

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

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

^a Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo de Bravo, Hidalgo, C.P. 43600, México.

^b Centro de Investigación e Innovación Tecnológica, Instituto Tecnológico de Nuevo León. Nuevo León, C.P. 67170, México.

e-mail: sixtojosue@gmail.com

RESUMEN

En el mundo se están buscando tecnologías amigables con el ambiente que permitan minimizar el impacto del uso de compuestos químicos, que contaminan y dañan el ambiente. Una alternativa a estos problemas son los agentes de control biológico. En los próximos años, el control biológico representará una derrama económica importante a nivel mundial, alrededor de \$4'000,000,000 de dólares para 2023. El presente trabajo se presenta el rol que puede tener la utilización de nemátodos entomopatógenos en este mercado, se expone la importancia de los sistemas de producción haciendo un énfasis en el cultivo líquido y se muestra algunas áreas de oportunidad para mejorar los rendimientos de estos procesos.

Palabras clave: Bioinsecticidas; cultivo líquido; nemátodos entomopatógenos.

Abstract

There are looking for friendly technologies in the world that minimize environmental impact of the use of chemicals which contaminate and damage the environment. Biological control agents are an alternative to these problems. For the next few years, biological control will represent an important global economic impact, about 4 billion USD for 2023. This paper presents the role that the use of entomopathogenic nematodes can play in this market, the importance of production systems is highlighted, with an emphasis on liquid culture and some areas of opportunity to improve the yields of the processes are shown.

Key words: Bioinsecticides; liquid culture; entomopathogenic nematodes.



I. 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 flora y fauna no objetivo. Existen programas como el “Manejo integrado de plagas” (IPM por sus siglas en inglés) propuesto por la FAO, que propone 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. 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. 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. Entre los bioinsecticidas, los nemátodos entomopatógenos (NE) se han utilizado con éxito para el control biológico de una amplia gama de plagas de insectos. En México, existen pocas empresas como Koppert México que comercializan geles de *S. carpocapsae*, por lo que México podría representar una zona importante de comercialización 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) en comparación con los productos químicos, por lo que se les considera de alto valor comercial. 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 (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. 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.

II. FENOTIPOS DE LAS BACTERIAS SIMBIOTAS DE LOS NE.

Las bacterias simbiotas presentan dos tipos de fase, estas difieren morfológicamente y fisiológicamente. Para diferenciar las fases se puede utilizar un medio de cultivo diferencial como NBTA, 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. 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 simbiota *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 simbiotas puede llegar a matar al huésped. Sin embargo, para ambas bacterias simbiotas, la fase 2 es menos eficaz para mantener las condiciones de crecimiento de los NE. En la fase 2, disminuye la producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios, aumentando la producción de enzimas respiratorias y tween-esterasas (Ferreira & Malan, 2014).

III. CICLO DE VIDA DE LOS NE.

El ciclo de vida de los NE se inicia con un estadio llamado “infectivo juvenil” (IJ), este se caracteriza por no comer, debido a que están adaptados morfológicamente y fisiológicamente para sobrevivir tiempos largos en la tierra.

Cuando los IJ encuentran un huésped (larva de insecto), entran en la cavidad interior por orificios naturales como boca, ano o directamente por la cutícula (sí tiene una herida), liberan su bacteria simbiote en el hemocele del insecto, está 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 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 que salen de la larva para buscar un nuevo huésped.

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, se pueden observar una importante cantidad de huevecillos y nemátodos en la fase J1. Al sexto día, parte de la población

total se encontraba en la fase J3/J4. 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 presentan cambios significativos en la población de los NE. Para el día 10, la población total puede alcanzar los 60 mil individuos por mL, donde el 87% de población son IJ.

IV. 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 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).

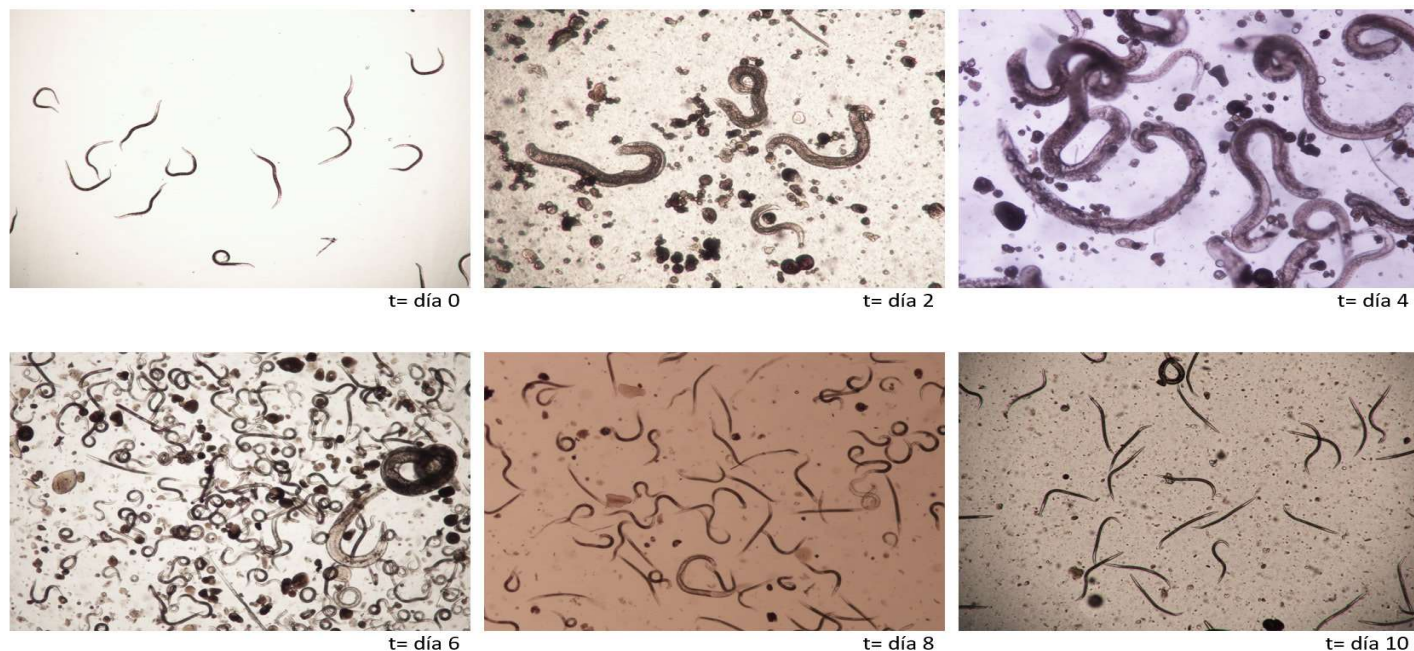


Figura 1. Evolución del crecimiento de *S. colombiense* y su simbiote *Xenorhabdus* sp. en matraces cilíndricos con agitación orbital. Condiciones de operación: 130 rpm y 28 °C. Microfotografías tomadas con objetivo 40X en un microscopio de campo claro (Nikon 80i).



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 $\frac{\text{producidos}}{\text{inoculados}}$), 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 por 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 en el medio de producción, es otro factor determinante en la productividad de IJ de *S. carpocapsae* y *S. feltiae*, hasta ahora se ha reportado que las concentraciones ideales de inóculo deben ser mayores de 10x10¹⁰ bacterias por 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 por 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 individuos, 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 I). Para evitar un cambio de fase de la bacteria simbiote 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, por lo que, no está disponible para todo el público. Un ejemplo 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>Neoplectana 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 < KLa (10 ⁻² s ⁻¹) < 3.5	4 L	Recirculación interna	Chavarria-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	Chavarria-Hernandez & 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	Chavarria-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)

Neoplectana posteriormente fue clasificado a *Steinernema*.

NR: No reportado, NA: No Aplica. KLa: coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

V. 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, para que suceda el apareamiento, el macho debe enredarse en la hembra. Sin embargo, 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). La fase 2 de la bacteria simbionte, puede influir en el rendimiento de IJ; 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. Carpocapsae* (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 estos 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 et al., 2014). 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. 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 ($K_L a$). 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 $K_L a$, incluso al aumentar el número de impulsores en reactores agitados mecánicamente (Ducci & Weheliye, 2014). Para reactores Air-lift, también se observó una disminución del $K_L a$ 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 poco estudiada, 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 et al., 2003; Nuñez-Ramírez et al., 2015; Young, Dunnill, & Pearce, 1998), que han sido ajustados al modelo de Oswald-de Waele ($\eta = k \cdot \dot{\gamma}^{n-1}$), donde se reportan dos parámetros reológicos: k (índice de consistencia, Pa sⁿ) 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, estas se forman principalmente por la agregación de proteínas que forman parte del medio de producción y los NE, esto último podemos definirlo como partículas cilíndricas inertes.

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 Einstein - 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. Para suspensiones de partículas suaves como microgeles de agarosa y microgeles de poliácrlato 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 $K_L a$ (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. 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 por mL, se observa un aumento de la viscosidad (Nuñez-Ramírez 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 $K_L a$ 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.

VI. CONCLUSIÓN

El cultivo líquido es 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. Otros factores importantes para fijar las condiciones de operación más adecuados en un bioreactor, son la tasa de respiración de las bacterias simbiotes y de los NE.

VII. REFERENCIAS

- Bedding, R.A. (1981). Low cost *in vitro* mass production of *neoplectana* 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.
- 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.
- 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.
- Ducci, A., & Weheliye, W.H. (2014). Orbitally shaken bioreactors-viscosity effects on flow characteristics. *AIChE Journal*, 60(11), 3951-3968.
- 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.
- García-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv*, 27(2), 153-176.
- García-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., & Georgis, R. (1991). Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Biological Control*, 1(4), 269-274.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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*. 52(3): 316-324.
- Iso, Y., Koch, D.L., & Cohen, C. (1996). Orientation in simple shear flow of semi-dilute fiber suspensions I. 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.
- 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* 5(207).
- 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.
- 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.
- 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.
- Wouts, W.M. (1981). Mass Production of the Entomogenous Nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on Artificial Media. *Journal of Nematology*, 13(4), 467-469.
- 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.