

PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARTICULARES PARA LA CONTRATACIÓN DE DEL SERVICIO DE ASISTENCIA TÉCNICA PARA EL DISEÑO Y DESARROLLO DE DIETA LARVAL DE CERATITIS CAPITATA PARA LA BIOPLANTA DE CAUDETE DE LAS FUENTES (VALENCIA), PROYECTO DE I+D+i “INNOVACIÓN EN LA LUCHA CONTRA LA MOSCA DEL MEDITERRÁNEO MEDIANTE LA TÉCNICA DEL INSECTO ESTÉRIL (OBRA: 3421816)” A ADJUDICAR POR PROCEDIMIENTO ABIERTO SIMPLIFICADO.

Ref.: TSA0067791.

1.- DESCRIPCIÓN DEL OBJETO DE CONTRATO

El presente pliego tiene por objeto la contratación por la Empresa de Transformación Agraria, S.A., S.M.E., M.P. (en lo sucesivo Tragsa), del servicio de asistencia técnica para el diseño y desarrollo de dieta larval de *C. capitata*, donde las larvas completarán su desarrollo previo al estado de pupa, en la bioplanta de machos estériles de Caudete de las Fuentes (Valencia).

El objetivo principal se centra en el desarrollo de una dieta artificial para la cría de la mosca de la fruta, *C. capitata* a partir de ingredientes estandarizados, cuya aplicación permita obtener una formulación homogénea que se traduzca en un incremento del rendimiento en la cría a un coste competitivo. Para alcanzar el objetivo principal expuesto, se plantea la siguiente metodología de trabajo:

1. Diseño y desarrollo de dieta larval en condiciones de laboratorio
 - a. Identificación de ingredientes (ingredientes nutricionales, compuestos de enriquecimiento, agentes texturizantes o de gelificación y conservantes) de aplicación en el diseño de dietas para la cría de *C. capitata*.
 - b. Diseño experimental: ingredientes y dosis de aplicación, tecnologías y variables de proceso, parámetros tecnológicos de evaluación.
 - c. Desarrollo de un máximo de 10 dietas diferentes. Caracterización físico-química, microbiológica y nutricional de las dietas.
2. Evaluación de las dietas seleccionadas. Ensayos a nivel de cría masiva
 - a. Evaluación de la estabilidad físico-química, microbiológica y nutricional de las dietas.
 - b. Evaluación del rendimiento de las dietas en condiciones de cría masiva

2.- INFORMACIÓN PREVIA. ANTECEDENTES Y CONDICIONES DE PARTIDA

En la Comunidad Valenciana, desde el año 2007 se lleva a cabo un proyecto de lucha biológica mediante la Técnica del Insecto Estéril (en adelante TIE) para el control de la mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata*, Wied. Este método se basa en la cría masiva (cientos de millones) de insectos de la misma especie a combatir (en nuestro caso, *C. capitata*) de los cuales se seleccionan y esterilizan, mediante irradiación, los machos. Una vez estos machos estériles alcanzan la madurez sexual son liberados en el área de actuación, se aparean con las hembras silvestres y los huevos puestos por éstas son inviables, de tal manera que no hay descendencia y por lo tanto disminuyen los niveles de plaga en campo.

El ciclo biológico de este insecto comprende cuatro estados: huevo, larva, pupa y adulto. La esterilización (irradiación) de los machos se produce en estado de pupa, y las pupas estériles evolucionan hasta estado adulto en jaulas en las instalaciones del Evolucionario, situado en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de Moncada (Valencia).

La dieta artificial que se utiliza para la cría masiva de *C. capitata* a nivel mundial, están basadas en la desarrollada por Tanaka (Tanaka, 1969) aunque cada programa utiliza diferentes agentes texturizantes dependiendo de la disponibilidad y precio. Los distintos ingredientes, así como las proporciones con que se formulan son factores decisivos al momento de su elaboración. En la dieta que se utiliza en la actualidad en el programa TIE que gestiona la empresa TRAGSA, el agua, al igual que en el resto de programas, es el ingrediente de mayor proporción y funciona como vehículo para que las larvas obtengan los nutrientes requeridos durante su desarrollo, seguida de los texturizantes, cuya proporción oscila entre el 1 y el 26% en la formulación de las dietas (según el tipo de texturizante), siendo el ingrediente utilizado en nuestro caso el pellet de pulpa de remolacha. Algunos texturizantes como el salvado de trigo aportan también grasas y lípidos. La sacarosa es la principal fuente de carbohidratos y contribuye para la formación de la estructura y función de los tejidos (Message & Zucoloto 1989, Fontellas & Zucoloto 2003). La principal fuente de proteína son las levaduras secas inactivas, las cuales contienen amonio, urea y algunos aminoácidos para sintetizar las vitaminas del grupo B requeridos para la reconstrucción y regeneración de órganos y tejidos de los insectos. Las vitaminas del complejo B como la tiamina, riboflavina, ácido nicotínico y pantoténico son esenciales para un buen desarrollo de los adultos como se describe para la *Bactrocera curcubitae*; además, en las hembras contribuye en la producción de huevos y en machos aumenta la viabilidad del esperma (Dadd 1973). Otros factores a considerar son la consistencia y palatabilidad obtenidas de la mezcla de los ingredientes, lo cual impacta en la textura final de la dieta y finalmente en el

desarrollo de la larva además del uso de conservantes, en este caso nipagina, benzoato sódico y ácido clorhídrico que mantendrá crecimientos fúngicos y bacterianos por debajo del umbral de afección de las larvas. Gran parte de la valoración de la calidad de una dieta artificial se mide utilizando el porcentaje de recuperación de individuos, que es el equivalente al porcentaje del total pupas recuperadas a partir del número de huevos sembrados en la dieta, y la tasa de productividad de la dieta larval, los litros de larva obtenidos por kg de dieta. Además, también se tiene en cuenta el tiempo de maduración larval, que es el periodo comprendido desde la siembra de huevos hasta el primer salto de las larvas. En la actualidad, ninguna de las dietas utilizadas en los programas TIE tienen una composición química conocida al detalle y este es un factor clave para poder ajustar al máximo la cantidad de nutrientes aportados y que este no sea un factor limitante del desarrollo larvario.

Uno de los inconvenientes de la utilización de dietas con texturizantes, es el residuo final que se genera una vez alcanzado el estado de pupa, que en el caso del Proyecto TIE de Tragsa asciende a 1100 Tm/año. Por lo tanto, sería interesante desarrollar preferentemente una dieta gélica, que minimice la producción de residuos sólidos y se pueda tener monitorizado todos los requerimientos nutricionales según los parámetros biológicos requeridos (Pašková, 2007) sin descartar diseños de dietas texturizadas que reúnan los mismos requisitos nutricionales.

Requisitos técnicos exigidos para presentar oferta

Aportar la información necesaria que acredite la experiencia previa en uno o varios de los siguientes campos de trabajo:

- Experiencia en diseño y elaboración de dietas para cría de insectos a pequeña escala (laboratorio) con resultados exitosos.
- Experiencia en diseño y elaboración de dietas para cría de insectos a gran escala (cría masiva) con resultados exitosos.
- Experiencia en ingredientes y materias primas para uso alimentario.
- Experiencia en mejora y desarrollo de productos alimentarios.
- Experiencia en procesos productivos industriales para industrias alimentarias.

Requisitos del servicio; Descripción técnica

FASE I: DISEÑO Y DESARROLLO DE DIETA LARVAL. ENSAYOS A NIVEL DE LABORATORIO. Tiempo de ejecución 8 meses.

Etapa 1. Investigaciones previas

Tarea 1.1. Identificación de los requerimientos nutricionales de las dietas

Inicialmente se recabará información acerca de los requerimientos nutricionales necesarios para el diseño de dichas dietas. Estos requerimientos harán referencia tanto a las necesidades nutricionales para el correcto desarrollo de las larvas, como a otros parámetros biológicos necesarios para su desarrollo (humedad, textura, pH, carga microbiana, etc.). Por otra parte, se realizará un estudio del coste estimado para los ingredientes de dicha dieta.

Tarea 1.2. Búsqueda bibliográfica de ingredientes potenciales

A partir de los requerimientos anteriormente identificados, en la presente tarea se llevará a cabo una actualización de la información científico-técnica disponible en bases de datos bibliográficos acerca de los ingredientes potencialmente aplicables en el diseño de dietas para la cría de *C. capitata*. A priori, los principales grupos de ingredientes que conformarán la base de la nueva dieta serán: ingredientes nutricionales, compuestos de enriquecimiento, agentes texturizantes o gelificantes y conservantes.

Tarea 1.3. Búsqueda de proveedores

A partir de la selección de aquellos ingredientes más adecuados para su uso en las nuevas dietas objeto de desarrollo, se llevará a cabo una búsqueda y contacto con proveedores, solicitando ficha técnica, así como su coste estimado teniendo en cuenta las cantidades solicitadas. Posteriormente, se identificarán aquellos ingredientes más interesantes desde un punto de vista nutricional, tecnológico y económico, que permitan desarrollar en etapas posteriores las dietas texturizadas y/o gelificadas a un precio competitivo. A efectos presupuestarios, se considera la selección de un máximo de 20 ingredientes diferentes.

Etapa 2. Diseño de dietas.

Tras la compilación de la información recogida en las tareas anteriores y de la selección de ingredientes, se diseñarán las diferentes dietas para la cría de *C. capitata*, dirigidas a alcanzar los requerimientos inicialmente establecidos. Para ello, se procederá a planificar la fase de experimentación, identificando los ingredientes (ingredientes nutricionales, compuestos de enriquecimiento, agentes texturizantes o gelificantes y conservantes) que conforman cada dieta diseñada, con sus dosis de aplicación, tecnologías y variables de proceso a aplicar, así como los parámetros tecnológicos de evaluación (humedad, textura, composición nutricional, etc.). Con todo ello, se establecerán los protocolos generales de los diseños, en los que se definirán:

- Tipos y cantidades de ingredientes a incorporar en cada una de las dietas y rango de concentraciones aplicables.
- Condiciones operativas en las distintas etapas de proceso.

Ensayos a realizar:

Parámetros tecnológicos de evaluación de las características de las dietas obtenidas (composición nutricional, textura, humedad, pH, etc.).

Etapa 3. Ensayos de desarrollo piloto de dietas en condiciones de laboratorio

En esta etapa se realizarán los diferentes ensayos propuestos en el plan experimental, que consistirán en la elaboración de los prototipos de dietas propuestas a pequeña escala (condiciones de laboratorio). La evaluación de dichas dietas, permitirá estudiar en primera instancia, el rendimiento de las distintas dietas diseñadas, de los ingredientes incorporados, así como las distintas variables del proceso, condicionan el resultado en el rendimiento de la cría de *C. capitata*. En cada uno de los ensayos realizados, se registrarán los datos correspondientes a las distintas cantidades de ingredientes empleados, así como a las diferentes variables del proceso (tiempos, temperaturas...). De cada dieta desarrollada, se elaborará el diagrama de flujo del proceso y los equipos básicos necesarios para su obtención. A modo orientativo, en condiciones de laboratorio, se suele utilizar 5 kg de cada una de las dietas diseñadas y se repite 3 veces en el tiempo, para un correcto análisis estadístico. A efectos presupuestarios, se estima desarrollar un máximo de 10 dietas diferentes, las cuales se evaluarán previamente en condiciones de laboratorio. Las dietas que obtengan buenos resultados en dicha fase, se validarán en la cría masiva de *C. capitata* e irán pasando a la Fase II conforme se vayan validando. Dichas valoraciones de las dietas obtenidas en cada ensayo permitirán evaluar el grado de avance de la experimentación e ir realizando los ajustes necesarios en las variables del proceso y formulación.

Las dietas desarrolladas serán inicialmente caracterizadas físico-química, microbiológica y nutricionalmente. Dicha caracterización consistirá en la determinación de su composición: humedad, grasa, proteínas, cenizas, hidratos de carbono (calculados por diferencia), así como la determinación de otros compuestos de interés desde el punto de vista nutricional, tales como vitaminas, minerales y otros parámetros físico-químicos (parámetros de textura, pH, etc.). Posteriormente, tras la finalización de los ensayos pertinentes en condiciones de laboratorio, se analizarán los resultados obtenidos, y se establecerán las variables de proceso y formulación más adecuadas entre las ensayadas que permitan conseguir, una dieta acorde a los requerimientos teóricos anteriormente establecidos.

FASE II: EVALUACIÓN DE LAS DIETAS DE LARVAS SELECCIONADAS. ENSAYOS A NIVEL DE CRÍA MASIVA.

Tiempo de ejecución 8 meses.

Etapa 1. Estudio de estabilidad de las dietas diseñadas en la Fase I

Con el objetivo de confirmar la estabilidad físico-química, microbiológica y nutricional de las dietas desarrolladas, durante su aplicación para cría larvaria de la mosca, se llevará a cabo una prueba de evaluación de estabilidad de las

mismas. Las muestras de las diferentes dietas se someterán a las condiciones habituales de cría masiva, (temperatura, humedad relativa, etc.). Posteriormente, se llevará a cabo el seguimiento de la evolución de las mismas, realizando para ello 2 controles. El primero de ellos con 20 bandejas de dieta sembrada (4.5 kg de dieta/bandeja o equivalente) y el segundo con otras 20 bandejas sin sembrar, evaluándose en ambos casos los parámetros físico-químicos y nutricionales y su evolución a lo largo del periodo estimado de cría (a priori 11-13 días). Posteriormente se procederá al análisis de los resultados obtenidos. Esta prueba se realiza en la fase de desarrollo, de forma paralela tras la ejecución de cada una de las dietas seleccionadas en la fase de laboratorio, y su objetivo será descartar fórmulas más inestables de partida o identificar defectos a corregir.

Etapa 2. Ensayos a nivel de cría masiva en la Bioplanta de Caudete de las Fuentes

De al menos tres dietas exitosas en condiciones de laboratorio (Fase I), el adjudicatario suministrará a Tragsa la cantidad necesaria para la realización de los ensayos en condiciones de cría masiva en la Bioplanta de Caudete de las Fuentes que a continuación se explican. Dichos ensayos serán ejecutados por Tragsa siguiendo los procedimientos de trabajo habituales y establecidos por esta y bajo la supervisión y en coordinación con la empresa adjudicataria, siendo esta libre de establecer el nivel de participación al que se compromete en la ejecución de dichos ensayos, pues los resultados obtenidos serán también responsabilidad de la empresa adjudicataria y no sólo de Tragsa.

Para la realización de los ensayos a escala de cría masiva, se utilizan 4 torres por dieta diseñada, que contienen 66 bandejas/ torre (4,5 kg de dieta/bandeja) y se repite 3 veces en el tiempo. Dependiendo del tipo de dieta diseñado, esa cantidad de dieta por bandeja podría variar, incluso el tipo de bandeja. Una vez completado el desarrollo larval, cada una de las torres de cada tratamiento se colectará de manera individual durante un tiempo determinado. Con el fin de comprobar la validez de cada uno de los tratamientos para la cría masiva, se registrarán tanto el tiempo de maduración larval, tiempo transcurrido desde la siembra de los huevos hasta la primera colecta larval, el porcentaje de recuperación larval, que se calcula como el porcentaje de pupas recuperadas por cada 100 huevos sembrados. Tras la fase de pupación, a los 5 días de madurez se calculará en laboratorio el número de pupas recuperadas. Una vez la pupa alcance la madurez adecuada, se prepararán muestras representativas de primer y segundo salto de cada dieta, que se prepararán para su esterilización, para poder realizar los correspondientes controles de calidad de los adultos obtenidos, que especificará la empresa Tragsa (FAO/IAEA 2014).

Con todo lo anterior, a medida que avancen los trabajos, se celebrarán reuniones periódicas con la frecuencia que determinen los técnicos de Tragsa para supervisar los avances y resolver las cuestiones técnicas que vayan surgiendo.

CLAUSULA FIN DE CONTRATO

A la finalización de la Fase I se evaluarán los resultados obtenidos. En el caso de no alcanzarse al menos en tres de las dietas diseñadas los estándares de calidad estipulados, la empresa Tragsa se reserva el derecho de rescindir el contrato y abonar únicamente el importe correspondiente al 50% de la fase ejecutada (Fase I).

En lo que se refiere a la ejecución de la Fase II, al menos una de las dietas ensayadas a escala masiva debe alcanzar los estándares de calidad estipulados. En caso contrario, se abonará únicamente el importe correspondiente al 50% de dicha Fase II.

Bibliografía

- Chan Jr, H. T., Hansen, J. D., & Tam, S. Y. (1990). Larval diets from different protein sources for Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(5), 1954-1958.
- Chang, C. L., Albrecht, C., El-Shall, S. S., & Kurashima, R. (2001). Adult reproductive capacity of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) on a chemically defined diet. *Annals of the Entomological Society of America*, 94(5), 702-706.
- Cohen, S. (2004). Social relationships and health. *American psychologist*, 59(8), 676.
- Dadd, R. H., Gomez, I., & Nambe, M. (1973). Requirement for ribonucleic acid in a semi-synthetic larval diet for the mosquito *Culex pipiens*. *Journal of medical entomology*, 10(1), 47-52.
- FAO/IAEA/USDA. 2014. Product quality control for sterile mass-reared and released tephritid fruit flies. Version 6.0 International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria. 159 pp. (<http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public/QualityControl.pdf>)
- Manoukas, A. G., & Zografou, E. N. (2000). A practical, efficient and low cost diet for rearing the Mediterranean fruit fly larvae. In *Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Joint proceedings of the international conference on area-wide control of insect pests, 28 May-2 June 1998 and the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Penang, Malaysia, 1-5 June 1998* (pp. 577-579). Penerbit Universiti Sains Malaysia.
- Message, C. M., & Zucoloto, F. S. (1989). Effect of some artificial diets on egg production by *Anastrepha obliqua*. *Rev. Bras. Biol.*, 49, 699-701.
- Pašková, M. (2007). New larval agar-based diet for laboratory rearing of Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Biologia*, 62(4), 477-481.

Raubenheimer, D., & Jones, S. A. (2006). Nutritional imbalance in an extreme generalist omnivore: tolerance and recovery through complementary food selection. *Animal Behaviour*, 71(6), 1253-1262.

Raubenheimer, D., & Simpson, S. J. (1999). Integrating nutrition: a geometrical approach. In *Proceedings of the 10th International Symposium on Insect-Plant Relationships* (pp. 67-82). Springer, Dordrecht.

Tanaka, N., Steiner, L. F., Ohinata, K., & Okamoto, R. (1969). Low-cost larval rearing medium for mass production of oriental and Mediterranean fruit flies. *Journal of Economic Entomology*, 62(4), 967-968.

Zucoloto, F. S. (1987). Feeding habits of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): can larvae recognize a nutritionally effective diet? *Journal of Insect Physiology*, 33(5), 349-353.

NO SE ADMITIRÁ LA PRESENTACIÓN DE VARIANTES

Madrid, a 4 de septiembre de 2019