

Producción de larvas de *Anastrepha ludens* (LOEW) en cultivo sumergido

Anastrepha ludens (LOEW) Larvae production insubmerged cultivate

Miguel Salvador Figueroa¹
Juan Martín Martínez-Pérez¹
María de Lourdes Adriano Anaya¹
Reynaldo Aguilar Laparra²

RESUMEN

En el proceso de producción de *Anastrepha ludens* (LOEW) la incubación de los huevos (para su transformación en larvas) se realiza de forma artesanal en medio líquido (pH 7.3), homogeneizado con aireación (flujo no controlado), utilizando una columna de burbujeo con relación altura/diámetro (h/d) de 1.5. Dicha columna fue comparada con otros dos biorreactores, una columna de burbujeo con relación h/d de 6.5 y un biorreactor air-lift con una relación h/d de 6.5. Se estudió el efecto del pH y la presencia de sacarosa o glucosa en el medio de incubación. La máxima productividad se obtuvo en la columna de burbujeo h/d 6.5 (5.19 larvas mL⁻¹ h⁻¹) a las 102 horas, superior a lo obtenido en los otros dos biorreactores. Se observó que a pH's de 3.3 y 4.3 la eclosión comienza antes que a pH's más básicos, obteniendo una productividad de 5.60 larvas mL⁻¹ h⁻¹ a las 102 horas. La adición de carbohidratos al medio de incubación redujo el tiempo de cultivo y alcanzando con glucosa 0.5% y sacarosa 1.0%, productividades de 5.83 larvas mL⁻¹ h⁻¹ a las 94 horas de cultivo. Así mismo, el consumo de oxígeno, 164 ng O₂ huevo⁻¹ h⁻¹, por parte de los huevos, es reportado.

PALABRAS CLAVE: biorreactor, huevo, incubación, medio líquido.

ABSTRACT

In the process of production of *Anastrepha ludens* (LOEW) the incubation of the eggs (for their transformation to larvae) is carried out in a handmade way between liquid (pH 7.3), homogenized with air (not controlled flow), using a column of I bubble with relationship height/diameter (h/d) of 1.5. This column was compared with other two bioreactors, a column of I bubble with relationship h/d of 6.5 and a bioreactor air-lift with a relationship h/d of 6.5. Also, was studied the effect of the pH and the sucrose presence or glucose in the means of incubation. The maximum productivity was obtained in the column of I bubble h/d 6.5 (5.19 larvae mL⁻¹ h⁻¹) at the 102 hours, superior to that obtained in the other two bioreactors. It was observed that to pH's of 3.3 and 4.3 the appearance begins before to more basic pH's, obtaining a productivity of 5.60 larvae mL⁻¹ h⁻¹ at the 102 hours. The addition of carbohydrates to the means of incubation reduced the time of cultivation and reaching with glucose 0.5% and sucrose 1.0%, productivities of 5.83 larvae mL⁻¹ h⁻¹ at the 94 hours of cultivation. Likewise the oxygen consumption, 164 ng O₂ egg⁻¹ h⁻¹, on the part of the eggs, is reported.

KEY WORDS: bioreactor, egg, incubation, liquid medium.

INTRODUCCIÓN

El control biológico de insectos plaga incluye, entre otras cosas, el empleo de individuos (machos, primordialmente) estériles, proceso conocido como de la Técnica del Insecto Estéril (TIE). Para que la TIE pueda aplicarse, se requiere establecer el proceso de producción masiva del insecto a controlar (Leyva *et al.*, 1991; Hernández, 1997; Klassen, 2005). Dicho proceso contempla una serie de etapas, iniciando con el establecimiento de la colonia en condiciones artificiales y concluyendo con la liberación de insectos adultos estériles (Rull *et al.*, 1994).

Dada la importancia de la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens* LOEW), en el municipio de Metapa de Domínguez, Chiapas se estableció la planta productora de moscas estériles, en la que actualmente se producen, en promedio, 235 millones de moscas por semana. Aunque el proceso de producción de este insecto es exitoso, la etapa de transformación de huevo a larva (etapa de incubación) es realizada de forma artesanal.

La incubación de huevecillos de *A. ludens* se realiza en botellones que contienen agua clorada (6ppm), procurando mantener una relación (v/v) huevo: agua de 1:27. Para mantener en

¹ Centro de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera a Puerto Madero Km 2.0. Tapachula, Chiapas. Correo-e: msalvad@hotmail.com

² Planta MOSCAFRUT. Camino a Cacaotales s/n, Metapa de Domínguez, Chiapas; México.

suspensión los huevos, a los botellones se les suministra aire (presión de 1.4 kg cm⁻²) sin control de flujo. Después de alcanzar 80% de transformación (en un tiempo aproximado de 100h) el proceso de incubación se da por concluido.

Escaso ha sido el trabajo orientado hacia entender el papel del biorreactor y las condiciones químicas del medio, en el desarrollo del embrión de la mosca de la fruta hasta alcanzar el estadio de larva (transformación de huevo a larva). Caso contrario, para el cultivo de microorganismos se tiene amplia experiencia y se ha establecido que todo biorreactor debe mantener un medio homogéneo, sin zonas muertas y a la vez transferir oxígeno y nutrimentos al medio sumergido empleando el mínimo de energía (Quintero, 1981). Se ha establecido que el ambiente mecánico de mezclado, aireación y presión de un biorreactor puede influenciar directamente sobre el crecimiento y la productividad ya que se alteran la transferencia de masa y calor (Deshusses *et al.*, 1997). Así mismo, en los procesos de crecimiento y producción de microorganismos aeróbicos la oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células, productos y CO₂ establece una demanda de oxígeno que es esencial satisfacer a través de la aireación y mezclado de cultivo. Cuando se evalúa la transferencia de oxígeno es necesario tomar en cuenta las resistencias que encuentra el oxígeno antes de llegar a las células, por ejemplo: la viscosidad, los sólidos disueltos, temperatura, agregación celular, etcétera.

Por otra parte, las técnicas de cultivo de células animales deben tener un ambiente adecuado de oxigenación, temperatura y pH, también debe tomarse en cuenta la transferencia de nutrimentos y el control de productos originados del metabolismo. Por ejemplo en las células de insecto cultivadas en reactores agitados se necesitan muy complejos, control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD), control y eliminación de contaminantes y metabolitos tóxicos, por esta razón la información en cuanto al crecimiento de este tipo de líneas celulares no es muy abundante (Palomares *et al.*, 1997).

Aunque mucho conocimiento se tiene con respecto al crecimiento de células individuales: microorganismos y células de eucariontes (plantas, animales e insectos) o incluso de tejidos, sin embargo, el conocimiento en el desarrollo de un organismo multicelular (larva de mosca) en biorreactores es realmente escaso (Martínez-Pérez *et al.*, 1997).

Las moscas de la fruta ovopositan en frutos que sean capaces de satisfacer las condiciones fisicoquímicas para la transformación del embrión (huevos ovopositados) a larva y las necesidades alimenticias de las larvas. Por lo anterior, en el proceso de cría masiva, y sobre todo en la incubación de los huevos es importante mimetizar las condiciones naturales. Actualmente, el cultivo sumergido de huevos de moscas de la fruta es realizado de manera artesanal (exclusivamente en agua) sin tomar en consideración que el tipo de biorreactor, la presión de burbujeo, el flujo de aire, el pH adecuado y la concentración de nutrimentos deben satisfacer las necesidades de desarrollo de los embriones y obtener la máxima productividad. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el tipo de biorreactor y sus condiciones de operación para maximizar la productividad de larvas de *Anastrepha ludens* (Loew) en cultivo sumergido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos experimentales se desarrollaron en el área de incubación de huevecillos de *A. ludens* de la Planta MOSCAFRUT en Metapa de Domínguez, Chiapas y en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Biociencias de la UNACH en Tapachula, Chiapas.

Material biológico. El material biológico utilizado fueron huevos de *Anastrepha ludens* (Loew) del 4º al 6º día de oviposición de la colonia ya establecida en el área de reproductores recién colectados y lavados con agua estéril. La concentración empleada fue de 685 huevecillos mL⁻¹ para todas las repeticiones.

Biorreactores y condiciones de trabajo. Se utilizaron tres biorreactores: dos columnas de burbujeo con una relación altura/diámetro (h/d) de 6.5 y 1.5 (columna testigo), respectivamente y un air-lift, h/d 6.5. Los biorreactores se agitados con aire a flujo de 1 vvm (volumen de aire · volumen de trabajo-1 · min⁻¹), presión de 1 kg cm⁻², volumen de trabajo de 500 mL y temperatura de incubación de 27 °C.

pH del medio de cultivo. El pH del medio de cultivo se varió de 3.3 hasta 7.3 (pH del cultivo tradicional). Para obtener los pH de ensayo se utilizó una solución reguladora a base de fosfatos (solución de McIlvaines) (Silverton y Anderson, 1961), el pH fue monitoreado a lo largo del cultivo utilizando un electrodo dentro de la columna.

Carbohidratos en el medio de cultivo.

Se varió la concentración de carbohidratos dentro del medio con sacarosa y glucosa en concentraciones de 0, 0.5 y 1.0%. La determinación de la concentración a lo largo del cultivo se realizó por el método enzimático GOD-POD (Glucosa oxidasa-peroxidasa) (Trinder, 1969).

Oxígeno disuelto. El oxígeno disuelto en el medio de incubación de los huevos de *A. ludens* se determinó, desde el inicio de la incubación hasta el inicio de la eclosión, mediante un electrodo de operación continua. Para obtener el consumo neto de oxígeno (QO_2) primeramente se determinó el coeficiente de transferencia de oxígeno, kLa , del biorreactor de columna con h/d 6.5, mediante el método indirecto de eliminación de gas (Quintero, 1981). El kLa del biorreactor de columna con h/d 6.5 fue de 40.761 h^{-1} y el consumo máximo de oxígeno fue de $164 \text{ ng O}_2/\text{huevo-1h}^{-1}$.

Porcentaje de eclosión. El porcentaje de eclosión [E (%)] se determinó empleando un microscopio estereoscópico. Para ello, muestras de 1 mL de la suspensión de huevos se distribuyó sobre un trozo de tela oscura y se contabilizaron las larvas presentes. El porcentaje de eclosión fue el resultado de dividir el número de larvas (L) entre el total de coriones y huevecillos (C+H) y, posteriormente, multiplicado por cien $\{E = [L/$

$(C+H)](100)\}$. Todas las lecturas se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de eclosión de huevos de *A. ludens* en los biorreactores

En la Figura 1 se muestra la curva de eclosión de los huevos de *A. ludens* cultivados en biorreactores agitados con aire. En dicha curva se observaron tres etapas o fases claramente identificadas. De la hora 0 a la hora 84 de incubación, no se encontraron larvas. Posteriormente, de la hora 84 a la hora 108, se observó un rápido incremento en la población de larvas neonatas. Finalmente, de la hora 108 a la hora 132, la cantidad de larvas neonatas alcanzó el valor máximo.

La curva de crecimiento por lote de una población de microorganismos o de células de eucariontes también muestran tres fases: la primera fase, o fase lag, donde los microorganismos o las células se adaptan al medio y condiciones de cultivo, la segunda fase, o fase log, donde los microorganismos o las células están adaptadas a las condiciones físico-químicas del ambiente por lo que crecen (duplican) de forma exponencial (esta fase se emplea para determinar la velocidad de crecimiento (μ) y cuyo valor depende del tipo de organismo y de las condi-

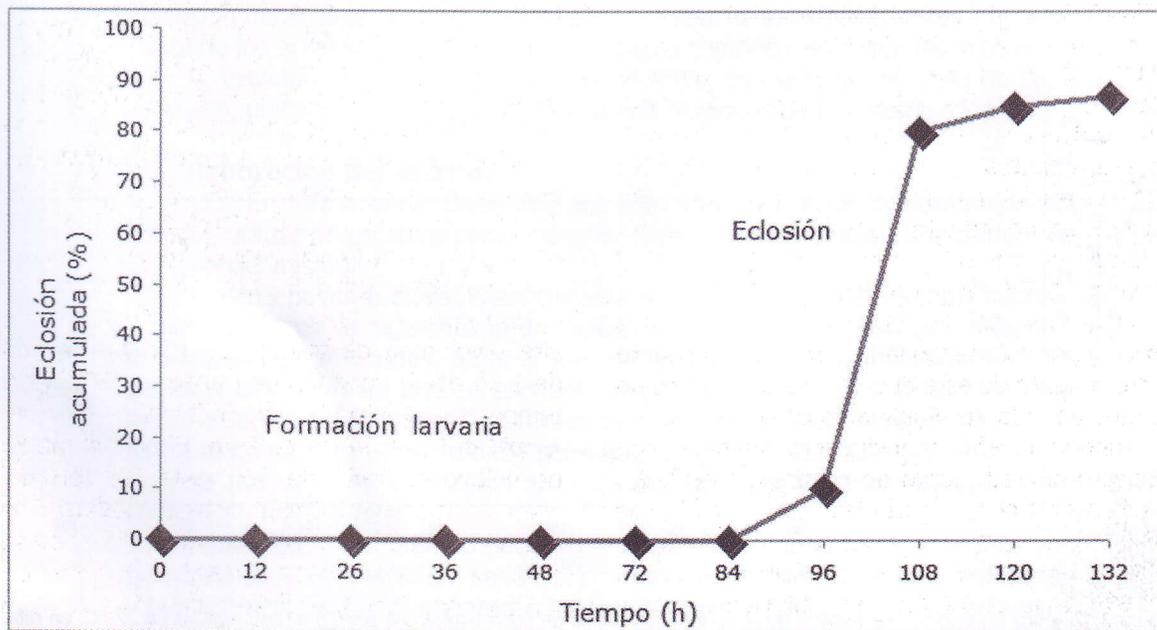


Figura 1. Curva típica de eclosión de huevos de *A. ludens*.

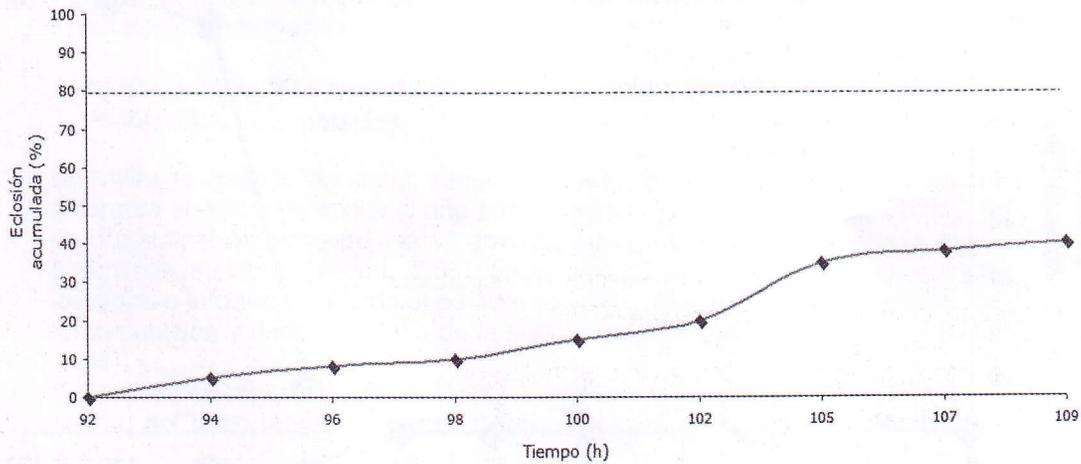
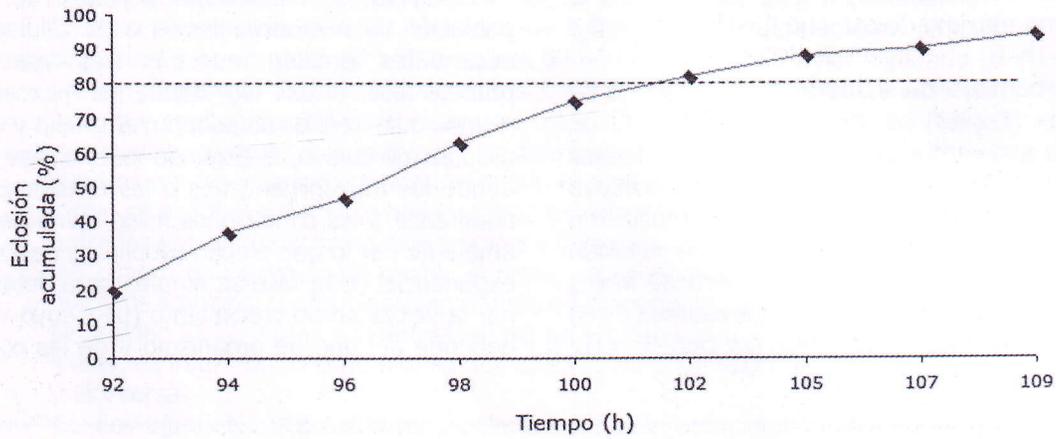
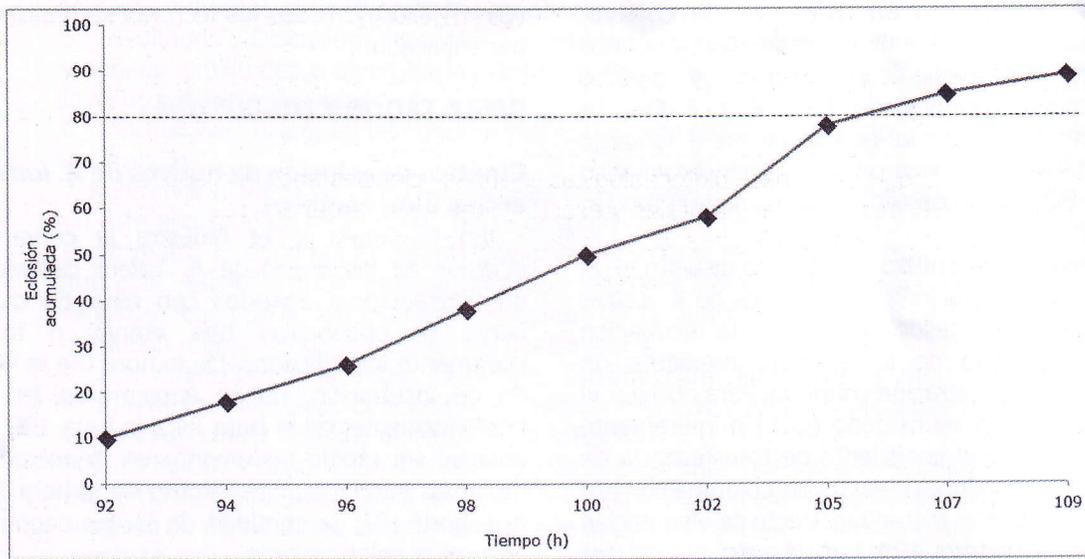


Figura 2. Cinética de eclosión de huevos de *A. ludens* incubados en agua estéril con pH 7.3 a temperatura de 27 °C, en diferentes biorreactores. Arriba: Columna de burbujeo con $h/d = 1.5$. En medio: Columna de burbujeo con $h/d = 6.5$. Abajo: Biorreactor tipo air-lift con $h/d = 6.5$.

ciones de cultivo), finalmente, la tercera fase o fase estacionaria, donde los microorganismos o células dejan de crecer porque algún factor físico-químico se vuelve limitante del crecimiento.

Para el caso de este trabajo, la fase donde no hay presencia de larvas se puede interpretar como de desarrollo del embrión. Esta etapa inicia con la fertilización del huevo y termina con la larva formada dentro del huevo (huevo no eclosionado). El tiempo de desarrollo, y por ende la velocidad, dependerá tanto de la genética, como de las condiciones físico-químicas en las que se realice la incubación de los huevos.

Desde el punto de vista genético Kraufur (2005) comentó que el confinamiento y aislamiento prolongado de una población de insectos induce menor diversidad genética. Sin embargo, la diversidad remanente (D_r) pudiera establecer las diferencias en el desarrollo de los individuos. Por lo anterior, bajo condiciones controladas de incubación hay pocas probabilidades de que dos huevos fecundados al mismo tiempo se desarrollen exactamente igual. Así que, el desarrollo diferencial del embrión impactará la curva de distribución de larvas neonatas. Por otro lado, al no ser el huevo un sistema aislado, el desarrollo del embrión pudiera ser afectado por el pH, la fuerza iónica, la presión osmótica, la transferencia de masa y la homogeneidad del medio de incubación. Hasta ahora no se tienen estudios referentes a este tópico.

Por su parte, la fase de eclosión puede ser resultante, exclusivamente, del patrón de distribución de la edad de los huevos. En este sentido es poco probable que una población de hembras maduras sexualmente copulen al mismo tiempo. También es poco probable que la fertilización y ovoposición se realice de forma sincrónica. Así que el patrón de distribución de la copulación, de la fertilización y de la ovoposición son los factores que impactan el patrón de distribución de larvas neonatas.

Por lo anterior, la curva de eclosión acumulada será resultante tanto de lo genético como de las condiciones ambientales de incubación y del patrón de madurez sexual, copulación, fertilización y ovoposición. Por lo anterior una proporción importante de embriones alcanzará la fase de larva en un rango de tiempo más o menos cerrado y la restante se dividirá en aquellas que se desarrollan rápidamente y las

más lentas (el tipo de distribución probabilística, normal, χ^2 , u otra, es desconocida).

Con estas consideraciones en mente, se estudió de forma más puntual la cinética de eclosión de los huevos de *A. ludens* en los diferentes biorreactores empleados en este trabajo (Figuras 2). En el gráfico se trazó la línea de 80% de eclosión que, como se mencionó en la Introducción, es el criterio para trasladar las larvas neonatas a la siguiente fase de producción de moscas estériles.

Como se puede notar en la Figura 2, en el biorreactor tipo *air-lift* la eclosión inició más tardíamente que las columnas de burbujeo, y que hasta las 109 h de incubación únicamente se alcanzó 45% de eclosión. En este mismo sentido, en las columnas de burbujeo con h/d de 1.5 y 6.5 se requirieron 105.5 y 101.5 h, respectivamente, para alcanzar dicho valor. Por otro lado, en las columnas con h/d 6.5 y 1.5 la velocidad de eclosión calculada fue de 4.996 y de 4.272 h⁻¹, respectivamente, mientras que en el reactor *air-lift* fue de 2.543 h⁻¹. Teniendo en consideración el criterio de 80% de eclosión, la productividad de los reactores fue 5.09, 5.19 y 4.42 larvas ml⁻¹ h⁻¹ para los biorreactores con h/d 1.5, 6.5 y *air-lift*, respectivamente. Los resultados anteriores de alguna manera indican la influencia que tiene el tipo de biorreactor para proporcionar el ambiente homogéneo necesario para el desarrollo del embrión. Las diferencias encontradas en los biorreactores empleados indican que el proceso es más homogéneo en la columna con h/d = 6.5.

Efecto del pH en la eclosión de huevos de *A. ludens*

La Figura 3 muestra el comportamiento de la eclosión, en el biorreactor de columna de burbujeo con h/d = 6.5, de los huevos de *A. ludens* en agua estéril con diferente pH (desde 3.3 hasta 7.3). De forma general se puede ver que el patrón de eclosión larval en los diferentes valores de pH experimentados no mostró variación. Por otro lado, se observó que conforme el pH se vuelve más ácido la eclosión inicia a tiempos más tempranos ya que a pH's de 3.3 y 4.3 a las 92 horas de cultivo se tiene el 20%, mientras que a pH's superiores la eclosión apenas comienza. Se pudiera pensar que un cambio en el valor de pH durante la fase de desarrollo larvario pudiera ser el verdadero

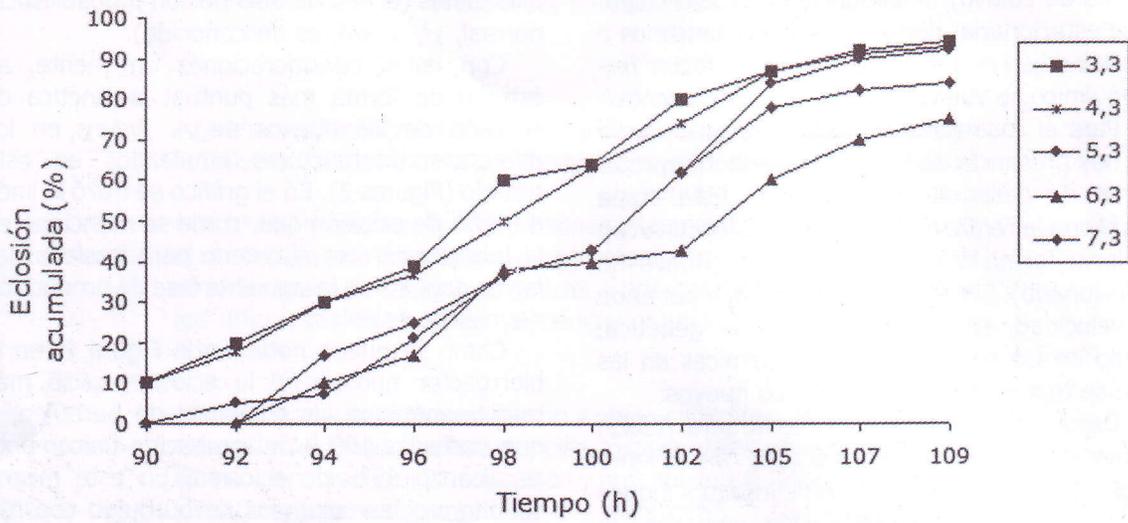


Figura 3. Cinética de eclosión de *A. ludens* a diferente pH en el biorreactor de columna con h/d 6.5. Las condiciones de incubación fueron agua estéril como medio de incubación y temperatura de 27 °C.

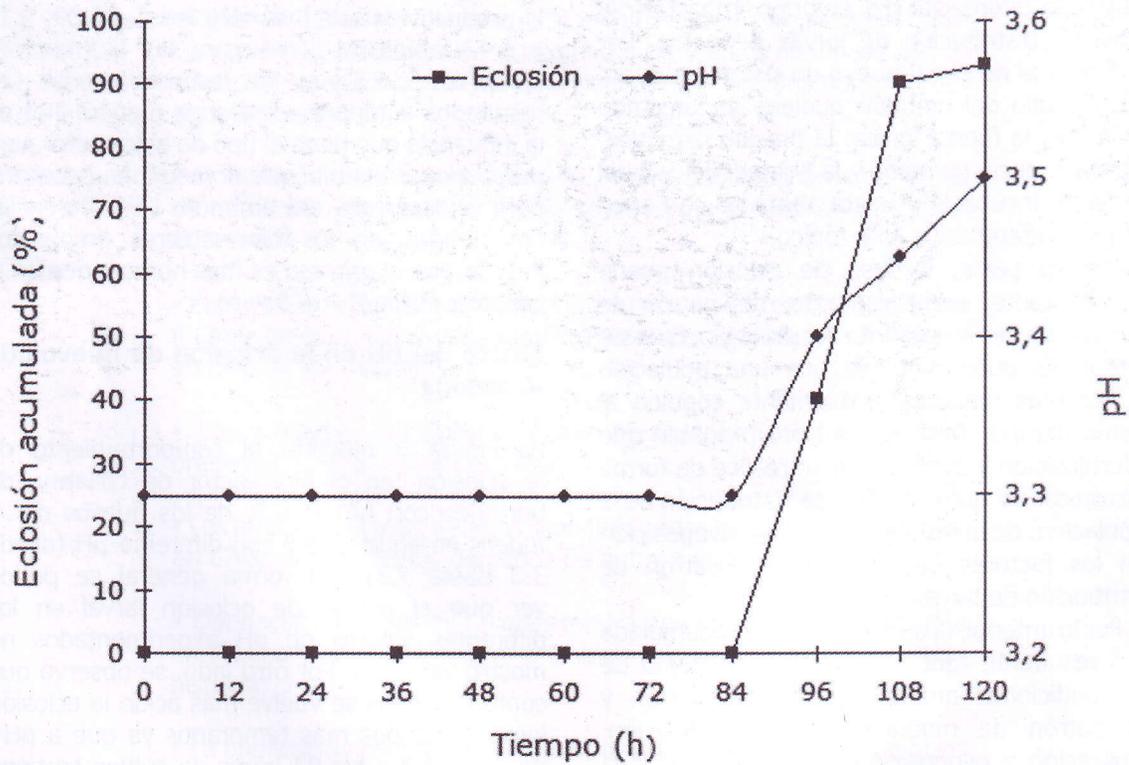


Figura 4. Comportamiento del pH a lo largo del proceso de incubación de huevos de *A. ludens* en biorreactor de columna con h/d 6.5.

efecto y no el pH inicial, por lo que se decidió monitorear esta variable a lo largo de todo el proceso. En la Figura 4 se muestra que durante la fase de desarrollo larvario el pH se mantuvo constante, observando variación exclusivamente en la fase de eclosión.

El desarrollo óptimo de los embriones de *A. ludens*, como de todos los organismos, se debe realizar dentro de un rango de pH. Fuera de este rango el desarrollo es menos eficiente e incluso puede no progresar. Los resultados obtenidos indican claramente que el rango de pH óptimo para el desarrollo de los embriones de *A. ludens* se encuentra entre los valores de 3.3 y 4.3. Este resultado puede no ser extraño ya que las moscas hembra ovopositan sobre frutos inmaduros (mango y cítricos) donde la acidez es elevada. Por otro lado, la variación de pH observada durante la fase de eclosión puede ser resultado de la liberación de sustancias básicas cuando la larva emerge del huevo.

Finalmente, en el Cuadro 1 se muestra la productividad de cada uno de los diferentes sistemas a diferente pH, observando que a pH 3.3 la productividad fue la mayor.

Cuadro 1. Productividad de larvas de *A. ludens* a diferente pH del medio de incubación

pH	Tiempo (t80) (h)	Productividad (larvas mL-1 h-1)
3.3	102	5.60
4.3	103	5.42
5.3	105	5.40
6.3	109	5.22
7.3	105.5	5.19

Cuadro 2. Productividad de larvas de *A. ludens* a diferente concentración de carbohidratos

pH	Tiempo (t80) (h)	Productividad (larvas mL-1 h-1)
Sacarosa 0.5%	96.2	5.69
Sacarosa 1.0%	94.0	5.83
Glucosa 0.5%	94.0	5.83
Glucosa 1.0%	97.0	5.64
Sin carbohidratos	105.5	5.19

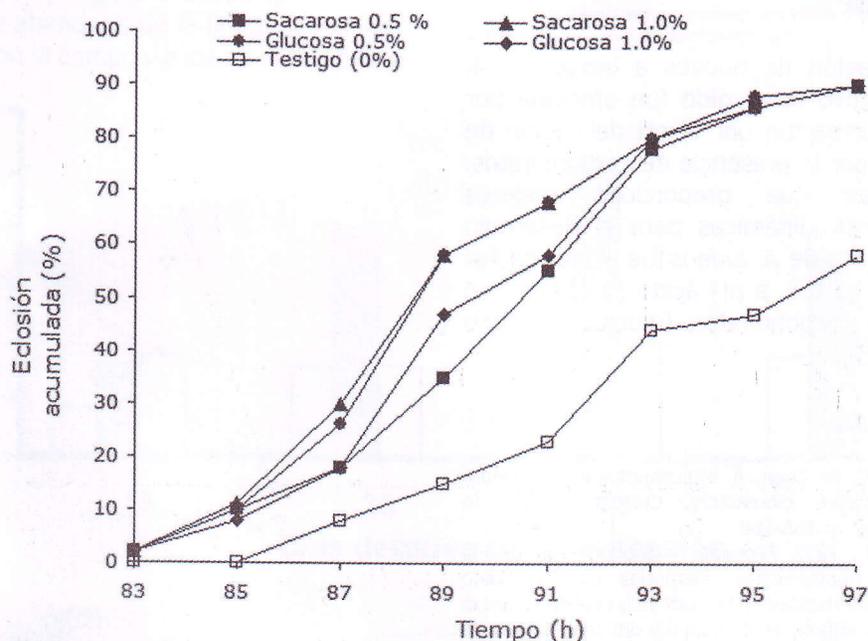


Figura 5. Cinética de eclosión de huevos de *A. ludens* incubados en soluciones con pH 3.3 y con diferentes concentraciones de carbohidratos. La incubación se realizó en biorreactor de columna con $h/d = 6.5$.

Efecto de los carbohidratos en la eclosión de huevos de *A. ludens*

En la Figura 5 se muestra la cinética de eclosión cuando los huevos de *A. ludens* se cultivan en presencia de diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa. En general, la presencia de carbohidratos mejoró el desarrollo de los embriones ya que la eclosión inició a tiempos más tempranos. Al igual que con la variable pH se observó que el patrón de eclosión no se modificó, ya que los comportamientos fueron similares, sin embargo, la presencia de glucosa, a concentración de 0.5%, o sacarosa, a concentración de 1%, mejoró, sustancialmente, el inicio de la eclosión. Por otro lado, a lo largo del proceso de incubación la concentración de carbohidratos permaneció sin cambios. Bajo estas condiciones, la productividad de los diferentes tratamientos se incrementó (Cuadro 2). Con el empleo de carbohidratos el inicio de la eclosión se redujo en 12 h. La mejora en el inicio de la eclosión de los huevos de *A. ludens* pudo deberse al cambio de densidad del medio de incubación lo que mantiene por más tiempo en suspensión a los huevos de la mosca mejorando, posiblemente el proceso de transferencia de O₂ y de CO₂.

CONCLUSIÓN

La transformación de huevos a larvas de *A. ludens* en cultivo sumergido fue afectada por el tipo de biorreactor, por el pH del medio de incubación y por la presencia de carbohidratos. El biorreactor que proporcionó mejores condiciones hidrodinámicas para el desarrollo de los embriones de *A. ludens* fue el biorreactor de columna h/d 6.5, a pH ácido (3 ó 4) y con presencia de carbohidratos (glucosa 0.5% o sacarosa 1.0%).

REFERENCIAS

- Deshusses, M. A., W. Chen, A. Mulchandani and Y. Dunn. 1997. Innovative bioreactors. Current Opinion in Biotechnology. 8: 165-168.
- Henrández O., E. 1997. Filogenia y Zoogeografía de los Tephritidae Neotropicales. Memorias del XI Curso Regional sobre moscas de la fruta y su control en áreas grandes con énfasis en la Técnica del Insecto Estéril. Metapa de Domínguez, Chiapas, México. 39-48.
- Kaufur, E. S. 2005. Roll of population genetics in the sterile insect technique. In: Sterile insect technique: Principles and Practice in area-wide Integrated Pest Management. Dick V.A., J. Hendrichs and A. S. Robinson (eds). Springer, Netherlands. 389-406.
- Klassen, W. 2005. Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. In: Sterile insect technique: Principles and Practice in area-wide Integrated Pest Management. Dick V.A., J. Hendrichs and A. S. Robinson (eds). Springer, Netherlands. 39-68.
- Leyva, J. L., H. Browning y F. E. Gilstrap. 1991. Effect of host fruits species, size and colour on parasitation of *Anastrepha ludens* by *Diachasmimorpha longicaudata*. Entomological Society of America. 20(5): 1469-1474.
- Martínez-Pérez, J.M., R.E. Roveló, R. Aguilar, L. Adriano y M. Salvador. 1997. Producción de larvas de *Anastrepha ludens* (LOEW) en cultivo sumergido. Memorias del VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposium Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos. Mazatlán, Sinaloa, México. 405.
- Palomares, L., R.Z. Mendonça y O.T. Ramírez. 1997. Identificación de nutrimentos esenciales y condiciones de cultivo óptimas de células de insecto (Sf-9). Memorias del VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposium Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos. Mazatlán, Sinaloa, México. 78.
- Quintero, R. 1981. Ingeniería Bioquímica. 1ª. Edición. Editorial Alhambra. México, D.F. 15-19, 81-95.
- Rull, J.A., J. Reyes y W. Enkerlin. 1994. The Mexican National Fruit Fly Eradication Campaign: largest fruit fly complex in teh world. Forth International Symposium on fruit flies of economic importance. Sand Key, Florida.
- Silverton, R. E. and M. J. Anderson. 1961. Handbook of medical laboratory formulae. 1ª Edition. Editorial Butterworth & Co. Publishers LTD. Great Britain. 614.
- Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose-oxidase with alternative oxigen acceptor. Ann. Clin. Biochem. 6:24.