y retos a vencer

Sixto-Josué Pérez-Campos^a, Adriana-Inés Rodríguez-Hernández^a, Ma. del Rocío López- Cuellar^a, René Sanjuán-Galindo^b, Norberto Chavarría-Hernández^a.

^a Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad km 1, Rancho Universitario, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, CP 43600, México.

^b Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, Instituto Tecnológico de Nuevo León, 16 Av. Eloy Cavazos 2001, Col. Tolteca en Guadalupe, Nuevo León, CP 67170, México.

sixtojosue@gmail.com

Frontera Biotecnológica. ISSN 2448-8461. No. 12. Pp. 10-18.

RESUMEN

En el mundo se están buscando tecnologías amigables con el medio ambiente que permitan minimizar el impacto del uso de compuestos químicos, que contaminan y dañan el medio ambiente. Los agentes de control biológico, son una alternativa propuesta a estos problemas. En los próximos años, el control biológico representará una derrama económica importante a nivel mundial, alrededor de \$ 4 mil millones de dólares para 2023. El presente trabajo expone el rol que puede tener la utilización de nemátodos entomopatógenos (NE) en este mercado, expone la importancia de los sistemas de producción haciendo un énfasis en el cultivo líquido, y muestra algunas áreas de oportunidad para mejorar los rendimientos finales de estos procesos.

ABSTRACT

In the world they are looking friendly technologies that minimize environmental impact of the use of chemicals which contaminate and damage the environment. The agents of biological control, is a proposed alternative to these problems. For the next few years, biological control will represent an important global economic impact, about \$ 4 billion for 2023. This paper describes the role that can have the use of entomopathogenic nematodes (EN) in this market, also, exposes the importance of the production systems with an emphasis on liquid culture, and shows some areas of opportunity to improve the final yields of these processes.

Palabras clave: Bioinsecticidas; cultivo liquido; nemátodos entomopatógenos.

1. INTRODUCCIÓN

Los pesticidas se han utilizado para prevenir o controlar plagas, maleza o enfermedades, con la finalidad de obtener un adecuado rendimiento de los cultivos. Y aunque su uso ha sido efectivo, se han expresado preocupaciones en todo el mundo por la presencia de estos compuestos en alimentos, aire, agua potable y suelo. Además de demostrar efectos perjudiciales para la vida silvestre, peces, plantas y otros insectos no objetivo (Bruinsma, 2003; Damalas & Eleftherohorinos, 2011).

Existen programas como el "Manejo integrado de plagas" (IPM por sus siglas en inglés) propuesto por la FAO, que propone usar cantidades menores de plaguicidas utilizando otras tecnologías, por ejemplo, variedades de cultivos resistentes a plagas, bioinsecticidas (control biológico), trampas o la rotación de cultivos. De tal forma que los plaguicidas se seguirían usando, pero en cantidades mucho más moderadas (Bruinsma, 2003). El uso de bioinsecticidas se ha convertido en alternativas reales en un mercado de constante crecimiento, que se estima que tendrá una participación de \$4.5 mil millones de dólares en 2023

(Olson, 2015). Actualmente el bioinsecticida más usado es la toxina purificada de *Bacillus thuringiensis*, con una participación del 75% de uso de bioinsecticidas en todo el mundo (Olson, 2015). Entre los bioinsecticidas microbianos, los nemátodos entomopatógenos (NE) se han utilizado con éxito para el control biológico de una amplia gama de plagas de insectos (Shapiro-Ilan, Han, & Qiu, 2014). En México, existen pocas empresas como Koppert México que comercializan geles de *S. carpocapsae*, por lo que México pudiera representar, una zona importante de comercialización de estos productos en los próximos años.

Los NE son capaces de ser transportados por el agua y su tiempo de acción en los cultivos es mayor (hasta 2 meses) a la de los productos químicos, por lo que se les considera de alto valor comercial (Ehlers, 2001). Los NE son seguros para ser aplicados cerca de humanos, ganado y plantas. La estrecha relación entre los nemátodos y sus contrapartes bacterianas, contribuyen a la seguridad y eficacia en su uso como agentes para el control biológico (Boemare, Laumond, & Mauleon, 1996; Ehlers & Hokkanen, 1996).

Las principales familias utilizadas para el control biológico son *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*, estos nemátodos se asocian de manera simbiótica con bacterias como *Xenorhabdus* sp., y *Photorhabdus* sp., respectivamente (Popiel & Hominick, 1992). La presencia de las bacterias simbiotas en el medio de producción es importante debido a que funcionan como su principal fuente de alimento, y contribuyen al desarrollo y reproducción de NE (Forst & Neelson, 1996).

Los NE pueden producirse de forma masiva usando métodos de cultivo "*in vivo*" o "*in vitro*". La producción "*in vitro*" en medio líquido es la forma más rentable para producir NE (Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002). Las fermentaciones líquidas se están convirtiendo en una forma industrial común para producir diversas especies de NE (Shapiro-Ilan , Han, & Qiu, 2014).

Existen investigaciones relacionadas con la formulación de medios de cultivo, la cinética de crecimiento de población de NE, el diseño del biorreactor y las

condiciones de operación, entre otros aspectos importantes. Sin embargo, se necesitan más estudios relacionados con las propiedades fisicoquímicas de los caldos de cultivo, como son: la tensión superficial, viscosidad y evaluación de las partículas en suspensión, entre otras, esto contribuiría a esclarecer cómo estas propiedades influyen en la transferencia de oxígeno. Estudios sobre la tasa respiratoria también son necesarios para determinar los requerimientos mínimos de operación de los reactores y las condiciones de almacenamiento de estas especies. El objetivo de este trabajo es explicar generalidades de cómo es el proceso de producción de NE en medio líquido y establecer algunas áreas de oportunidad para mejorar los procesos de producción de NE.

2. FENOTIPOS DE LAS BACTERIAS SIMBIONTES DE LOS NE

Las bacterias simbiotes presentan dos tipos de fase, estas difieren morfológicamente y fisiológicamente. Para diferenciar las fases se puede utilizar un medio de cultivo diferencial como NBTA (Nutrient Bromothymol blue Triphenyltetrazolium chloride Agar), que está constituido por agar nutritivo, azul de bromotimol y cloruro de feniltetrazolio (TTC). En este medio, la forma primaria o fase 1, absorbe el azul de bromotimol y reduce el TTC, produciendo colonias con un núcleo rojo superpuesto por un azul oscuro y rodeadas de un halo claro; la forma secundaria o fase 2, reduce el TTC pero no absorbe el azul bromotimol, produciendo un color rojo marrón (Akhurst, 1980). En la fase 1, las células son más grandes y tienen alta movilidad por la presencia de flagelos peritricosos. Llevan proteínas de inclusión y producen metabolitos secundarios, endoenzimas y exoenzimas como proteasas, lecitinasas y antibióticos. Para el caso de *Photorhabdus*, produce bioluminiscencia. Además, la fase 1, proporciona y protege los nutrientes esenciales para los NE, mata y metaboliza al huésped evitando la pudrición debido a la gran cantidad de antibióticos producidos. La bacteria simbiote *Xenorhabdus* coloniza la vesícula de los nemátodos del género *Steinernema*, mientras que *Photorhabdus* coloniza el extracto intestinal de los *Heterorhabditis* (Ferreira & Malan, 2014). La fase 2 de las bacterias simbiotes puede llegar a matar al huésped (Wang, Bilgrami, Shapiro-Ilan, & Gaugler, 2007).

Sin embargo, para ambas bacterias simbiotes, la fase 2 es menos eficaz para mantener las condiciones de crecimiento de los NE (Wang et al., 2007). En la fase 2, disminuye la producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios, aumentando la producción de enzimas respiratorias y tween-esterasas (Boemare & Akhurst, 1988; Boemare & Akhurst, 2006; Ferreira & Malan, 2014; Forst & Neelson, 1996).

3. CICLO DE VIDA DE LOS NE

El ciclo de vida de los NE inicia con un estadio llamado “infectivo juvenil” (IJ’s), este se caracteriza por no comer, debido a que están adaptados morfológicamente y fisiológicamente para sobrevivir tiempos largos en la tierra (Woodring & Kaya, 1988). Cuando los IJ’s encuentran un huésped (larva de insecto), entran en la cavidad interior por orificios naturales como boca, ano o directamente por la cutícula (si tiene una herida), liberan su bacteria simbiote en el hemocele del insecto, esta se multiplica rápidamente y mata al insecto por septicemia, generalmente dentro de 24 a 48 h. Los tejidos del hospedero y la bacteria simbiote proporcionan un medio rico para el crecimiento de los NE. Los nemátodos empiezan a comer debido a señales que reciben de la bacteria simbiote (Goodrich-Blair & Clarke, 2007) y cambian al estadio J4, posteriormente pasan a la quinta etapa en la que se convierten en adultos de primera generación. En el caso de los NE del género *Steinernema*, se da el apareamiento y las hembras ponen huevos que eclosionan como juveniles de primera etapa (J1), posteriormente; siguen el ciclo: J1 ➡ J2 ➡ J3 ➡ J4 ➡ Adulto. Este ciclo se repite hasta que existe un agotamiento de los nutrientes por lo que se forma una generación de IJ’s que salen de la larva para buscar un nuevo huésped (Ehlers, 2001).

El ciclo de vida de *Heterorhabditis* es también similar a la de *Steinernema*, pero los adultos de primera generación son hembras hermafroditas. Para la segunda generación de adultos, la reproducción se da sexualmente, por lo que se presentan machos y hembras (Johnigk & Ehlers, 1999).

La cinética de crecimiento de los NE en medio líquido es muy similar al presentado en larva, en la figura 1, se muestran la curva de crecimiento de *S. colombiense* en medio líquido. Una vez inoculados los nemátodos en el estadio IJ (día 0), estos se recuperaron rápidamente convirtiéndose en adultos (jóvenes) al día 2, para el día 4, estos ya eran adultos bien desarrollados y en la etapa de reproducción, gran cantidad de huevecillos y nemátodos en la fase J1 fueron capaces de ser observados. Al día 6, gran parte de la población total se encontraba en la fase J3/IJ. Las condiciones del medio fueron adecuadas para que los nemátodos J3 siguieran desarrollándose a J4 y adultos de segunda generación. A partir del día 8, no se presentaron cambios significativos en la población de los NE. Para el día 10, la población total era de 58,771 NE/mL, donde el 87% de población eran IJ's (Pérez-Campos, Rodríguez-Hernández, López-Cuellar, Zepeda-Bastida & Chavarría-Hernández, 2018). En los siguientes capítulos, se discutirán más generalidades del cultivo líquido.

4. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE NE

4.1 Producción “*in vivo*”

Los nemátodos entomopatógenos pueden ser producidos en masa usando métodos de cultivo “*in vivo*” o “*in vitro*”. El método “*in vivo*” se usa para la producción a escala laboratorio, generar material para pruebas de campo y pequeñas empresas productoras como cooperativas agrícolas (Shapiro-Ilan, Gaugler, Tedders, Brown, & Lewis, 2002). Para la producción “*in vivo*” se utiliza la trampa White (Figura 2), donde las larvas de insecto son infectadas en una bandeja o plato con papel absorbente, después de 2 a 7 días los cadáveres infectados son trasladados a un plato de cosecha que contiene agua, finalmente los IJ's migran al agua y son recuperados. El insecto huésped más estudiado para el cultivo “*in vivo*” es la larva de la polilla de cera (*Galleria mellonella*), pero el gusano de la harina (*Tenebrio molitor*) también se ha considerado para el cultivo de nemátodos, sin embargo se han realizado pocos estudios (Gaugler, Brown, Shapiro-Ilan, & Atwa, 2002).

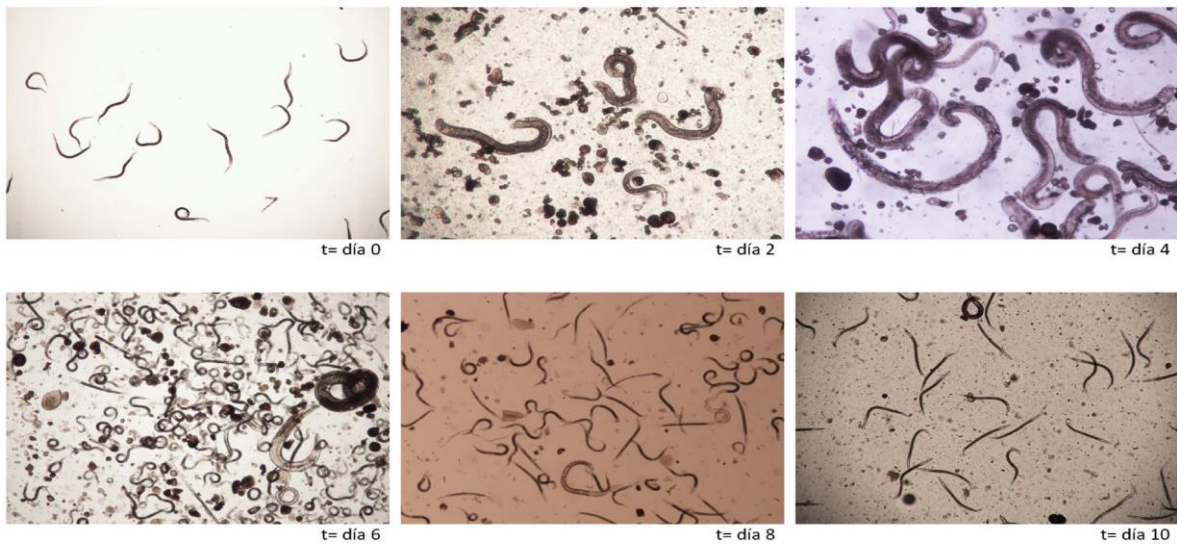


Figura 1 Evolución del crecimiento de *S. colombiense* y su simbiote *Xenorhabdus* sp. en matraces cilíndricos con agitación orbital. Condiciones de operación: 130 rpm y 28 °C. Microfotografías tomadas con objetivo 40x en un microscopio de campo claro (Nikon 80i).



Figura 2 Trampa White (*Galleria mellonella* infectada con *S. colombiense*)

4.2 Producción “*in vitro*” en medio sólido

Para la producción de NE en medio sólido, se realiza un cultivo monóxenico, donde primero se hace una fermentación de la bacteria simbiote y posteriormente se inoculan los NE. Las ventajas del cultivo “*in vitro*” en medio sólido son similares a las del cultivo “*in vivo*”. La inversión inicial y el nivel de conocimientos técnicos son bajos comparados con otros métodos. Entre las desventajas de este método tenemos que, a escalas mayores de producción, su principal limitante es el tamaño de la autoclave para la esterilización y el área con ambiente estéril para la inoculación (Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002).

La producción de medio sólido inició con la utilización de cajas petri con medios de producción basados en comida para perros, riñón de cerdo, sangre de res y usando agares nutritivos (Wouts, 1981). Posteriormente, se desarrolló el método Bedding (Bedding, 1981), donde se usan matraces Erlenmeyer con espuma de poliuretano, después de un tiempo, los matraces fueron reemplazados con bolsas esterilizables con un sistema de bombeo de aire estéril (Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002). Entre los factores que son importantes a considerar en esta tecnología son la temperatura, en tamaño del biorreactor y la concentración de nutrientes.

4.3 Producción “*in vitro*” en medio líquido

La rentabilidad de estos procesos se basa en el rendimiento (producción final de $IJ's_{\text{producidos}}/IJ's_{\text{inoculados}}$), el tiempo de proceso, la capacidad de virulencia, tolerancia ambiental y capacidad de búsqueda de hospedadores; esta última conducirá a menores costos debido a que el tratamiento en campo requerirá menos NE/m² (Shapiro-Ilan et al., 2014). La producción *in vitro* en medio líquido, es el proceso más rentable para la producción de nemátodos entomopatógenos (Ehlers, 2001). El costo de producir 1 millón NE de *S. carpocapsae* es una décima parte del costo de producirlo *in vivo* usando *G. mellonella*. La eficacia de este proceso se debe a que al ir escalando el proceso, el costo de producción por unidad disminuye (Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002). La producción en medio líquido se realiza usando cultivos monoxénicos. La concentración de la bacteria simbiote

antes de la inoculación de IJ's en el medio de producción, es otro factor determinante en la productividad de IJ's de *S. carpocapsae* y *S. feltiae*, hasta ahora se ha reportado que las concentraciones ideales de inóculo deben ser mayores de 10×10^{10} bacterias/mL (Hirao & Ehlers, 2009b). Además, entre los parámetros que favorecen el cultivo líquido de NE está el pH, la concentración de CO₂, la temperatura, la velocidad de relación de la agitación/aireación y la concentración de nutrientes; por ejemplo, la concentración de minerales no debe generar una resistencia osmótica del medio superior a 600 miliosmol/kg (Ehlers, 2001).

En la producción de NE en medio líquido como en cualquier bioproceso, se debe tomar en cuenta los requerimientos nutricionales de la especie que se desea producir, pero otro factor clave es el suministro de oxígeno al medio, esto debido a su baja solubilidad en el agua. La concentración de oxígeno disuelto depende de las propiedades fisicoquímicas del medio (viscosidad, tensión superficial, densidad, etc.), la concentración de microorganismos, el volumen del medio, el diseño del reactor, velocidad del agitador y los esfuerzos cortantes (García-Ochoa, Gómez, Santos, & Merchuk, 2010). Entre los reactores que se han utilizado en la producción de NE tenemos a los reactores agitados orbitalmente, los agitados mecánicamente y los Air-lift (tabla 1). Para evitar un cambio de fase de la bacteria simbionte debe mantenerse una concentración de oxígeno disuelto de al menos el 30% (Shapiro-Ilan et al., 2014). Aunque la producción industrial de NE de algunas especies de nemátodos ya se está realizando, ésta sigue siendo empírica. Falta un mayor entendimiento de todo el proceso, mucha de esta información se encuentra en patentes (Friedman, Langston, & Pollitt, 1991; Pace, Grote, Pitt, & Pitt, 1986), por lo cual no está disponible para todo el público. Un ejemplo claro de esta problemática, es la información de la cinética de propagación de los NE en cultivos axénicos y monoxénicos, al igual que la de los requerimientos de oxígeno de los diferentes estadios de crecimiento de los nemátodos. Por otra parte, no existen publicaciones que mencionen los efectos causados a la población de los NE por las condiciones hidrodinámicas en los cultivos líquidos, así como de la

transferencia de oxígeno al medio. Se sabe que la operación de un biorreactor, depende de muchos factores, entre ellos está la cinética de crecimiento, las fuerzas de cizalla generadas durante el mezclado y el coeficiente global de transferencia de oxígeno (López-y-López, Chavarría-Hernández, Sumano-Fernández, & de-la-Torre, 2000). Todos ellos se ven afectados por las condiciones hidrodinámicas, que dependen de la geometría usada, al igual que las condiciones de operación y algunas propiedades fisicoquímicas, como la viscosidad del caldo de fermentación.

Por tanto, entre los principales retos a vencer en los sistemas de producción en líquido está el costo y eficiencia del suministro de oxígeno en el sistema, así como la cizalla excesiva que pudiera dañar a los NE. Estos problemas de oxigenación y velocidad de agitación se pueden agravar debido a la viscosidad de los caldos de fermentación y la formación de espuma, debida al tipo y concentración de proteínas usadas en la formulación del medio. En la tabla 1, se presentan los trabajos realizados en la producción de diferentes NE en medio líquido.

Tabla 1 Trabajos sobre la producción de nemátodos entomopatógenos *in vitro* en medio líquido usando biorreactores.

Especie de nemátodo	Concentración inicial (JI/mL)	Concentración final (JI/mL)	Tipo de reactor	Tiempo de proceso (días)	Oxígeno	Volumen de operación	Tipo de impulsor o recirculación	Referencia
<i>Steinernema feltiae</i>	2,000	95,000	Agitado mecánicamente (Braun series E)	10	50% de saturación	10 L	NR	Pace, Grote, Pitt, & Pitt (1986)
<i>Steinernema feltiae</i>	2,000	90,000	Air Lift (Braun series E)	10	20% de saturación	20 L	Columna de burbujeo	Pace et al. (1986)
* <i>Neoaplectana carpocapsae</i>	1,000	158,000	Agitación orbital (125 rpm), frascos de 125 mL	7	NR	30 mL	NA	Friedman, Langston, & Pollitt (1991)
<i>Steinernema carpocapsae</i>	8 x 10 ⁵	30 x 10 ⁶	Agitación orbital (125 rpm), frascos cónicos de 500 mL	16	NR	100 mL	NA	Han (1996)
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	56 x 10 ⁵	30 x 10 ⁶	Agitación orbital (125 rpm), frascos cónicos de 500 mL	12	NR	100 mL	NA	Han (1996)
<i>Steinernema carpocapsae</i> CABA01	1,000	250,000	Air Lift	16	1.9 < K _{La} (10 ⁻² s ⁻¹) < 3.5	4 L	Recirculación interna	Chavarría-Hernández et al. (2011)
<i>Steinernema feltiae</i>	500	140,000-200,000	Agitación orbital (130 rpm), frascos (250 mL).	7	NR	50 mL	NA	Chavarría-Hernández & de la Torre (2001)
<i>Steinernema carpocapsae</i>	442	65,887	Agitación orbital (150 rpm), frascos (500 mL).	16	NR	50 mL	NA	Islas-López et al. (2005)
<i>Steinernema carpocapsae</i>	500	126,666	Agitación orbital (150 rpm), frascos (420 mL).	24	NR	50 mL	NA	Chavarría-Hernández et al. (2006)
<i>Steinernema colombiense</i>	1,000	50,895	Agitación orbital (130 rpm), frascos (500 mL).	10	NR	10 y 20 mL	NA	Pérez-Campos et al. (2018)

Neoaplectana posteriormente fue clasificado a *Steinernema*.

NR: No reportado, NA; No aplica. K_{La}: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

5. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE NE EN MEDIO LÍQUIDO

Aunque los nemátodos *Steinernema* y *Heterorhabditidae* comparten semejanzas en los requerimientos básicos de aeración, las estrategias para maximizar el rendimiento en las 2 familias son muy diferentes, debido a los ciclos de vida y a la biología reproductiva de cada especie. Para *Steinernema*, los nemátodos se reproducen sexualmente, por lo que a condiciones excesivas de flujo dentro del bioreactor, los nemátodos son incapaces de reproducirse, pues para que suceda el apareamiento, el macho debe enredarse en la hembra. Por otra parte, para los nemátodos de la familia *Heterorhabditidae* esto no es un problema, debido a que la primera generación de hembras es hermafrodita. En la segunda generación de adultos, estos nemátodos son sexuados por lo que la optimización en la producción debe centrarse en la primera generación (Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002).

La capacidad infectiva de NE producidos en medio líquido también ha sido evaluada, para *H. Bacteriophora*, donde se ha observado que puede presentar una disminución de la capacidad infectiva debido a los ingredientes del medio de cultivo, sobre todo el contenido de lípidos. Para NE del género *Steinernema* como *S. carpocapsae* y *S. riobrave* no encontraron diferencia significativas en la capacidad infectante (Gaugler & Georgis, 1991).

Diversos factores pueden influir en la producción de nemátodos entomopatógenos del género *Steinernema*, como son temperatura, la concentración y tipo de grasas, la fuente de nitrógeno y la concentración de carbohidratos (Chavarria-Hernandez & de la Torre, 2001; Hirao & Ehlers, 2009a, 2009b; Islas-López et al., 2005; Yoo, Gaugler, Brown, & Cohen, 2001). La fase 2 de la bacteria simbiote, puede influir en el rendimiento de IJ's; este efecto se ha observado en nemátodos del género *Heterorhabditis* (Han & Ehlers, 2001; Inman-III, Singh, & Holmes, 2012) y en NE del género *Steinernema* como *S. feltiae* y *S. Carpopcapsae* (Hirao & Ehlers, 2009b).

Determinar la tasa respiratoria de los microorganismos que se están produciendo en un reactor, establece las condiciones de operación que debe tener el sistema para que éstos se desarrollen adecuadamente sin condiciones de estrés que perjudique el rendimiento final o la producción de metabolitos secundarios de interés (García-Ochoa, Gómez, Santos, & Merchuk, 2010). Para el caso de la tasa respiratoria de los NE ha sido poco estudiada, existen reportes de la tasa respiratoria de *S. feltiae*, *S. carpocapsae*, *S. carpocapsae* CABA01 y *Photorhabdus luminescens* antes de producción de *Heterorhabditis* (Belur, Inman, & Holmes, 2013; Chavarría-Hernández, Pérez-Pérez, Chavarría-Hernández, Barahona-Pérez, & Rodríguez-Hernández, 2017; Lindegren, Rij, Ross, & Fouse, 1986; Qiu & Bedding, 2000). Se necesitan más trabajos que relacionen la tasa respiratoria y la transferencia de oxígeno durante la producción de NE en medio líquido. De esta forma, sabremos qué condiciones favorecen la producción final de IJ's. En la tabla 2 se muestran los trabajos que determinan la tasa respiratoria de NE.

5.1 Efecto de las propiedades fisicoquímicas en la producción de NE

Las propiedades fisicoquímicas de los caldos de fermentación en la producción de cualquier microorganismo, son importantes ya que influyen en la transferencia de oxígeno que está definida por el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (K_{La}). Entre las propiedades fisicoquímicas que influyen en la producción de NE en medio líquido tenemos a la viscosidad y tensión superficial.

5.1.1 Viscosidad

Para reactores agitados mecánicamente y reactores agitados orbitalmente, el aumento de la viscosidad provoca una disminución importante en el K_{La} , incluso al aumentar el número de impulsores en reactores agitados mecánicamente (Ducci & Weheliye, 2014; García-Ochoa & Gómez, 1998). Para reactores Air-lift, también se observó una disminución del K_{La} debido al aumento de la viscosidad, pero este no se vio afectado dramáticamente como en los reactores agitados mecánicamente (García-Ochoa & Gómez, 2009).

La viscosidad de los caldos de fermentación de los NE ha sido estudiada por pocos autores, donde se reporta que debido a la fermentación de la bacteria simbiote, el crecimiento y reproducción de los NE, se obtienen fluidos no newtonianos con comportamiento pseudoplástico (Chavarría-Hernández, Rodríguez-Hernández, Perez-Guevara, & de la Torre, 2003; Nuñez-Ramirez, Medina-Torres, Calderas, & Sanchez-Olivares, 2015; Young, Dunnill, & Pearce, 1998), que han sido ajustados al modelo de Oswald-de Waele (Ecu. 1) donde se reportan dos parámetros reológicos: k (índice de consistencia, Pa s^n) y n (índice de flujo, adimensional) (Steffe, 1996). De forma general, los reportes sugieren que los cambios de viscosidad y comportamiento pseudoplástico se deben a la desintegración de los cadáveres de los NE y las hembras consumidas por un proceso llamado “endotokia matricida”, este consiste en que la hembra no expulsa todos los huevecillos, eclosionando dentro de ella y consumiendo su cuerpo (Chavarría-Hernández et al., 2003; Young et al., 1998), además de la posible producción de polisacáridos por las bacterias simbiotes (Young et al., 1998). Sin embargo, la determinación de la viscosidad en los caldos de fermentación es compleja debido a la presencia de partículas en suspensión; éstas se forman principalmente por la agregación de proteínas que forman parte del medio de producción y los NE, este último podemos definirlo como partículas cilíndricas inertes.

$$\text{Ec. 1 } \eta = k * \dot{\gamma}^{n-1}$$

Estudios realizados por Albert Einstein fueron los primeros en reportar el efecto de la concentración de partículas en suspensión sobre la viscosidad, definiendo la fracción volumétrica crítica (Φ_p), ésta se caracteriza por ser la concentración de partículas, donde se observa un aumento súbito de viscosidad (Tadros, 2011). El valor de la fracción volumétrica crítica depende de la morfología, la distribución, la interacción de las partículas y la matriz reológica de la solución (Shewan & Stokes, 2015). Actualmente se han propuesto nuevos modelos para interpretar el comportamiento de las partículas en suspensión en régimen concentrado, pero el

modelo de Albert Einstein y Bachelor sigue siendo aceptado en régimen diluido ($\Phi < 0.05$) y semidiluido ($\Phi < 0.15$) (Tadros, 2011).

Para partículas esféricas rígidas como microgeles de agarosa mono y poli-dispersas, vidrio, látex y partículas de polimetilmetacrilato (PMMA), reportan valores de Φ_p que van de 0.59 a 0.71 (Shewan & Stokes, 2015). Para suspensiones de partículas suaves como microgeles de agarosa y microgeles de poliacrilato se reportan Φ_p de 0.3 (Shewan & Stokes, 2015). De forma general, a concentraciones menores de 0.15~0.2 de la fracción volumétrica, no se observan cambios significativos en las propiedades del flujo de la fase continua donde se encuentran inmersas las partículas en suspensión.

La presencia de partículas en suspensión además de modificar la viscosidad, modifican la densidad aparente, pueden presentar una afinidad por oxígeno y ejercen efectos estéricos que modifiquen la trayectoria de las burbujas, aumentando el tiempo de residencia o causar la coalescencia, por lo que todos en conjunto pueden modificar el K_{La} (Freitas & Teixeira, 2001; Littlejohns & Daugulis, 2007; Mena, Ferreira, Teixeira, & Rocha, 2011; Pino-Herrera et al., 2018).

Las partículas en suspensión propias del medio al igual que la diversidad poblacional de los NE, juegan un papel importante en el comportamiento al flujo de estos sistemas. Los NE pueden considerarse como partículas cilíndricas inertes, esto principalmente a que las interacciones moleculares entre los nemátodos y las partículas del medio se pueden considerar como despreciables.

Actualmente no existen reportes del comportamiento al flujo de los NE, estos datos son importantes, debido a que pueden ayudar a determinar la velocidad máxima de cizalla que debe controlarse durante la producción de NE. Existen pocos trabajos que pudieran servir como modelo para entender el comportamiento de NE al flujo, estudios realizados a partículas cilíndricas, inertes y rígidas de hematita coloidal, muestran un alineamiento de las partículas al flujo a medida que aumenta la relación largo/ancho y la velocidad de cizalla, esta alineación depende mucho de la matriz polimérica (medio continuo) en la que se encuentren y la

viscosidad del medio (Gunes, Scirocco, Mewis, & Vermant, 2008). Otros estudios realizados a partículas cilíndricas inertes de propionato de acetato de celulosa con tamaños similares a los NE ($d: 50\mu\text{m} \pm 2.3$ y $L=1.18 \text{ mm} \pm 0.06$), mostraron una alineación al flujo con velocidades de cizalla de 0.1 a 10 s^{-1} (Iso, Koch, & Cohen, 1996). Por otra parte, estudios de cizalla simple estacionaria realizados a caldos de cultivo con NE, muestran que a concentraciones mayores de 230,000 NE/mL, se observa un aumento de la viscosidad (Nuñez-Ramirez et al., 2015).

De forma general, la concentración de partículas en suspensión y la concentración NE puede ser un factor determinante en los valores de viscosidad y por lo tanto, en la transferencia de oxígeno al medio.

5.1.2 Tensión superficial

Otra propiedad fisicoquímica que se tiene que tomar en cuenta para la producción de sistemas biológicos es la tensión superficial; una alta tensión superficial puede generar la coalescencia de las burbujas, disminuyendo el K_{La} en los reactores burbujeados (Ruzicka, 2008). Estudios de la tensión superficial sobre la producción de NE no existen. En los diversos tipos de reactores esta propiedad está relacionada con el número de Weber ya que relaciona la deformación de burbujas y gotas en ascenso libre o en colisiones con un obstáculo donde los efectos dinámicos son importantes. Bajos valores del número de Weber significa baja deformación y viceversa. La tensión superficial en la producción NE se debe considerar desde la formulación del medio de producción y se debe tener en cuenta la producción de metabolitos secundarios, endoenzimas y exoenzimas como proteasas, lecitinasas por parte de la bacteria simbiote, que pudieran modificar la tensión superficial durante el proceso de producción.

6. CONCLUSIÓN

El cultivo líquido es la forma más rentable de producir NE y aunque se tienen conocimientos técnicos de las necesidades nutrimentales (lípidos, carbohidratos, proteínas, etc.), se necesitan más estudios de las propiedades fisicoquímicas de los caldos de cultivo y su evolución durante la fermentación. Las propiedades fisicoquímicas que se deben considerar en la producción líquida, son la tensión superficial e interfacial, la viscosidad y la densidad aparente, estas dos últimas pueden ser modificadas por la concentración de partículas en suspensión, por lo que es otro factor a considerar. Estudiar las propiedades fisicoquímicas de los caldos de cultivo durante la producción de NE, permitirá entender cómo se da el proceso de transferencia de oxígeno y obtener mejores rendimientos de IJ's. Otros factores importantes para fijar las condiciones de operación más adecuadas en un bioreactor, son la tasa de respiración de las bacterias simbiotas y de los NE.

7. REFERENCIAS

- Akhurst, R. J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121, 303-309.
- Bedding, R. A. (1981). Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica*, 27, 109-114.
- Belur, P. D., Inman, F. L., & Holmes, L. D. (2013). Determination of specific oxygen uptake rate of *Photorhabdus luminescens* during submerged culture in lab scale bioreactor. *Biocontrol Science and Technology*. 23(12), 1458-1468.
- Boemare, N., & Akhurst, R. (1988). Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp.(Enterobacteriaceae). *Microbiology*, 134(3), 751-761.

- Boemare, N., & Akhurst, R. (2006). The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, 451-494.
- Boemare, N., Laumond, C., & Mauleon, H. (1996). The Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complex: Biology, Life Cycle and Vertebrate Safety. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 333-346.
- Bruinsma, J. (2003). *World agriculture: towards 2015/2030: An FAO perspective*: Earthscan.
- Chavarría-Hernandez, N., & de la Torre, M. (2001). Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Letters*, 23(4), 311-315.
- Chavarría-Hernández, N., Espino-García, J.-J., Sanjuan-Galindo, R., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2006). Monoxenic liquid culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using a culture medium containing whey. *Journal of Biotechnology*, 125(1), 75-84.
- Chavarría-Hernández, N., Pérez-Pérez, N.-C., Chavarría-Hernández, D. N., Barahona-Pérez, L.-F., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2014). Specific oxygen uptake of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* CABA01 in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*, 24(7), 723–733.
- Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Hernández, A. I., Pérez-Guevara, F., & de la Torre, M. (2003). Evolution of culture broth rheological properties during propagation of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Progress*, 19(2), 405-409.
- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(12), 1402-1419.
- Ducci, A., & Weheliye, W. H. (2014). Orbitally shaken bioreactors-viscosity effects on flow characteristics. *AIChE Journal*, 60(11), 3951-3968.
- Ehlers, R.-U. (2001). Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 623-633.

- Ehlers, R. U., & Hokkanen, H. M. T. (1996). Insect Biocontrol with Non-endemic Entomopathogenic Nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp.): Conclusions and Recommendations of a Combined OECD and COST Workshop on Scientific and Regulatory Policy Issues. *Biocontrol Science and Technology*, 6(3), 295-302.
- Ferreira, T., & Malan, A. P. (2014). Xenorhabdus and Photorhabdus, Bacterial Symbionts of the Entomopathogenic Nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis* and their *in vitro* Liquid Mass Culture: A Review. *African Entomology*, 22(1), 1-14.
- Forst, S., & Neelson, K. (1996). Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological reviews*, 60(1), 21.
- Freitas, C., & Teixeira, J. A. (2001). Oxygen mass transfer in a high solids loading three-phase internal-loop airlift reactor. *Chemical Engineering Journal*, 84(1), 57-61.
- Friedman, M. J., Langston, S. E., & Pollitt, S. (1991). USA Patent No. 5,023,183. T. U. S. P. a. T. Office.
- Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (1998). Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. *Biochemical Engineering Journal*, 1(1), 1-10.
- Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv*, 27(2), 153-176.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., & Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 289-307.
- Gaugler, R., Brown, I., Shapiro-Ilan, D., & Atwa, A. (2002). Automated technology for *in vivo* mass production of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 24, 199–206.

- Gaugler, R., & Georgis, R. (1991). Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*). *Biological Control*, 1(4), 269-274.
- Goodrich-Blair, H., & Clarke, D. J. (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Mol Microbiol*, 64(2), 260-268.
- Gunes, D. Z., Scirocco, R., Mewis, J., & Vermant, J. (2008). Flow-induced orientation of non-spherical particles: Effect of aspect ratio and medium rheology. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 155(1-2), 39-50.
- Han, R., & Ehlers, R.-U. (2001). Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the *in vivo* and *in vitro* development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(3), 239-247.
- Han, R. C. (1996). The Effects of Inoculum Size On Yield of *Steinernema Carpocapsae* and *Heterorhabditis Bacteriophora* in Liquid Culture. *Nematologica*, 42(5), 546-553.
- Hirao, A., & Ehlers, R. U. (2009a). Effect of temperature on the development of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84(6), 1061-1067.
- Hirao, A., & Ehlers, R. U. (2009b). Influence of cell density and phase variants of bacterial symbionts (*Xenorhabdus* spp.) on dauer juvenile recovery and development of biocontrol nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda: Rhabditida). *Appl Microbiol Biotechnol*, 84(1), 77-85.
- Inman-III, F. L., Singh, S., & Holmes, L. D. (2012). Mass production of the beneficial nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and its bacterial symbiont *Photorhabdus luminescens*. *Indian Journal of Microbiology*.
- Islas-López, M.-A., Sanjuan-Galindo, R., Rodríguez-Hernández, A.-I., & Chavarría-Hernández, N. (2005). Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulquero (*Agave* spp). Effects of the

- contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(1), 91-97.
- Iso, Y., Koch, D. L., & Cohen, C. (1996). Orientation in simple shear flow of semi-dilute fiber suspensions 1. Weakly elastic fluids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 62(2-3), 115-134.
- Johnigk, S.-A., & Ehlers, R.-U. (1999). Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematology*, 1(3), 251-260.
- Lindegren, J. E., Rij, R. E., Ross, S. R., & Fouse, D. C. (1986). Respiration rate of *Steinernema feltiae* infective juveniles at several constant temperatures. *Journal of Nematology*, 18(2), 221–224.
- Littlejohns, J. V., & Daugulis, A. J. (2007). Oxygen transfer in a gas–liquid system containing solids of varying oxygen affinity. *Chemical Engineering Journal*, 129(1-3), 67-74.
- López-y-López, E., Chavarría-Hernández, N., Sumano-Fernández, P., & de-la-Torre, M. (2000). Fermentation processes for bioinsecticide production. An overview. *Recent Research Developments in Biotechnology & Bioengineering*, 3, 1-20.
- Mena, P., Ferreira, A., Teixeira, J. A., & Rocha, F. (2011). Effect of some solid properties on gas–liquid mass transfer in a bubble column. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(2), 181-188.
- Núñez-Ramírez, D. M., Medina-Torres, L., Calderas, F., & Sanchez-Olivares, G. (2015). Properties of the Entomoparasitic Nematodes (*Heterorhabditis bacteriophora*) Liquid Culture using a Helicoidal Ribbon Agitator as Rheometric System. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 05(02).
- Olson, S. (2015). An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on pest management*, 26(5), 203-206.
- Pace, G.-W., Grote, W., Pitt, D.-E., & Pitt, J.-M. (1986). Australia Patent No.: W. I. P. O. WIPO.

- Pérez-Campos, S.-J., Rodríguez-Hernández, A.-I., López-Cuellar, M.-del Rocío, Zepeda-Bastida, A., & Chavarría-Hernández, N. (2018). *In-vitro* liquid culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense*, in orbitally shaken flasks. *Biocontrol Science and Technology*, 28(9), 901-911.
- Pino-Herrera, D. O., Fayolle, Y., Pageot, S., Huguenot, D., Esposito, G., van Hullebusch, E. D., & Pechaud, Y. (2018). Gas-liquid oxygen transfer in aerated and agitated slurry systems with high solid volume fractions. *Chemical Engineering Journal*, 350, 1073-1083.
- Popiel, I., & Hominick, W. M. (1992). Nematodes as Biological Control Agents: Part II. 31, 381-433.
- Qiu, L., & Bedding, R. (2000). Energy metabolism and its relation to survival and infectivity of infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under aerobic conditions. *Nematology*, 2(5), 551-559.
- Ruzicka, M. C. (2008). On dimensionless numbers. *Chemical Engineering Research and Design*, 86(8), 835-868.
- Shapiro-Ilan, D., & Gaugler, R. (2002). Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 137-146.
- Shapiro-Ilan, D., Gaugler, R., Tedders, L.-W., Brown, I., & Lewis, E. E. (2002). Optimization of Inoculation for *In Vivo* Production of Entomopathogenic Nematodes. *Journal of Nematology*, 34(4), 343-350.
- Shapiro-Ilan, D., Han, R., & Qiu, X. (2014). Production of entomopathogenic nematodes *Mass production of beneficial organisms*, Elsevier. pp. 321-355.
- Shewan, H. M., & Stokes, J. R. (2015). Analytically predicting the viscosity of hard sphere suspensions from the particle size distribution. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 222, 72-81.
- Shewan, H. M., & Stokes, J. R. (2015). Viscosity of soft spherical micro-hydrogel suspensions. *J Colloid Interface Sci*, 442, 75-81.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*: Freeman press. pp.1-50.

- Tadros, T. F. (2011). *Rheology of dispersions: principles and applications*: John Wiley & Sons. pp. 85-118.
- Wang, Y., Bilgrami, A. L., Shapiro-Ilan, D., & Gaugler, R. (2007). Stability of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens*, during in vitro culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(1), 73-81.
- Woodring, J. L., & Kaya, H. K. (1988). *Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A Handbook of Biology and Techniques*. Retrieved from Fayetteville, Arkansas:
- Wouts, W. M. (1981). Mass Production of the Entomogenous Nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on Artificial Media *Journal of Nematology*, 13(4), 467-469.
- Yoo, S.-K., Gaugler, R., Brown, I., & Cohen, N. (2001). Medium Concentration Influencing Growth of the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and its Symbiotic Bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 644-648.
- Young, J. M., Dunnill, P., & Pearce, J. D. (1998). Physical properties of liquid nematode cultures and the design of recovery operations. *Bioprocess Engineering*, 19(2), 121-127.

Capítulo 2

Cultivo líquido *in-vitro* del nemátodo entomopatógeno, *Steinernema colombiense*, en francos agitados orbitalmente

BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY
2018, VOL. 28, NO. 9, 901–911
<https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1499872>



SHORT COMMUNICATION



***In-vitro* liquid culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense*, in orbitally shaken flasks**

Sixto-Josué Pérez-Campos, Adriana-Inés Rodríguez-Hernández, Ma. del-Rocío López-Cuellar, Armando Zepeda-Bastida and Norberto Chavarría-Hernández

Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, México.

ABSTRACT

Steinernema colombiense, an entomopathogenic nematode species (EPN) was grown in two types of orbitally shaken flasks at 130 rpm and 28°C, containing 10 or 20 mL, respectively of a complex culture medium with an initial EPN-concentration of 1,000 Infective Juveniles (IJ)/mL. At the 10th day, the EPN-concentration was 58,771 individuals/mL with 87% of them in the IJ stage. No significant differences were found between the EPN growth kinetics in both types of flasks. The nematode-population growth was modelled by a re-parameterized Gompertz equation of three-parameters with best-fit values of 3.8 days for the lag time, 33.8 day⁻¹ for the maximum growth rate, and 57.3 (dimensionless) for the maximum asymptotic growth.

KEYWORDS

Bioinsecticides; entomopathogenic nematodes; *Steinernema colombiense*; nematode mass production; liquid culture; bioreactors.

1. INTRODUCCIÓN

Nowadays, there is a great concern due to the excessive use of agro-chemicals as plant protection agents against different pests. These agro-chemicals can leave residues and derivatives of toxicological significance (Marx-Stoelting et al., 2014; Pimentel & Burgess, 2014). Nevertheless, the so-called biopesticides have become real alternatives with a steadily growing market estimated above \$4.5 billion USD by 2023 (Olson, 2015). Among the microbial biopesticides, entomopathogenic nematodes (EPN) have been used successfully for biological control of a wide range of insect pests (Grewal, Ehlers, & Shapiro-Ilan, 2005). EPN species belong to the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*, which are symbiotically associated with enterobacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, respectively (Boemare & Akhurst, 2006). The symbiotic bacterium can occur in two forms (Akhurst, 1980), with only one of them (the so-called phase I) effective in killing the host. Steinernematids have a life cycle that includes the egg, four juvenile stages (J1 to J4) and the adult (Woodring & Kaya, 1988). All stages except the infective juvenile occur in the infected insect only. Under certain conditions, infective juveniles (IJs) are formed and exit from the cadaver. They are adapted to survive outside the host and to search for and infect new host insects. Thus, there is great interest in the mass production of IJs for field applications (Peters, 2013), and according to different authors, the *in-vitro* liquid culture of EPNs is the most suitable biotechnology for the industrial scale production in view that higher productivities are obtained in fermentation processes using bioreactors (Chavarría-Hernández et al., 2011; Leite, Shapiro-Ilan, Hazir, & Jackson, 2016). Nonetheless, this technology still presents important challenges for the EPN producers, including aspects concerning culture medium composition (Leite et al., 2016), bioreactor design (Chavarría-Hernández, Ortega-Morales, Vargas-Torres, Chavarría-Hernández, & Rodríguez-Hernández, 2010), effects of hydrodynamics on the viability and reproduction process of the nematodes (Chavarría-Hernández, Sanjuan-Galindo, Rodríguez-Pastrana, Medina-Torres, & Rodríguez-Hernández, 2007), oxygen requirements (Chavarría-Hernández, Pérez-Pérez, Chavarría-

Hernández, Barahona-Pérez, & Rodríguez-Hernández, 2014), as well as mathematical modelling for yield and IJ productivity predictions (Chavarría-Hernández, Islas-López, Maciel-Vergara, GayossoCanales, & Rodríguez-Hernández, 2008). There is a tendency to search for native EPN strains with attractive biological control properties, to be included in biological control programmes in order to reduce undesirable ecological side-effects due to the introduction of exotic EPN strains (Hsieh et al., 2009; Salama & Abd-Elgawad, 2001). Therefore, the suitability of native EPN isolates and species for liquid culture must be investigated.

The present work deals with the submerged culture of the EPN, *Steinernema colombiense*, in presence of its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp., in two cylindrical bioreactors, in a complex culture medium. *S. colombiense* was isolated in Quindío, Colombia (López-Núñez, Plichta, Góngora-Botero, & Stock, 2008), and has exhibited potential as a biological control agent (Aristizábal et al., 2015). In order to characterize the fermentation process, the EPN population growth was modelled with a re-parameterized Gompertz equation of three parameters.

2. Materials and methods

2.1 Biological specimens

IJ stages of *S. colombiense* from in vivo cultures in *Galleria mellonella*, were maintained in 15 mL sterile-distilled water suspensions (35×10^3 IJ/mL) in cell culture flasks (total volume 50 mL) at 8°C. The IJs were previously disinfected with 0.1% (w/v) Thimerosal (Fluka, Argentina, batch 1350553) during 2–3 h with agitation, then washed with sterile water (Woodring & Kaya, 1988). Aeration of the nematode stock was done through 150 rpm-orbital shaking at lab temperature for 10 min, every 20 days.

The symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp., was isolated according to Shapiro-Ilan, Bock, and Hotchkiss (2014) and conserved at -75°C in 2 mL-vials in 25% (v/v) sterile glycerol (Chavarría-Hernández & de la Torre, 2001).

2.2 Culture media

NBTA medium (Akhurst, 1980): 2.3% (w/v) nutrient agar (BD Bioxon, Mexico, batch 9188305), 0.025% (w/v) bromothymol blue (BTB) (Sigma, USA, batch 22K3747), 0.004% (w/v) triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Sigma, USA, batch 120K1144). The medium pH was adjusted to 8.5. This medium was used for differentiating phase I (blue colonies) from phase II bacteria (red colonies).

STB medium (Buecher & Popiel, 1989): 3% (w/v) trypticase soy broth (BD Bioxon, Mexico, batch 0237300), 0.5% (w/v) yeast extract (BD Bioxon, Mexico, batch 5113777). The medium pH was adjusted to 7. This medium was used for producing *Xenorhabdus* sp. to inoculate the EPN production medium.

Production medium (PM) (Chavarría-Hernández & de la Torre, 2001): 2.3% (w/v) yeast extract, 1.25% (w/v) dried egg yolk (Alimentos de la Granja SA de CV, Mexico, batch YP181106), 0.5% (w/v) sodium chloride (kitchen salt) (Sal La Fina, Mexico, batch L-01462 6-C) and 4% (v/v) canola oil (Patrona, Mexico, batch 202). This medium was used for co-culturing the EPN and its symbiotic bacterium.

2.3 In-vitro liquid cultures

Samples of one *Xenorhabdus* sp.-vial were streaked onto NBTA plates and incubated for 48 h at 30°C (Shel Lab, model GI6, USA). Then, a loopful of an isolated colony of the bacterium in phase I, was transferred to 50 mL of STB contained in a 250 mL Erlenmeyer flask and incubated for 36 h at 30°C and 150 rpm (Lab Companion, model SI-600R, China). Thereafter, 500 mL Erlenmeyer flasks containing 150 mL of PM medium were inoculated with 5% (v/v) *Xenorhabdus* sp.-STB culture broth, and incubated for 60 h at 30°C and 150 rpm. Then, the culture broths were inoculated with a concentrated disinfected-IJ water suspension to give an initial concentration (C_0) of 1,000 IJ/mL, approximately. After homogenization, the broths were poured into sterile glass bioreactors (Figure 1) provided with aluminum paper caps with a central hole ($D = 10.55$ mm) covered with cotton.

Bioreactors B1 and B2 were filled with 10 and 20 mL, respectively, by quadruplicate. After that, all bottles were incubated at 28°C and 130 rpm during 10 days, taking samples every 2 days, to determine: (1) Viable nematode concentration by developmental stage (C; nematodes/mL); (2) Phenotypic stage of the symbiotic bacterium by streaking samples onto NBTA plates; and (3) Medium pH with a potentiometer (Hanna, model HI4222, Romania). Also, 1.5–2.0 mL of sterile water was added every 2 days into each bioreactor to compensate water evaporation, taking into account daily weight loss records.

2.3 Determination of the viable nematode concentration, C

Culture broth samples of 0.1 mL were diluted with sterile water from 1:1 to 1:100 depending on the nematode concentration. Then, viable nematodes (C) were counted by developmental stage in 0.1 mL-diluted samples under the light microscope (Nikon, model 80i, Japan) (magnifications, 40X and 100X) provided with a digital camera (Nikon, model DSFi3, Japan). Nematodes that move or look 'undamaged' although immobile were considered viable. Otherwise, they were considered non-viable. Quadruplicate counts were done to determine the EPN concentration (C; nematodes/mL).

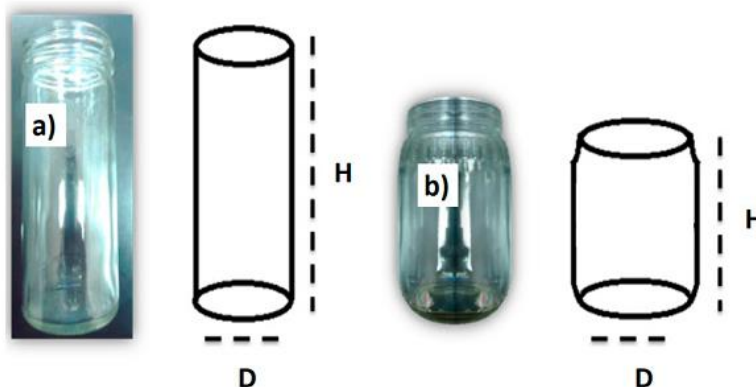


Figure 1. Cylindrical flasks used for the in-vitro liquid culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense*. a) Bioreactor 1 (B1): Diameter, $D = 4.72$ cm; height, $H = 11.98$ cm. b) Bioreactor 2 (B2): $D = 5.84$ cm; $H = 9.25$ cm.

2.4 Modelling of the EPN population growth curve

Data of dimensionless nematode concentration (C/C_0) (–) were fitted to a re-parameterized Gompertz equation of 3-parameters (Eq. 1) (Chavarría-Hernández & de la Torre, 2001) using the SigmaPlot 12.5 software package (Systat Software, Inc.) to estimate the parameters of the model: (1) the EPN multiplication factor or maximum growth, $(C/C_0)_{max}$ (–); (2) the maximum population growth rate, $m_{max} = [d(C/C_0)/dt]_{max}$ (day^{-1}), and (3) the lag time, λ (day).

$$(C/C_0) = (C/C_0)_{max} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{m_{max} \times e}{(C/C_0)_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

2.5 Statistical analysis

All EPN concentration data are presented as the mean \pm standard deviation. Data were analyzed for statistical significance by analysis of variance (ANOVA) followed by the All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) ($P < 0.05$) (SigmaPlot 12.5, Systat Software, Inc.).

3. Results and discussion

All liquid cultures (i.e. in both STB and PM media) favoured the growth of *Xenorhabdus* sp. mainly in phase I in view of the dominant blue colonies that grew in NBTA plates streaked with culture broth samples (Figure 2). Cells of *Xenorhabdus* sp. in phase I absorb BTB producing dark blue colonies, whereas phase II-bacterium cells do not absorb BTB, but reduce TTC producing red colonies on NBTA (Akhurst, 1980). The predominance of the symbiotic bacterium in phase I has been associated to both higher productivities and virulence of the IJs produced in *in-vitro* liquid cultures of EPNs (Boemare & Akhurst, 2006; Han & Ehlers, 2001). Unfortunately, under *in-vitro* conditions the bacterium tends to change in an unpredictable manner to the phase II, which is associated to both lower EPN productivities and virulence. Then it is advisable to check the bacterium phase during the EPN production processes by streaking culture broth samples onto NBTA.

Figure 3 shows the time course of the viable nematode concentration by developmental stage, recorded in both bioreactors, being very similar to each other. The liquid cultures started with a concentration of 1,000 IJ/mL (Standard deviation (SD) = 200) (Figure 4a). By the second day, most IJs were ex-sheathed giving place to J4 stage individuals (Figure 4b). Then, on day 4, first generation adult females containing large quantities of eggs, were recorded (Figure 4c). On day 6, nematode concentration increased to more than 50,000 individuals/mL as a result of egg release and hatching of J2 stages (Figure 4d).

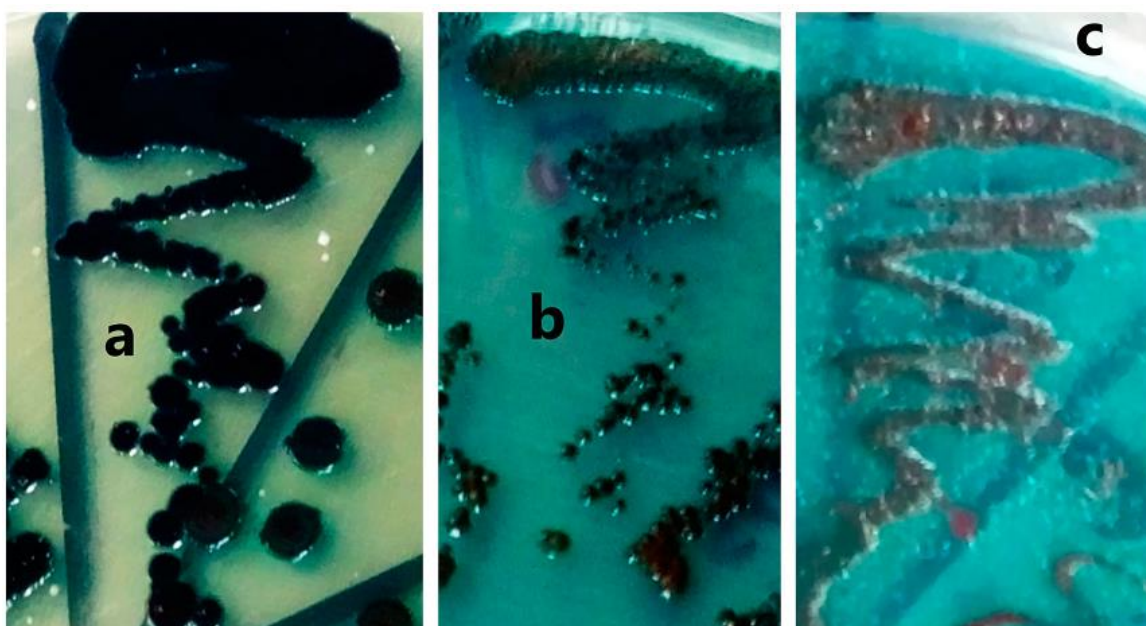


Figure 2. Aspect of the growth of *Xenorhabdus* sp. in NBTA plates after 2 days of incubation at 30°C. Culture broth samples were streaked onto agar plates at a) t = 0 days; b) 4 days, and c) 8 days, after the inoculation of IJs of *Steinernema colombiense* into the production medium PM.

Later, on the eighth and tenth days, numerous J4 and adults of the second generation were recorded (Figure 4e and f). At the day 10, when the cultures finished, the average total population in the bioreactor B1 was 57,075 individuals/mL (SD = 14,217) with 92.8% (SD = 2.4) in the IJ stage; for the bioreactor B2, the average total EPN concentration was 64,612 individuals/mL (SD = 13,612) with 77.7% (SD = 6.1) of them in the IJ stage.

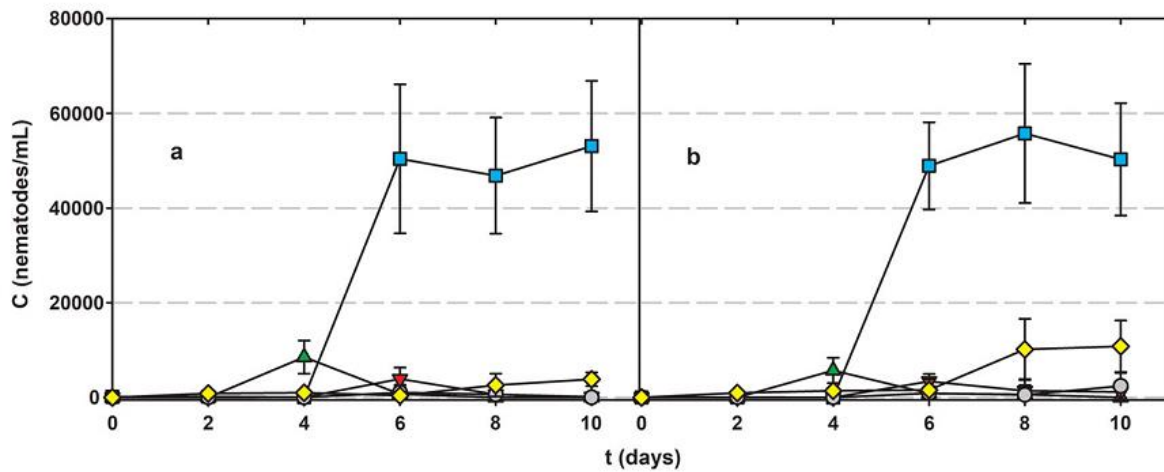


Figure 3. Evolution of the population of the EPN, *Steinernema colombiense*, in presence of its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp. Cultures were carried out in medium PM in two cylindrical bottles: a) bioreactor B1, and b) bioreactor B2, at 28°C and 130 rpm. Key: Nematode developmental stage: juveniles of the first stage (J1, ▲), second stage (J2, ▼), third and infective juvenile stages (J3/IJ, ■), fourth stage (J4, ●) and the adult stage (A, ◆). There were no statistically significant differences between the evolutions of EPN concentrations in fermentations B1 and B2 (Dunn's Method; $P < 0.05$).

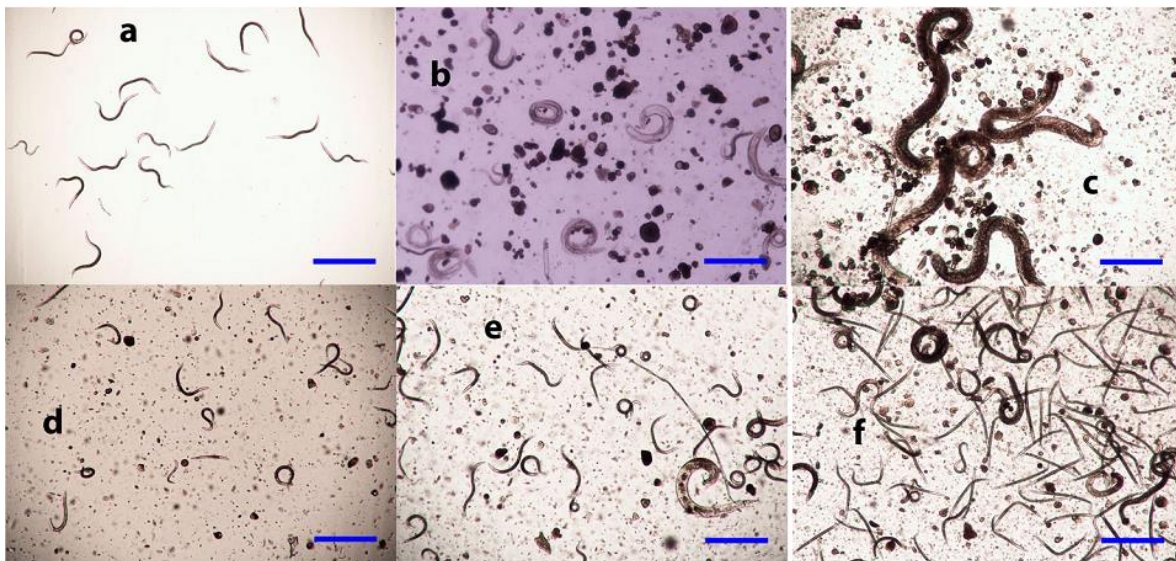


Figure 4. Physical aspects of some developmental stages of the EPN, *Steinernema colombiense*, in cultures with its symbiont, *Xenorhabdus* sp., in cylindrical flasks, in medium MP at 28°C and 130 rpm. a) IJs at $t = 0$ days; b) J4 stages at $t = 2$ days; c) first generation adults at $t = 4$ days; d) J2 and J3 stages at $t = 6$ days; e) and f) present J4 stages, second generation adults and new IJs between the days 8 and 10. The scale bar is 500 μm in all images.

There were no statistically significant differences between the evolutions of EPN concentrations in fermentations B1 and B2.

To our knowledge, this is the first report regarding the in-vitro liquid culture of *S. colombiense*. Several groups have published results concerning the mass production of steinernematids in orbitally shaken bioreactors (Table 1). For example, Leite et al. (2016) reported the propagation of *S. feltiae* in liquid cultures in a medium similar to the one used in the present study (i.e. 2.3% (w/v) yeast extract, 1.25% (w/v) egg yolk, 0.5% (w/v) NaCl, and 4% (v/v) corn oil). In another work, Ferreira, Addison, and Malan (2015) propagated the EPN, *S. yirgalemense*, in liquid cultures using a medium with 1.5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) soy powder, 0.4% (w/v) NaCl, 0.035% (w/v) KCl, 0.015% (w/v) CaCl₂, 0.01% (w/v) MgSO₄ and 4.6% (v/v) vegetable oil. Hirao, Strauch, and Ehlers (2010) reported the culture of *S. carpocapsae* in a medium containing 1.5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) soy powder, 0.4% (w/v) NaCl, 0.035% (w/v) KCl, 0.015% (w/v) CaCl₂, 0.01% (w/v) MgSO₄, 0.6% (w/v) lecithin and 4% (v/v) vegetable oil. Table 1 presents the fermentation conditions and main results of the former reports, which are a representative sample for the *in-vitro* liquid culture of steinernematids in orbitally shaken flasks. The authors cited in Table 1 have used complex culture media of relatively similar concentrations of proteins, fats and carbohydrates to support the EPN population growth, obtaining IJ multiplication factors from 7 to 51 (-) and IJ-productivities from 1,000 to 10,000 IJ/(mL·day). Also, these studies used three species of steinernematids, flasks of different sizes, different operating conditions (i.e. liquid volume to total volume ratio, agitation speeds and temperatures), among other factors that influence the yields and productivities in EPN-mass production bioprocesses. The interaction of these factors is complex and just a few functions have been proposed in the case of *S. carpocapsae* production in pneumatically and mechanically agitated bioreactors (Chavarría-Hernández et al., 2007, 2010) where the reproductive process, that requires mating, can be affected by the prevailing hydrodynamic conditions.

Table 1. Some reports concerning the *in-vitro* liquid culture of *Steinernema* species in orbitally shaken bioreactors.

EPN species	Fermentation system & operating conditions	Composition of culture medium ^a	Initial EPN concentration, $C_{IJ,0}$ (IJ/mL)	Final EPN concentration (nematodes/mL)	Final IJ concentration, $C_{IJ,final}$ (IJ/mL)	IJ multiplication factor, ($C_{IJ,final}/C_{IJ,0}$) (dimensionless)	IJ productivity ^b (IJ/(mL·day))	Reference
<i>S. feltiae</i>	150 mL-Erlenmeyer flask (D = 7 cm), V_L = 50 mL; 180 rpm & 25°C, during 28 days	%P = 1.57; %F = 4.74; %CH = 0.01	5,000	35,000	34,300	6.9	1,046	(Leite et al., 2016)
<i>S. yirgalemense</i>	250 mL-Erlenmeyer flask (D = 8 cm), V_L = 30 mL; 180 rpm & 25°C, during 15 days	%P = 1.55; %F = 5.00; %CH = 0.67	4,000	–	75,000	18.8	4,733	(Ferreira et al., 2015)
<i>S. carpocapsae</i>	500 mL-Erlenmeyer flask (D = 10 cm), V_L = 100 mL; 180 rpm & 25°C, during 15 days	%P = 1.55; %F = 5.00; %CH = 0.67	5,000	–	158,000	31.6	10,200	(Hirao et al., 2010)
<i>S. colombiense</i>	Bioreactors B1 and B2 (average results)	%P = 1.57; %F = 4.74; %CH = 0.01	1,000	58,770	50,895	50.9	4,990	Present study

^aContains of Proteins (P), Fat (F) and Carbohydrates (CH) in the culture medium, after the ingredient's mass balance done based on the USDA Food Composition Databases (<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>).

^bCalculated with the formula $(C_{IJ,final} - C_{IJ,0})/(\text{liquid culture span})$.

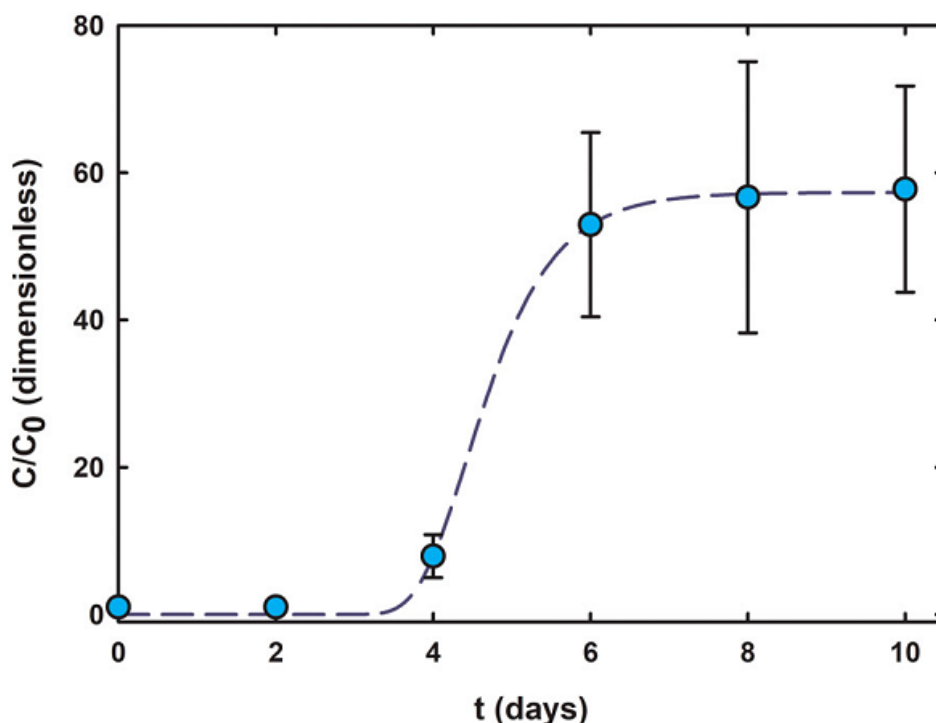


Figure 5. Time course of the dimensionless *Steinernema colombiense*-concentration (C/C_0) in liquid cultures in medium PM in two cylindrical bottles at 28°C and 130 rpm (i.e. bioreactors B1 and B2). The dash line is the best fit of data to a re-parameterized Gompertz model (Eq. 1) obtained by non-linear regression (Table 2).

On the other hand, Figure 5 shows the best fit of EPN-dimensionless concentration data to a re-parameterized Gompertz model, during the propagation of *S. colombiense* in both B1 and B2 orbitally shaken flasks. The corresponding kinetic parameters are presented in Table 2. Both B1 and B2 fermentations are well described by the same kinetic parameters: lag phase (λ), maximum growth rate (m_{\max}) and the multiplication factor (i.e. $(C/C_0)_{\max}$). This result was not expected. Taking into account that the culture medium was the same in both bioprocesses as well as the bacterial and nematode inocula, it was expected higher EPN concentrations in B2 flasks. In aerobic bioprocesses, the biomass production is commonly growing proportionally with the oxygen transfer rate (OTR) and the OTR is proportionally growing with the diameter of shaken bioreactors (i.e. maximum-OTR $\propto D^{1.88}$; (Meier et al., 2016)). In the present study, the flask diameter ratio was $D_{B2}/D_{B1} = (5.84 \text{ cm})/(4.72 \text{ cm}) = 1.24$ times: The lack of differences in EPN

production can either be explained by a lack of difference in the OTR due to special characteristics of the flasks or a lack of sensitivity of the EPN process to different OTR values in the range tested. It might well be possible that oxygen was not limiting the growth of the symbiotic bacteria and the nematodes in both bioreactor types.

More studies are required to set up the mass production of IJ stages of *S. colombiense* for biocontrol applications. For instance, nowadays our group is studying the specific oxygen requirements of *S. colombiense* and its symbiotic bacterium, and how these would change with both developmental and physiological stages. These data are of great importance for designing and scaling up EPN-production bioprocesses (Chavarría-Hernández et al., 2014; Lindegren, Rij, Ross, & Fouse, 1986; Qiu & Bedding, 2000).

Table 2. Kinetic parameters for the in-vitro liquid culture of *Steinernema colombiense* in both B1 and B2 orbitally shaken bioreactors, on the basis of a re-parameterized Gompertz model of 3-parameters (Eq. 1).

Maximum asymptotic growth, (C/C ₀) _{max} (dimensionless)	Maximum population growth rate, m _{max} (day ⁻¹)	Lag time, λ (day)	R ²	% of IJ at t = 10 days
57.31 (1.46)*	33.81 (5.81)*	3.80 (0.09)*	0.84	87

*Standard error (= standard deviation × n^{-1/2}).

Acknowledgments

SJPC acknowledged CONACyT Doctor Scholarship. Authors thanked J. Jimenez, Perkins Ltda, and A. Bustillo, Cenipalma, for fruitful collaboration. Also, the valuable assistance of R.O. Pacheco-Rodríguez and C. Cruz-Muthe is acknowledged. This work was supported by the CONACyT-México under Grants CB 2014, No. 238359; INFRA 2014, No. 230138, and INFRA 2016, No. 269805.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the CONACyT-México under Grants CB 2014, No. 238359; INFRA 2014, No. 230138, and INFRA 2016, No. 269805.

References

- Akhurst, R. J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121, 303–309.
- Aristizábal, L. F., Ortiz, A. L., Quintero, J. C., López-Nuñez, J. C., Toro, H., & Arthurs, S. P. (2015). Effect of Colombian strains of *Steinernema colombiense* (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) against *Eurhizococcus colombianus* (Hemiptera: Margarodidae) and *Aeneolamia* sp. (Hemiptera: Cercopidae). *Florida Entomologist*, 98(3), 981–983. doi:10.1653/024.098.0330
- Boemare, N., & Akhurst, R. (2006). The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.). *The prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma subclass* (pp. 451–494). New York, NY: Springer New York.
- Buecher, E. J., & Popiel, I. (1989). Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. *Journal of Nematology*, 21(4), 500–504.

- 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. doi:10.1023/A:1005694709366
- Chavarría-Hernández, N., Islas-López, M. A., Maciel-Vergara, G., Gayosso-Canales, M., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2008). Kinetics of infective juvenile production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in submerged monoxenic culture. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(5), 419–426. doi:10.1007/s00449-007-0178-0
- Chavarría-Hernández, N., Maciel-Vergara, G., Chavarría-Hernández, J.-C., Castro-Rosas, J., Rodríguez-Pastrana, B.-R., de la Torre-Martínez, M., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2011). Mass production of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, through the submerged monoxenic culture in two internal-loop airlift bioreactors with some geometric differences. *Biochemical Engineering Journal*, 55(3), 145–153. doi:10.1016/j.bej.2011.03.011
- Chavarría-Hernández, N., Ortega-Morales, E., Vargas-Torres, A., Chavarría-Hernández, J.-C., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2010). Submerged monoxenic culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, in a mechanically agitated bioreactor: Evolution of the hydrodynamic and mass transfer conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(4), 580–589. doi:10.1007/s12257-009-3107-z
- Chavarría-Hernández, N., Pérez-Pérez, N.-C., Chavarría-Hernández, J.-C., Barahona-Pérez, L.-F., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2014). Specific oxygen uptake of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*, 24(7), 723–733. doi:10.1080/09583157.2014.890697

- Chavarría-Hernández, N., Sanjuan-Galindo, R., Rodríguez-Pastrana, B. R., Medina-Torres, L., & Rodríguez-Hernández, A. I. (2007). Submerged monoxenic culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in an internal-loop airlift bioreactor using two configurations of the inner tube. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 167–176. doi:10.1002/bit.21356
- Ferreira, T., Addison, M. F., & Malan, A. P. (2015). Development and population dynamics of *Steinernema yirgalemense* (Rhabditida: Steinernematidae) and growth characteristics of its associated *Xenorhabdus indica* symbiont in liquid culture. *Journal of Helminthology*, 1–8. doi:10.1017/S0022149X15000450
- Grewal, P. S., Ehlers, R.-U., & Shapiro-Ilan, D. I. (Eds.). (2005). *Nematodes as biocontrol agents*. UK: CABI Publishing.
- Han, R., & Ehlers, R.-U. (2001). Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the *in vivo* and *in vitro* development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35(3), 239–247. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00809.x
- Hirao, A., Strauch, O., & Ehlers, R.-U. (2010). Life cycle and population development of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda, Rhabditida) in monoxenic liquid culture. *Nematology*, 12(2), 201–210. doi:10.1163/156854109X463756
- Hsieh, F. C., Tzeng, C. Y., Tseng, J. T., Tsai, Y. S., Meng, M., & Kao, S. S. (2009). Isolation and characterization of the native entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis brevicaudis*, and its symbiotic bacteria from Taiwan. *Current Microbiology*, 58(6), 564–570. doi:10.1007/s00284-009-9371-5
- Leite, L. G., Shapiro-Ilan, D. I., Hazir, S., & Jackson, M. A. (2016). The effects of nutrient concentration, addition of thickeners, and agitation speed on liquid fermentation of *Steinernema feltiae*. *Journal of Nematology*, 48(2), 126–133.

- Lindegren, J. E., Rij, R. E., Ross, S. R., & Fouse, D. C. (1986). Respiration rate of *Steinernema feltiae* infective juveniles at several constant temperatures. *Journal of Nematology*, 18(2), 221–224.
- López-Núñez, J. C., Plichta, K., Góngora-Botero, C. E., & Stock, S. P. (2008). A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), from Colombia. *Nematology*, 10(4), 561–574. doi:10.1163/156854108784513879
- Marx-Stoelting, P., Niemann, L., Ritz, V., Ulbrich, B., Gall, A., Hirsch-Ernst, K. I., ... Solecki, R. (2014). Assessment of three approaches for regulatory decision making on pesticides with endocrine disrupting properties. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70(3), 590–604. doi:10.1016/j.yrtph.2014.09.001
- Meier, K., Klöckner, W., Bonhage, B., Antonov, E., Regestein, L., & Büchs, J. (2016). Correlation for the maximum oxygen transfer capacity in shake flasks for a wide range of operating conditions and for different culture media. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 228–235. doi:10.1016/j.bej.2016.01.014
- Olson, S. (2015). An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management*, 26(5), 203–206. doi:10.1564/v26_oct_04
- Peters, A. (2013). Application and commercialization of nematodes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), 6181–6188. doi:10.1007/s00253-013-4941-7
- Pimentel, D., & Burgess, M. (2014). Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In D. Pimentel & R. Peshin (Eds.), *Integrated pest management: Pesticide problems*, Vol.3 (pp. 47–71). Dordrecht: Springer Netherlands.

- Qiu , L., & Bedding, R. (2000). Energy metabolism and its relation to survival and infectivity of infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under aerobic conditions. *Nematology*, 2(5), 551–559.
- Salama, H. S., & Abd-Elgawad, M. M. (2001). Isolation of heterorhabditid nematodes from palm tree planted areas and their implications in the Red Palm Weevil control. *Anzeiger für Schädlingkunde*, 74, 43–45.
- Shapiro-Ilan, D. I., Bock, C. H., & Hotchkiss, M. W. (2014). Suppression of pecan and peach pathogens on different substrates using *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens*. *Biological Control*, 77, 1–6. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.05.010
- Woodring, J. L., & Kaya, H. K. (1988). *Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques*. Fayetteville, AR: Arkansas Agricultural Experiment Station.

Capítulo 3

Cultivo líquido del nemátodo entomopatógeno, *Steinernema colombiense*: evolución de la concentración del nemátodo, fracción volumétrica de las partículas, propiedades reológicas y tensión superficial.

Biocontrol Science
and Technology



Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
EIC: Ong, John EIC: Migheli, Quirico Under Review	CBST-2019-0151	Liquid culture of the entomopathogenic nematode, <i>Steinernema colombiense</i> : evolution of the nematode concentration, particles volume fraction, rheological properties and surface tension View Submission	18-May-2019	31-May-2019

Liquid culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense*: evolution of the nematode concentration, particles volume fraction, rheological properties and surface tension

Journal:	<i>Biocontrol Science & Technology</i>
Manuscript ID:	CBST-2019-0151
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	31-May-2019
Complete List of Authors:	Pérez-Campos, Sixto; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Rodríguez-Hernández, Adriana; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, López-Cuellar, Ma. ; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Martínez-Juárez, Víctor; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Instituto de Ciencias Agropecuarias Sanjuan-Galindo, René; Instituto Tecnológico de Nuevo León Chavarría Hernández, Norberto; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,
Keywords:	Bio-insecticides, rheological properties, surface tension, particle size, solid-liquid suspensions

SCHOLARONE™
Manuscripts

Liquid culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense*: evolution of the nematode concentration, particles volume fraction, rheological properties and surface tension.

Sixto-Josué Pérez-Campos^a, Adriana-Inés Rodríguez-Hernández^a, Ma. del Rocío López-Cuellar^a, René Sanjuán-Galindo^b, Víctor Manuel Martínez-Juárez^a and Norberto Chavarría-Hernández^a

^a Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad km 1, Rancho Universitario, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, CP 43600, México.

^b Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, Instituto Tecnológico de Nuevo León, Av. Eloy Cavazos 2001, Col. Tolteca en Guadalupe, Nuevo León, CP 67170, México.

Keywords: Bio-insecticides; *Steinernema colombiense*; liquid culture; rheological properties; surface tension; particle size; solid-liquid suspensions

Abstract

The rheological properties (RP) and surface tension (σ) of culture broths (CB) with suspended particles (SP), are factors that affect the performance of fermentation processes. This article presents the first report concerning the evolution of SP, RP and σ of CB during the monoxenic liquid culture of *Steinernema colombiense*, in a medium containing 1.25% (w/v) egg yolk (EY). Cultures started with 1,087 infective-juveniles/mL and finished with 53,583 individuals/mL after 10 days. CB were complex suspensions of nematodes of different sizes depending on their developmental stage, and EY particles. CB were moderately concentrated suspensions with total particles volume fraction in the range 0.08-0.14. RP corresponded to pseudoplastic fluids with flow behavior index values ≤ 0.3 , being greatly determined by the symbiotic bacterium activity. After nematode inoculation, the apparent viscosity values (η_a ; Pa s) for the whole CB and its supernatants were in the ranges 0.010-0.018 and 0.008-0.015, respectively. Concerning σ , the average value was 34.53 mN/m, being probably determined by the contents of EY.

1. Introduction

The overuse of agro-chemicals for the plant protection is of worldwide concern, particularly due to the toxicological effects to non-target populations (Atwood and Paisley-Jones, 2017; Martínez-Valenzuela and Gómez-Arroyo, 2007; Marx-Stoelting et al., 2014). One alternative is the use of biocontrol agents, which are associated with growing markets (Olson, 2015). Relevant biocontrol agents comprise certain species of bacteria, fungi, viruses and entomopathogenic nematodes (EPN), among others. The recognized EPN species are comprised in the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*, which are symbiotically associated with enterobacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, respectively (Boemare and Akhurst, 2006). Moreover, EPN species have been effective in biological control applications (Dito, Shapiro-Ilan, Dunlap, Behle, & Lewis, 2016; Guo, Yan, Zhao, Chen, & Han, 2014; Khan et al., 2016; Navarro and Gea, 2014). The symbiotic bacterium can occur in two phenotypic forms: phase I and phase II (Akhurst, 1980), being the phase I the only effective in killing the host. The Steinernematids' life cycle includes six developmental stages: the egg, four juvenile stages (J1, J2, J3 and J4) and the adult, all occurring within the infected host. When food is depleted, certain juveniles transformed into infective juveniles (IJs), being this particular stage the only one that can survive outside the host, and has the ability to find and infect new preys (Tanada and Kaya, 1993). Hence, the mass production of IJs is of great interest for field applications (Shapiro-Ilan, Han, & Qiu, 2014), being the *in-vitro* liquid culture the most appropriate method for commercial production (Chavarría-Hernández et al., 2011; Johnigk, Ecke, Poehling, & Ehlers, 2004). Nevertheless, this technology still exhibits drawbacks and should be improved, taking into account aspects of culture medium recipe (Leite, Shapiro-Ilan, Hazir, & Jackson, 2016a), design of the fermenter (Chavarría-Hernández, Ortega-Morales, Vargas-Torres, Chavarría Hernández, & Rodríguez-Hernández, 2010; Chavarría-Hernández, Sanjuan-Galindo, Rodríguez-Pastrana, Medina-Torres, & Rodríguez-Hernández, 2007), operating conditions (Johnigk, et al., 2004; Leite, Shapiro-Ilan, Hazir, & Jackson, 2016b; Strauch and Ehlers, 2000)

and process modelling (Chavarría-Hernández, Espino-García, Sanjuan-Galindo, & Rodríguez-Hernández, 2006; Chavarría-Hernández, et al., 2010), among others. Moreover, reports concerning the physical properties of EPN-culture broths are scarce, although the rheological properties and surface tension of culture broths, among others, affect aerobic fermentation processes (Villadsen, Nielsen, & Lidén, 2011). In this sense, only two reports have been published concerning the rheological properties of culture broths during the liquid culture of EPNs: *S. feltiae* and *H. megidis* (Young, Dunnill, & Pearce, 1998), and *S. carpocapsae* (Chavarría-Hernández, Rodríguez-Hernández, Pérez-Guevara, & de-la-Torre, 2003), where they found a pseudoplastic behavior of such culture broths. Furthermore, the EPN-culture broths are complex suspensions of flexible cylinders (i.e., nematodes) in media which would contain other particles (i.e., coagulated egg yolk (Chavarría-Hernández and de la-Torre, 2001)) and fat (i.e., olive and canola oil (Yoo, Brown, & Gaugler, 2000)). The solid particles-volume fraction Φ (total volume of the particles divided by the volume of the dispersion) would influence the properties of suspensions (Tadros, 2011); nonetheless, there are no EPN-liquid culture reports considering these aspects. Another property that greatly affects these processes, is the surface tension (σ ; N m^{-1}) due to it affects the interfacial area through which oxygen diffuses from air bubbles to the culture broth allowing the respiration of both EPNs and their symbiotic bacteria (Belur, Inman, & Holmes, 2013; Chavarría Hernández, Pérez-Pérez, Chavarría-Hernández, Barahona-Pérez, & Rodríguez-Hernández, 2014; Villadsen, et al., 2011). However, till now, there are no reports concerning σ and its evolution during the EPNs liquid culture.

The present work deals with the liquid culture of *Steinernema colombiense*, in presence of its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp. (Pérez-Campos, Rodríguez-Hernández, López Cuellar, Zepeda-Bastida, & Chavarría-Hernández, 2018) in a medium containing dried egg yolk, where the culture broths are complex particle suspensions. It is reported the evolutions of the concentrations and volume fractions of suspended particles (i.e., flexible cylinders –nematodes- and

coagulated egg yolk particles), and the rheological properties and surface tension of the culture broths.

2. Materials and methods

2.1 Biological specimens

S. colombiense-IJs from *in vivo* cultures using *Galleria mellonella* (Woodring & Kaya, 1988), were maintained in 15 mL sterile-distilled water suspensions (35×10^3 IJ/mL) in tissue culture bottles (total volume 50 mL) at 3-7 °C. The IJs were formerly disinfected with 0.1% (w/v) Thimerosal (Fluka, Argentina) during 2-3 h with agitation, then washed with sterile water. Aeration of the nematode stock was carried out through 150 rpm-orbital agitation at lab temperature by 10 min, scheduled every 20 days.

The symbiont bacterium, *Xenorhabdus* sp., was isolated from IJs as reported by Shapiro-Ilan, Bock, & Hotchkiss (2014) and stored at -75 °C within 2 mL-vials in 25% (v/v) sterile glycerol (Chavarría-Hernández and de-la-Torre, 2001) till use in the experiments.

2.2 Culture media

NBTA medium (Akhurst, 1980): 2.3% (w/v) nutrient agar (BD Bioxon, Mexico, batch 9188305), 0.025% (w/v) bromothymol blue (BTB) (Sigma, USA, batch 22K3747), 0.004% (w/v) triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Sigma, USA, batch 120K1144) dissolved in distilled water. The medium was adjusted to a pH of 8.5.

STB medium (Buecher & Popiel, 1989): 3% (w/v) trypticase soy broth (BD Bioxon, Mexico, batch 0237300), 0.5% (w/v) yeast extract (BD Bioxon, Mexico, batch 5113777). The medium pH was adjusted to 7.

Medium for EPN Production (PM) (Chavarría-Hernández and de-la-Torre, 2001): 2.3% (w/v) yeast extract, 1.25% (w/v) dried egg yolk (Alimentos de la Granja SA de CV, Mexico), 0.5% (w/v) sodium chloride (kitchen salt) (Sal La Fina, Mexico) and 4% (v/v) canola oil (Patrona, Mexico), dissolved or dispersed in distilled water.

2.3 Liquid cultures

One vial of *Xenorhabdus* sp. was streaked onto NBTA plates, then incubated at 30 °C for 48 h (Shel Lab, model GI6, USA). Later, a loopful of an isolated phase I-bacterium colony (i.e., a blue color colony), was inoculated into 50 mL of STB contained in a 250 mL-flask, to be incubated at 30 °C and 150 rpm for 36 h (Lab Companion, model SI-600R, China). Later on, 150 mL of PM medium were inoculated with 5% (v/v) *Xenorhabdus* sp.-STB culture broth and incubated at 30°C and 150 rpm for 60 h. Thereafter, the PM-culture broths were inoculated with a IJs-water suspension to have an initial concentration of 1,000 IJ/mL, approximately, well homogenized and poured into 32 sterile cylindrical glass bottles (diameter, 5.84 cm; height, 9.25 cm), 20 mL/each one, provided with aluminum paper caps with a central orifice (diameter, 10.55 mm) covered with cotton. Thereafter, bottles were incubated at 28°C and 130 rpm for 10 days, taking samples every 2 days, to determine: 1) Viable nematode concentration (nematodes/mL and (g_{EPN}/L)_{wet basis}); 2) Suspended-particles size distribution (i.e., the nematodes and the coagulated egg yolk particles, CEYP); 3) Volume fractions (Φ) of the nematodes and CEYP; 4) Rheological properties of the whole culture broths and their supernatants after centrifugation; and 5) Surface tension of the whole culture broths. Every two days, a volume of 1.5-2.0 mL of sterile water was added to the bottles to recoup the water evaporation, based on weight loss records.

2.3.1 Determination of the viable nematode concentration

Depending on the nematode concentration (C, individuals/mL), culture broth samples were diluted (10^0 - 10^2) with sterile water. The concentrations of total viable nematodes and IJs were determined by quadruplicate counts in 0.1 mL of diluted samples under the light microscope (Nikon, model 80i, Japan) (amplification, 40x and 100x) provided with a digital camera (Nikon, model DSFi3, Japan). At least 40 photographs of EPNs by developmental stage were considered for the image analysis with the software package ImageJ 1.52a, NIH, USA (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) to determine the length (*l*, m) and diameter (*D*,

m) of the nematodes which were considered as cylinders. Then, taking into account the EPN density ($\rho_{nematode}$, which ranges 1,035-1,075 kg/m³ depending on the developmental stage (Young, et al., 1998)) it was calculated the nematode concentration, X (g/L) wet basis (Eq. 1).

$$X = C \cdot V_{nematode} \cdot \rho_{nematode} \quad (1)$$

Where the nematode volume was calculated with $V_{nematode} = (\pi D^2/4) \cdot l$

2.2.3 Determination of the size of CEYP particles

Photographs of diluted culture broth samples were taken under the light microscope (Nikon, model 80i, Japan) (amplification, 40x and 100x) provided with a digital camera (Nikon, model DSFi3, Japan). The average CEYP size was calculated as the volume–moment mean diameter (d_{4,3}, m) (Allen, 1981) using at least 40 photographs of CEYPs analysed with the software package ImageJ 1.52a, NIH, USA (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

2.2.4 Determination of the volume fractions (Φ)

The suspended particles considered in this work were of two types: a) the nematodes (EPN), and b) the coagulated egg yolk particles (CEYP). After centrifugation of culture broth samples (Hermle z323k, 6000 rpm, 4°C during 30 min), the supernatant was carefully collected and measured in a graduated glass cylinder (25 mL, ®Pyrex) to determine, by difference, the volume fraction of total particles, Φ_{TP} (i.e., EPNs plus CEYPs which formed the pellets). On the other hand, the volume fraction of EPNs was determined with Eq. 2.

$$\theta_{EPN} = \sum_{i=1}^n (C_i \cdot V_{nematode,i}) \quad (2)$$

Where i indicates the nematode developmental stage (i.e., $i=1$, juveniles J1; $i=2$, J2; $i=3$, J3; $i=4$, J4; $i=5$, first generation-female adults, and so on). The volume fraction of CEYP was determined by difference, $\Phi_{CEYP} = \Phi_{TP} - \Phi_{EPN}$.

2.3.5 Determination of rheological properties

The rheological properties were determined in simple-shear flow conditions in an ARES G2 TA rheometer (USA). A concentric cylinders fixture was used (Bob diameter, 27.663 mm; Cup diameter, 30 mm). Samples of 7 mL of the whole culture broth or the supernatant after centrifugation were loaded and sheared at 28°C involving shear rate values from 1 to 100 s⁻¹. The rheological behavior was modelled with the Ostwald-de Waele model (Eq. 3) where τ (Pa) is the shear stress, $\dot{\gamma}$ (s⁻¹) is the shear rate, and K (Pa sⁿ) and n (-) are the consistency and flow behavior indices, respectively.

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (3)$$

Experimental data were fitted to Eq. 3 through nonlinear regression with the software package Sigmaplot™ 12.5, Systat Software, Inc. Then, using the obtained K and n values, it was calculated the apparent viscosity (η_a) with Eq. 4.

$$\eta_a = K\dot{\gamma}_a^{(n-1)} \quad (4)$$

$$\dot{\gamma}_a = kN \quad (5)$$

Where $\dot{\gamma}_a$ is the average shear rate (s⁻¹), k=13 (Metzner and Otto, 1957) and N=130 rpm.

2.3.6 Surface tension (σ) determinations

The surface tension (σ) of culture broth samples (40 mL) was determined with a tensiometer DCAT 21, Dataphysics (Germany) using the Wilhelmy plate technique (accuracy, 0.001 mN/m) at 28°C. Before the tests, samples were homogenized by magnetic stirring during 5 min.

2.3.7 Statistical analysis

Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD). An analysis of variance (ANOVA) was carried out, followed by the All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) (P < 0.05) (SigmaPlot™ 12.5, Systat Software, Inc.).

3. Results and discussions

Figure 1a presents the evolution of the viable nematode concentration by developmental stage, beginning with 1,087 IJ/mL (SD=200). Then, by day 2 the majority of IJs were changed into J4 stage nematodes. By day 4, it was recorded the presence of first generation adult females containing lots of eggs, resulting in a nematode concentration higher than 50,000 individuals/mL by the 6th day. Thereafter, between days 8 and 10, the presence of J4 individuals and adults of the second generation was abundant. Finally, by day 10, the total population was 53,583 nematodes/mL (SD=10,273) with 58.57% (SD=2.4) in the IJ stage (Fig. 2). This is the second report dealing with the liquid culture of *S. colombiense* (Pérez Campos, et al., 2018); in contrast, there are several reports concerning the submerged culture of other species of steinernematids, like *S. feltiae*, *S. carpocapsae* and *S. yirgalemense* (Chavarría-Hernández and de-la-Torre, 2001; Ferreira, Addison, & Malan, 2015; Hirao, Strauch, & Ehlers, 2010) where complex suspended-particles in liquids were probably involved due to the production medium formulations, nematode concentrations, nematodes of different lengths depending on the developmental stage, etc. Furthermore, the size of the nematodes varied importantly depending on the specific strains and on the selected production method (Nguyen and Smart, 1995). In this sense, Table 1 presents the average size of different developmental stages of *S. colombiense*, recorded in the present work.

Taking into account the average size of the developmental stages of the nematodes and their concentration changes with time (Fig. 1a and Fig. 1b), it was determined the evolution of the nematodes-volume fraction in the culture broths (Φ_{NEPs}), as shown in Figure 3, which also shows the volume fraction evolution of both total particles (Φ_{TP}) and coagulated egg yolk particles (Φ_{CEYP}). Although cultures started with a very low value of $\Phi_{EPN}=2\times 10^{-4}$ (SD= 3×10^{-5}), the culture broths were considered as moderately concentrated suspensions due to Φ_{TP} values were in the range $0.08<\Phi_{TP}<0.14$ (Tadros, 2011). In fact, at the beginning the CEYPs (Fig. 4) which come from the egg yolk gelation during the culture

medium sterilization (Kiosseoglou, 2003), were the dominant suspended particles, exhibiting a volume-fraction value very close to that of total particles: $\Phi_{TP} \approx \Phi_{CEYP} = 0.14$ (Fig. 3). The EPN population grew (Fig. 1) and as a result, Φ_{EPN} increased to 0.035 ($SD = 7 \times 10^{-3}$) at the 10th day, exhibiting a similar evolution-profile to that of the nematode concentration (Fig. 1b; X, g/L). According to our knowledge, this is the first time that Φ_{EPN} data are reported concerning the liquid culture of entomopathogenic nematodes.

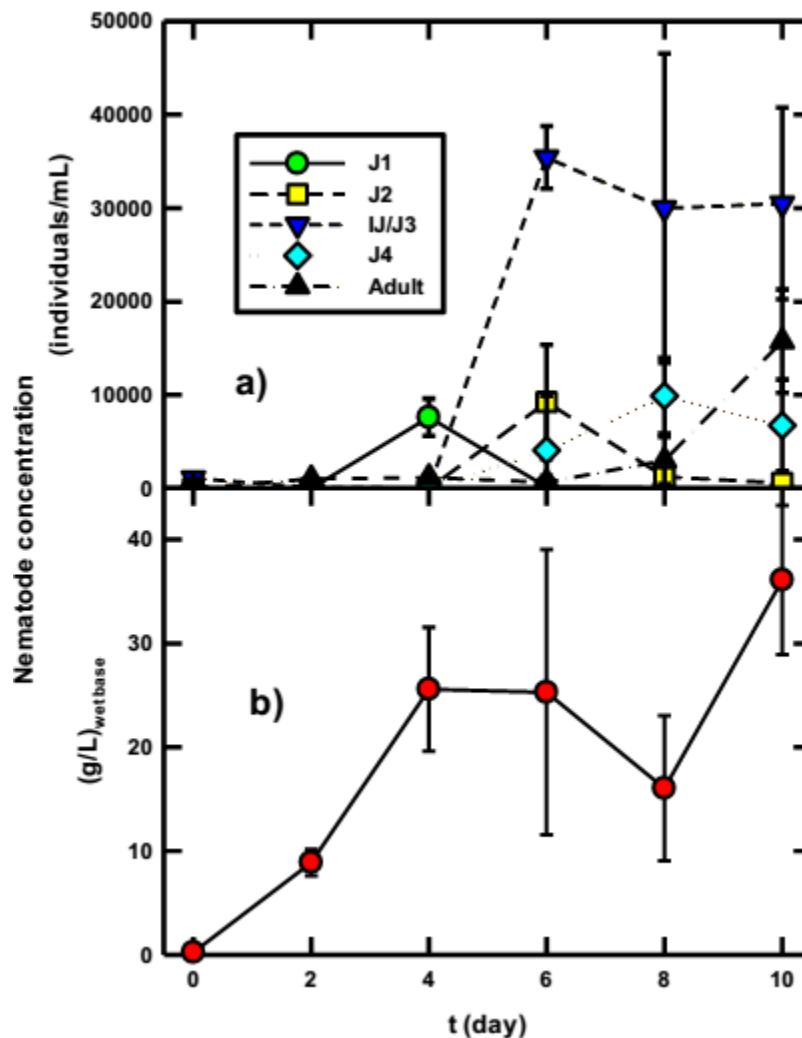


Figure. 1 Evolution of the concentration of the EPN, *Steinernema colombiense*, in presence of its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp. Cultures were carried out in medium PM at 28 °C and 130 rpm. a) By nematode developmental stage: juveniles of the first stage (J1, ●), second stage (J2, ■), third and infective juvenile stages (J3/IJ, ▼), fourth stage (J4, ◆) and the adult stage (Adult, ▲). b) Biomass concentration, wet base (●).

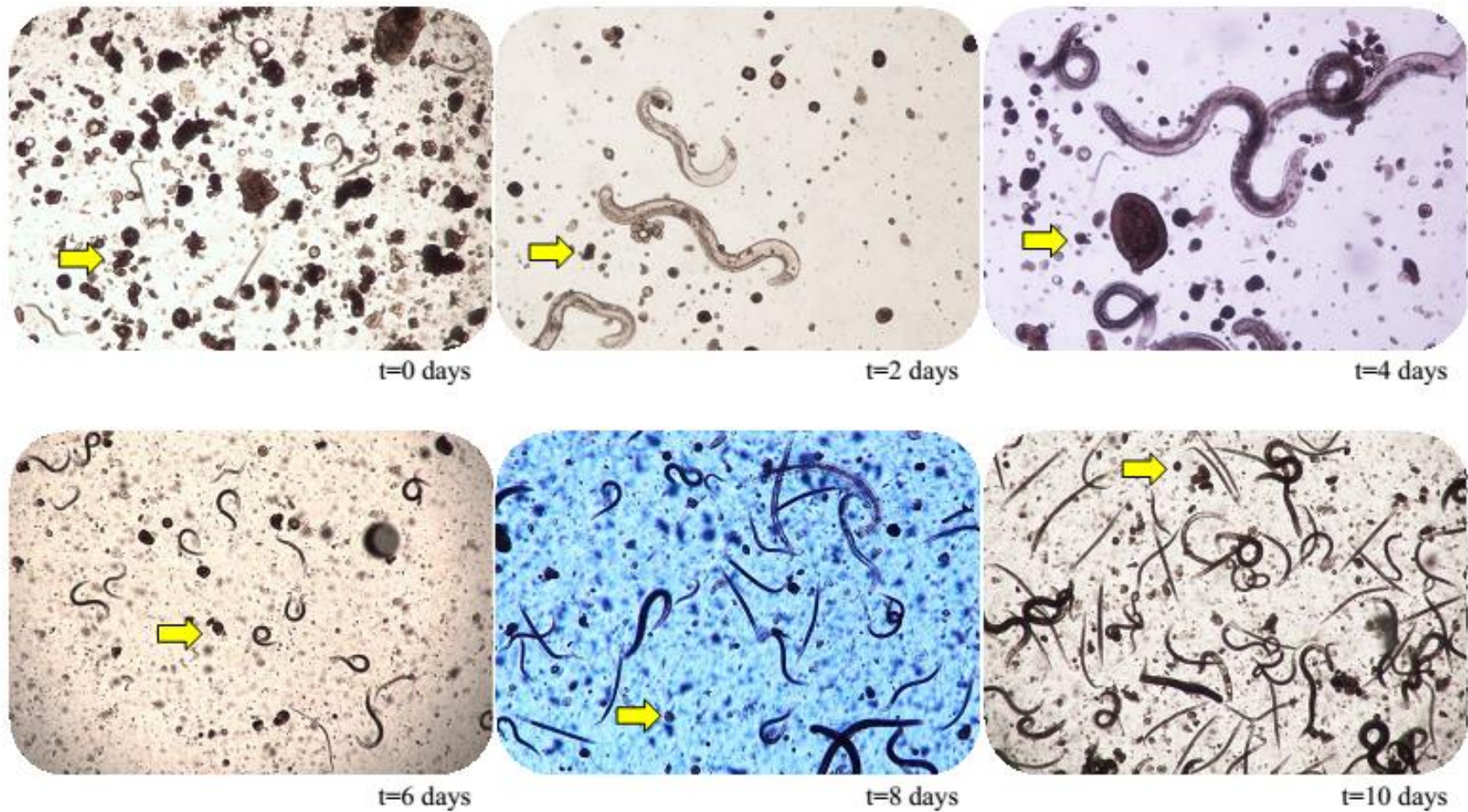


Figure. 2 Light microphotographs of samples of culture broths of liquid cultures of *Steinernema colombiense* at different times. Many coagulated egg yolk particles can be observed (some are indicated by arrows). The magnification was 40x in all images.

Table. 1 Mean body length and width of developmental stages of *Steinernema colombiense* in liquid culture, in presence of *Xenorhabdus* sp. (Standard deviation is in parenthesis).

Stage	Day	Length (μm)	Width (μm)	Density (kg/m^3) ^a
Female	2	1,325.7 (284.5)	97.8 (11.1)	1,035
Male	2	719.6 (86.7)	73.8 (7.08)	1,035
Female	4	2,284.4 (177.96)	121.23(6.76)	1,035
Male	4	899.3 (113.86)	79.63 (12.5)	1,035
J1	4	14.44 (1.33)	1.45 (0.1)	1,050
J2	5	253.98 (19.57)	24.57 (3.14)	1,050
J3/IJ	6	523.28 (54.17)	22.66 (2.85)	1,075
J4	8	447.68 (49.42)	33.57 (4.39)	1,035
Female ^b	10	904.13 (172.87)	52.26 (14.44)	1,035
Male ^b	10	771.81 (18.48)	46.21 (1.62)	1,035

^a Data taken from Young et al. (1998)

^b Adults of the second generation

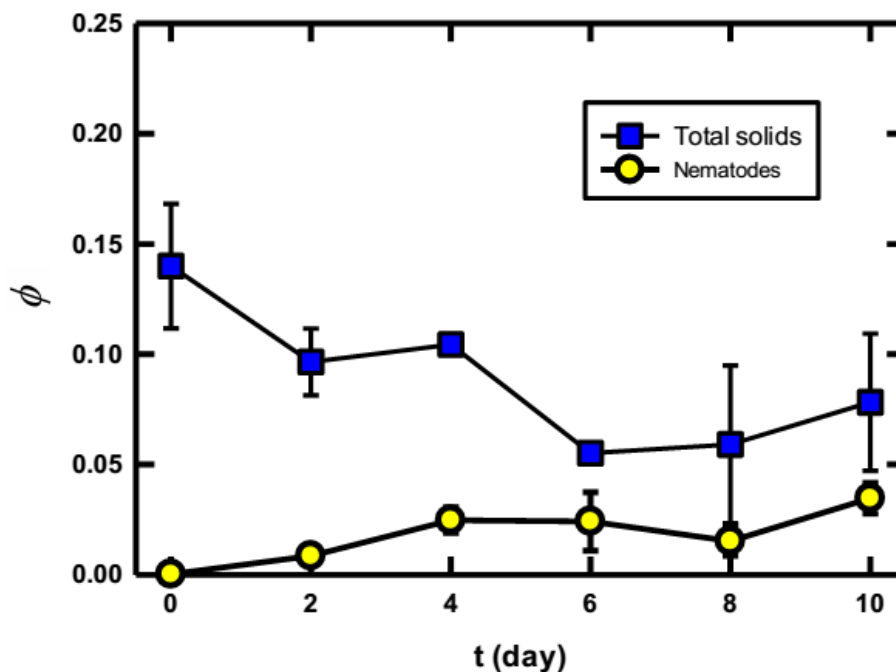


Figure. 3 Evolution of the volume fraction of solid particles (Φ), wet base, during the production of *Steinernema colombiense*, in presence of its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp. Cultures were carried out in medium PM at 28 °C and 130 rpm. Key: Total solids (■); nematodes (●).

Concerning the CEYPs, its concentration decreased with time, as well as its volume fraction value which exhibited no important changes (i.e., Φ_{CEYP} , average=0.04) from day 6 to the end. The Φ_{CEYP} decreasing along the process was probably due to the action of certain secreted enzymes (i.e., lipases, phospholipases and proteases) by *Xenorhabdus* sp. (Boemare and Akhurst, 1988; Forst and Nealson, 1996) which acts on CEYPs, providing food for the EPN population growth (Fig. 1 and Fig. 2). The largest CEYPs were up to 350 μm size during the first steps of the process, exhibiting a high size polydispersity with a clear particle size diminution along the time (Fig. 5). This is the first report concerning the evolution of CEYPs during the EPN production in liquid culture, in spite that various reports in the field used egg yolk as an important source of nutrients (i.e., Johnigk, et al., 2004; Leite, et al., 2016a).

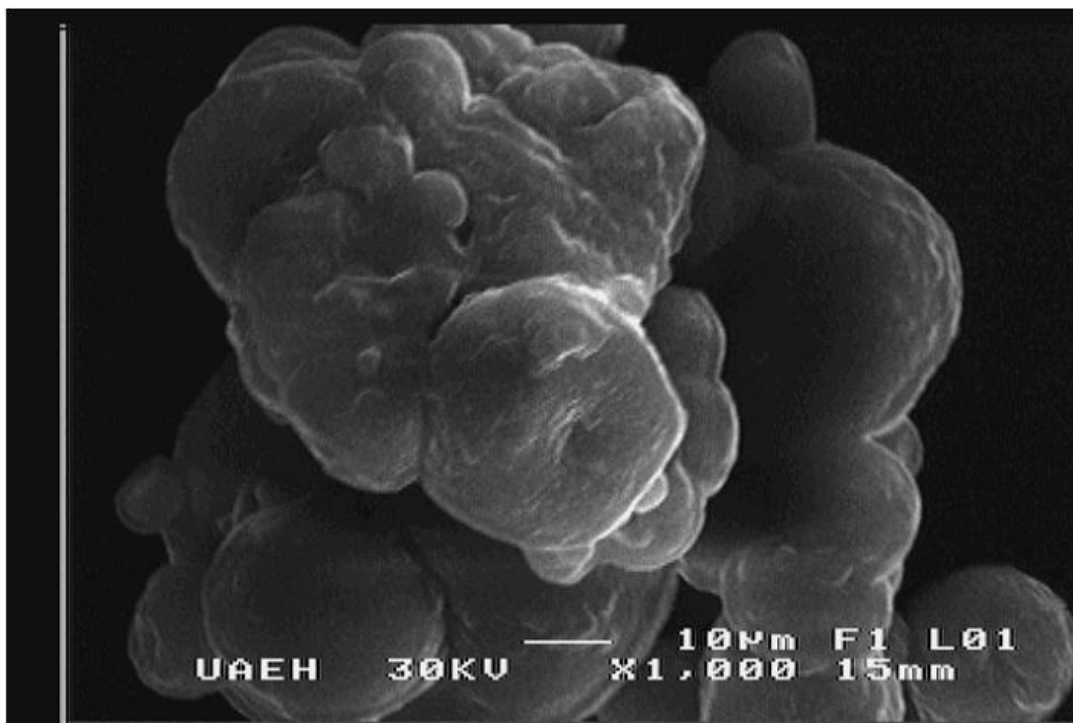


Figure. 4 Scanning electron microscope (SEM) image of coagulated egg yolk particles of the culture medium used for the liquid culture of *Steinernema colombiense* in presence of its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp. (Magnification, $\times 1000$; bar length, 10 μm).

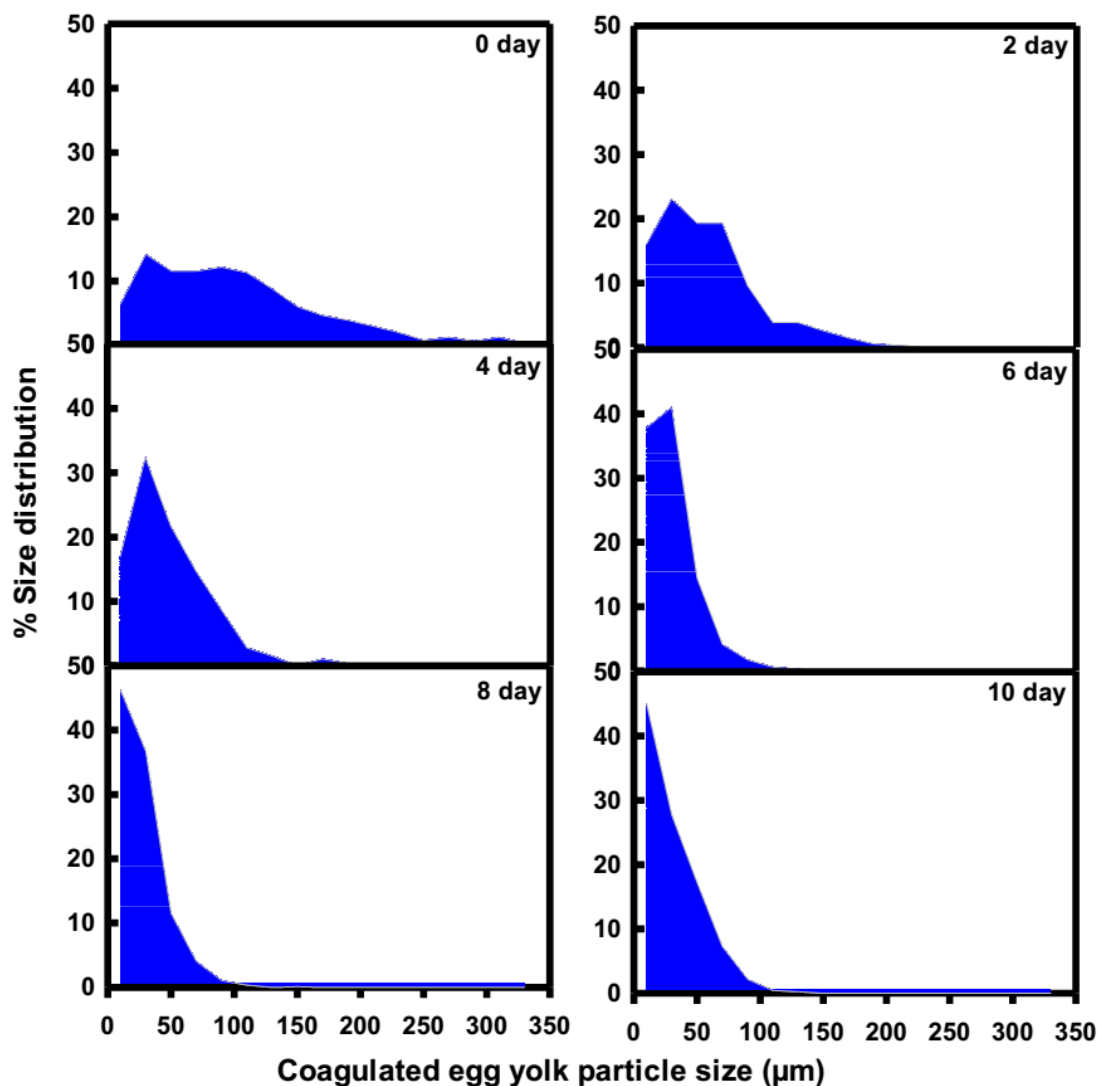


Figure. 5 Evolution of the distribution of suspended coagulated egg yolk particles during the liquid culture of *Steinernema colombiense* in presence of its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp.

On the other hand, Figure 6 presents the evolution of the rheological properties of the fermentation broths to produce *S. colombiense*. At the beginning, when the culture medium was inoculated with *Xenorhabdus* sp. ($t = -2$ days), the fermentation broth exhibited a nearly Newtonian behaviour ($n = 1.04$ (-) and $K = 1.03 \times 10^{-3} \text{ Pa s}^n$, associated to a $\eta_a = 0.001 \text{ Pa s}$) very similar to that of water ($\mu = 1 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$). However, after 2 days of bacterial fermentation (i.e., For Peer Review Only $t = 0$ days) the broth exhibited a strong pseudoplastic behaviour ($n = 0.16$ (-); $K = 0.18 \text{ Pa}$

s^n ; $\eta_a=10\times 10^{-3}$ Pa s). To date it has not been reported that *Xenorhabdus* spp. produce thickener substances such as exopolysaccharides, in contrast to other bacteria, like the Gram-negative *Xanthomonas campestris*, which produces Xanthan gum that notably increased the culture broth viscosity (Galindo, Torrestiana, & Garcia-Rejón, 1989; Palaniraj and Jayaraman, 2011). However, the mucoid appearance of the phase I colonies of both *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* symbionts was reported in solid cultures (Boemare and Akhurst, 2006), which in some cases are associated to the production of exopolysaccharides (Torres-Rodríguez et al., 2014). Young, et al. (1998) suggested that the symbiont bacterium of *H. megidis* probably synthesizes polysaccharide capsules that viscosify the fermentation broths during the production of this nematode, reporting values of $\eta=30\times 10^{-3}$ Pa s for these culture broths.

After the nematodes inoculation at $t=0$ days, the rheological behaviour of the culture broths continued being highly pseudoplastic ($n\leq 0.3$) till the end of the fermentations (Fig. 6). Furthermore, the apparent viscosity values (η_a ; Pa s) of these non-Newtonian fluids were in the ranges $0.010 < \eta_{a, \text{whole-culture-broth}}$ (Pa s) < 0.018 and $0.008 < \eta_{a, \text{culture-broth-supernatant}}$ (Pa s) < 0.015 (Table 2), where the whole culture broths always exhibited higher viscosities than those of their corresponding supernatants after centrifugation, involving viscosity ratios in the range $1.2 < (\eta_{a, \text{Wfb}}/\eta_{a, \text{Bs}}) < 1.5$. Specifically, the major difference between the apparent viscosities of whole culture broths and their supernatants was recorded on the 4th day (i.e., $\eta_{a, \text{Wfb}}/\eta_{a, \text{Bs}}=0.018/0.012=1.5$ times), being precisely that day when the largest nematodes were recorded (i.e., adults of the first generation; Table 1; Fig. 3). Then, the presence of the largest nematodes could explain these observations, taking into account that the rheological behaviour of these systems is affected by the particles volume fraction Φ , particle size and its distribution, morphology and the net energy of interaction (i.e., the balance between repulsive and attractive forces) (Tadros, 2011).

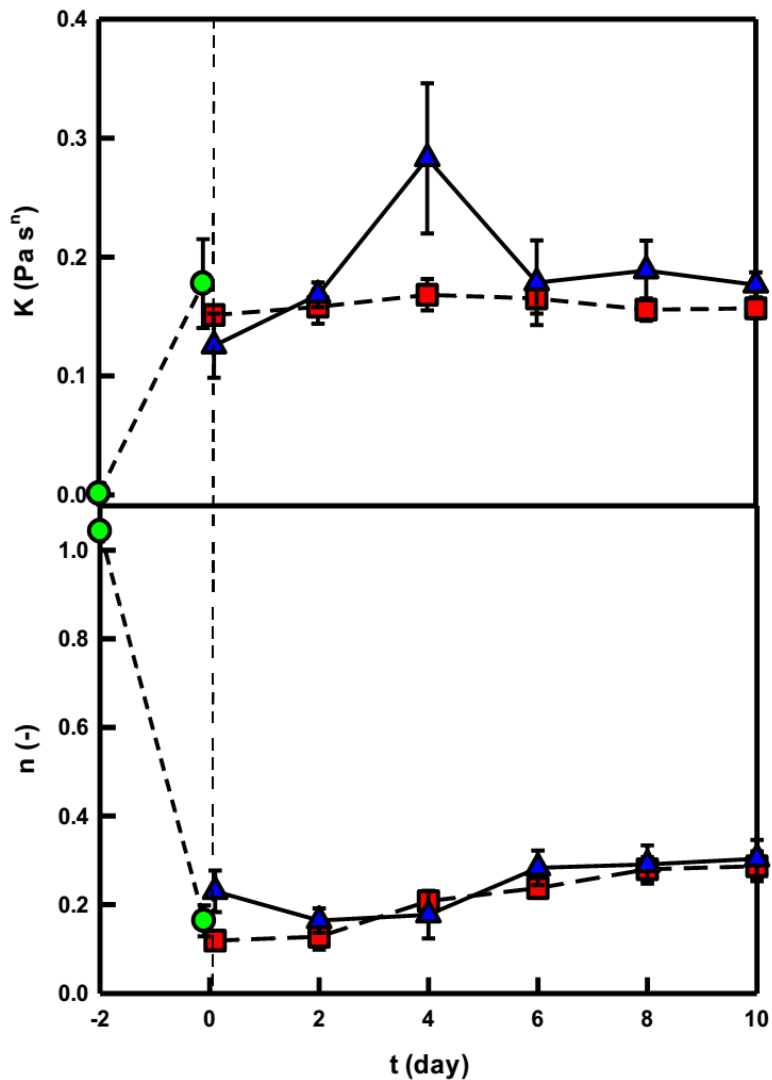


Figure. 6 Time course of the rheological parameters, consistency index (K) and flow behavior index (n) of the Oswald-de Waele model (Eq. 1), during the liquid culture of *Steinernema colombiense* and *Xenorhabdus* sp. Key: (●) Bacterium culture broths prior to nematode inoculation which occurred at t=0 days. (▲) Whole culture broth samples, and (■) supernatant samples after centrifugation of the whole culture broths.

In the present work, the fermentation broths for the production of EPNs were complex systems of flexible cylindrical particles of different sizes depending on the developmental stage, suspended in aqueous media that can include other kind of particles (i.e., CEYP) as well as vegetable oils (Fig. 2). Then, the rheological characterization of these systems is a really interesting task. According to the authors' knowledge, this is the first time that results of rheological properties of

EPNs culture broths are presented considering them as complex suspended particles in aqueous systems.

Table. 2 Apparent viscosity (η_a) of whole culture broths and their supernatants, during the liquid culture of *Steinernema colombiense* in presence of its symbiont, *Xenorhabdus* sp.

t (days)	Apparent viscosity, η_a (Pa s)		Ratio ($\eta_{a,Wfb}/\eta_{a,Bs}$)
	Whole fermentation broth	Broth supernatant	
0	0.010	0.008	1.2
2	0.010	0.009	1.2
4	0.018	0.012	1.5
6	0.016	0.013	1.3
8	0.018	0.014	1.3
10	0.017	0.015	1.2

Other kind of suspensions have been investigated elsewhere; for example, Shewan and Stokes (2015a) worked with suspensions of rigid mono and polydispersed agarose microgels, gas, latex and polymethylmethacrylate beads, with volume fractions ranging from 0.59 to 0.71. In other study, the same group (Shewan and Stokes, 2015b) worked with soft particle suspensions of agarose microgels and polyacrylate microgels, recording non-linear changes at concentrations greater than 0.3 volume fraction. Concerning suspensions of cylindrical particles, such studies are scarce. For example, Iso, Koch, & Cohen (1996) studied the adopted orientation of cellulose acetate propionate fibres (diameter, $50 \mu\text{m} \pm 2.3$; length, $1.18 \text{ mm} \pm 0.06$) suspended in a mixture of glycerine and polyethylene glycol in simple shear flow conditions.

Another culture broth property that should be considered for the understanding and control of aerated liquid fermentations is the surface tension (σ) which is involved in the coalescence of bubbles within the culture medium, determining the aeration efficiency during the bioprocesses (Villadsen, et al., 2011). According to our

knowledge, till now there are no studies concerning the surface tension of culture broths during the production of EPNs.

Figure 7 presents the evolution of the surface tension of the culture broths in the present work, exhibiting a value of 37.9 mN m^{-1} (SD= 0.58) at $t= -2$ days, which is in fact a low value. The surface tension of pure water at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ is 72.0 mN/m (Myers, 2006). The recorded surface tension may be due to the inclusion of egg yolk as a basic ingredient within the production medium. The chicken egg yolk, among other natural resources, contains lecithin (approximately, 10% w/w_{wet} basis) which is the name that receives a large amount of phospholipids with amphiphilic nature that provides unique interfacial properties, which causes it to accumulate in the oil and water interfaces, reducing the interfacial tension and improving the formation of emulsions.

The micellar critical concentration reported for lecithin fractions from the egg yolk is 15.3 mg/mL and is capable to reduce the surface tension to a value of 35.1 mN m^{-1} (Palacios and Wang, 2005), being this value relatively close to the recorded σ values in the present study. Furthermore, after two days of fermentation conducted by the symbiont bacterium, *Xenorhabdus* sp., the surface tension decreased to 31.2 mN m^{-1} (SD=0.24). These σ decreasing would result from the biological activity of *Xenorhabdus* sp. Jewell and Dunphy (1996) reported that *X. nematophilus*, symbiotically associated with *S. carpocapsae* DD136, produces surface-active agents, probably lipopeptides, which can affect the surface tension of culture broths and the entire process. Nonetheless, more research is needed in this concern.

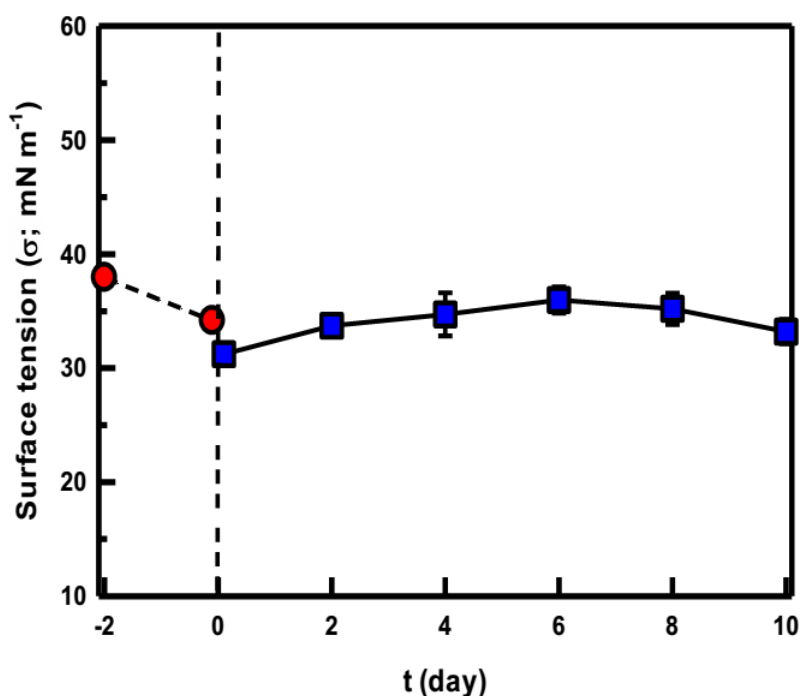


Figure. 7 Time course of the surface tension of the culture broths during the production of *Steinernema colombiense* in presence of its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp. Key: Bacterial fermentation stage (●). Monoxenic culture (■) (i.e., both nematode and bacterium driving the fermentation process).

Then, after the nematode inoculation during the monoxenic culture stage, from $t=0$ to $t=10$ days, small variations were recorded on the surface tension of the culture broth (i.e., $\sigma_{\text{average}}=34 \text{ mN m}^{-1}$; $SD=1.7$), which suggests that nematodes do not release surface-active substances into the medium. In other eukaryotic organism, it has been reported the production and roll of biological surfactants in processes like the dispersion of mitotic chromosomes (Cuylen et al., 2016). On the other hand, *Xenorhabdus* sp. biomass concentration is decreasing due to it is the main food for the nematodes, then no important variations are observed on the culture broth- σ because the surface active agents-concentration, hypothetically, remains without important variations during the monoxenic culture stage.

This is the first report of surface tension of culture broths during the EPN production. This property plays an important role in the oxygen transfer rate in sparged bioreactors due to it affects the gas-liquid mass transfer coefficients and,

as a consequence, the yields and productivities involved in such processes (Garcia-Ochoa and Gomez, 2005; Garcia-Ochoa, Gomez, Santos, & Merchuk, 2010).

4. Conclusion

The monoxenic liquid culture of *Steinernema colombiense* was characterized in its evolutions of nematodes concentration, suspended particles volume fraction, culture broth rheological properties and surface tension. The culture broths behave as moderately concentrated suspensions. Both the whole culture broth and its supernatant after centrifugation exhibited a strong pseudoplastic behaviour. The surface tension did not change importantly, and was determined by the contents of egg yolk within the culture medium. The obtained knowledge will be useful to improve these biotechnological processes, especially concerning the bioreactor design and operation.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

SJPC acknowledged CONACyT Doctor Scholarship. Authors thanked J. Hernández, ICBI UAEH, for SEM photographs; and J. Jimenez, Perkins Ltda, and A. Bustillo, Cenipalma, for fruitful collaboration. This work was supported by CONACyT-México under Grants CB 2014, No. 238359; INFRA 2014, No. 230138, and INFRA 2016, No. 269805.

References

- Akhurst, R. J. (1980). Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 121, 303-309.
- Allen, T. (1981). *Particle size measurement* (3rd ed.): Springer-Science+Business Media, B.V.
- Atwood, D., & Paisley-Jones, C. (2017). Pesticides Industry Sales and Usage 2008 – 2012 Market Estimates. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- Belur, P. D., Inman, F. L., & Holmes, L. D. (2013). Determination of specific oxygen uptake rate of *Photorhabdus luminescens* during submerged culture in lab scale bioreactor. *Biocontrol Science and Technology*, 23(12), 1458-1468. doi: 10.1080/09583157.2013.840361.
- Boemare, N., & Akhurst, R. (2006). The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In M. 369 Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass* (pp. 451-494). New York, NY: Springer New York.
- Boemare, N. E., & Akhurst, R. J. (1988). Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Journal of General Microbiology*, 134(3), 751-761. doi: 10.1099/00221287-134-3-751
- Buecher, E. J., & Popiel, I. (1989). Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. *Journal of Nematology*, 21(4), 500–411 504.

- Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A. Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A. A., & Gerlich, D. W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535(7611), pp. 308-312. doi:10.1038/nature18610
- Chavarría-Hernández, N., & de-la-Torre-Martínez, M. (2001). Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Letters*, 23, 311-315.
- Chavarría-Hernández, N., Espino-García, J.-J., Sanjuan-Galindo, R., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2006). Monoxenic liquid culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using a culture medium containing whey. *Journal of Biotechnology*, 125(1), 75-84. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.021
- Chavarría-Hernández, N., Maciel-Vergara, G., Chavarría-Hernández, J.-C., Castro-Rosas, J., Rodríguez-Pastrana, B.-R., de-la-Torre-Martínez, M., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2011). Mass production of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, through the submerged monoxenic culture in two internal-loop airlift bioreactors with some geometric differences. *Biochemical Engineering Journal*, 55(3), 145-153. doi: 10.1016/j.bej.2011.03.011
- Chavarría-Hernández, N., Ortega-Morales, E., Vargas-Torres, A., Chavarría-Hernández, J.-C., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2010). Submerged monoxenic culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, in a mechanically agitated bioreactor: Evolution of the hydrodynamic and mass transfer conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(4), 580-589. doi: 10.1007/s1 2257-430 009-3107-z

- Chavarría-Hernández, N., Pérez-Pérez, N.-C., Chavarría-Hernández, J.-C., Barahona-Pérez, L.-F., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2014). Specific oxygen uptake of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*, 24(7), 723-733.
- Chavarría-Hernández, N., Rodríguez-Hernández, A.-I., Pérez-Guevara, F., & de-la-Torre, M. (2003). Evolution of culture broth rheological properties during propagation of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Progress*, 19, 405-409.
- Chavarría-Hernández, N., Sanjuan-Galindo, R., Rodríguez-Pastrana, B.-R., Medina-Torres, L., & Rodríguez-Hernández, A.-I. (2007). Submerged monoxenic culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in an internal-loop airlift bioreactor using two configurations of the inner tube. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 167-176. doi: 10.1002/bit.21356
- Dito, D. F., Shapiro-Ilan, D. I., Dunlap, C. A., Behle, R. W., & Lewis, E. E. (2016). Enhanced biological control potential of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, applied with a protective gel formulation. *Biocontrol Science and Technology*, 1-28. doi: 10.1080/09583157.2016.1159659
- Ferreira, T., Addison, M. F., & Malan, A. P. (2015). Development and population dynamics of *Steinernema yirgalemense* (Rhabditida: Steinernematidae) and growth characteristics of its associated *Xenorhabdus indica* symbiont in liquid culture. *J Helminthol*, 1-8. doi: 10.1017/S0022149X15000450
- Galindo, E., Torrestiana, B., & Garcia-Rejón, A. (1989). Rheological characterization of xanthan fermentation broths and their reconstituted solutions. *Bioprocess Engineering*, 4(3), pp. 113-117. doi:10.1007/BF00369759

- Garcia-Ochoa, F., & Gomez, E. (2005). Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(6), pp. 761-772. doi:10.1002/bit.20638
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E., & Merchuk, J. C. (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), pp. 289-307. doi:10.1016/j.bej.2010.01.011
- Guo, W., Yan, X., Zhao, G., Chen, J., & Han, R. (2014). Efficacy of entomopathogenic *Steinernema* and *Heterorhabditis* nematodes against *Holotrichia obliterata*. *Journal of Pest Science*, 88(2), pp. 359-368. doi:10.1007/s10340-014-0626-y
- Hirao, A., Strauch, O., & Ehlers, R.-U. (2010). Life cycle and population development of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda, Rhabditida) in monoxenic liquid culture. *Nematology*, 12(2), 201-210. doi: 10.1163/156854109x463756
- Iso, Y., Koch, D. L., & Cohen, C. (1996). Orientation in simple shear flow of semi-dilute fiber suspensions 1. Weakly elastic fluids. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 62(2-3), 115-134.
- Jewell, J. B., & Dunphy, G. B. (1996). Antifoaming agent produced by strains of the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* and its effect on the development of the insect pathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* DD136. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 42(1), pp. 39-49. doi:10.2323/jgam.42.39.
- Johnigk, S. A., Ecke, F., Poehling, M., & Ehlers, R. U. (2004). Liquid culture mass production of biocontrol nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): improved timing of dauer juvenile inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(5), 651-658. doi: 10.1007/s00253-003-1519-9

- Khan, M. A., Ahmad, W., Paul, B., Paul, S., Khan, Z., & Aggarwal, C. (2016). Entomopathogenic Nematodes for the Management of Subterranean Termites. In K. R. Hakeem, M. S. Akhtar, & S. N. A. Abdullah (Eds.), *Plant, Soil and Microbes. Volume 1: Implications in Crop Science* (pp. 317-352). Switzerland: Springer International Publishing.
- Kiosseoglou, V. (2003). Egg yolk protein gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(4-5), 365-370. doi: 10.1016/s1359-0294(03)00094-3
- Leite, L. G., Shapiro-Ilan, D. I., Hazir, S., & Jackson, M. A. (2016). The Effects of Nutrient Concentration, Addition of Thickeners, and Agitation Speed on Liquid Fermentation of *Steinernema feltiae*. *Journal of Nematology*, 48(2), 126-133.
- Leite, L. G., Shapiro-Ilan, D. I., Hazir, S., & Jackson, M. A. (2016). A new medium for liquid fermentation of *Steinernema feltiae*: selection of lipid and protein sources. *Nematropica*, 46(2), 147-153.
- Martínez-Valenzuela, C., & Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 23(4), 185-200.
- Marx-Stoelting, P., Niemann, L., Ritz, V., Ulbrich, B., Gall, A., Hirsch-Ernst, K. I., . . . Solecki, R. (2014). Assessment of three approaches for regulatory decision making on pesticides with endocrine disrupting properties. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 70(3), 590-604. doi: 10.1016/j.yrtph.2014.09.001
- Metzner, A. B., & Otto, R. E. (1957). Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE Journal*, 3(1), pp. 3-10. doi:10.1002/aic.690030103.
- Myers, D. (2006). *Surfactant science and technology* (Third ed.) USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Navarro, M. J., & Gea, F. J. (2014). Entomopathogenic nematodes for the control of phorid and sciarid flies in mushroom crops. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49(1), 11-17. doi: 10.1590/s0100-204x2014000100002
- Nguyen, K. B., & Smart, G. C. (1995). Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology*, 27(2), pp. 206-212.
- Olson, S. (2015). An Analysis of the Biopesticide Market Now and Where it is Going. *Outlooks on Pest Management*, 26(5), 203-206. doi: 10.1564/v26_oct_04
- Palacios, L. E., & Wang, T. (2005). Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. 498 *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(8), 571-578.
- Palaniraj, A., & Jayaraman, V. (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*, 106(1), 1-12. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.03.035
- Pérez-Campos, S.-J., Rodríguez-Hernández, A.-I., del-Rocío López-Cuellar, M., Zepeda-Bastida, A., & Chavarría-Hernández, N. (2018). *In-vitro* liquid culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense*, in orbitally shaken flasks. *Biocontrol Science and Technology*, 28(9), 901-911. doi: 10.1080/09583157.2018.1499872
- Shapiro-Ilan, D. I., Bock, C. H., & Hotchkiss, M. W. (2014). Suppression of pecan and peach pathogens on different substrates using *Xenorhabdus bovienii luminescens*. *Biological Control*. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.05.010

- Shapiro-Ilan, D. I., Han, R., & Qiu, X. (2014). Production of Entomopathogenic Nematodes. In J. A. Morales-Ramos, M. G. Rojas, & D. I. Shapiro-Ilan (Eds.), *Mass Production of Beneficial Organisms. Invertebrates and Entomopathogens* (pp. 321 -355). USA: Academic Press doi: 10.1016/b978-0-12-391453-8.00010-8
- Shewan, H. M., & Stokes, J. R. (2015a). Analytically predicting the viscosity of hard sphere suspensions from the particle size distribution. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 222, 72-81. doi: 10.1016/j.jnnfm.2014.09.002
- Shewan, H. M., & Stokes, J. R. (2015b). Viscosity of soft spherical micro-hydrogel suspensions. *J Colloid Interface Sci*, 442, 75-81. doi: 10.1016/j.jcis.2014.11.064
- Strauch, O., & Ehlers, R. U. (2000). Influence of the aeration rate on the yields of the biocontrol nematode *Heterorhabditis megidis* in monoxenic liquid cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(1), 9-13. doi: 10.1007/s002530000352
- Tadros, T. F. (2011). *Rheology of dispersions: principles and applications*: John Wiley & Sons.
- Tanada, Y., & Kaya, H. K. (1993). *Insect Pathology*. USA: Academic Press, Inc.
- Peer Review Only
- Torres-Rodríguez, I., Rodríguez-Alegría, M., Miranda-Molina, A., Giles-Gómez, M., Conca Morales, R., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Escalante, A. (2014). Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchi* isolated from traditional fermented pulque beverage. *SpringerPlus*, 3(1), p 583. doi:10.1186/2193-1801-3-583
- Villadsen, J., Nielsen, J., & Lidén, G. (2011). *Bioreaction Engineering Principles* (3 ed.) USA: Springer Science+Business Media.

- Woodring, J. L., & Kaya, H. K. (1988). *Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A Handbook of Biology and Techniques*. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas.
- Yoo, S. K., Brown, I., & Gaugler, R. (2000). Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6), pp. 759-763. doi:10.1007/s002530000478
- Young, J. M., Dunnill, P., & Pearce, J. D. (1998). Physical properties of liquid nematode cultures and the design of recovery operations. *Bioprocess Engineering*, 19(2), pp. 121-127. doi:10.1007/s004490050492

Conclusiones generales

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- 1) Usando un medio que contiene yema de huevo, extracto de levadura y aceite de maíz, se obtuvieron concentraciones de nematodos (Nep's) cercanas a 60,000 Nep's/mL.
- 2) El uso de dos geometrías en reactor agitados orbitalmente en la producción del nemátodo *Steinernema colombiense*, no mostraron diferencias significativas en tanto a la población total de individuos pero si a la concentración final del estadio infectivo juvenil, siendo la geometría A con la que se obtuvieron mejores resultados (93% de la población total).
- 3) La evolución de los caldos de fermentación en producción del nemátodo *Steinernema colombiense*, no afectó a la tensión superficial del medio, pero los valores registrados son los suficientemente bajos (30-35 mN/m) para tener una adecuada oxigenación de los caldos de fermentación.
- 4) Las pruebas de cizalla simple estacionaria muestran que en diferentes etapas del proceso, se producen o se disuelven compuestos que le dan un carácter pseudoplástico a los caldos de cultivo, el cual fue modelado con la ecuación Oswald-de Waele. Es el medio continuo acuoso, el que le da el carácter pseudoplástico a los caldos de fermentación. La principal etapa donde se dan estos cambios es en la fermentación de la bacteria simbiote (*Xenorhabdus* sp.) en el medio de producción.