

ENCAPSULAMIENTO DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS EN MATERIALES BASADOS EN BIOPOLÍMEROS Y SU EFECTO SOBRE *Galleria mellonella*

Delia Bogantes*, Lorena Flores**, Erick Castellón***, Lidieth Uribe¹*

Palabras clave: *Heterorhabditis*; encapsulado; alginato de calcio; nematodos entomopatógenos.

Keywords: *Heterorhabditis*; encapsulation; calcium alginate; entomopathogenic nematodes.

Recibido: 24/11/17

Aceptado: 21/03/18

RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos (NEP) del género *Heterorhabditis* son utilizados para el control biológico de insectos plaga, la mayoría de las aplicaciones de estos organismos involucran el uso de abundante agua y no cuentan con protección contra condiciones ambientales desfavorables, por lo que existe la necesidad del desarrollo de formulaciones que faciliten la aplicación y extiendan la vida útil de estos organismos. La técnica de encapsular nematodos en hidrogeles o cápsulas es una alternativa prometedora para aumentar la viabilidad de *Heterorhabditis* sp. Se evaluaron 23 formulaciones a partir de los biopolímeros pectina, carboximetilcelulosa (CMC), alginato y gelatina, 15 de las cuales formaron cápsulas, se eligieron los hidrogeles preparados a partir de alginato al 2,0%, pectina al 4,2% y CMC al 2,2%, ya que presentaron las mejores condiciones respecto a forma, capacidad de retener nematodos y dureza de las cápsulas. De estos materiales se escogió el alginato por sus características de viabilidad de los nematodos y ausencia de contaminación. Se evaluó la retención y viabilidad de los juveniles infectivos (JI) a concentraciones de alginato al 2%, 3% y 4%, en el que las cápsulas de alginato al 2% presentaron

ABSTRACT

Encapsulation of entomopathogenic nematodes in polymer-based materials and their effect on *Galleria mellonella*. The entomopathogenic nematodes (EPN) *Heterorhabditis* are used for the biological control of insect pests, most of the applications of these organisms involve the use of abundant water and do not involve protection against unfavorable environmental conditions; for this reason, there is a need to develop formulations that facilitate the application and extend the life span of these organisms. Encapsulating nematodes in hydrogels or capsules is a promising alternative to increase the viability of *Heterorhabditis* sp. Twenty-three different formulations from biopolymers pectin, carboxymethylcellulose (CMC), alginate and gelatin were evaluated; 15 of these formed capsules. Hydrogels prepared from 2.0% alginate, 4.2% pectin and 2.2% CMC were chosen since they presented the best conditions regarding shape, ability to retain nematodes and consistency. Alginate was chosen from these materials because of its characteristics of viability of the nematodes and absence of contamination. The retention and viability of infective juveniles (JI) were evaluated at 2%, 3% and 4% alginate concentrations, with

1 Autora para correspondencia. Correo electrónico: lidieth.uribe@ucr.ac.cr

* Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones Agronómicas, Costa Rica.

** Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Protección de Cultivos, Costa Rica.

*** Universidad de Costa Rica, Escuela de Química, Costa Rica.

los mejores resultados. Cuando se determinó la capacidad de estas cápsulas para infectar larvas de *Galleria mellonella* se encontró que un aumento en la concentración (JI.ml⁻¹) y la dosis (Cápsulas.larva⁻¹) causó un aumento en el porcentaje de infección. Finalmente, se determinó que la DL50% correspondió a 2,9 cápsulas.larva⁻¹.

alginate capsules at 2% showing the best results. When the ability of these capsules to infect larvae of *Galleria mellonella* was determined, it was found that an increase in the concentration (JI.ml⁻¹) and the dose (Capsules.larva⁻¹) caused an increase in the percentage of infection. Finally, it was determined that the LD50% corresponded to 2.9 capsules.larva⁻¹.

INTRODUCCIÓN

El uso excesivo de plaguicidas en la agricultura causa serios daños en los suelos, aguas y seres vivos, por lo que es necesario el desarrollo de alternativas ambientalmente amigables para el control de plagas. Los nematodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema* pueden ser utilizados eficazmente como agentes de control biológico, ya que son parásitos obligados de larvas de insectos plaga de gran importancia económica. Los NEP establecen una relación mutualista con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, las cuales requieren de este hospedero para obtener protección y lograr diseminarse de un insecto a otro (Georgis 1992, Boemare 2002, Shapiro *et al.* 2006, Vashisth *et al.* 2013).

El complejo nematodo bacteria elimina los hospederos rápidamente, no causa daños a plantas y vertebrados, ni efectos negativos sobre el medio ambiente. Pueden reproducirse in vivo e in vitro y su aplicación es sencilla mediante el uso de equipo convencional. Estos organismos no se ven afectados seriamente por plaguicidas químicos y tienen un amplio rango de hospederos, cuyas fases larvarias viven en el suelo, como lepidópteros, dípteros y coleópteros, el desarrollo de resistencia es poco probable, debido a la coevolución existente entre el nematodo y el insecto plaga (Gardner *et al.* 1994, Burnell y Stock 2000, Ehlers 2001, Hazir *et al.* 2004, Gulcu *et al.* 2014, Amador *et al.* 2015, Rumbos y Athanassiou 2017).

Los NEP poseen un ciclo de vida complejo en el cual sólo un estadio denominado juvenil infectivo (JI) habita fuera del insecto, está bien adaptado para la sobrevivencia en el ambiente del suelo, no se alimenta y presenta la capacidad de localizar e infectar a su presa. El JI se forma después de que el nematodo se reproduce dentro de la larva y como respuesta a la disminución de fuentes de alimento, así como a condiciones adversas en el entorno (Stock *et al.* 1999, Nguyen y Hunt 2007). Jacas y Caballero (2007) observaron que una vez en el suelo, los nematodos de *H. bacteriophora* se movilizan en capas profundas que van de 8 a 35 cm. Además, pueden estar inmóviles y atacar en emboscada al posible hospedero o mantenerse siempre en movimiento.

Los NEP son aplicados a nivel de campo mediante el uso de pulverizadores presurizados, electrostáticos o aéreos, nebulizadores y el sistema de riego, estas formas de aplicación generan pérdidas de estos individuos (Ngoma *et al.* 2016). Además, cuando se aplican de forma inundativa o por el sistema de irrigación, se utilizan concentraciones de 2,5 mil millones de JI.Ha⁻¹ para poder contrarrestar los efectos de los factores bióticos y abióticos y hacer un buen control, por lo cual el requerimiento de agua para aplicar estos organismos es muy alto (Gowen y Hague 2002).

En Costa Rica se ha utilizado con éxito la cepa *Heterorhabditis* sp. en el control de *P. elenans* (Rodríguez *et al.* 2009) y *Cosmopolites sordidus* (Amador *et al.* 2015) a nivel de invernadero, sin embargo, para su uso a nivel de

campo, el nematodo debe enfrentarse a condiciones ambientales tales como radiación, humedad y temperatura, que pueden disminuir su eficacia como controlador biológico, por lo que el uso de formulaciones que los protejan de estas condiciones adversas puede mejorar su aplicación y sobrevivencia en el campo (Bilgrami y Gaugler 2007, Goud *et al.* 2010, Hegazi *et al.* 2012, Shapiro-Ilan *et al.* 2012).

Generalmente las formulaciones de NEP están compuestas por un ingrediente activo (JI), un acarreador (sólidos, líquidos, geles y cadáveres de insectos infectados) y aditivos (absorbentes, adsorbentes, emulsionantes, surfactantes, espesantes, humectantes, dispersantes, antimicrobianos y protectores contra rayos UV) (Grewal 2002, Cruz-Martínez *et al.* 2017). Asimismo, los JI pueden aplicarse activos como en las formulaciones acuosas y en los cadáveres de insectos infectados, parcialmente deshidratados en un material como arcilla o vermiculita, o protegidos en un hidrogel mediante la técnica de encapsulamiento. Esta metodología se utiliza para resguardar sustancias de condiciones ambientales desfavorables y hacerlas más persistentes al reclutar el encapsulado en una matriz polimérica (Madziva *et al.* 2005, Hussein y Abdel-Aty 2012, Cruz Martínez *et al.* 2017). La encapsulación facilita labores como almacenamiento, transporte y aplicación de estos microorganismos, protege al nematodo de condiciones ambientales adversas, permite realizar aplicaciones localizadas, reducir el consumo de agua y extender su vida útil (Kaya y Nelsen 1985, San Blas 2013, Hiltbold 2015).

Entre los materiales utilizados para el encapsulamiento de NEP se encuentra el alginato, biopolímero que se extrae a partir de algas como *Lessonia nigrescens* y *L. trabeculata* (Cabané *et al.* 2011). Las matrices de alginato encapsulan las células vivas, las cuales forman pequeñas esferas al gotear la mezcla de alginato de sodio y células sobre una solución con cationes multivalentes como Ca^{2+} (Mujica 2006). Su éxito para encapsular NEP se debe a que al inmovilizar a estos controladores, les prolonga la vida y a que la matriz de alginato los protege de condiciones

ambientales adversas (Goud *et al.* 2010, Rumbos y Athanassiou 2017). La carboximetilcelulosa (CMC) o goma de celulosa es un producto con gran potencial para ser utilizado con organismos biológicos, es un biopolímero lineal de unidades de glucosa anhidra- β , cada glucosa contiene 3 grupos hidroxilo, los cuales se acomplejan con iones trivalentes (Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+}) para formar geles (Reyes *et al.* 2011, Mussinovitch y Hirashima 2013). Este biopolímero se obtiene al introducir grupos carboximetilo (CH_2COOH) en la estructura de la celulosa y posterior neutralización de los grupos carboxilo con NaOH , lo que la hace soluble en agua (Reyes *et al.* 2011). Una de sus principales características es que tiene la capacidad de retener agua (Mussinovitch y Hirashima 2013).

La pectina es un biopolímero que se extrae de la cáscara de cítricos y de la pulpa de manzana; tiene la capacidad de gelificarse cuando se mezcla con cationes divalentes como el calcio (Helgerud *et al.* 2010). Es una macromolécula biodegradable que se utiliza para encapsular productos farmacéuticos y biológicos en microcapsulas de hidrogel (Crouse *et al.* 2015). Está formada por ácido α -D-galacturónico unido con enlaces α -1,4-glucosídico, el ácido galacturónico tiene algunos grupos carboxílicos metilados, y pueden presentar cadenas laterales de arabinosa, galactano, arabinogalactano, glucosa, manosa, y xilosa, lo cual depende del material vegetal utilizado (Costas *et al.* 2008). Por su parte, la gelatina es un biopolímero natural de origen animal formado por proteínas y utilizado en la formulación de alimentos; esta ha sido utilizada para la encapsulación de probióticos (Kumar y Harjinder 2007).

Se pueden preparar cápsulas de centro gelificado o centro líquido; en ambos casos, la superficie de la gota se solidifica y forma una estructura tridimensional por el entrecruzamiento de las cadenas del polímero, debido a enlaces coordinados entre el catión y los grupos carboxílicos de dichas cadenas. Cuando se gotea la disolución del biopolímero sobre la del catión, la mayor movilidad de los cationes con

respecto al biopolímero hace que los iones se difundan de afuera hacia el centro de las cápsulas, lo cual forma una cápsula con el centro solidificado. Mientras que al gotear la disolución del catión sobre la del polímero, los cationes difunden desde el centro de las cápsulas hacia afuera y forman cápsulas con centro líquido (Hiltbold 2015).

Hiltbold (2015) indica que con ambos procedimientos al utilizar alginato y cloruro de calcio se puede encapsular NEP para aplicaciones en el campo. La presente investigación busca evaluar el uso de diferentes biopolímeros para el encapsulamiento del nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el nematodo *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas, así como larvas de *Galleria mellonella* para el cultivo de los nematodos. Los juveniles infectivos se almacenaron en botellas de vidrio con solución Ringer por un período no mayor a 30 días (Rodríguez *et al.* 2009, Amador *et al.* 2015).

Selección de materiales de encapsulamiento

Se evaluó la formación de cápsulas mediante la combinación de 4 biopolímeros: Pectina (sal de sodio), Sigma Aldrich; alginato de sodio, Sigma Aldrich; carboximetilcelulosa (CMC, sal de sodio), BDH y “gelatina pura sin sabor marca Diet.X”. Se utilizaron las soluciones catiónicas cloruro de calcio al 4,4%, cloruro de hierro (III) al 5,5%, clorhidruro de poli(alilamina) (PAA-HCl) y HCl 0,1 mol.l⁻¹.

La elaboración de las cápsulas se realizó al mezclar 5 ml de una suspensión de los nematodos con 5 ml de las diferentes concentraciones 2X (m/v) de los polímeros. La mezcla se goteó sobre la solución de cationes (Figura 1) con el fin de conformar las siguientes preparaciones: Pectina 1,2%-Ca, Pectina 2,7%-Ca, Pectina 4,2%-Ca, Pectina 4,8%-Ca, Pectina 5,5%-Ca, Pectina 6,0%-Ca, Pectina 1,2%-Fe, Alginato 1,2%-Ca, Alginato 2,0%-Ca, Alginato 2,4%-Ca, Alginato 3,0%-Ca, Alginato-Fe 1,2%, Alginato-1,2%MgCl₂, CMC 1,1%-Fe, CMC 1,7%-Fe, CMC 2,2%-Fe, CMC1,1%-Ca, CMC-PAAHCl 1,1%-Ca-Fe, Gelatina 1,2%-HCl, Gelatina 1,8%-HCl, Gelatina 2,2%-HCl. Además, se evaluó la formación de cápsulas inversas al gotear la solución catiónica sobre el biopolímero: Ca-Alginato 1,2%, PAAHCl-Ca-Fe-CMC 1,1%.

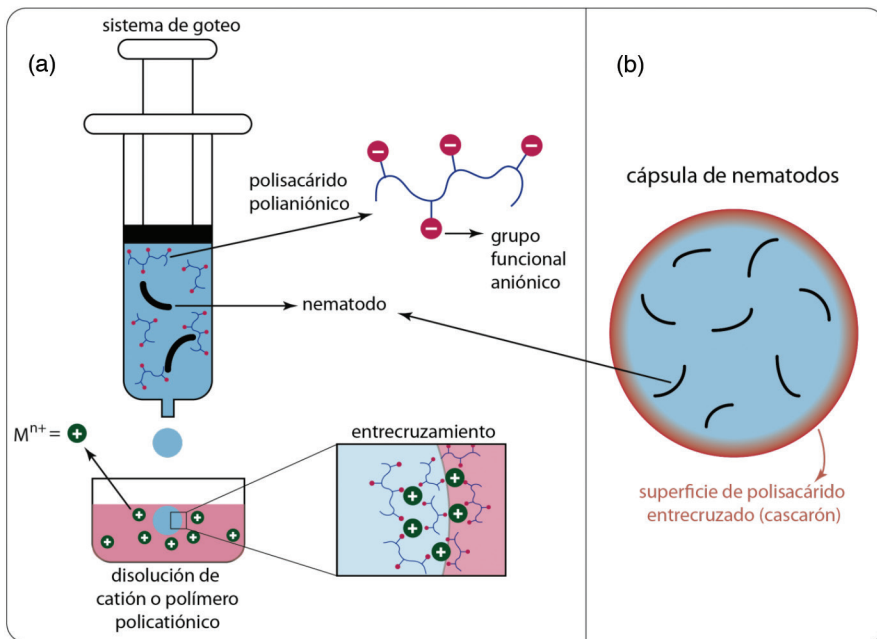


Fig. 1. Encapsulamiento de nematodos entomopatógenos: a: Juveniles infectivos suspendidos en el polímero polianiónico y goteados sobre la disolución de catión o polímero policatiónico, b: Representación de una cápsula con nematodos basada en biopolímeros polianiónicos gelificados.

Las sales de sodio de los biopolímeros alginato, pectina y CMC producen disoluciones acuosas con pH ligeramente superiores al valor pH neutro (7.00-7.50), dado que los grupos carboxílicos se comportan como ácidos débiles. Con estos valores de pH, la forma predominante de los biopolímeros es la polianiónica, en donde la mayor parte de los grupos carboxílicos se encuentran desprotonados (con carga negativa) y, por lo tanto, son susceptibles de entrecruzar las cadenas poliméricas mediante coordinación de estos grupos funcionales con cationes.

Para cada combinación biopolímero-solución catiónica se evaluó si se formaban cápsulas, la forma de las mismas y si retenían nematodos. Se eligió para los ensayos posteriores una formulación de cada uno de los materiales que fueron capaces de formar cápsulas a fin de evaluar la viabilidad de los nematodos en las mismas.

Evaluación de tres materiales de encapsulamiento

Se prepararon cápsulas de pectina, alginato y CMC, y se determinó, al seguir el protocolo utilizado por Solórzano (2014), la dureza de las cápsulas al utilizar un texturómetro digital (TAX Plus Texture Analyzer, Stable Micro Systems LTD, Godalming, Reino Unido). Se evaluaron 30 cápsulas de cada material, se utilizó una punta cilíndrica de 3 mm de diámetro que penetró a 2 mm de profundidad en cada cápsula y a una velocidad de $1,5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, la fuerza de ruptura expresada en N mm^{-1} se obtuvo a partir del cálculo del área bajo la curva, la cual inició desde la penetración, hasta alcanzar el pico máximo de ruptura.

La viabilidad de los nematodos encapsulados se evaluó al colocarse 10 cápsulas de cada material en placas Petri de 5 cm de diámetro,

se les añadió 2 ml de citrato de sodio 0,5M + 0,1% Tritón x-100 (Goud *et al.* 2010). Para optimizar la elaboración de las cápsulas de pectina se utilizó el biopolímero autoclavado en polvo y en solución. Con respecto al CMC, se evaluó el uso de FeCl_3 al 2,8% y AlCl_3 en lugar de FeCl_3 al 5,0%, además, se trató de incrementar el pH de las soluciones mediante la adición de NaOH. Para los ensayos posteriores se eligió el material que presentó las mejores condiciones de formación de cápsulas y viabilidad de nematodos.

Evaluación de cápsulas preparadas con diferentes concentraciones de alginato

Determinación de la dureza de las cápsulas

Se prepararon cápsulas de alginato al 2, 3 y 4%, se adicionó 5 ml de una suspensión de nematodos de una concentración de 500 JI.ml^{-1} , a 5 ml de cada una de 3 soluciones acuosas de alginato (4%, 6% y 8%), para una concentración final de 250 JI.ml^{-1} . Las suspensiones fueron goteadas sobre una solución de cloruro de calcio al 4,4%. Las cápsulas se almacenaron en agua a temperatura ambiente durante 24 horas. Se determinó la dureza de las cápsulas al utilizar un texturómetro digital en la forma previamente descrita.

Determinación de la cantidad de JI presentes en cápsulas obtenidas a partir de diferentes concentraciones de nematodos

Se prepararon cápsulas a partir de suspensiones nematodo-alginato correspondientes a 250, 500 y 1000 JI.ml^{-1} , posteriormente, las cápsulas se disolvieron con citrato y se realizó el conteo y observación de los nematodos a fin de determinar la cantidad presente en las mismas.

Liberación y sobrevivencia de nematodos encapsulados

Se realizaron 2 experimentos para determinar la capacidad de cápsulas de diferentes concentraciones de alginato para retener los nematodos viables al utilizar una suspensión

de 250 JI.ml^{-1} . En el primer ensayo se evaluó la liberación de los nematodos a partir de las cápsulas, en un tubo de eppendorf de 2 ml se colocaron 5 cápsulas y 1 ml de agua desionizada. Se utilizó 5 repeticiones por tratamiento. Se realizaron evaluaciones a las 24 horas y cada 7 días hasta la semana 5, los tubos se incubaron a 25°C , después de 24 horas de transferidos se tomó una alícuota de $100 \mu\text{L}$ y se determinó, mediante lectura con un estereoscopio, el número de JI vivos y muertos presentes en el agua. Se utilizó un diseño irrestricto en un arreglo factorial. Se calculó el área bajo la curva (ABC) y se analizó a través del análisis de varianza (ANOVA) y LSD fisher, con la utilización del programa Infostat versión 2016. El nivel de significancia se definió al 5%.

En el segundo ensayo se determinó la sobrevivencia de los nematodos en cápsulas con diferentes concentraciones de alginato. De cada concentración se colocó 5 cápsulas en un tubo eppendorf de 2 ml, lo cual constituyó la unidad experimental. Para determinar el número de JI presentes en las cápsulas se modificó la metodología de Goud *et al.* (2010) de la siguiente manera: las cápsulas se lavaron con agua destilada, se colocaron en un tubo cónico de 15 ml y se les añadió 0,5 ml de citrato, se agitó en el vortex por 15 segundos, se dejaron reposar por 1 hora, transcurrido este tiempo se agitó en el vortex por 30 segundos y se dejó reposar por una hora, finalmente, se agitó manualmente y se le agregó 0,5 ml de agua desionizada para que la solución resultante fuera más clara, y se realizó el conteo y observación de los nematodos.

Se utilizó un diseño irrestricto en un arreglo factorial con 5 repeticiones por tratamiento por tiempo. Se realizaron 5 evaluaciones una vez por semana. Para analizar los datos obtenidos se calculó el área bajo la curva con el fin de hacer comparaciones entre tratamientos, los datos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y LSD Fisher, se utilizó el programa Infostat. El nivel de significancia se definió al 5%.

Evaluación de la infectividad de los nematodos encapsulados

Evaluación de la infectividad de las cápsulas de nematodos a diferentes concentraciones y dosis

Se realizaron 2 ensayos en los que se estudió el efecto de diferentes concentraciones de nematodos y dosis de cápsulas sobre *G. mellonella*, en un primer ensayo se evaluaron 3 dosis de cápsulas preparadas con una concentración de 250 JI.ml⁻¹ sobre el porcentaje de infección de *G. mellonella*. La unidad experimental consistió en 5 larvas colocadas en un plato petri de 8,5 cm de diámetro con doble papel filtro, a las que se aplicaron 3 cantidades de cápsulas; 2, 10 y 20 cápsulas.larva⁻¹, se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento. Los platos se incubaron a 25°C durante 15 días. En un segundo experimento se evaluó el efecto de 3 dosis de cápsulas (2, 5 y 10 cápsulas.larvas⁻¹), a 2 concentraciones 500 y 1000 JI.ml⁻¹ al seguir la metodología descrita anteriormente. El porcentaje de larvas muertas (%) se determinó a los días 2, 8, 10 y 15. Los datos se analizaron mediante ANOVA y LSD Fisher utilizando el programa Infostat.

Determinación de la DL50

Para determinar la DL50 se utilizó la concentración de nematodos que presentó los

mejores resultados en los ensayos previos. Se evaluaron las siguientes dosis 0, 1, 2, 3, 4 y 5 cápsulas.larva⁻¹. Para asegurar que los nematodos estaban viables se implementó un blanco que consistió de 5 larvas por plato petri al que se adicionó 1 ml de una suspensión de 200 JI.ml⁻¹, se utilizaron 6 repeticiones por tratamiento. Los platos se incubaron a 25°C durante 6 días. Se realizó la evaluación del porcentaje de infección al sexto día después de inoculación. Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA y LSD Fisher para determinar el porcentaje de infección al día 6 y una regresión de Probit para cuantificar la dosis letal (DL50%) o dosis requerida para infectar al 50% de las larvas. Los análisis se hicieron a través del uso de Infostat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de materiales de encapsulamiento

Se logró formar cápsulas a partir de pectina, alginato y CMC, para un total de 15 combinaciones biopolímero-cación que difirieron en la forma y dureza de las mismas, y que fueron capaces de retener los nematodos (Cuadro 1). No se obtuvieron *cápsulas con la gelatina*, ni con las formulaciones inversas.

Cuadro 1. Determinación de la forma, consistencia y retención de JI según los materiales utilizados para encapsular.

Formulación	Características	JI
1. Pectina 1,2%-Ca	Irregular, muy suaves	+
2. Pectina 2,7%-Ca	Irregular, suave	+
3. Pectina 4,2%-Ca	Regular, dura	+
4. Pectina 4,8%-Ca	Regular, dura	+
5. Pectina 5,5%-Ca	Regular, dura	+
6. Pectina 6,0%-Ca	Deformes, muy dura	+
7. Pectina 1,2%-Fe	Material amarillo	-
8. Alginato 1,2%-Ca	Regular, suave	+
9. Alginato 2,0%-Ca	Regular, dura	+
10. Alginato 2,4%-Ca	Regular, dura	+
11. Alginato 3,0%-Ca	Regular, dura	+
12. Alginato 4,0%-Ca	Regular, dura	+
13. Alginato-Fe 1,2%	Cápsulas aglomeradas	+
14. Alginato-MgCl ₂ 1,2%	-	-
15. CMC 1,1%-Fe	Regular, suave	+
16. CMC 1,7%-Fe	Regular, dura	+
17. CMC 2,2%-Fe	Regular, dura	+
18. CMC 1,1%-Ca	-	-
19. CMC 1,1%-PAAHCl-Ca-Fe	Material amarillo	-
20. Gelatina-HCl 1,2%	-	-
21. Gelatina-HCl 1,8%	-	-
22. Gelatina-HCl 2,2%	-	-
23. Ca-Alginato 1,2%	-	-
24. PAAHCl-Ca-Fe-CMC 1,1%	-	-

En el caso de la pectina, se produjeron *cápsulas en todas las concentraciones evaluadas*, sin embargo, los hidrogeles al 1,2% fueron muy suaves, mientras que al 5,5% (Figura 2a) y 6% fueron deformes. Cuando se utilizó Fe³⁺ se formó un material amarillo y pegajoso, esto se debe probablemente a que la reticulación pectina-solución catiónica se realiza con más fuerza en soluciones catiónicas divalentes que trivalentes. Esto puede relacionarse con el fuerte carácter ácido de las

disoluciones acuosas de Fe³⁺, debido a la electrorestricción ejercida por el catión trivalente sobre las moléculas de agua de solvatación. Este carácter ácido puede promover la protonación de grupos carboxílicos en las cadenas de la pectina, lo cual disminuye la capacidad de coordinación de los grupos protonados con los cationes de hierro. En comparación, las disoluciones acuosas de Ca²⁺, son mucho menos ácidas que las de Fe³⁺, por lo que promueven menos la protonación de grupos

carboxílicos y preserva en mayor grado la capacidad de coordinación con cationes mediante fuertes interacciones electrostáticas carboxilato-calcio (del

tipo anión-catión). Según Das *et al.* (2011), para la generación de cápsulas redondas a partir de pectina es indispensable la presencia de iones de calcio.

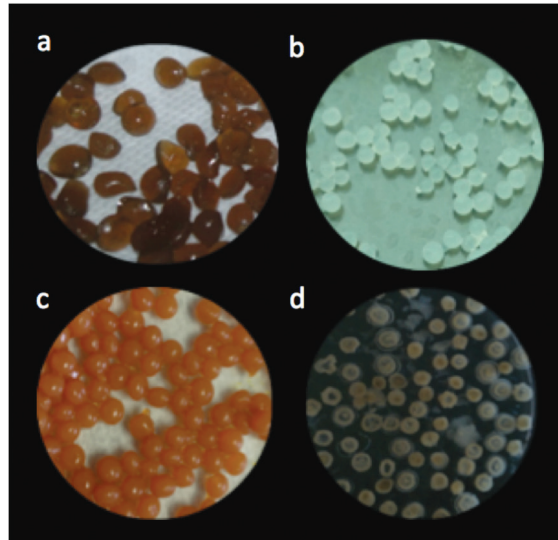


Fig. 2. Cápsulas de diferentes materiales: a: pectina 5,5%-Ca b: alginato 2,0%-Ca, c: CMC 2,2%-Fe, d: solución de pectina al 4,8% autoclavada.

Se obtuvo cápsulas en todas las combinaciones alginato- Ca^{2+} , las preparadas con alginato al 1,2% resultaron muy suaves, mientras que a mayor concentración de alginato aumentó la dureza y firmeza de los hidrogeles (Cuadro 1, Figura 2b). Por otro lado, el uso de Fe al 1,2% produjo cápsulas duras y aglomeradas, mientras que con el empleo de Mg no se logró fabricar cápsulas.

Cuando se utilizó CMC, se encontró que todas las suspensiones goteadas sobre Fe formaron cápsulas (Cuadro 1, Figura 2c) y que, al igual que con el alginato, la dureza de las mismas se incrementó con la concentración del compuesto, sin embargo, no se obtuvo hidrogeles al gotear CMC sobre Ca^{2+} y PAAHCl-Ca-Fe. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Davidson *et al.* (2013), quienes encapsularon fertilizante líquido al gotear CMC al 7% sobre una mezcla de soluciones de cloruro de hierro II, cloruro de

hierro III y cloruro de calcio, los autores determinaron que los iones de Fe^{3+} aumentan las fuerzas de entrecruzamiento y generan estructuras más fuertes en comparación con los iones de Ca^{2+} . Estos hallazgos tienen relación con los resultados obtenidos en este estudio, ya que la CMC empleada al 2,2% solo produjo cápsulas cuando se utilizó FeCl_3 . Esto puede deberse a la mayor presencia de grupos carboxílicos en el CMC, polímero derivado de celulosa, mediante carboxilación intensiva de grupos hidroxilos en cada unidad de glucosa (Kennedy *et al.* 1992), en relación con la pectina, por lo que la protonación inducida por las disoluciones ácidas de hierro (III) tiene un efecto menor en la disminución de la capacidad de entrecruzamiento por coordinación carboxilato-hierro. Así la mayor rigidez de las cápsulas de CMC-hierro (III) puede explicarse por la capacidad de coordinación del carboxilato (carga=-1)

con el hierro(III) (carga=+3), en proporciones de 3:1, al tener este catión una alta capacidad de entrecruzamiento de cadenas polianiónicas.

Se eligieron los hidrogeles de pectina 4,2%-Ca, alginato 2%-Ca y CMC 2,2%-Fe, ya que todas estas cápsulas contaban con forma regular, consistencia dura, facilidad de manipulación y lograron retener nematodos, características deseables para la manipulación del producto terminado.

Evaluación de tres materiales de encapsulamiento

Al medir la fuerza de ruptura de las cápsulas se puede determinar la protección mecánica del encapsulado, debida al grado de entrecruzamiento obtenido en las combinaciones polímero catión ensayadas, a mayor entrecruzamiento, mayor es la dureza de la cápsula, la resistencia que debe vencer el encapsulado para liberarse y el paso de nutrientes a través de los poros del complejo biopolímero-solución catiónica (Solórzano 2014).

Cuando se determinó el punto de ruptura de las cápsulas de pectina 4,2%-Ca, alginato 2%-Ca y CMC 2,2%-Fe, al utilizar un texturómetro digital, se observó que todas las cápsulas presentaron valores significativamente diferentes de resistencia ($p < 0,01$), al ser las más suaves las de CMC, con un valor de $0,081 \pm 0,015 \text{ N.mm}^{-1}$, seguidas por las de pectina con $0,479 \pm 0,120 \text{ N.mm}^{-1}$ y las de alginato con un valor de fuerza de ruptura de $1,149 \pm 0,168 \text{ N.mm}^{-1}$, lo que indica que los JI deben ejercer una mayor fuerza para romper las cápsulas de alginato y que se requiere una menor cantidad de este biopolímero que de los otros materiales para generar cápsulas de forma y consistencia adecuada para encapsular nematodos.

Entre los principales estudios que se deben de realizar para corroborar la calidad de las formulaciones está la evaluación de cambios físicos y químicos en el producto, la viabilidad de los nematodos y la presencia de contaminantes en

el material de almacenamiento (Grewal y Peters 2005). Con respecto a la viabilidad, las formulaciones a base de alginato y pectina presentaron nematodos vivos, mientras que los nematodos encapsulados en CMC se encontraron muertos.

Si bien la pectina presentó características adecuadas para la formación de cápsulas, estas mostraron contaminación con hongos. Se observó que las cápsulas al 2,7%, preparadas a partir de pectina seca autoclavada, fueron muy suaves e irregulares y mostraron contaminación 7 días más tarde, mientras que no se lograron hacer cápsulas a partir de la solución de pectina al 4,8% autoclavada (Figura 2d). Costas *et al.* (2008), indican que la pectina se extrae de diferentes vegetales, por lo que contiene azúcares como arabinosa, galactano, arabinogalactano, glucosa, manosa y xilosa que pueden ser utilizados por microorganismos. Según Peters (2014), los microorganismos contaminantes en las formulaciones de NEP afectan de manera negativa a los JI, por lo cual las sustancias utilizadas para hacer dichas formulaciones no deben promover el crecimiento de los mismos.

Con respecto a las cápsulas de CMC se determinó que los JI suspendidos en este biopolímero se encontraban viables y que fueron afectados cuando la suspensión se goteó sobre el cloruro de hierro, esto debido a la acidez de la solución de FeCl_3 al 5,5% con un $\text{pH} = 0,81$, resultado que contrasta con el obtenido para la solución de CaCl_2 al 4,4% utilizada para hacer las cápsulas de alginato-Ca ($\text{pH} = 7,12$), y al de la suspensión de nematodos ($\text{pH} = 8,12$). Cuando se disminuyó la concentración de FeCl_3 del 5,5% a 2,8%, el pH fue de 0,90, mientras que con la sustitución de la solución de FeCl_3 por AlCl_3 el pH fue de 2,7.

Asimismo, cuando se corrigió el pH de las soluciones de cloruro de aluminio y cloruro de hierro, se encontró que la adición de 10 ml de NaOH incrementó el pH a 1,4; en el caso de la solución de AlCl_3 al 5,2%, al agregar una mayor cantidad de NaOH la solución se tornó café oscura, mientras que el uso de 10 ml de NaOH aumentó el pH de la solución de FeCl_3 al 5,5% a

3,25, la adición de tan solo 1 ml causó la suspensión de partículas en la solución. Estos valores de pH se encuentran por debajo del rango de pH (4 a 8) indicado por Vashisth *et al.* 2013 para la sobrevivencia de los NEP, por lo que se descartó el uso de CMC. Cuando se formula un bioplaguicida es de vital importancia que el polímero sea compatible con los microorganismos que serán protegidos. Además, para mantener las características ambientales favorables para el bioplaguicida es fundamental que los otros componentes de la formulación, en nuestro caso el catión, sean también compatibles (Wenzel *et al.* 2017).

Debido a que el alginato goteado sobre CaCl_2 presentó las mejores características: pH adecuado, nematodos viables, ausencia de contaminación, se decidió trabajar con este biopolímero, cabe mencionar que el alginato ha sido utilizado con éxito para almacenar nematodos entomopatógenos por otros autores, quienes señalan que la ventaja que presenta esta formulación, es que es un material biodegradable y permite la liberación paulatina de estos microorganismos (Soler *et al.* 2003, Hiltbold 2015).

Evaluación de cápsulas preparadas con diferentes concentraciones de alginato

Determinación de la dureza de las cápsulas

La resistencia de las cápsulas a la ruptura se incrementó significativamente ($p < 0,01$) con la concentración del biopolímero, las cápsulas con la concentración más alta fueron las más duras, esto se debe a que al aumentar la concentración del polímero, se incrementa el entrecruzamiento y la red tridimensional formada adquiere una mayor resistencia mecánica, por lo que se requiere la aplicación de una mayor fuerza para romperlas ($4,2 \pm 0,5$) N.mm^{-1} . Las

cápsulas hechas con alginato al 3% necesitaron una fuerza de ($2,8 \pm 0,5$) N.mm^{-1} y las de alginato al 2% ($1,8 \pm 0,18$) N.mm^{-1} . Esto concuerda con lo reportado por Mandal *et al.* (2000), Saiprasad *et al.* (2003) y Singh *et al.* (2006), quienes encontraron al trabajar con semillas sintéticas de diferentes materiales vegetales, que al modificar la concentración de alginato cambió la dureza de las cápsulas y con ella la capacidad de emergencia o germinación de estas semillas, en el caso de los nematodos, la fuerza de ruptura se podría relacionar con la dificultad que pueden tener los JI para salir de las cápsulas.

Determinación de la cantidad de JI presentes en cápsulas obtenidas a partir de diferentes concentraciones de nematodos

Los resultados indican que al aumentar la concentración de la suspensión de JI, aumentó significativamente el número de nematodos por cápsula ($p < 0,00001$), así la concentración de 250 JI.ml^{-1} generó cápsulas con una cantidad de $40 \pm 3,2$ nematodos, con 500 JI.ml^{-1} se encontraron $101 \pm 4,3$ individuos por cápsula y para 1000 JI.ml^{-1} se obtuvieron $246 \pm 10,7$ JI por cápsula.

Liberación y sobrevivencia de los nematodos encapsulados

La mayoría de los nematodos permanecieron viables en las cápsulas en las diferentes concentraciones de hidrogel (Cuadro 2), que no afectaron la concentración del alginato y tampoco la sobrevivencia de esos nematodos. Se observó una alta variabilidad en el número de JI encapsulados, lo que se debe probablemente a que los JI se sedimentan rápidamente, a pesar de que la suspensión se agitó manualmente de manera constante antes de gotear el alginato para formar las cápsulas.

Cuadro 2. Número y área bajo la curva de nematodos encapsulados vivos y muertos en alginato al 2%, 3% y 4% después de 28 días de encapsulamiento.

Nematodos	Concentración	Vivos	ABC vivos	Muertos	ABC muertos
Encapsulados	2%	44±9*	33,8±3,1a	2±1	1,4±0,4a
	3%	48±9	37,8±2,6a	2±1	1,2±0,5a
	4%	39±8	29,6±1,8a	2±2	4,2±2,5a

Valores con letras desiguales en la misma columna son significativamente diferentes con 95% de confianza. LSD Fischer.

* Error estándar.

No se encontraron diferencias significativas en el área bajo la curva (ABC) de JI, encapsulados vivos entre cápsulas de diferente concentración (Cuadro 2). Se observó, además, un número muy bajo de nematodos encapsulados muertos, lo que indica que estos sobrevivieron al proceso de encapsulamiento y que el uso de este hidrogel es prometedor para aumentar la vida estante de los nematodos (Cuadro 2). Estos resultados indican que los nematodos permanecen encapsulados viables en un período de al menos 28 días. Al respecto, Hegazi *et al.* (2012) encontró que 2 cepas de *Heterorhabditis* sp. presentaron mayor sobrevivencia en alginato que en vermiculita. La sobrevivencia se mantuvo durante los primeros 21 días

y disminuyó a 24,5 y 35,48% después de 84 días. Debido a que la viabilidad varía entre cepas de nematodos, cada formulación debe ser evaluada.

Como se observa en el Cuadro 3, únicamente en las cápsulas al 2% se liberaron JI vivos y muertos. Con respecto al ABC de nematodos liberados vivos, las cápsulas al 2% presentaron un valor de 9,6%±2 que fue significativamente mayor que los tratamientos al 3% y 4% (Cuadro 3). En el caso del ABC de nematodos liberados muertos, se observa que el tratamiento al 2% tuvo un valor de 2,2%±1 y fue significativamente mayor que los tratamientos de 3% y 4%. Estos resultados indican que a menor concentración de alginato, mayor liberación de JI.

Cuadro 3. Número y área bajo la curva de nematodos liberados vivos y muertos en alginato al 2%, 3% y 4% después de 28 días de encapsulamiento.

Nematodos	Concentración	Vivos	ABC vivos	Muertos	ABC muertos
Liberados	2%	11±4*	9,6±2,0 b	3±2	2,2±1,0 b
	3%	0±0	0±0 a	0±0	0±0 a
	4%	0±0	0,6±0,6 a	0±0	0±0 a

Valores con letras desiguales en la misma columna son significativamente diferentes con 95% de confianza. LSD Fischer.

* Error Estandar.

Los JI no se alimentan, sino que metabolizan lípidos y carbohidratos almacenados, lo cual genera desechos gaseosos como dióxido de carbono, amoníaco y sulfuro de hidrógeno, así

como calor que debe ser disipado, todo esto se debe considerar al formular estos microorganismos (Peters 2014). A pesar de que las cápsulas de alginato son permeables (Cabané *et al.* 2011),

a mayor concentración las cápsulas son más duras, lo que puede reducir la permeabilidad y que los JI se vean intoxicados con sus propios materiales de desecho. Se eligió la concentración al 2% para los siguientes ensayos.

Evaluación de la infectividad de los nematodos encapsulados

Evaluación de la infectividad de las cápsulas de nematodos a diferentes concentraciones y dosis

Se determinó que las larvas de *G. mellonella* inoculadas con cápsulas preparadas con una concentración de 250 JI.ml⁻¹ (aprox. 40 JI.cápsula⁻¹), se infectaron a partir del día 2 (Figura 3), lo que indica que los nematodos fueron capaces de salir de las cápsulas e infectar las larvas (Figura 4a). Los tratamientos de 10

y 20 cápsulas no se diferenciaron significativamente entre sí y presentaron un incremento en el porcentaje de larvas infectadas desde los 2 días después de inoculación (ddi) hasta los 10 ddi. El tratamiento de 2 cápsulas.larva⁻¹ presentó mortalidad hasta el día 10 con 4%±4, la cual se mantuvo en ese nivel hasta el día 15. Los tratamientos 10 y 20 cápsulas.larva⁻¹ presentaron infección de 12%±8 y 4%±4 respectivamente al día 2, al octavo día se encontró un nivel de 72%±8 y 48%±15, los valores de infección fueron para estos mismos tratamientos de 76%±7,5 y 52%±13,5 para los días 10 y 15. Las larvas presentaron una coloración roja y no se descompusieron (Figura 4b), características típicas de la infección por *Heterorhabditis* (Rodríguez *et al.* 2009). Es importante destacar que la infección de las larvas ocurrió a pesar de la presencia de la seda e incluso de la formación de pupas de *G. mellonella* (Figura 4c).

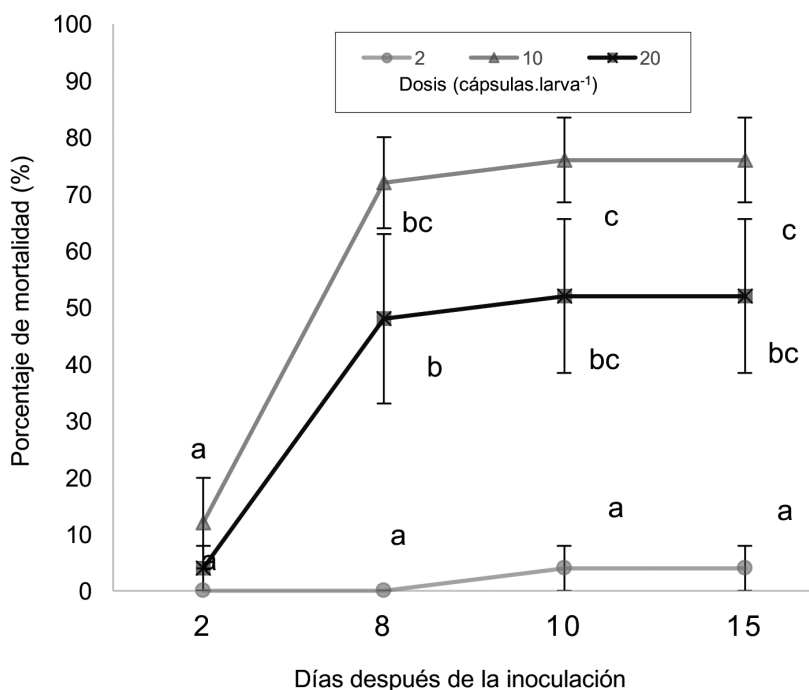


Fig. 3. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* infectadas en un periodo de 15 días con las dosis 2, 10 y 20 cápsulas.larva⁻¹, elaboradas a una concentración de 250 JI.ml⁻¹ (40 JI.cápsula⁻¹) (p=0,0086). Barras corresponden al error estándar.

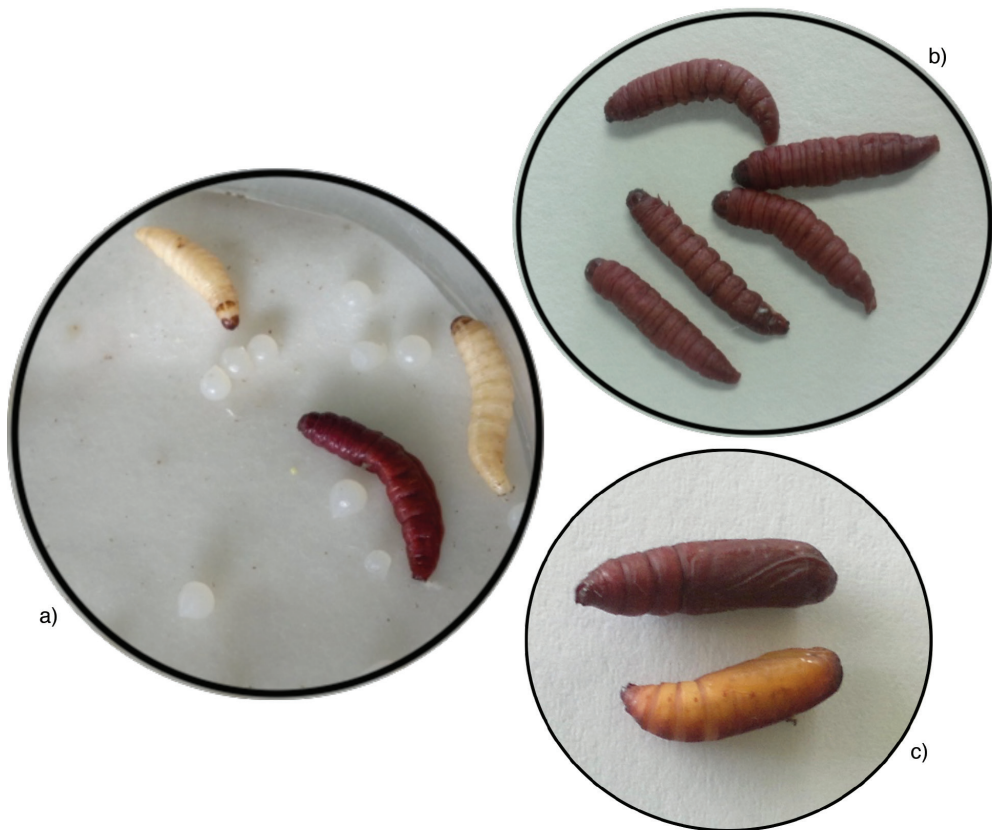


Fig. 4. Infección de *Galleria mellonella* utilizando cápsulas a: Cápsulas de 250 JI.ml⁻¹, con *Gallerias* vivas y muertas, b: Larvas infectadas a 2ddi, c: Pupas infectadas.

Se observó que las mayores dosis (10 y 20 cápsulas.larva⁻¹) tuvieron un mayor porcentaje de infección de *Galleria* que la dosis de 2 cápsulas.larva⁻¹, debido a que no hubo diferencias en el uso de 10 y 20 cápsulas, se recomienda la dosis de 10 cápsulas por su menor costo al utilizar menos cápsulas y nematodos.

En la Figura 5 se observa el porcentaje de larvas infectadas según la concentración de nematodos utilizada (500 y 1000 JI.ml⁻¹) y a 3 dosis diferentes (2, 5 y 10 cápsulas.larva⁻¹). La dosis de 2 cápsulas.larva⁻¹ de una

concentración de 500 JI.ml⁻¹ presentó el menor valor de infección (16%±7,5) sin diferenciarse de los otros tratamientos a la misma concentración. Con respecto a las cápsulas con una concentración de 1000 JI.ml⁻¹, se observó que el tratamiento de 2 cápsulas.larva⁻¹ tuvo el menor valor de infección de 44%±16, sin diferenciarse de los tratamientos con la misma concentración. Mientras que el tratamiento de 10 cápsulas.larva⁻¹ presentó un valor de 72%±15, significativamente mayor que todas las dosis de la concentración de 500 JI.ml⁻¹.

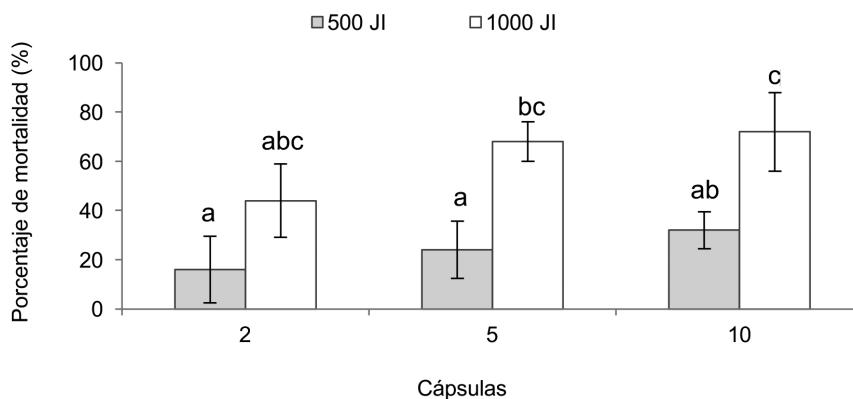


Fig. 5. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Galleria mellonella* a los 15 días después de inoculación con dosis de 2, 5 y 10 cápsulas.larva⁻¹, elaboradas a concentraciones de 500 y 1000 JI.ml⁻¹ (101 y 246 JI.cápsula⁻¹). Barras corresponden al error estándar.

Al parecer, la concentración de JI en las cápsulas tiene efecto sobre el porcentaje de infección, así, a mayor cantidad de individuos por cápsula mayor porcentaje de mortalidad de *G. mellonella*.

Las larvas infectadas presentaron una coloración rojiza desde los 2 ddi (Figura 4b) a los 10 ddi, se observaron hembras en el interior de las larvas disectadas, a los 15 ddi las *Gallerias* de color café oscuro mostraron juveniles emergiendo.

Determinación de la DL50

En la Figura 6 se observó un aumento en el porcentaje de mortalidad conforme se

incrementó la dosis de cápsulas por larva. La dosis de 0 y 1 cápsulas.larva⁻¹ presentaron un porcentaje de mortalidad de 0% y 13%±7, respectivamente, aspecto que expone una significación estadística menor que los demás tratamientos. A su vez, las dosis de 2, 3 y 4 cápsulas.larva⁻¹ expusieron resultados iguales y tuvieron valores de mortalidad de 47%±10, 53%±8 y 63%±10 para las dosis señaladas. Las aplicaciones correspondientes a 5 cápsulas.larva⁻¹ presentaron el mayor porcentaje de infección 87%±10, por lo que se diferenció porcentualmente de forma importante de los demás tratamientos, excepto de la dosis de 4 cápsulas.

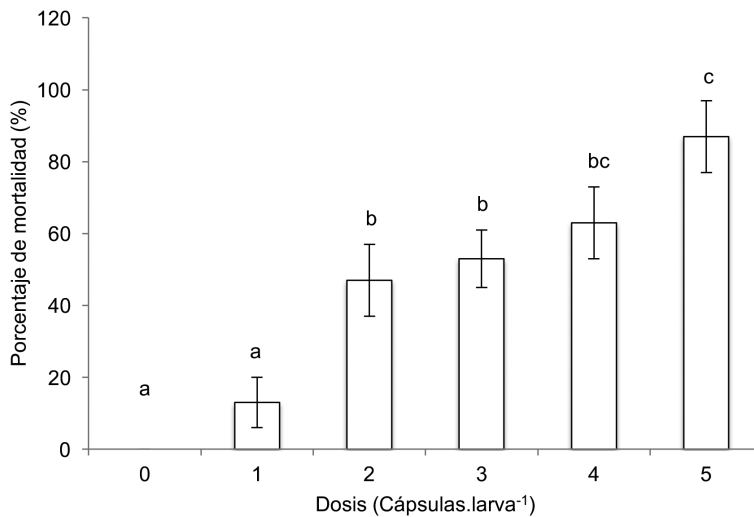


Fig. 6. Porcentaje de larvas de *Galleria mellonella* infectadas al día 6 según dosis de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 cápsulas a 1000 JI.ml⁻¹. Barras corresponden al error estándar.

En la Figura 7 se presenta el análisis de Probit, con el que se determinó que la dosis requerida para infectar al 50% de la población de larvas de *G. mellonella* (DL50) es de $14,45 \pm 0,37$ para un 95% de confianza en las

condiciones en que se efectuó el ensayo, lo que corresponde a 2,9 cápsulas.larva⁻¹. Asumiendo que cada cápsula tiene aproximadamente 246 JI.cápsula⁻¹ este valor corresponde a 713 JI.larva⁻¹.

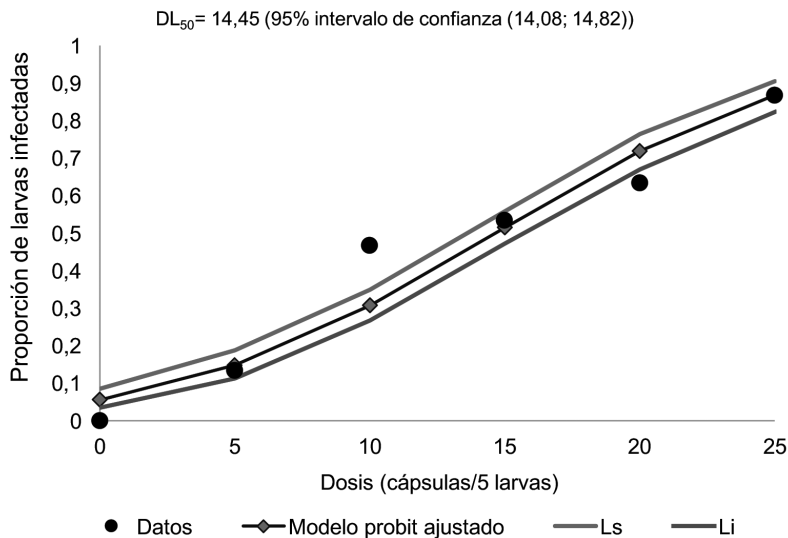


Fig. 7. Proporción de *G. mellonella* infectadas a 5, 10, 15, 20, y 25 cápsulas a 1000 JI.ml⁻¹ (246 JI.cápsula⁻¹); modelo probit ajustado y límite superior e inferior para un intervalo de confianza del 95%. Para PI= 0,5, $x = 14,45$ DL50.

Por su parte, Tofangsazi *et al.* (2014) reportan que la DL50 de *Heterorhabditis indica*, *H. bacteriophora* y *H. megidis* en suspensión para el control de larvas pequeñas de *Herpetogramma phaeopteralis* fue de 387, 270 y 554 (JI.ml⁻¹) por larva. Mahmoud (2014) reportaron que la DL50 de *H. bacteriophora* sobre larvas de los olivos *Palpita unionalis* a 25°C fue de 38,2 (30,9-47,2) JI.larva⁻¹.

La DL₅₀ encontrada en este ensayo para la cepa *Heterorhabditis* sp. CIA-NE07 fue más alta que la DL50 de 475 JI.larva⁻¹ a los 8ddi, observada cuando esta cepa fue utilizada en suspensión por Rodríguez *et al.* (2009) para infectar larvas de L2 de *P. elenans* en vasos plásticos con 120 g de suelo autoclavado y que la DL50 de 52 JI.larva⁻¹ a 1 ddi encontrada por Amador *et al.* (2015) para infectar larvas L5 de *C. sordidus* en placas Petri. Cabe señalar que a diferencia de estos ensayos los nematodos encapsulados son liberados lentamente, por lo que la infección de larvas también se da de manera gradual, a diferencia de la aplicación directa de suspensiones de nematodos, en donde todos están disponibles al mismo tiempo y que la infección varía con el hospedero utilizado.

Para que se dé un “reciclaje” de nematodos, o sea, que los nematodos aplicados en un inicio continúen multiplicándose y generando nuevos individuos, se requiere que los hospederos estén siempre presentes en el campo, que sean susceptibles a la infección por los NEP y que las condiciones ambientales propicien la vida de ambos organismos, por ello, para mantener un buen control, se hace necesario realizar aplicaciones constantes (Yul *et al.* 2011). El uso de nematodos encapsulados permitiría su permanencia por un tiempo mayor en el campo, lo que aumentaría la probabilidad de que el nematodo encuentre el insecto hospedero. El uso del agua es una limitante importante en los cultivos, el desarrollo de formulaciones que puedan aplicarse con volúmenes reducidos de agua es de gran importancia para el sector agrícola. Además, el método de encapsulamiento de los NEP puede llegar a reducir el efecto deletéreo del ambiente

sobre estos organismos y hacer de esta forma de control biológico un sistema más eficiente.

Es importante evaluar el uso de la formulación desarrollada en este trabajo en condiciones de invernadero y campo con diferentes insectos plaga.

AGRADECIMIENTOS

La investigación fue financiada por los proyectos VI-733-B6-087 y VI 733-A1-821. Se agradece al Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica por facilitar el uso del texturómetro.

LITERATURA CITADA

- Amador, M; Molina, D; Guillen, C; Parajeles, E; Jiménez, K; Uribe, L. 2015. Utilización del nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis atacamensis* CIA-NE07 en el control del picudo del banano *Cosmopolites sordidus* en condiciones in vitro. *Agronomía Costarricense* 39(3):47-60.
- Bilgrami, A; Gaugler, R. 2007. Effects of various stress factors on heat tolerance by *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *Nematology* 9(2):161-167.
- Boemare, N. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In Gaugler, R (ed.). *Entomopathogenic nematology*. NJ., USA. CABI. p. 35-56.
- Burnell, A; Stock, P. 2000. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbiont- lethal pathogens of insects. *Nematology* 2(1):31-42.
- Cabané, P; Alvo, A; Neira, A; Caviedes, P; Gace, P. 2011. Microencapsulación de células y tejido para terapia celular. *Revista chilena de cirugía* 63(1):110-113.
- Costas, L; Bosio, VE; Pandey, A; Castro, GR. 2008. Effects of organic solvents on immobilized lipase in pectin microspheres. *Biotechnol.* 151:578-586.
- Crouse, J; Mahuta, K; Mikulski, B; Harvestine, J; Guo, X; Lee, J; Kaltchev, M; Midelfort, K; Triitt, C; Chen, J; Zhang, W. 2015. Development of a microscale red blood cell-shaped pectin-oligochitosan hydrogel system using an electrospray-vibration method: preparation and characterization. *Journal of Applied Biomaterials y Functional Materials* 13(4):326-331.
- Cruz-Martínez, H; Ruiz-Vega, J; MatadaMas-Ortíz, PT; Cortés-Martínez, CI; Rosas-Díaz, J. 2017. Formulation of Entomopathogenic Nematodes for Crop Pest Control – a Review. *Plant Protect. Sci.* 53(1):15-24.

- Das, S; Chaudhury, A; Ng, Ka-Yun. 2011. Polyethyleneimine-modified pectin beads for colon-specific drug delivery: In vitro and in vivo implications. *Journal of Microencapsulation* 28(4):268-279.
- Davidson, DW; Verma, MS; Gu, FX. 2013. Controlled root targeted delivery of fertilizer using an ionically crosslinked Carboxymethyl Cellulose hydrogel matrix. *Springerplus* 2:318.
- Ehlers, RU. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(6):623-633.
- Gardner, SL; Stock, SP; Kaya, HK. 1994. A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian islands. *The Journal of parasitology* 80(1):100-106.
- Goud, S; Hugar, PS; Prabhuraj, A. 2010. Effect of temperature, population density and shelf life of EPN *Heterorhabditis indica* (RCR) in sodium alginate gel formulation. *Journal of Biopesticides* 3(3):627-632.
- Georgis, R. 1992. Present and future prospects for entomopathogenic nematode products. *Biocontrol Science and Technology* 2:83-99.
- Gowen, S; Hague, N. 2002. Nematode control of pests. In Pimentel, D. (eds.). *Encyclopedia of Pest Management*. CRC Press. p. 526-529.
- Grewal, PS. 2002. Formulation and application technology. In Gaugler R. (ed.). *Entomopathogenic Nematology*. Oxfordshire, USA, CABI. p. 265-287.
- Grewal, PS; Peters, A. 2005. Formulation and Quality. In Grewal, S; Ehlers, RU; Shapiro-ilan, DI (eds.). *Nematodes as Biocontrol Agents*. USA, Cabi Publishing. p. 79-89.
- Gulcu, B; Ulug, D; Hazir, C; Karagoz, M; Hazir, S. 2014. Biological control potential of native entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) against *Spodoptera ciliatum* (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass. *Biocontrol Science and Technology* 24(8):965-970.
- Hegazi, E; Aamer, N; Atwa, A; Ali, S; Hafez, M. 2012. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 22(1):55-60.
- Hazir, S; Kaya, HK; Stock, SP; Keskin, N. 2004. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology* 27(4):181-202.
- Helgerud, T; Ga °Serød, O; Fjæreide, T; Andersen, PO; Larsen, CK. 2010. *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents: Alginates*. ed. AImeson. United States of America, Wiley-Blackwell. p. 50-69.
- Hiltbold, I. 2015. Prospects in the Application Technology and Formulation of Entomopathogenic Nematodes for Biological Control of Insect Pests. In Campos, R. (ed.). *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests*. Springer International. p. 187-205.
- Hussein, M; Abdel-Aty, MA. 2012. Formulation of two native entomopathogenic nematodes at room temperature. *Journal of Biopesticides* 5:23-27.
- Jacas, J; Caballero, P. 2007. El control biológico de plagas y enfermedades. España, Universitat Jaume I. p. 87-93.
- Kaya, HK; Nelsen, CE. 1985. Encapsulation of *Steinernematid* and *Heterorhabditid* nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology* 14:572-574.
- Kennedy, JF; Melo, EHM; Crescenzi, V; Dentini, M; Matricardi. P. 1992. A rapid quantitative determination of pectin and carboxymethyl cellulose in solution using poly (hexamethylenebiguanidinium chloride). *Carbohydrate Polymers* 17(3):199-203.
- Kumar, A; Harjinder, S. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Food Science and Technology* 18:240-251.
- Madziva, H; Kailasapathy, K; Phillips, M. 2005. Alginate-pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery in foods. *Journal of Microencapsulation* 22(4):343-351.
- Mahmoud, MF. 2014. Virulence of Entomopathogenic Nematodes against the Jasmine Moth, *Palpita unionalis* Hb. (Lepidoptera: Pyralidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 24(2):393-397.
- Mandal, J; Pattnaik, S; Chand, PK. 2000. Alginate encapsulation of axillary buds of *Ocimum americanum* l. (hoary basil), *O. basilicum* l. (sweet basil), *O. gratissimum* l. (shrubby basil), and *O. sanctum* l. (sacred basil). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Plant. 36(4):287-292.
- Mujica, PA. 2006. Formulación de la cepa S 111 de *Serratia liquefaciens* (Grimes y Hennerty 1931) Bascomb *et al.* 1971, en matrices de alginato y su efectividad para inhibir in vitro a *Rhizoctonia solani* Kühn. Tesis Lic. Valdivia, Chile, Universidad Austral de Chile. 120 p.
- Mussinovich, A; Hirashima, M. 2013. *Cooking Innovations: Using hydrocolloids for thickening, gelling, and emulsification*. U.S. CRC Press. p. 69-76.
- Ngoma, L; Mwanza, M; Adegboye, MF. 2016. Entomopathogenic Nematodes for Insect Control, Distribution and Applicability in South Africa. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 26(1):175-184.
- Nguyen, K; Hunt, D. 2007. Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts. USA, Brill Academic Pub. 816 p.
- Peters, A. 2014. Formulation of Nematodes. In Glare, TR; Moran-Diez, ME. (eds.). *Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols*. New York, USA, Springer. p. 121-135.
- Reyes, ME; González, VA; Luna, JF. 2011. Uso de carboximetilcelulosa como matriz polimérica en la síntesis de nuevos materiales híbridos. *Ciencia UANL*. 4:459-465.

- Rodríguez, D; Torres, M; Uribe, L; Flores, L. 2009. Susceptibilidad de los estadios L2 y L3 de *Phyllophaga eleanans* a una cepa nativa de *Heterorhabditis* sp. en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense* 33(2):171-182.
- Rumbos, CI; Athanassiou, CG. 2017. The use of entomopathogenic nematodes in the control of stored-product insects. *J Pest Sci.* 90:39-49.
- Saiprasad, GVS; Polisetiy, R. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* 39(1):42-48.
- San-Blas, E. 2013. Progress on entomopathogenic nematology research: A bibliometric study of the last three decades: 1980–2010. *Biological Control* 66:102-124.
- Shapiro-Ilan, DI; Gouge, DH; Piggott, SJ; Fife, JP. 2006. Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biological Control* 38(1):124-133.
- Shapiro-Ilan, DI; Han, R; Dolinski, C. 2012. Entomopathogenic Nematode Production and Application Technology. *The Journal of Nematology* 44:206-217.
- Singh, AK; Sharma, M; Varshney, R; Agarwal, SS; Bansal, KC. 2006. Plant regeneration from alginate-encapsulated shoot tips of *Phyllanthus amarus* schum and thonn, a medicinally important plant species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* 42(2):109-113.
- Soler, DM; Gómez, L; Sánchez, L. 2003. Formulación de nematodos entomopatógenos. *Revista de Protección Vegetal* 18(1):9-10.
- Solórzano, P. 2014. Embriogénesis somática y producción de semilla artificial de papaya (*Carica papaya*) híbrido “Pococf”. Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 45 p.
- Stock, SP; Pryor, BM; Kaya HK. 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) in natural habitats in California, USA. *Biodiversity & Conservation* 8(4):535-549.
- Tofangsazi, N; Cherry, RH; Arthurs, SP. 2014. Efficacy of commercial formulations of entomopathogenic nematodes against tropical sod webworm, *Herpetogramma phaeopteralis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Applied Entomology* 138:656-661.
- Vashisth, S; Chandel, YS; Sharma, PK. 2013. Entomopathogenic nematodes. *Agricultural Reviews* 34(3):163-175.
- Yul, H; Myeong, S; Woon, D; Huan, H. 2011. Ecology of entomopathogenic nematodes. *In* Borgio, JF; Sahayara K; Susurluk IA. (eds.). *Microbial Insecticides: Principles and Application*. Nova Science Publishers. p. 150-180.
- Wenzel, I; Filho, A; Giordano, I; Denadae, B; Fernandes, J; Forim, M. 2017. Compatibility of polymers to fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their formulated products stability. *Acta Scientiarum Agronomy* 39(4):457-464.

