

**Evaluación de cuatro medios sólidos de
crecimiento para la producción *in vitro* del
nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis
bacteriophora***

Iván Andrés Grijalva Terán

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2014**

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación de cuatro medios sólidos de
crecimiento para la producción *in vitro* del
nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis
bacteriophora***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Iván Andrés Grijalva Terán

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2014

Evaluación de cuatro medios sólidos de crecimiento para la producción *in vitro* del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*.

Iván Andrés Grijalva Terán

Resumen. El nematodo entomopatógeno, *Heterorhabditis bacteriophora*, es un controlador biológico de larvas de coleópteros y lepidópteros en el suelo. Tiene una relación simbiótica con la bacteria *Photorhabdus luminescens* que produce metabolitos para preservar el insecto mientras el nematodo se desarrolla, la bacteria transforma el insecto hospedado como fuente de alimento para el nematodo. El objetivo fue evaluar cuatro medios sólidos de reproducción *in vitro* con concentraciones iniciales de inóculo de 1000 y 2000 nematodos por mililitro. Los medios de crecimiento sólido fueron un cultivo monoxénico, agar nutritivo hígado grasa, extracto de larvas molidas de *Galleria mellonella* y agar nutriente. Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de cuatro medios de crecimiento sólidos con dos concentraciones de nematodos (4×2) y se realizó una separación de medias usando LSMEANS. El cultivo monoxénico, presentó el mayor rendimiento de producción de nematodos infectivos juveniles a una concentración de 1000 nematodos por mililitro a las 240 horas (10 días) después de la inoculación.

Palabras Clave: Control biológico, infectivos juveniles, rendimiento.

Abstract. The entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* is a biological control of Coleoptera and Lepidoptera larvae in the soil. It has a symbiotic relationship with the bacteria *Photorhabdus luminescens*, which produces metabolites to preserve the insect while the nematode develops, transforms the insect stayed as a food source for the nematode. The aim of this study was evaluate four solid growing media with an initial inoculum of 1000 and 2000 mL nematodes. The growing media were a monoxenic culture, nutrient agar fatty liver, extract of *Galleria mellonella* larvae and nutrient agar were used. Experimental design was completely randomized factorial arrangement of 4 solid growth media with two concentrations of nematodes (4×2) and mean separation was performed using LSMEANS. The monoxenic culture had the highest production of infective juvenile nematodes with a concentration of 1000 nematodes per mL 240 hours (10 days) after inoculation.

Keywords: Biological control, infective juvenile, yield.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4 CONCLUSIONES	13
5 RECOMENDACIONES	14
6 LITERATURA CITADA.....	15

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Costos de producción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	3
2. Medios de crecimiento sólidos evaluados para la producción <i>in vitro</i> del nematodo entomopatógeno <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	9
3. Medias de número de infectivos juveniles vivos (IJ) a partir de una inoculación inicial de 1000 y 2000 nematodos por mililitro, a las 240 horas (10 días) después de la inoculación.	11
4. Medias de número de infectivos juveniles vivos (IJ) a partir de una inoculación inicial de 1000 y 2000 nematodos por mililitro, a las 240 horas (10 días) después de la inoculación.	12

Figuras	Página
1. Medio NBTA sin inoculación de la bacteria <i>Photorhabdus luminescens</i> (foto A), medio NBTA con la bacteria simbiote fase primaria (foto B) y medio NBTA con la bacteria simbiote fase secundaria (foto C).	5
2. Bacteria simbiote <i>Photorhabdus luminescens</i> para criopreservar.	6
3. Medios de crecimiento sólidos inoculados con la bacteria simbiote.	7
4. Producción <i>in vitro</i> con el cultivo monoxénico descrito por Ehlers en líquido.	14

1. INTRODUCCIÓN

El control biológico es un componente importante del manejo integrado de plagas (Van Driesche y Heinz 2004; Van Lenteren 2007; Parrella 2008). Un ejemplo de estos son los nematodos entomopatógenos (NEP) que atacan principalmente larvas de coleópteros y lepidópteros en el suelo (Nicholls 2008). Los nematodos entomopatógenos tienen un gran potencial para controlar varias plagas de insectos de importancia agrícola (Klein 1990; Shapiro-Ilan y Gaugler 2002).

Heterorhabditis bacteriophora (Rhabditida: Heterorhabditidae) es usado como control biológico para controlar plagas agrícolas pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Díptera y Thysanoptera (Gaugler y Kaya 1990). Muchas especies de *Heterorhabditis* han sido descritas y estudiadas por su potencial como agentes biológicos (Adams *et al.* 2006). El laboratorio de control biológico de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, posee una producción *in vivo* de este organismo, ha sido usado para control de larvas de varias especies, entre ellas *Phyllophaga* spp.

Heterorhabditis bacteriophora se encuentra entre los nematodos entomopatógenos más importantes, tiene potencial de control contra diversas plagas de insectos, de importancia económica (Klein 1990). Este nematodo está asociado simbióticamente a la bacteria *Photorhabdus luminescens*, la cual se hospeda en el intestino del infectivo juvenil (Ciche *et al.* 2006). Las bacterias crecen en el huésped y producen condiciones adecuadas para el desarrollo de *Heterorhabditis bacteriophora* y su reproducción (Susurluk *et al.* 2013). Es un hospedante obligatorio de la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens*, esta bacteria se transmite durante la etapa infectiva juvenil del nematodo, esencial para parasitar insectos y poder reproducirse (Han y Ehlers 2000). La bacteria hace una relación simbiote con su insecto hospedero produciendo factores virulentos que neutraliza y matan al insecto huésped. Convierten el hospedero en componentes nutricionales usados como fuente principal de alimentación del nematodo. Esta bacteria produce un ambiente óptimo para la reproducción y crecimiento del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* (Kooliyottil *et al.* 2013), es esencial para garantizar altos rendimientos en la producción *in vitro* del nematodo (Valdés *et al.* 2005).

La producción de *Heterorhabditis bacteriophora* a gran escala es difícil, ya sea *in vivo* o *in vitro*, debido a diversos obstáculos. La producción de NEP se puede lograr *in vivo*; sin embargo, la producción a escala comercial es impráctica debido a los altos costos de producción y a bajos rendimientos por gramo de biomasa de insectos (Strauch *et al.* 1994). La producción *in vitro* requiere de tecnología y tiene mayor rendimientos de nematodos por gramo de material sólido (medios de crecimiento) en comparación a las

tecnologías *in vivo*. Sin embargo, los costos asociados con tecnologías, medios sólidos de crecimiento, son mucho mayores que *in vivo* (Kooliyottil *et al.* 2013).

En general, la producción *in vivo* consiste en usar como hospedero larvas de *Galleria mellonella* (Lepidóptera: Pyralidae), insecto huésped más común usado para la producción comercial de nematodos entomopatógenos (Woodring y Kaya 1988). La fase larval de este insecto se infecta con *Heterorhabditis bacteriophora*, el cual transporta la bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* y es liberada, posteriormente la bacteria provoca la muerte de las larvas por septicemia, descomponen los tejidos, libera antibióticos lo que permite que el nematodo pueda reproducirse 2-3 ciclos dentro del cuerpo de las larvas. (Eleftherianos *et al.* 2006). Para la cosecha se utiliza el método de trampas White (White, 1927).

Otra técnica de producción de NEP es *in vitro* en cultivos sólidos o líquidos (Susurluk *et al.* 2013). El cultivo *in vitro* de estos nematodos se ha desarrollado a través del tiempo usando medios de crecimiento basados en peptona-glucosa-agar e hígado de cerdo (Dutky 1964). Se basa en la inoculación de la bacteria *Photorhabdus luminescens* a un medio nutritivo, posteriormente la introducción de los nematodos desinfectados (Akhurst 1980), creando un ambiente apto para el crecimiento y reproducción. La composición del medio puede tener un efecto sustancial en el rendimiento de los nematodos. El aumento de la cantidad y calidad de lípidos aumentará el rendimiento y la calidad de nematodos (Shapiro-Ilan y Gaugler 2002).

La producción *in vivo* de NEP ofrece varias ventajas con respecto a la producción *in vitro*, incluyendo inversión inicial y la menor cantidad de conocimientos técnicos para la puesta en marcha (Shapiro-Ilan y Gaugler 2002). La desventaja radica que se obtiene bajos rendimientos de producción del nematodo. Por eso es necesario evaluar métodos de reproducción *in vitro* para obtener mayores rendimientos (Cuadro 1). Un elemento importante es identificar el medio de crecimiento sólido adecuado para la reproducción de *Heterorhabditis bacteriophora*.

Varios estudios han evaluado medios de crecimiento de composición variable, como cultivos nutritivos en combinaciones de hígado de pollo con almidón e hígado de cerdo con melaza, almidón y polvo de arroz, mostrando una preferencia de la bacteria por medios de crecimiento ricos en proteína para obtener altos rendimientos en la producción del nematodo (Valdés *et al.* 2005). Los componentes lipídicos que reflejan la composición de los nematodos en su hospedero natural son más adecuados para la producción. Otros ingredientes pueden tener un efecto directo sobre el rendimiento de los nematodos como son fuente de proteínas y sales (Shapiro-Ilan y Gaugler 2002).

La utilización de cualquier agente de control biológico depende de su disponibilidad en suficientes cantidades a un costo aceptable (Nicholls 2008). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar diversos medios de crecimiento para la producción *in vitro* del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* con el fin de determinar un medio de crecimiento sólido para obtener el mayor rendimiento en producción a una concentración inicial de 1000 o 2000 nematodos por mililitro, que seguirá ofreciendo un paso intermedio en la tecnología, costos entre *in vivo* y en cultivo en líquido (Shapiro-Ilan y Gaugler 2002).

Cuadro 1. Costos de producción *in vivo* e *in vitro* del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*.

Método	Medio de reproducción	Unidad de producción	\$/ unidad de producción	Rendimiento final (IJ)
<i>In vitro</i>	Medio de crecimiento sólido	15 ml de medio monoxénico descrito por Ehlers.	0.09	1,968,000
<i>In vivo</i>	Insecto hospedero	1 larva de <i>Galleria mellonella</i> .	0.25	200,000

IJ:infectivos juveniles.

Referencias: Udo-Ehlers 2001; Laboratorio de Control Biológico EAP 2014.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras, ubicado en el valle del Yeguaré a 32 km de Tegucigalpa, D.C. en las coordenadas geográficas latitud norte de 14° 00' 46.97" longitud Oeste de 87° 00' 13.54". Las condiciones del ensayo se mantuvieron a 28 °C, para la inoculación de la bacteria simbiote y para la reproducción del nematodo entomopatógeno de 25 °C, en condiciones de incubadora.

Material biológico. Los nematodos se obtuvieron de la producción *in vivo* del laboratorio de Control Biológico de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, los cuales se reproducen utilizando como hospedero larvas de *Galleria mellonella*. Cada larva de *G. mellonella* es infectada con 1000 nematodos infectivos juveniles de *H. bacteriophora* que se reproducen dentro de las larvas por 15 días, los nematodos son recuperados en cantidades que oscilan entre 80,000 hasta 200,000 infectivos juveniles por larva. Para la recuperación de los nematodos se usa trampas White modificadas que consiste en colocar dentro de una bandeja plástica (22 cm de ancho × 28 cm de largo × 10 cm de altura) 100 ml de agua esterilizada, y placas Petri de vidrio de 80 mm × 15 mm con un disco de papel filtro humedecido en el interior. Sobre el papel filtro se colocan unas 15 larvas de *G. mellonella* que muestran sintomatología de infección (coloración roja) y se deja incubar durante 15 días a una temperatura de 25 °C y humedad relativa de 60%. Los nematodos que salen del cuerpo de las larvas son atraídos por la humedad del agua y hacen puentes vivos para trasladarse hacia este medio líquido. Esta solución de 50 mL (agua + nematodos) se extrae y se coloca en tubos de centrifugación de 45 mL para ser desinfectados con Timerosal al 0.025% de concentración para su posterior reproducción *in vitro*.

Preparación del medio NBTA (Nutrient blue tetrasodium agar) y criopreservación de la bacteria *Photorhabdus luminescens*.

Se preparó el medio NBTA utilizando agar nutritivo (OXOID) usando 1.0 g en 100 mL de agua destilada. A esa mezcla se le agregó una concentración del 1% de azul de bromotimol. Se mezcló en la plancha de calor hasta llevar a punto de ebullición. Esta preparación se esterilizó a 121 °C, durante 15 min en la autoclave. El medio se dejó enfriar dentro de la cámara de flujo laminar hasta obtener una temperatura de 40 °C, tibio al tacto y se le agregó TTC (solución de cloruro de trifeniltetrazolio) a una concentración de 0.004%. Posteriormente el medio fue distribuido en cinco platos Petri, con 15 mL de medio cada uno.

Extracción de la bacteria *Photorhabdus luminescens* de nematodos infectivos juveniles (IJ).

Utilizando una solución con una concentración de nematodos (material biológico), se tomó una gota (50 µL), la cual se depositó en un portaobjetos. Cada gota contenía aproximadamente 25 IJ que se pasaron por una gota de solución de cloro al 7.5% de concentración. Se dejó reposar por 10 min y se pescaron nuevamente para ser enjuagados en una gota de agua destilada estéril. Los infectivos juveniles enjuagados se colocaron en una gota de STB (Soy Triptase Broth), donde fueron fraccionados por mitad con una asa bacteriológica. Posteriormente se añadieron 15 mL del medio de producción STB en un plato Petri y se inoculó la solución conteniendo los nematodos IJ fraccionados, los platos fueron sellados con cinta parafina para luego incubarlos a 30 °C, durante 24 horas.

A las 24 horas se extrajo una muestra de la solución de la fractura y con asa bacteriológica se estrió en cinco platos Petri preparados con el medio NBTA, para luego incubarlas a 30 °C, durante 24 horas. Se monitoreó el cultivo en placa para determinar la fase simbiote de la bacteria. Las colonias de *Photorhabdus luminescens* en fase primaria se observan de color verde oliva y en fase secundaria infectiva se tornan de color rojo. La fase primaria se caracteriza por la absorción del azul de bromotimol del medio NBTA, así las colonias bacterianas se tornan entre verde y azul oscuro. Para la fase secundaria, las bacterias no absorben colorantes y reducen el cloruro de trifeniltetrazolio del medio NBTA, generando colonias rojas (Akhurst 1980).

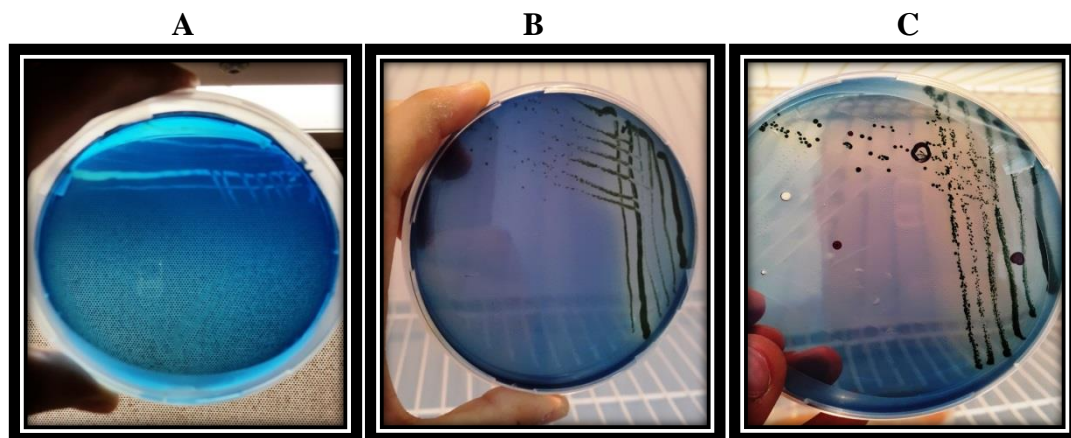


Figura 1. Medio NBTA sin inoculación de la bacteria *Photorhabdus luminescens* (foto A), medio NBTA con la bacteria simbiote fase primaria (foto B) y medio NBTA con la bacteria simbiote fase secundaria (foto C).

Inoculación del medio líquido STB.

Se prepararon unos 50 mL de caldo peptona de caseína-peptona de harina de soya (TSB), usando 1.5 g de producto. Este medio líquido se esterilizó a 121°C por 15 minutos en la autoclave y se dejó enfriar dentro de la cámara de flujo laminar. De las placas de NBTA se escogieron las colonias aisladas que presentaron una coloración verde oliva (fase primaria). Estas colonias fueron introducidas en el matraz que contenía el medio líquido

STB. Al inocular, se calentó la asa bacteriológica, se dejó enfriar y se tocó la colonia. Posteriormente, la boca del matraz se flameó, se le colocó un tapón y se selló con cinta parafina. El matraz se agitó a 150 rpm en la mesa orbital durante 24 horas a una temperatura de 30 °C, dentro de la incubadora.

Criopreservación de la bacteria *Photorhabdus luminescens*.

Se evaluó el pH del medio líquido STB a las 24 horas, mostrando un pH de 7.3. El pH, alcalino entre un rango de 7.0 a 7.9, indica que no existe contaminación y que la bacteria *Photorhabdus luminescens* se está reproduciendo. Solamente el medio con un pH mayor a 7.0 se mezcló con glicerol anhidrido estéril a una proporción de 20% v/v y se dejó agitar por 10 minutos. Se vertió 1.0 mL del medio líquido STB- glicerado en tres tubos Eppendorff esterelizados 1.5 mL de capacidad. Los tubos Eppendorff se refrigeraron a -1.0 °C por una hora, 2 horas en congelación y se almacenó a -80 °C en el ultra congelador, para su posterior utilización.



Figura 2. Bacteria simbiote *Photorhabdus luminescens* para criopreservar.

Inoculación de la bacteria *Photorhabdus luminescens* a cada medio de crecimiento.

Se prepararon 100 mL de caldo peptona de caseína-peptona de harina de soya (TSB), usando 3 g de producto. Este medio líquido se esterilizó a 121°C por 15 minutos en el autoclave y se dejó enfriar completamente sobre la cámara de flujo laminar, reactivamos la bacteria *Photorhabdus luminescens* contenida en el tubo Eppendorff aprox. 1.0 mL calentándola mediante el tacto para descongelar la bacteria sacada del ultra congelador a -80 °C. Sin tocar la boca ni la pared del matraz, se vertió el contenido (1.0 mL en los 100 mL de la solución) de la bacteria al medio TSB. La boca del matraz se flameó, se colocó un tapón de algodón y se selló con cinta de parafina. El medio líquido TSB se agitó a 150 rpm en la mesa orbital por 24 horas a una temperatura de 28 °C en la incubadora (Shel Lab, USA). A las 24 horas se evaluó el pH mediante el potenciómetro, mostrando un pH

de 7.2. El pH entre un rango de 7.0 a 7.9 indica que no existe contaminación y que las bacterias *Photorhabdus luminescens* se están reproduciendo.

Dentro de la cámara de flujo laminar, el matraz se abrió, flameó y se inclinó hasta que el medio líquido llegara al cuello del matraz, con una pipeta Pasteur se extrajo 1.0 mL del medio STB y se inocularon 12 platos Petri con 15 ml de medio de los cuatro medios crecimiento sólido, esparciendo el contenido bacteriano por toda la caja Petri, si era necesario usando el asa bacteriológica, esterilizada con el mechero. Se selló cada plato Petri con cinta de parafina y se almacenó en la incubadora (Shel Lab, USA) a 28 °C. Después de 24 horas se inoculó con 1000 nematodos infectivos juveniles por mililitro, previamente desinfectados, dentro de la cámara de flujo laminar. Se selló con cinta de parafina cada plato Petri y se redujo la temperatura a 25 °C dentro de la incubadora, para garantizar la temperatura óptima de desarrollo del nematodo. Posteriormente, se usó una concentración de 2000 nematodos infectivos juveniles por mililitro, siguiendo los mismos procedimientos ya mencionados.

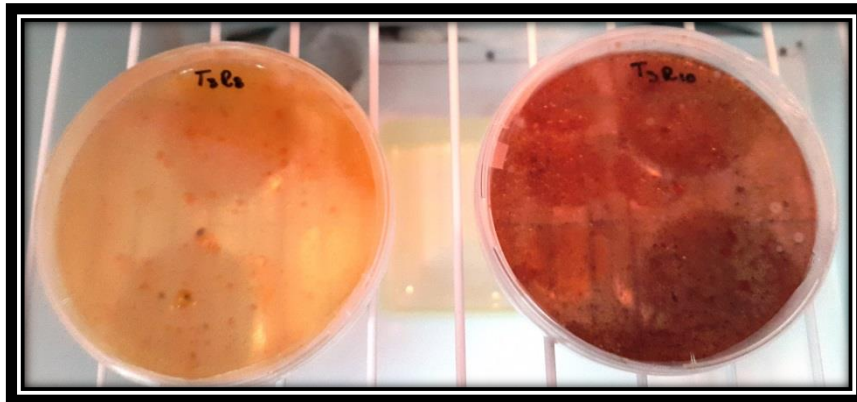


Figura 3. Medios de crecimiento sólidos inoculados con la bacteria simbiote.

Desinfección del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora*.

Con una solución de 50 mL de agua con nematodos cosechados de las trampas White (material biológico), fue colocada aproximadamente 40 mL en tubos de centrifuga de 45 mL para extraer nematodos a 3000 rpm por 3 min. Los nematodos concentrados en el fondo del tubo de centrifuga se extrajeron con una pipeta Pasteur y se colocaron en tubos de cristal, añadiendo 1.0 mL solución de Timerosal a una concentración de 0.025%, la cual se agitó a 150 rpm en la mesa orbital por 15 min a temperatura ambiente. Después de agitar, se colocaron en la centrifuga a 3000 rpm por 3 minutos, para concentrar los nematodos desinfectados, los que posteriormente se enjuagaron con 1.0 mL de agua destilada estéril, para eliminar la solución de Timerosal. Con los nematodos sanitizados superficialmente se inoculó cada medio de crecimiento sólido a una concentración de 1000, 2000 nematodos por 15 mL de medio, inoculados 24 horas antes con la bacteria *Photorhabdus luminescens*. Para determinar la concentración de nematodos se colocaron 9.0 mL de agua destilada y 1.0 mL de la solución de nematodos para obtener una dilución de 1:10, de esa dilución se extrajo 1.0 mL y se disolvió nuevamente en 9.0 mL de agua

destilada. Se extrajo 1.0 mL de la dilución y se colocó en un plato Petri formando cinco gotas. Con el estereoscopio se contaron los nematodos en cada gota (solución madre). La cantidad de nematodos observados se multiplica por el factor de dilución $1:10^2$ para obtener la concentración por mililitro para el proceso de inoculación.

Recolección de datos.

Se contó la cantidad de nematodos extraídos de cada caja Petri mediante un lavado con agua destilada, usando un frasco cilíndrico de plástico, de los medios de crecimiento sólido, mediante diluciones, que consiste en colocar 9.0 mL de agua destilada y 1.0 mL del lavado para obtener una dilución de 1:10, de esa dilución se extrajo 1.0 mL y se disolvió dos veces en 9 mL de agua destilada. Se extrajo 1.0 mL de la dilución y se colocó en un plato Petri formando cinco gotas. Con el estereoscopio se contaron los nematodos en cada gota (solución madre). La cantidad de nematodos observados se multiplica por el factor de dilución $1:10^3$ para obtener la concentración por mililitro para el proceso de inoculación.

Diseño experimental.

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial (4×2) con tres repeticiones, con un total de 24 unidades experimentales, se realizó una separación de medias usando LSMEANS y un análisis de varianza GLM.

Cuadro 2. Medios de crecimiento sólidos evaluados para la producción *in vitro* del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*.

Medios de crecimiento sólidos	Ingredientes (g) / 100 mL	
Extracto de larvas molidas de <i>Galleria mellonella</i>	50 larvas	<i>Galleria mellonella</i> .
	2.80	Agar nutriente IVT.
	2.8	Agar nutriente IVT.
Agar nutritivo hígado grasa	2.0	Aceite vegetal de maíz.
	10.0	Hígado troceado de pollo.
	1.0	Peptone B.
	1.0	Extracto de levadura.
	0.6	Yema de huevo deshidratada.
	0.3	Harina de soya.
Cultivo monoxénico descrito por Ehlers	0.4	Cloruro de sodio (NaCl).
	0.035	Cloruro de potasio (KCl).
	0.03	Cloruro de calcio (CaCl ₂).
	0.02	Sulfato de magnesio (MgSO ₄).
	0.005	Sulfato Ferroso (FeSO ₄).
	3.0	Aceite vegetal de maíz.
Agar nutriente	1.7	Bacto agar.
	2.80	Agar nutriente IVT.

Referencias: Udo-Ehlers 2001; Valdés *et al.* 2005

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No hubo interacción de los medios de crecimiento sólido con las concentraciones del inóculo ($P < 0.73$) en la producción de IJ (Cuadro 3). Por lo tanto, se discuten los efectos de los factores individuales. La concentración de inóculo no afecta en la producción de IJ, existen otros factores que intervienen en el rendimiento del nematodo, como desplazamiento de fase de la bacteria simbiote, bajos porcentajes de copulación nematodo, inóculo (bacteria/ nematodo), concentración de oxígeno, pH, temperatura, agitación. La falta de conocimiento que implica la relación simbiótica entre NEP y sus respectivas bacterias simbiotes plantea más dificultad para establecer y optimizar protocolos estandarizados de producción (Kooliyottil *et al.* 2013).

Hubo diferencia significativa entre los medios de crecimiento ($P < 0.0001$). El medio de crecimiento con mayor rendimiento de producción a las 240 horas (10 días después de inoculación) fue el cultivo monoxénico descrito por Ehlers (Cuadro 4) que los otros tres medios a una concentración de 1000 nematodos/mL. Se puede apreciar que los tres medios, extracto de larvas molidas de *Galleria mellonella*, agar nutritivo hígado grasa y agar nutriente, permitieron que los infectivos juveniles se reprodujeran en las mismas cantidades, podemos decir que el cultivo monoxénico descrito por Ehlers, produjo un 80% más de infectivos juveniles que los otros medios de crecimiento sólido.

El cultivo monoxénico descrito por Ehlers produjo más infectivos juveniles, probablemente se debe a que la bacteria *Photobacterium luminescens* produce diferentes tipos de proteasas y lipasas según el tipo de medio de cultivo artificial (Daborn *et al.* 2001). Este cultivo permitió un mayor crecimiento bacteriano, por su contenido de nutrientes, lo que permite que la bacteria transforme este medio y el aporte de su propia biomasa para la alimentación del nematodo (Valdés *et al.* 2005) garantizando mayores rendimientos. La relación nutricional es altamente específica para *Heterorhabditis* porque estos nematodos no pueden ser cultivadas en condiciones axénicas o en otras bacterias (Kooliyottil *et al.* 2013).

El cultivo monoxénico descrito por Ehlers presentó el mayor número de nematodos infectivos juveniles a una concentración de 2000 nematodos/mL, pero no fue significativamente diferente al medio de crecimiento agar nutritivo hígado grasa (Cuadro 4). Esto se atribuye a que estas fuentes de proteína (hígado de pollo) tienen diferente composición comparado con los medios de crecimiento sólido que tengan hígado de cerdo, lo que resultó de más difícil degradación para el simbiote bacteriano, la fase postexponencial de crecimiento se alcanzó más tarde, se retardó la producción de metabolitos (señales de alimento) que desencadenaría la recuperación de los infectivos juveniles (Valdés *et al.* 2005), disminuyendo su rendimiento. No hubo diferencia

significativa entre las concentraciones de inóculo de 1000 y 2000 nematodos por mililitro ($P < 0.90$). Esto es debido a que la concentración de inóculo inicial no puede afectar el rendimiento en producción del nematodo *H. bacteriophora* (Shapiro-Ilan y Gaugler 2002). Existen otros factores que afectan el rendimiento final de infectivos juveniles en producción *in vitro*, metabolitos (señales de alimentos) producidos por la bacteria simbiótica *Photorhabdus luminescens* (Udo Ehlers 2001). La composición del medio puede tener un efecto sustancial en el rendimiento de los nematodos. El aumento de la cantidad y calidad de lípidos aumentará el rendimiento y la calidad de nematodos. Componentes lipídicos que reflejan la composición de los nematodos de huésped natural son más adecuados a la producción. Otros ingredientes del medio que pueden tener un efecto directo sobre el rendimiento de nematodos incluyen fuente de proteínas y sales (Shapiro-Ilan y Gaugler 2002).

Cuadro 3. Medias de número de infectivos juveniles vivos (IJ) a partir de una inoculación inicial de 1000 y 2000 nematodos por mililitro, a las 240 horas (10 días) después de la inoculación.

Medios de crecimiento sólido	Concentración de IJ/mL	Número de IJ/ 15 mL de medio
Cultivo monoxénico descrito por Ehlers	1000	1,968,000 ^a ¥
Cultivo monoxénico descrito por Ehlers	2000	1,688,667 ^a
Agar nutritivo hígado grasa	1000	148,167 ^{ab}
Agar nutritivo hígado grasa	2000	467,667 ^b
Extracto de larvas molidas de <i>Galleria mellonella</i>	1000	203,667 ^b
Extracto de larvas molidas de <i>Galleria mellonella</i>	2000	6,387 ^b
Agar nutriente	1000	101,833 ^b
Agar nutriente	2000	163,667 ^b

¥ Valores en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí según la prueba LSMEANS ($P \leq 0.05$).

Cuadro 4. Medias de número de infectivos juveniles vivos (IJ) a partir de una inoculación inicial de 1000 y 2000 nematodos por mililitro, a las 240 horas (10 días) después de la inoculación.

Medios de crecimiento sólido	1000 nematodos/mL	2000 nematodos/mL
Extracto de larvas molidas de <i>Galleria mellonella</i>	203,667 ^b	6,387 ^b
Agar nutritivo hígado grasa	148,167 ^b	467,667 ^{ab}
Cultivo monoxénico descrito por Ehlers	1,968,000 ^a ¥	1,688,667 ^a
Agar nutriente	101,833 ^b	163,667 ^b

¥ Valores en columnas con distinta letra, difieren estadísticamente entre sí según la prueba LSMEANS ($P \leq 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- El cultivo monoxénico descrito por Ehlers presentó el mayor rendimiento de producción de nematodos infectivos juveniles.
- No existe interacción entre la concentración de inóculo con el medio de crecimiento sólido en la producción *in vitro* del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora*. El cultivo monoxénico descrito por Ehlers, presentó el mayor rendimiento de infectivos juveniles a una concentración inicial de 1000 IJ/mL.

5. RECOMENDACIONES

- Definir parámetros de la cantidad de oxígeno, un factor que influye en la producción *in vitro* de nematodos entomopatógenos, mediante un bioreactor.
- Establecer protocolos de producción *in vitro* usando el medio de crecimiento cultivo monoxénico descrito por Ehlers en líquido mediante el uso de un bioreactor. Se evaluó la producción *in vitro* en medio líquido usando este medio, pero solo se logró el proceso de diferenciación del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* (Figura 4).
- Evaluar los estados de desarrollo del nematodo *Heterorhabditis bacteriophora* en diferentes tiempos.



Figura 4. Producción *in vitro* con el cultivo monoxénico descrito por Ehlers en líquido.

6. LITERATURA CITADA

Abu Hatab, M., R. Gaugler. 2000. Diet composition and lipid of in vitro-produced *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biological control* 20: 1-7.

Adams, B.J., A. Fodor, H.S. Koppenhofer, E. Stackebrandt, S. Stock, M.G. Klein. 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37: 32-49.

Akhurst, R. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology* 121: 303-309.

Chavarría-Hernández, M. A., G. Islas-López, B.R. Maciel-Vergara, A. Rodríguez Pastrana, I. Rodríguez-Hernández. 2008. Kinetics of infective juvenile production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in submerged monoxenic culture. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7(1): 13-20.

Ciche, T., C. Darby, R-U. Ehlers, S. Forst y H. Goodrich-Blair. 2006. Dangerous liaisons: the symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biological Control* 38 (1): 22-46.

Daborn, P. J., N. Waterfield, M.A. Blight, R.H. French-Constant. Measuring Virulence Factor Expression by the Pathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during Insect Infection. *Journal of Bacteriology* 183(20): 5834-5839.

Dutky, S., J. Thompson y G.E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology* 6: 417-422.

Eleftherianos, I., S. Boundy, S.A. Joyce, S. Aslam, J.W. Marshall, R.J. Cox, T.J. Simpson, D.J. Clarke, R.H. French-Constant., S.E. Reynolds. 2006. An antibiotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defenses through phenoloxidase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(7): 2419-2424.

Gaugler, R. y H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, FL, 384 p.

- Han, R.C. y R.U. Ehlers. 2000. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. *Journal of Invertebrate Pathology* 75 (1), 55–58.
- Klein, M. 1990. Efficacy against Soil-Inhabiting Insect Pests. *In: Gaugler, R. y H. K., Kaya* (eds) *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* CRC Press, Boca Raton, FL. p 195 -214.
- Kooliyottil, R., D. Upadhyay, F. Inman III, S. Mandjiny, L. Holmes. 2013. A comparative analysis of entomoparasitic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *Open Journal of Animal Sciences* 3 (4), 326-333.
- Nicholls, C. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Colombia, Editorial Universidad de Antioquia. 277 p.
- Parrella, M. 2008. Biological control in protected culture: will it continue to expand? *Phytoparasitica* 36(1):3-6.
- Shapiro-Ilan, D.I. y R. Gaugler. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28: 137-146.
- Strauch, O., S. Stoessel y R.U. Ehlers. 1994. Culture conditions define automictic or amphimictic reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*. *Fundamental and Applied Entomology* 17:575-582.
- Strauch, O. y R.U. Ehlers. 1998. Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50:369–374.
- Susurluk, A. et al. 2013. Quality control of in vitro produced *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strains isolated from Turkey. *Türk. Entomol Derg* 37 (3): 283-29.
- Udo-Ehlers, R. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56:623-633
- Valdés, Y., A. Lobaina Audevert, M. Márquez Gutiérrez y M. Gómez Pacheco. 2005. Reproducción de *Heterorhabditis indica* en cultivos bidimensionales elaborados con proteína animal. *Fitosanidad* 9 (2): 25-28.
- Valdés, Y., A. Lobaina Audevert, M. Márquez Gutiérrez y M. Gómez Pacheco. 2006. Influencia de la composición de diferentes medios de cultivo en la reproducción de *Photorhabdus luminescens*. *Fitosanidad* 10 (1): 29-31.
- Van Driesche, R. G y K.M. Heinz. 2004. An overview of biological control in protected culture. *In: K. M. Heinz, R. G. Van Driesche, y M. Parrella, M.* (eds.) *Bio Control in Protected Culture*. p 1-24.

Van Lenteren, J. C. 2007. Biological control for insect pests in greenhouses: an unexpected success. *In* C. Vincent, M. S. Goettel, y G. Lazarovits (eds.) *Biological Control: A Global Perspective*. p 105-117.

White, G., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66 (1709): 302-303.

Woodring, J. Kaya H. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques. Fayetteville, Arkansas, Southern Cooperative Series Bulletin 331. 30 p.