

**Tema 15: PRODUCCIÓN DE ENTOMOPATÓGENOS Y EVALUACIÓN DE EFICACIA**

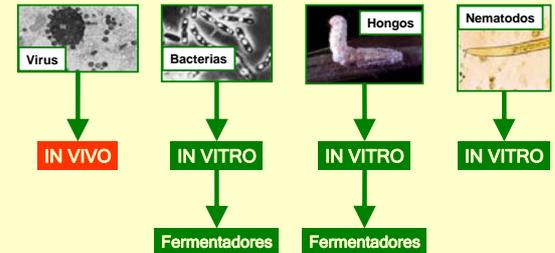
- 15.1. Introducción
- 15.2. Producción de entomopatógenos:
  - 15.3.1. Virus
  - 15.3.2. Bacterias
  - 15.3.3. Hongos
  - 15.3.4. Nematodos
- 15.3. Formulación y aplicación de entomopatógenos:
  - 15.4.1. Virus
  - 15.4.2. Bacterias
  - 15.4.3. Hongos
  - 15.4.4. Nematodos
- 15.4. Evaluación de eficacia: Bioensayos

**Tema 15: PRODUCCIÓN Y EFICACIA DE ENTOMOPATÓGENOS**

15.1. Introducción:

Producción de entomopatógenos: problema de coste en función

- Sustrato: "in vivo" o "in vitro"
- Manejo del cultivo (fermentadores)



**Tema 15: PRODUCCIÓN Y EFICACIA DE ENTOMOPATÓGENOS**

15.2. Producción de entomopatógenos: virus

Cultivo de virus entomopatógenos:

- "In vivo":** Sistema empleado hasta la fecha para la producción industrial
  - Ventajas:
    - Menor coste actual que la producción "in vitro"
    - Técnica totalmente desarrollada
    - Factible para toda la gama de virus entomopatógenos
  - Inconvenientes:
    - Dificultad de producción estándar y control de calidad
    - Imposibilidad de producción de virus recombinantes mejorados (rNPVs).
- "In vitro"**  
Se realiza sobre cultivo de tejidos en biorreactores (problema del coste actual)



**Tema 15: PRODUCCIÓN Y EFICACIA DE ENTOMOPATÓGENOS**

Cultivo de Baculovirus "in vivo":

- Objetivo** es maximizar el rendimiento de cuerpos de inclusión (biológicamente activos) al menor costes de producción.
- Factores que afectan al rendimiento/coste:**
  - Insecto huésped
    - Origen:
      - Mantenedos en laboratorio sobre dieta artificial
      - Recolectados en campo: menor coste, pero puede presentar posible problemas de parásitos y contaminantes
    - Estado de desarrollo:
      - Larvas de último estadio, p.e.: L-IV
      - $2 \times 10^5$  hasta  $4,3 \times 10^7$  OB/mg de peso vivo
    - Sexo:
      - Normalmente las hembras producen más OB que los machos
    - Huésped alternativo





Cultivo de Baculovirus "in vivo" (cont.):

- Inóculo viral
  - Origen
    - Se realizan 3 amplificaciones-purificaciones para evitar contaminantes.
  - Actividad
    - La virulencia depende del origen geográfico del aislado
  - Dosis
    - $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^7$  para asegurar el 100% de mortalidad.
- Condiciones ambientales
  - Temperatura: se somete a ensayo, suele situarse entre 20 y 26°C
  - Humedad relativa: presenta poco efecto
  - Fotoperíodo: presenta poco efecto
  - Alimentación: empleo de dietas artificiales o naturales



15.2. Producción de entomopatógenos: virus

Cultivo de Baculovirus "in vitro":

□ Cultivos de células de insectos:

- Origen de células de ovarios o embriones no diferenciados
- Medios de cultivos:
  - Medios oligídicos (no definidos):
    - Suero fetal bovino (SFB)
    - Medios sin SFB
  - Medios holídico (definidos): no empleados a nivel de producción
  - Condiciones muy estrictas de T<sup>o</sup>, pH, presión osmótica, oxígeno, etc.



15.2. Producción de entomopatógenos: virus

Cultivo de Baculovirus "in vitro" (cont.):

□ Procedimiento:

- Sistemas de cultivo del huésped:
  - Cultivos estacionarios
  - Cultivos en suspensión
  - Reactores agitados
  - Reactores airlift
- Infección viral:
  - Inóculo viral
  - Proceso:
    - Primera infestación: viriones libres
    - Segunda infestación: cuerpos de inclusión



15.2. Producción de entomopatógenos: bacterias

□ Producción "in vitro" : costes bajos y extensión del método

□ Medios de cultivo:

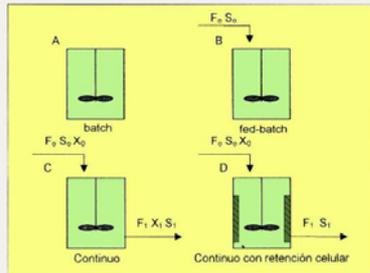
- Medios fundamentalmente merídicos (semi-definidos), a veces, oligídico (no definido)
- Importancia de fuentes de C-N-Microelementos para el crecimiento bacteriano con elementos de bajo coste y composición constante.

Ejemplos de fuentes de nutrientes que *Bacillus thuringiensis* requiere para su crecimiento y producción de toxinas insecticidas

Nutriente	Fuentes
Carbono	Glucosa, fructosa, maltosa, glicerol, sacarosa, almidón, melaza, etc.
Nitrógeno	Sulfato de amonio; levadura; harina de algodón, pescado o de mostaza; semillas de leguminosas; torta de carne; suero de leche; etc.
Micronutrientes	Magnesio, Manganeseo, Calcio, Potasio y hierro.

15.2. Producción de entomopatógenos: bacterias

Producción comercial: Fermentadores (tipos)

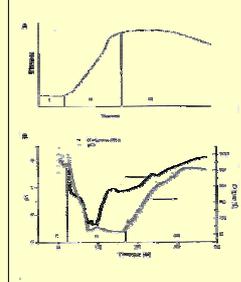


Métodos de producción de *Bt*:  
 A) Cultivo batch  
 B) Cultivo fed-batch  
 C) Cultivo continuo  
 D) Cultivo continuo con retención celular

$F_0$ : Flujo de entrada de sustrato  
 $F_1$ : Flujo de salida de sustrato  
 $X_0$ : Biomasa de entrada  
 $X_1$ : Biomasa de salida  
 $S_0$ : Concentración del sustrato a la entrada  
 $S_1$ : Concentración del sustrato a la salida

15.2. Producción de entomopatógenos: bacterias

Producción comercial: Proceso cinético en la fermentación

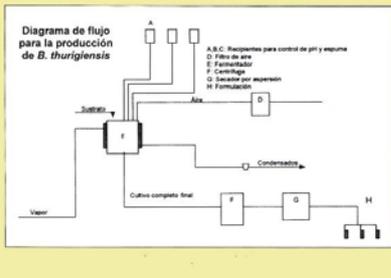


A) Curva de crecimiento de la biomasa  
 Zona I : de adecuación  
 Zona II : crecimiento exponencial  
 Zona III: esporulación

B) Dinámica de pH y oxígeno

15.2. Producción de entomopatógenos: bacterias

Producción comercial: Diagrama de flujo de una planta



Costes de producción: 23% del precio final planta con una producción de 100 toneladas/año

15.2. Producción de entomopatógenos: hongos

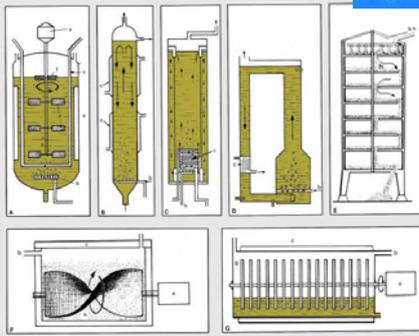
- Producción "in vitro" : similar al anterior
- Medios de cultivo:
  - Medios merídicos (semi-definidos)
  - Importancia de fuentes de C-N-Microelementos, en este caso, incluyendo vitaminas y aminoácidos

Ejemplos de fuentes de nutrientes necesarios para el crecimiento de hongos entomopatógenos

Nutriente	Fuentes
Carbono	Dextrosa, polisacáridos, lípidos
Nitrógeno	Nitratos, amoníaco o nitrógeno orgánico (aminoácidos o proteínas)
Macronutrientes	Potasio, Magnesio y Azufre
Micronutrientes	Calcio, Cobre, Hierro, Manganeso, Molibdeno y Zinc
Vitaminas	Biotina y tianina
Aminoácidos	Cisteína y Metionina

15.2. Producción de entomopatógenos: hongos

Producción: en medio líquido o sólido



15.2. Producción de entomopatógenos: nematodos

Producción:

- "in vivo": sólo a pequeña escala, costes mayores.
- "in vitro": Fermentadores especialmente adaptados
  - Cultivo en medio sólido: se inició con torta de carne más sustancias anti-microbianas.
  - Cultivo en medio líquido: secreto de las casas comerciales, son medios que permiten el desarrollo de bacterias simbióticas

Ejemplos de fuentes de nutrientes necesarios para el crecimiento de nematodos entomopatógenos

Nutriente	Fuentes
Carbono	Glucosa, harina de soja
Lípidos	Ácidos grasos moninsaturados
Macronutrientes	CiNa, SO <sub>4</sub> , Mg, Cl <sub>2</sub> Ca, ClK
Otros	Levadura, Colesterol, peptona, etc.

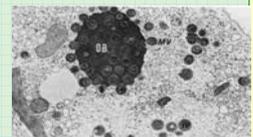
15.3. Formulación y aplicación de entomopatógenos

- Formulación muy similar a los pesticidas químicos de síntesis
- Forma de aplicación más utilizada es la pulverización.
- Consideraciones especiales por la forma resistente del entomopatógeno
- Formulación puede necesitar aditivos extras para aumentar la capacidad de conservación y/o actuación del entomopatógeno



15.3. Formulación y aplicación de entomopatógenos: virus

- Tipos de formulaciones:
  - Líquida: portador el agua (más frecuente) para pulverización
  - Sólidas (mejor conservación en almacén) para pulverización
  - Microencapsulado
- Coadyuvantes: comunes a pesticidas (surfactantes, adherentes, espesantes, ligantes, etc.
- Otras sustancias de la formulación:
  - Cebos y estimulantes alimenticios
  - Protectores UV
  - Blanqueadores ópticos
  - Proteasas
  - Ácido bórico
  - Azadiractina



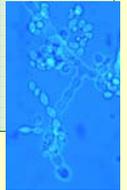
15.3. Formulación y aplicación de entomopatógenos: bacterias

- ❑ Tipos de materias activas
  - 1ª generación: mezcla de esporas y endotoxina de un serovar (más frecuente, 84% de los productos registrados)
  - 2ª generación: mezcla de esporas y endotoxinas de un serovar que se modificó genéticamente, introduciendo genes de otros serovares
  - 3ª generación: contiene endotoxinas de *Bt*, producidas por otras bacterias recombinantes.
- ❑ Tipos de formulaciones: Muy variada
  - Líquida para pulverización normal, BV y UBV
  - Sólidas: gránulos y microencapsulados
- ❑ Coadyuvantes: comunes a pesticidas



15.3. Formulación y aplicación de entomopatógenos: hongos

- ❑ Tipos de formulaciones:
  - Sólidas para pulverización normal: presenta problemas debido a que las conidias aéreas son hidrofóbicas
  - Líquidas en aceite (vegetal o mineral) para aplicaciones BV y UBV en agua (son mejores)
- ❑ Coadyuvantes: comunes a pesticidas
- ❑ Otros aditivos de la formulación:
  - Protectores solares (esporas son muy sensibles a la radiación solar y UV)



15.3. Formulación y aplicación de entomopatógenos: nematodos

- ❑ Tipos de formulaciones disponibles comercialmente
  - Sólidas para pulverización
  - Líquidos concentrados para pulverización
  - Gránulos dispersables en agua, para pulverización
  - Geles para pulverización
- ❑ Coadyuvantes: comunes a pesticidas



15.4. Evaluación de eficacia de entomopatógenos: bioensayos

- ❑ Evaluación de eficacia (mortalidad originada) igual que los insecticidas químicos de síntesis
- ❑ Análisis probit, igual también, para estimar  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$
- ❑ Ensayos de laboratorio y de campo similares, pero con la precaución extra de evitar contaminaciones
- ❑ Unidades:

Patógeno	Unidades
Virus	Cuerpos de inclusión/Ud. de volumen (No. OB/litro)
Bacterias	Unidades internacionales/Ud. de volumen (No. UI/litro)
Hongos	Número de esporas/Ud. de volumen (No. Esporas/litro)
Nematodos	Número de individuos/Ud. de volumen (No. / litro)

**Tema 15:** PRODUCCIÓN Y EFICACIA DE ENTOMOPATÓGENOS

**15.4. Evaluación de eficacia de entomopatógenos: bioensayos**

**Unidades en el caso de *Bacillus thuringiensis*.**

*Unidades tóxicas Internacionales (ITU)*

$ITU \cdot mg^{-1} = (15.000 \text{ ITU} \cdot mg^{-1}) \cdot (DL_{50} \text{ del estándar} / DL_{50} \text{ del ensayo})$

