

## **Cultivo Monoxénico Sumergido del Nematodo Entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, en Biorreactor *airlift* con Recirculación Interna**

Gabriela Maciel-Vergara, Adriana-Inés Rodríguez-Hernández, Norberto Chavarría-Hernández\*

*Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria. Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Av. Universidad km 1, Rancho Universitario, Tulancingo de Bravo, Hidalgo. CP 43600, México.*

*E-mail: [norberto@uaeh.edu.mx](mailto:norberto@uaeh.edu.mx)*

### **RESUMEN**

El presente artículo trata acerca del cultivo sumergido del nematodo entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, aislado en el estado de Hidalgo, México, y su bacteria simbiote, *Xenorhabdus nematophila*, en un biorreactor con agitación neumática, del tipo *airlift* con recirculación interna, usando un medio de cultivo complejo que contiene 10% (volumen/volumen, v/v) aguamiel de agave (*Agave* spp.), 2% v/v aceite de maíz, 1% (peso/volumen, p/v) yema de huevo deshidratada, 0.5% p/v NaCl y 1% p/v extracto de levadura. Se realizaron dos corridas de fermentación, F1 y F2, expresándose las condiciones de operación en términos del número adimensional de Reynolds (Re), como índice de las condiciones hidrodinámicas, y del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $k_La$ , como indicador de las condiciones de oxigenación imperantes durante los bioprocesos. Los experimentos comenzaron con aproximadamente 1,000 nematodos en fase infectiva juvenil (IJ) por mililitro (ml) de medio, alcanzándose al día 16, 127,220 y 92,897 nematodos/ml con 99.7% y 96.5% en fase IJ, en las corridas F1 y F2, respectivamente. Las propiedades reológicas de los caldos de fermentación evolucionaron del comportamiento dilatante al inicio, a casi Newtoniano al final de los experimentos, y las condiciones de operación cambiaron notablemente, involucrando valores del número Re de 80 a 4,900 y del  $k_La$  en el intervalo de  $3.1 \times 10^{-3}$  a  $6.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . La máxima concentración de fases IJ, 126,882 por ml, fue alcanzada en la fermentación F1.

**Palabras clave:** biorreactor *airlift*, hidrodinámica, transferencia de oxígeno, nematodos entomopatógenos, biocontrol, variedades silvestres.

## ABSTRACT

The present article reports on the submerged culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, isolated within the state of Hidalgo, Mexico, and its symbiotic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, in an internal-loop *airlift* bioreactor using a complex culture medium containing 10% (volume/volume, v/v) agave sap from *Agave* spp., 2% v/v corn oil, 1% (weight/volume, w/v) dried egg yolk, 0.5% w/v NaCl and 1% w/v yeast extract. Two fermentation runs, F1 and F2, were carried out at operating conditions expressed in terms of the dimensionless Reynolds number ( $Re$ ), as an index of hydrodynamics, and the volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_La$ ), as an index of oxygen transfer conditions, during the bioprocesses. Experiments initiated with 1,000 infective juvenile stage nematodes (IJ) per millilitre (ml), approximately, and at the day 16, they achieved 127,220 and 92,897 nematodes/ml with 99.7% and 96.5% in IJ stage, corresponding to F1 and F2 runs, respectively. Culture broth rheological properties evolved from the dilatant behaviour to nearly the Newtonian one at the end. Also, operating conditions changed notably involving values of  $Re$  from 80 to 4,900, and  $k_La$  from  $3.1 \times 10^{-3}$  to  $6.4 \times 10^{-3} s^{-1}$ . The maximum IJ concentration, 126,882 per ml, was achieved within F1 run.

**Keywords:** *airlift* bioreactor, hydrodynamics, oxygen transfer, entomopathogenic nematodes, biocontrol, indigenous strains.

## INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del uso excesivo de sustancias químicas en la agricultura, se han reportado efectos ecológicos negativos como contaminación de suelo y agua, impactos en las cadenas alimentarias, así como efectos sobre la salud humana (<http://www.fao.org/ag/magazine/0205sp2test.htm>; <http://www.fao.org/ag/magazine/0504sp2.htm>). Particularmente, el abuso en el uso de sustancias con actividad insecticida es preocupante. En este sentido, el control biológico ha mostrado ser una alternativa viable para el control de un amplio número de insectos plaga (Hajek, 2004). Específicamente, el uso de las llamadas fases

infectivas juveniles (IJ) de nematodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, ha mostrado ser efectivo en ciertos sistemas agrícolas para controlar larvas de insectos plaga como escarabajos en viñedos y pastos (i. e., *Otiorhynchus sulcatus* y *Pachnaeus* spp.; Shapiro-Ilan & Gaugler, 2002). Tanto steinernemátidos como heterorhabdítidos han establecido relaciones evolutivas simbióticas con bacterias Gram negativas de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente, las cuales pueden presentar dos fenotipos, siendo únicamente la llamada fase I, esencial para la actividad entomopatógena así como

para la reproducción de los nematodos (Forst *et al.*, 1997). La bacteria es acarreada en el intestino del IJ, el cual es el único estadio de desarrollo de los NEP que puede vivir fuera del insecto huésped y tiene la habilidad de buscar a su presa e invadirla, liberando a su bacteria simbionte en la hemolinfa del insecto, donde ésta prolifera produciendo toxinas y enzimas que son responsables de la muerte del insecto y su bioconversión en una sopa nutritiva ideal para el crecimiento y reproducción de los NEP, lo cual ocurre hasta que los nutrientes se agotan, momento en el que se induce una nueva generación de IJ que abandona la carcasa del insecto en búsqueda de nuevos huéspedes (Forst & Clarke, 2002). Por lo anterior, la producción masiva de fases IJ de NEP es de interés actual. En este sentido, de acuerdo con distintos autores la mejor opción tecnológica para producir NEP es el cultivo monoxénico sumergido usando biorreactores (Ehlers, 2001; Chavarría-Hernández *et al.*, 2008) aunque los NEP de mayor "calidad" se obtienen mediante el cultivo in vivo. Actualmente, aunque algunas compañías en el mundo producen distintas especies de NEP mediante el cultivo monoxénico sumergido (<http://www.sipweb.org/DirectoryMCP/nematodes.htm>), los resultados obtenidos son muy variables por lo que esta tecnología debe ser mejorada. En particular, para disponer de bioprocesos más confiables para la producción de NEP, se requieren más estudios concernientes a la formulación de medios de cultivo, cinética del crecimiento poblacional de los NEP, diseño de biorreactores así como exploración de mejores condiciones de

operación. Más aún, son escasos los estudios relacionados con los efectos de las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de oxígeno durante la producción de NEP (Chavarría-Hernández *et al.*, 2007), aunque hay algunos reportes dedicados a otros aspectos durante su producción usando distintos tipos de biorreactores (Pace *et al.*, 1986; Friedman *et al.*, 1991; Surrey & Davies, 1996; Ehlers *et al.*, 1998; Strauch & Ehlers, 2000; Neves *et al.*, 2001; Johnnigk *et al.*, 2004).

Por otra parte, en un afán de conservar o alterar lo menos posible la biodiversidad existente en los distintos ecosistemas, la práctica del biocontrol de insectos plaga mediante el uso de NEP actualmente tiende a usar preferentemente especies de NEP endémicos de las zonas geográficas donde éstos serían aplicados para el biocontrol (Campos-Herrera *et al.*, 2007), en lugar de usar especies exóticas aisladas de nichos ecológicos diferentes, que por otra parte aún continúa siendo la práctica más ampliamente usada en muchos agrosistemas. Más aún, se ha reportado que el uso de especies nativas de NEP es frecuentemente más eficaz que el correspondiente a especies exóticas, cuando los especímenes han sido aplicados en igualdad de circunstancias.

Con base en lo anterior, el presente estudio trata sobre la producción masiva del NEP, *Steinernema carpocapsae* CABA01 aislado en el estado de Hidalgo, México, mediante el cultivo monoxénico sumergido usando un biorreactor agitado neumáticamente, del tipo *airlift* con recirculación interna a través de un cilindro

concéntrico. Uno de los intereses principales fue el establecer cómo cambian las condiciones del proceso con el tiempo, para lo cual el número de Reynolds ( $Re$ ) y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ), fueron tomados como indicadores de las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de oxígeno imperantes durante las fermentaciones, respectivamente. Para lograr lo anterior, la evaluación de la viscosidad aparente ( $\eta_a$ ) del caldo de fermentación fue de gran importancia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Especímenes biológicos*

Fases IJ de *S. carpocapsae* CABA01 fueron mantenidas en suspensiones acuosas (300,000 IJ/ml) en botellas para el cultivo de células, a 4°C y periodos de agitación de 15 min cada 15 d para proporcionar el oxígeno requerido. Los NEP fueron aislados de muestras de suelo de Alcholoaya, en el estado de Hidalgo, México, e identificados por métodos de morfometría y biología molecular (Pérez-Santos, 2009).

*X. nematophila* en fase I, fue conservada en viales de 2 ml en 25% p/v glicerol a -80°C ( $10^9$  células por vial). La bacteria simbiótica fue aislada de cultivos en NBTA (Akhurst, 1980) estriados con hemolinfa de larvas del último instar de *Galleria mellonella* previamente infectadas con fases IJ de *S. carpocapsae* CABA01 (Woodring & Kaya, 1988). La bacteria fue identificada mediante secuenciación del gene 16s rADN y pruebas bioquímicas (Martínez-Rodríguez, 2008)

### *Medios de cultivo*

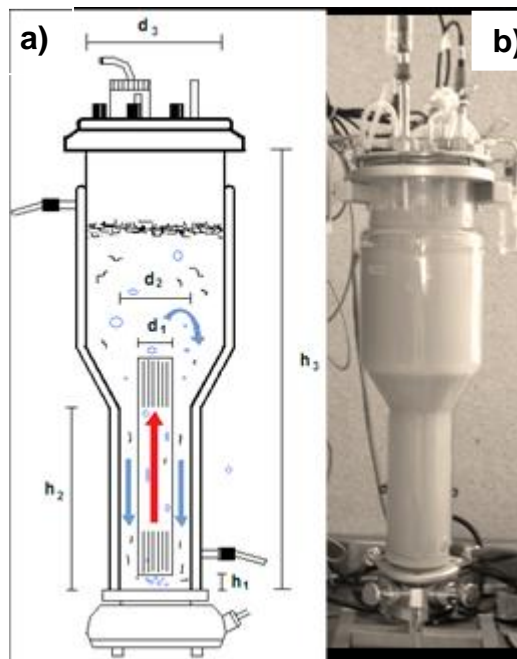
Medio STB (Buecher & Popiel, 1989). 3% p/v caldo de soya tripticasa y 0.5% p/v extracto de levadura. pH 7.

Agar NBTA (Akhurst, 1980). 2.3% p/v agar nutritivo, 0.0375% p/v azul de bromotimol y 0.004% p/v cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). pH 8.5.

Medio MA10 (Modificado de Islas-López *et al.*, 2005). 10% v/v aguamiel de *Agave* spp., 2% v/v aceite de maíz, 1% p/v yema de huevo deshidratada, 0.5% p/v NaCl, 1% p/v extracto de levadura. Se usó 0.3 ml de antiespumante A [100% base silicón] (SIGMA-Aldrich) por cada litro de medio. pH de 7.5.

### *Cultivo monoxénico sumergido de Steinernema carpocapsae CABA01*

Un vial de conservación de *X. nematophila* se inoculó en 420 ml de medio STB y se incubó a 150 rpm y 30°C durante 48 h. Muestras de este cultivo fueron estriadas sobre placas de NBTA para verificar la presencia de la fase I bacteriana, la cual absorbe al azul de bromotimol dando lugar a colonias azul oscuro, mientras que la fase II bacteriana no absorbe este colorante, además de reducir al TTC dando lugar a colonias rojas (Akhurst, 1980). El caldo-STB fue posteriormente bombeado al biorreactor *airlift* con recirculación interna (Fig. 1) que contenía 3.8 l de medio MA10 estéril. El biorreactor fue previamente sanitizado durante 1.5 h con vapor saturado a 98°C. Luego, el cultivo bacteriano fue incubado a 30°C con



**Fig. 1.** Biorreactor *airlift* con recirculación interna usado para el cultivo sumergido del nematodo entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, aislado en el estado de Hidalgo, México, y su bacteria simbiote, *Xenorhabdus nematophila*. El volumen de trabajo fue 4.2 l y las fermentaciones se desarrollaron a 22°C y aireación variable (1 a 1.5 vvm) durante 16 días. a) Esquema del biorreactor mostrando la sección de flujo ascendente a través del tubo concéntrico interno, así como la sección de flujo descendente a través del espacio anular entre los cilindros, creándose un patrón de flujo principal en la dirección axial. Dimensiones principales:  $d_1$ , 5.16 cm;  $d_2$ , 6.25 cm;  $d_3$ , 13 cm;  $h_1$ , 2 cm;  $h_2$ , 21 cm;  $h_3$ , 54 cm. b) Fotografía del biorreactor.

aireación de 1 volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm) durante 48 h. Trascurrido este tiempo, fases IJ de *S. carpocapsae* CABA01 fueron inoculadas hasta una concentración de 1,000 IJ/ml aproximadamente, cambiándose la temperatura de proceso a 22°C con aireación variable de 1 a 1.5 vvm hasta el final de los experimentos. Se realizaron dos corridas de fermentación (i. e., F1 y F2).

#### *Concentración de nematodos viables (nematodos/ml)*

Cada 2 d se tomó una muestra de 10 ml de caldo de fermentación para determinar la

concentración de nematodos viables. Dependiendo de la concentración de nematodos, las muestras de caldo de fermentación fueron diluidas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  con solución salina isotónica. Muestras diluidas de 0.1 ml fueron colocadas en portaobjetos excavados para la cuenta de NEP bajo el microscopio de campo claro (aumentos, 40× y 100×). Los NEP móviles o inmóviles pero de aspecto “normal” fueron considerados como viables.

#### *Propiedades reológicas.*

Cada 4 d se tomó 30 ml de caldo para determinar las propiedades reológicas de los

caldos de fermentación. Éstas fueron evaluadas en un reómetro de esfuerzos controlados AR-2000 TA Instruments usando la geometría *vane rotor*. Las muestras fueron sometidas a cizalla de 50 a 600 s<sup>-1</sup> (tanto en sentido ascendente como descendente para eliminar posibles dependencias con el tiempo) a 25°C durante un periodo acumulado de 37 min. El comportamiento reológico fue descrito con el modelo de Ostwald-de Waele (Ecuación 1)

donde  $\tau$  (Pa) es el esfuerzo de cizalla,  $\dot{\gamma}$  (s<sup>-1</sup>) es la cizalla, y K (Pa·s<sup>n</sup>) y n (adimensional) son los índices de consistencia y comportamiento al flujo, respectivamente.

$$\tau = K \left( \dot{\gamma} \right)^n \quad (1)$$

### Determinación de la viscosidad aparente del caldo de fermentación, $\eta_a$ (Pa·s)

Primero, las componentes de velocidad en el reactor fueron consideradas como  $v_\theta=v_r=0$  y  $v_z \neq 0$ . Luego, el valor promedio de  $\dot{\gamma}$  (i. e.,  $\dot{\gamma}_a$ ) fue estimado de acuerdo con lo siguiente:

a) Sección de ascenso (sa). La velocidad superficial del gas fue estimada con la Ecuación 2, donde Q es el flujo de aire (l/s) y  $A_{sa}$  es el área transversal al flujo (20.91 cm<sup>2</sup>)

$$v_{sg} = \left( \frac{Q}{A_{sa}} \right) \quad (2)$$

El valor  $\dot{\gamma}_{a-sa}$  fue determinado con la Ecuación 3, si  $v_{sg} \geq 0.04$  m/s, o la Ecuación 4, si  $v_{sg} \leq 0.04$  m/s (Li *et al.*, 1995)

$$\dot{\gamma}_{a-sa} = 5000 \cdot v_{sg} \quad (3)$$

$$\dot{\gamma}_{a-sa} = 5000 \cdot v_{sg}^{0.5} \quad (4)$$

b) Sección de descenso (sd). En esta sección del sistema, el valor  $\dot{\gamma}_{a-sd}$  fue estimado con la Ecuación 5 (Al-Masry & Al-Ahmed, 2005) la cual considera el valor  $v_{sg}$  de la sección de ascenso, la razón de áreas transversales al flujo ( $A_{sd}/A_{sa}$ ) (siendo  $A_{sd}=6.40$  cm<sup>2</sup> y  $A_{sa}=20.91$  cm<sup>2</sup>) y la altura de la sección de descenso ( $h_{sd}=35.3$  cm).

$$\dot{\gamma}_{a-sd} = 4800 \cdot v_{sg}^{1.86} \left( 1 + \frac{A_{sd}}{A_{sa}} \right)^{-0.14} (h_{sd})^{0.48}$$

(5)

Una vez contando con los valores de cizalla promedio por sección, los correspondientes valores de viscosidad aparente fueron determinados con la Ecuación 6.

$$\eta_a = K \left( \dot{\gamma}_a \right)^{n-1} \quad (6)$$

### Determinación de las condiciones hidrodinámicas durante las fermentaciones

El número de Reynolds (Re) fue usado como un índice de las condiciones hidrodinámicas imperantes y fue calculado con la Ecuación 7, donde  $D_H$  es el diámetro hidráulico igual a  $4R_H$ , siendo  $R_H$  el radio hidráulico igual a la razón (área transversal al flujo)/(perímetro mojado) (Tilton, 1999).

$$Re = \frac{D_H v \rho}{\eta_a} \quad (7)$$

Se consideró la densidad del caldo de fermentación como  $\rho=1,000 \text{ kg/m}^3$ .

a) Sección de ascenso. En esta sección, el valor de  $Re$  fue determinado considerando la velocidad  $v$  igual a  $v_{sg}$  (m/s).

b) Sección de descenso. Aquí, el número  $Re$  fue calculado usando la velocidad promedio de descenso  $v=Q/A_{ad}$ , la cual fue estimada considerando que el gas inyectado “bombea” aproximadamente un flujo volumétrico de medio de cultivo similar a  $Q$ , el cual luego de desgasificarse cuando abandona la zona de ascenso, se mueve hacia la base del reactor a través del ánulo.

### Estimación de las condiciones de oxigenación durante las fermentaciones

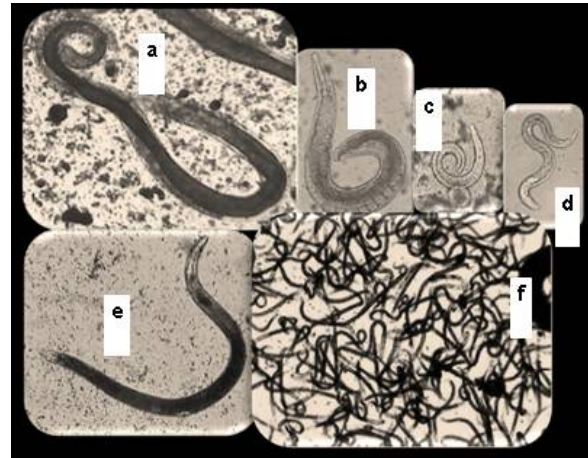
El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $k_L a$ , fue considerado como un índice de la eficiencia de oxigenación lograda durante los bioprocesos y fue estimado mediante la Ecuación 8 (Li *et al.*, 1995). Los valores empleados de  $v_{sg}$  fueron a su vez determinados mediante las Ecuaciones 3 o 4, según correspondiese.

$$k_L a = 0.0343 \cdot v_{sg}^{0.524} \eta_a^{-0.255} \quad (8)$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En principio, durante el desarrollo de las fermentaciones, *X. nematophila*, permaneció principalmente en fase I, lo cual fue sugerido por el desarrollo abundante de colonias azules al crecer en NBTA. Sin embargo, a partir del día 8, el crecimiento de colonias rojas se incrementó

gradualmente sugiriendo un cambio bacteriano a la fase II (Akhurst, 1980). Por otra parte, la Fig. 2 presenta el aspecto exhibido por distintos estadios de desarrollo de los nematodos durante las fermentaciones



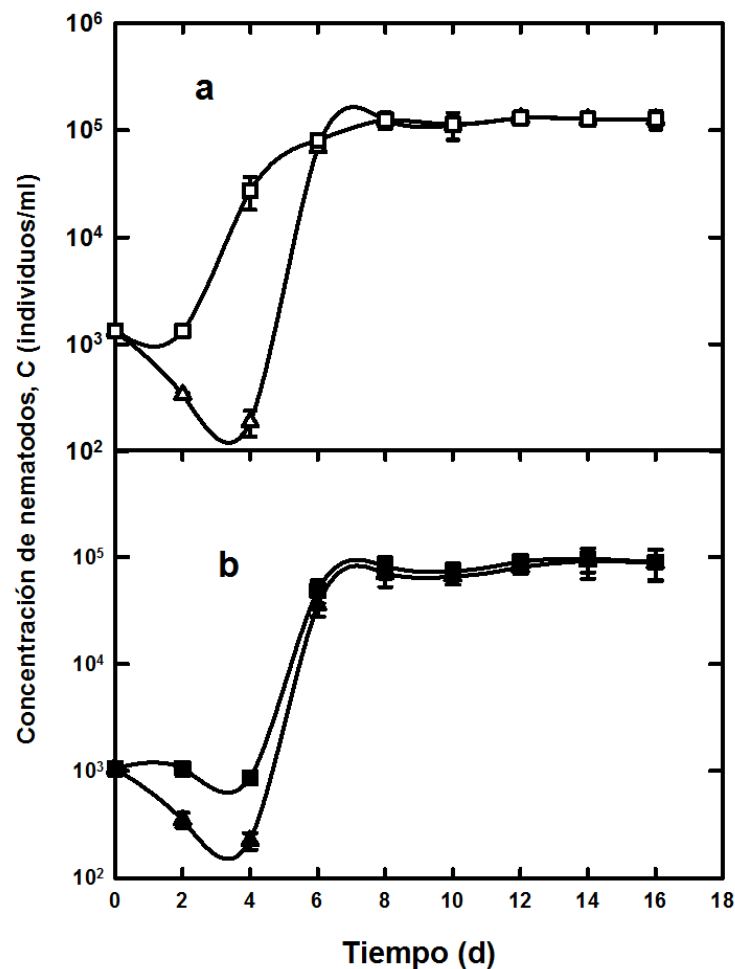
**Fig. 2** Fotografías de campo claro de distintos estadios de desarrollo de *Steinernema carpocapsae* CABA01, durante su cultivo sumergido en presencia de su simbiote bacteriano, *Xenorhabdus nematophila*, en un biorreactor *airlift* con recirculación interna. a) Hembra adulta de primera generación a  $t=4$  d (longitud,  $3,800 \mu\text{m}$ ;  $40\times$ ); b) Macho adulto de primera generación a  $t=4$  d (longitud,  $1,600 \mu\text{m}$ ;  $100\times$ ); c) juvenil de primera etapa a  $t=4$  d (longitud,  $200 \mu\text{m}$ ;  $400\times$ ); d) juvenil de segunda etapa a  $t=6$  d (longitud,  $320 \mu\text{m}$ ;  $200\times$ ); e) hembra adulta de segunda generación a  $t=12$  d (longitud,  $1,200 \mu\text{m}$ ;  $40\times$ ); f) fases infectivas juveniles a  $t=8$  d (longitud,  $630 \mu\text{m}$ ;  $40\times$ )

### Evolución de la concentración de nematodos

Las Figuras 3a y 3b presentan la evolución de las concentraciones de nematodos totales y de fases IJ durante las corridas realizadas en el presente trabajo. Las correspondientes concentraciones iniciales fueron  $1,330 \text{ IJ/ml}$  (Desviación estándar,  $DE=63$ ) y  $1,064 \text{ IJ/ml}$  ( $DE=146$ ), para las corridas F1 y F2,

respectivamente. Por otra parte, la máxima concentración total de NEP de 127,220 por ml (DE=16,330) con 99.7% IJ al final (126,882 IJ/ml) se alcanzó en el experimento F1. Los

resultados correspondientes al experimento F2 fueron 92,897 NEP/ml (DE=24,061) con 96.5% IJ (i.e., 89,667 IJ/ml). Este es el primer



**Fig. 3** Evolución de las concentraciones del total de nematodos viables (cuadros) y de fases infectivas juveniles (triángulos) durante el cultivo sumergido de *Steinerinema carpocapsae* CABA01 y su bacteria simbiótica, *Xenorhabdus nematophila*, en un biorreactor *airlift* con recirculación interna. a) Corrida F1; b) corrida F2. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 conteos independientes.

reporte sobre la propagación masiva de steinernemátidos aislados en México, mediante el uso de biorreactores del tipo *airlift* con recirculación interna. De hecho, existen pocos

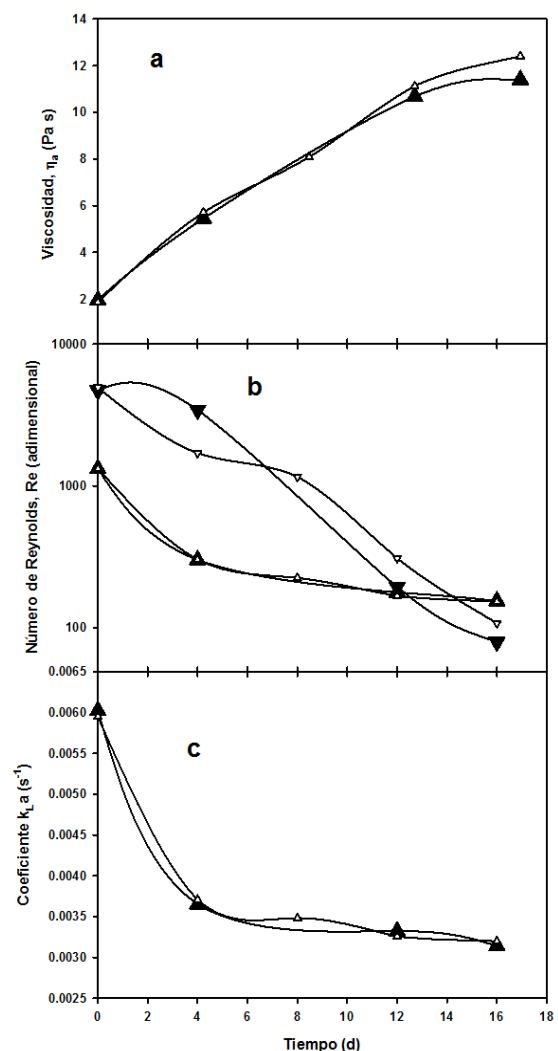
reportes acerca de la producción de steinernemátidos usando biorreactores agitados neumáticamente. Anteriormente, Chavarría-Hernández *et al.* (2007) reportaron la producción

de hasta 193,140 IJ/ml trabajando con *S. carpocapsae* All mediante el uso de un biorreactor *airlift* con recirculación interna a través de tubos internos modificados. Pace *et al.* (1986) y Friedman *et al.* (1991) usaron tanques agitados mecánicamente para la producción de NEP, pero desprovistos de sus impulsores para que funcionasen como columnas burbujeadoras, de tal manera que lograron concentraciones de 90,000 IJ/ml y 95,000 IJ/ml al propagar *S. feltiae* y *Neoplectana* ( $\equiv$  *Steinernema*) *carpocapsae*, respectivamente. Por otra parte, en la propagación de *S. carpocapsae*-Az 20, estirpe aislada en las Azores, Portugal, Neves *et al.* (2001) obtuvieron de 38,000 a 64,000 IJ/ml mediante el uso de un biorreactor *airlift* de 1 l con recirculación externa.

### Cambios en el comportamiento reológico de los caldos de fermentación

En principio, se observaron cambios importantes en las propiedades reológicas de los caldos de fermentación (Fig. 4a), que involucraron cambios en la viscosidad aparente ( $\eta_a$ ) de 2 mPas al inicio de los cultivos, hasta 12 mPas a los 16 días de las fermentaciones. Por otra parte, el comportamiento de los caldos de fermentación fue no Newtoniano (i.e., viscosidad variable dependiente de las condiciones de deformación), evolucionando específicamente del comportamiento dilatante al inicio, hasta cercano al comportamiento Newtoniano al final de los experimentos. Anteriormente, con relación a las propiedades reológicas de caldos de fermentación durante la producción de nematodos entomopatógenos, sólo se contaba

con los reportes de Young *et al.* (1998) quienes reportaron el comportamiento pseudoplástico



**Fig. 4.** Cultivo sumergido de *Steinernema carpocapsae* CABA01 y su bacteria simbiótica, *Xenorhabdus nematophila*, en un biorreactor *airlift* con recirculación interna. Evoluciones de: a) viscosidad aparente ( $\eta_a$ ) del caldo de fermentación; b) condiciones hidrodinámicas en términos del número de Reynolds (Re), y c) condiciones de oxigenación en términos del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ). Clave: símbolos negros, corrida F1; símbolos blancos, corrida F2; sección de ascenso,  $\Delta$ ; sección de descenso,  $\nabla$ .

durante la producción de *S. feltiae*, y los reportes de Chavarría-Hernández *et al.* (2003, 2007) quienes determinaron tanto los comportamientos dilatante como pseudoplástico durante la producción de *S. carpocapsae* All al propagarlo en matraz agitado orbitalmente así como en biorreactor *airlift* con recirculación interna, usando medios de cultivo relativamente similares a los empleados en el presente estudio. Por otra parte, en los trabajos mencionados se emplearon distintas geometrías para la evaluación reológica (Cilindros concéntricos: Young *et al.*, 1998, y Chavarría-Hernández *et al.*, 2003; impulsor helicoidal: Chavarría-Hernández *et al.*, 2007; impulsor de paletas *vane rotor*: presente trabajo) lo que pudiese tener alguna relación con la variabilidad entre los resultados mencionados, además de los posibles efectos causados por usar medios de cultivo distintos, especímenes biológicos distintos así como sistemas de fermentación diferentes.

## *Cambios en las condiciones hidrodinámicas durante las fermentaciones*

Con relación a las condiciones hidrodinámicas existentes durante el desarrollo de las fermentaciones para producir *S. carpocapsae* CABA01, éstas implicaron menores valores del número de Reynolds en la sección de ascenso ( $150 < Re$  (adimensional)  $< 1,320$ ) que lo determinado en la sección de descenso ( $80 < Re$  (adimensional)  $< 4,900$ ) (Fig. 4b), y fueron notablemente mayores que lo reportado por Chavarría-Hernández *et al.* (2007) al producir *S. carpocapsae* All en un sistema

relativamente similar al usado en el presente trabajo (i.e., *standard draft tube airlift bioreactor*) tanto en la zona de ascenso ( $19 < Re$  (adimensional)  $< 425$ ) como en la de descenso ( $3 < Re$  (adimensional)  $< 129$ ) en el trabajo mencionado. Lo anterior puede tener implicaciones interesantes. Cuando las condiciones hidrodinámicas tienden hacia la laminaridad (i.e., involucrando menores valores de  $Re$ ) el proceso de apareamiento de los nematodos se puede ver favorecido (recordar que los adultos machos y hembras de steinernemátidos deben copular para reproducirse). En este sentido, un incremento del número  $Re$  como consecuencia de la mayor prevalencia de las fuerzas inerciales por sobre las fuerzas viscosas durante el mezclado en el biorreactor *airlift*, podrían traducirse en una disminución de la eficiencia del apareamiento entre steinernemátidos, originándose a su vez una disminución de la productividad de fases IJ lograda durante estos procesos. Esto parece tener relación con el hecho de que en el presente trabajo, partiendo aproximadamente de 1,000 NEP/ml se lograron producir de 90,000 a 130,000 *S. carpocapsae* CABA01-NEP/ml, mientras que Chavarría-Hernández *et al.* (2007), usando un sistema relativamente similar al aquí reportado pero propagando *S. carpocapsae* All, lograron producir 207,000 individuos/ml en condiciones de operación que involucraron menores números de Reynolds que los calculados para los experimentos reportados en este trabajo, como ya fue mencionado anteriormente. Otros autores también han sugerido la influencia de las condiciones

hidrodinámicas en la reproducción de steinernemátidos, como Neves *et al.* (2001) quienes durante la producción de *S. carpocapsae* Az 20 sugirieron que el apareamiento de nematodos puede ser favorecido a través de la creación de una zona de baja velocidad del fluido lo cual puede generar mejores oportunidades para el apareamiento, tomando en cuenta las diferencias de densidades entre hembras y machos reportadas por estos autores. Desafortunadamente en la literatura relacionada se cuenta con muy pocos reportes sobre la producción de NEP mediante biorreactores, que involucren un seguimiento de los cambios en las condiciones hidrodinámicas y sus posibles implicaciones en la productividad de fases IJ. Por lo tanto, son escasas las comparaciones de los resultados aquí presentados con otros trabajos.

### *Cambios en las condiciones de transferencia de oxígeno durante las fermentaciones*

Por otra parte, la Fig. 4c muestra la evolución de las condiciones de transferencia de oxígeno durante las fermentaciones desarrolladas en la presente investigación. La eficiencia de oxigenación fue expresada en base al coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $k_La$ , el cual fue calculado para la sección de ascenso en el biorreactor *airlift*. Los valores de  $k_La$  determinados se ubicaron en el intervalo de  $3.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a  $6.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  los cuales están en concordancia con lo previamente reportado durante la producción de *S. carpocapsae* All en biorreactor *airlift* (i.e.,

$2.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  a  $0.0447 \text{ s}^{-1}$ , Chavarría-Hernández *et al.*, 2007). Mehrnia *et al.* (2005) reportaron valores de  $k_La$  en el intervalo de  $0.004 \text{ s}^{-1}$  a  $0.03 \text{ s}^{-1}$  al experimentar con mezclas de queroseno/agua y diesel/agua en un biorreactor *airlift* con tubo concéntrico involucrando valores de  $v_{sg}$  de 0.01 m/s a 0.075 m/s.

Para realizar un balance de oxígeno conveniente durante la producción de NEP, es deseable contar con datos acerca de la demanda específica de oxígeno de los NEP y cómo ésta puede cambiar con el estadio de desarrollo; no obstante, no existen datos publicados sobre esto, excepto para fases IJ de algunos especímenes y en condiciones diferentes a las imperantes durante la producción en biorreactores. En este sentido, Lindegren *et al.* (1986) reportaron la rapidez de respiración de fases IJ de *S. feltiae* a distintas temperaturas de almacenamiento.

Por otra parte, los resultados aquí presentados sólo pueden ser comparados con muy pocos reportes ya que las implicaciones de las condiciones de oxigenación han sido escasamente exploradas durante la producción de nematodos entomopatógenos con potencial aplicación en el biocontrol de plagas.

## CONCLUSIONES

Fue posible lograr la propagación masiva del nematodo entomopatógeno, *Steinernema carpocapsae* CABA01, aislado en el estado de Hidalgo, México, usando un biorreactor tipo *airlift* con recirculación interna, logrando concentraciones de 127,000 IJ/ml en procesos de 16 días de duración. Por otra parte, fue

posible determinar la evolución de las condiciones hidrodinámicas imperantes durante las fermentaciones, así como estimar la correspondiente a las condiciones de transferencia de oxígeno, destacándose que la reproducción de nematodos fue posible aún cuando se alcanzaron condiciones de franca turbulencia en algunas zonas dentro del biorreactor, de acuerdo con los valores calculados para el número de Reynolds. Esto es de gran importancia ya que abre la posibilidad de optimizar las condiciones de proceso para maximizar productividades de NEP en biorreactores *airlift*, usando enfoques de ingeniería básica. Además, este estudio muestra que es posible lograr la producción masiva de nematodos entomopatógenos aislados en México, con potencial aplicación para el biocontrol de insectos plaga y así contribuir al acceso hacia una agricultura sustentable.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por los *Fondos Mixtos-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Gobierno del Estado de Hidalgo, México* (Proyectos con claves 48556 y 9206) y PIFI P/CA-3 2006-14-04 “*Consolidación del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria*”, así como a la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C., y Química Valaner por otorgar el *Premio Sergio Sánchez Esquivel a Protocolos de Tesis en Biotecnología y Bioingeniería 2007* a G. Maciel-Vergara. Se agradece la asistencia técnica de E. Ortega-

Morales, U. Pérez-Santos y A. Martínez-Rodríguez.

## REFERENCIAS

- Akhurst RJ (1980) Morphological and functional dimorphism in *Xenohabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121: 303-309.
- Al-Masry WA, Al-Ahmed MI (2005) Effect of scale-up on wall shear rates in circulating bubble columns. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 1230-1235.
- Buecher EJ, Popiel I (1989) Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. *J. Nematol.* 21: 500-504.
- Campos-Herrera R, Escuer M, Labrador S, Robertson L, Barrios L, Gutiérrez C (2007) Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). *J. Inver. Pathol.* 95: 125 – 139.
- Chavarría-Hernández N, Islas-López MA, Maciel-Vergara G, Gayosso-Canales M, Rodríguez-Hernández AI (2008) Kinetics of infective juvenile production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in submerged monoxenic culture. *Bioprocess Biosys. Eng.* 31: 419-426.
- Chavarría-Hernández N, Rodríguez-Hernández AI, Pérez-Guevara F, de la Torre M (2003) Evolution of culture broth rheological properties during propagation of the

# Artículos

- entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnol. Prog.* 19: 405-409.
- Chavarría-Hernández N, Sanjuan-Galindo R, Medina-Torres L, Rodríguez-Hernández AI (2007) Submerged monoxenic culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in an internal-loop airlift bioreactor using two configurations of the inner tube. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 167-176.
- Ehlers R-U (2001) Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 623-633.
- Ehlers R-U, Lunau S, Krasomil-Osterfeld K, Osterfeld KH (1998) Liquid culture of the entomopathogenic nematode bacterium-complex *Heterorhabditis megidis/Photorhabdus luminescens*. *BioControl* 43: 77-86.
- Forst S, Clarke D (2002) Bacteria-nematode symbiosis. In: Entomopathogenic Nematology. Gaugler R (Ed). CABI Publishing, Cambridge MA, USA. pp. 57-77.
- Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E (1997) *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 47-72.
- Friedman MJ, Langston SE, Pollitt S (1991) Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. US Patent, 5023183.
- Hajek AE (2004) Natural enemies. An introduction to biological control. Cambridge University Press, USA.
- Islas-López MA, Sanjuan-Galindo R, Rodríguez-Hernández AI, 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 91-97.
- Johnigk SA, Ecke F, Poehling M, Ehlers RU (2004) Liquid culture mass production of biocontrol nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): improved timing of dauer juvenile inoculation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 651-658.
- Li GQ, Yang SZ, Cai ZL, Chen JY (1995) Mass transfer and gas-liquid circulation in an airlift bioreactor with viscous non-Newtonian fluids. *Chem. Eng. J.* 56: B101-B107.
- Lindgren JE, Rij RE, Ross SR, Fouse DC (1986) Respiration rate of *Steinernema feltiae* infective juveniles at several constant temperatures. *J. Nematol.* 18: 221-224.
- Martínez-Rodríguez A (2008) Aislamiento y producción masiva de simbioses bacterianas de nematodos nativos del estado de Hidalgo con potencial para el control de plagas agrícolas. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo.
- Mehrnia MR, Towfighi J, Bonakdarpour B, Akbarnejad MM (2005) Gas hold-up and oxygen transfer in a draft-tube airlift bioreactor with petroleum-based liquids. *Biochem. Eng. J.* 22: 105-110.

# Artículos

- Neves JM, Teixeira JA, Simoes N, Mota M (2001) Effect of airflow rate on yields of *Steinernema carpocapsae* Az 20 in liquid culture in an external-loop airlift bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 369–373.
- Pace GW, Grote W, Pitt DE, Pitt JM (1986) Liquid culture of nematodes. International Patent Application, WO 86/01074.
- Pérez-Santos U (2009) Aislamiento de nematodos nativos del estado de Hidalgo con potencial para el control de plagas agrícolas. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo, Hidalgo.
- Shapiro-Ilan DI, Gaugler R (2002) Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 137–146.
- Strauch O, Ehlers R-U (2000) Influence of the aeration rate on the yields of the biocontrol nematode *Heterorhabditis megidis* in monoxenic liquid cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 9-13.
- Surrey MR, Davies RJ (1996) Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Inver. Pathol.* 67: 92-99.
- Tilton JM (1999) Fluid and particle dynamics. In: Perry's Chemical Engineers' Handbook. Perry RH, Green DW, Maloney JO (eds). McGraw-Hill, USA. pp. 6-12.
- Woodring JL, Kaya HK (1988) Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. Arkansas Agric. Exp. Stn. USA.
- Young JM, Dunnill P, Pearce JD (1998) Physical properties of liquid nematode cultures and the design of recovery operations. *Bioprocess Eng.* 19: 121-127