

XVI Forum de Ciencia y Técnica. 0908001



**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA (CIGB)**
CIGB Camagüey. Laboratorio de Bioproductos.

1. Título de la ponencia:

HeberNem: Sustituto de tratamientos químicos en Cultivos Protegidos.

2. Grupo de colaboración al que pertenece el trabajo:

Programa Agroalimentario.

3. Datos autores y coautores:

Nombre y Apellidos de los autores	% de participación	No. de Identidad	Firma
Jesús Mena Campos	20	54122407445	<i>Jesús Mena</i>
Eulogio Pimentel Vázquez.	15	68081716344	<i>Eulogio Pimentel</i>
Armando Hernández García.	9	71090815822	<i>Armando Hernández</i>
Licette León Barreras.	8	68080107696	<i>Licette León</i>
Yamilka Ramírez Núñez.	7	73072106238	<i>Yamilka Ramírez</i>
Idania Wong Padilla.	3	58070306957	<i>Idania Wong</i>
Marieta Marín Bruzos.	3	75020610614	<i>Marieta Marín</i>
Juan Diego Mencho Ponce.	3	64031508409	<i>Juan Diego Mencho</i>
Manuel Hernández García.	3		<i>Manuel Hernández</i>
Ileana Sánchez Ortiz.	2	71051205412	<i>Ileana Sánchez</i>
Manuel Espósito Negrín.	2	70022607521	<i>Manuel Espósito</i>
Antonio del Castillo Ramírez.	2	43092603827	<i>Antonio del Castillo</i>
Gilda Jiménez Montejó.	2	47100225357	<i>Gilda Jiménez</i>
Mario Fleitas Díaz.	2	73102726347	<i>Mario Fleitas</i>
Eduardo Smith Polo.	1	60091804202	<i>Eduardo Smith</i>
Nemecio González Fernández.	1	69012704148	<i>Nemecio González</i>
Jesús Zamora Sánchez.	1	70083104309	<i>Jesús Zamora</i>
Eladio Zalazar Gómez.	1	69122505000	<i>Eladio Zalazar</i>
Vladimir Olivera Romero.	1	711030502401	<i>Vladimir Olivera</i>
Gustavo Rodríguez Rodríguez.	1	70070928842	<i>Gustavo Rodríguez</i>
Bárbaro Álvarez Martínez.	1	63101205829	<i>Bárbaro Álvarez</i>
Hubert Dandie Marshalleck.	1	67101818003	<i>Hubert Dandie</i>
María del C. Sánchez Aguilar.	1	63010109813	<i>María del C. Sánchez</i>
Rafael Pimentel Pérez.	1	70023002821	<i>Rafael Pimentel</i>
Carlos Pérez Heredia.	1	45110018001	<i>Carlos Pérez</i>
Oscar Compte Alberto.	1	64030303066	<i>Oscar Compte</i>
Madelín Sardiñas Padrón.	1	69012004116	<i>Madelín Sardiñas</i>
Lidiana Martínez Armas.	1	73110515774	<i>Lidiana Martínez</i>
Alaín Moreira Rubio.	1	76112210222	<i>Alaín Moreira</i>
Diasmaris Salinas Rodríguez.	1	72080809620	<i>Diasmaris Salinas</i>
Roberto Basulto Baker.	1	63020209289	<i>Roberto Basulto</i>
Carlos Borroto Nordelo.	1	50070504406	<i>Carlos Borroto</i>
Luis Herrera Martínez.	1	43112700909	<i>Luis Herrera</i>

plo p/w
plo p/w

Nombre y Apellidos de los autores	Institución a la que pertenecen.	Edad/Sexo	Escolaridad	Ocupación
Jesús Mena Campos	CIGB.	50/masculino	Universitario	Investigador
Eulogio Pimentel Vázquez.	CIGB.			
Armando Hernández García.	CIGB.			
Licette León Barreras.	CIGB.			
Yamilka Ramírez Núñez.	CIGB.			
Idania Wong Padilla.	CIGB.			
Marieta Marín Bruzos.	CIGB.			
Juan Diego Mencho Ponce.	Univ. Camagüey.			
Manuel Hernández García.	Cíticos Caribe.			
Ileana Sánchez Ortiz.	CIGB.			
Manuel Espósito Negrín.	CIGB.			
Antonio del Castillo Ramírez.	Instituto de Suelos.			
Gilda Jiménez Montejo.	ISP “José Martí.”			
Mario Fleitas Díaz.	Univ. Camagüey.			
Eduardo Smith Polo.	CIGB.			
Nemecio González Fernández.	CIGB.			
Jesús Zamora Sánchez.	CIGB.			
Eladio Zalazar Gómez.	CIGB.			
Vladimir Olivera Romero.	CIGB.			
Gustavo Rodríguez Rodríguez.	CIGB.			
Bárbaro Álvarez Martínez.	CIGB.			
Hubert Dandie Marshalleck.	CIGB.			
María del C. Sánchez Aguilar.	CIGB.			
Rafael Pimentel Pérez.	CIGB.			
Carlos Pérez Heredia.	CIGB.			
Oscar Compte Alberto.	CIGB.			
Madelín Sardiñas Padrón.	CIGB.			
Lidiana Martínez Armas.	CIGB.			
Alaín Moreira Rubio.	CIGB.			
Diasmaris Salinas Rodríguez.	CIGB.			
Roberto Basulto Baker.	CIGB.			
Carlos Borroto Nordelo.	CIGB.			
Luis Herrera Martínez.	CIGB.			

4. Nombre y Apellido de los Colaboradores:

- § Graciela García. *Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey*
- § Ruthdalys Segura. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Roberto Vázquez. *Universidad de Camagüey.*
- § Alina López. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Roberto Fernández. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Miguel del Sol. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Leandro Blanco. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Ruddy Peral. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Osvaldo Oliva. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Manuel Raíces. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Marianela García. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Ana C. Campal. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Merardo Pujol. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*
- § Angela Sosa. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.*

5. Tipo de ponencia: **Generalización**

El resultado se ha generalizado en:

1. Empresa Citrícola “La Jíquima”. Holguín.
2. Empresa Citrícola “Ceballos”. Ciego de Avila.
3. Empresa Citrícola “Sierra de Cubitas”. Camagüey.
4. Empresa Citrícola “Arimao”. Cienfuegos.
5. Empresa Citrícola “Ceiba”. Provincia Habana.

6. Esta ponencia tiene _____ páginas.

1. Aporte Técnico:

Esta variante tecnológica (el uso de HeberNem) tiene carácter positivo sobre las variables productivas, ya que amortigua los efectos deprimentes que ocurren por la aplicación de productos químicos, disminuyendo los riesgos de contaminación del suelo, de los frutos y del agua subterránea y del personal que labora dentro o alrededor de las casas de cultivos.

En relación con el rendimiento, se observa que se atenúan las afectaciones debidas al número y peso de los frutos, y no se cuantifica detrimento de las características bromatológicas y de calidad de los frutos.

Se producen cambios cuantitativos con la implementación del uso de esta variante biotecnológica, en los valores estéticos, científicos, educativos y conservacionistas. El valor estético se observa en los favorables resultados visuales del estado fisiológico del cultivo, el cual se muestra más vigoroso, con mayor desarrollo, mejor coloración. El valor científico viene dado por la información adquirida por los propios productores para poder asumir la asimilación de este nuevo producto; así como la cuantificación de otros indicadores de calidad del cultivo en relación con el suelo y la calidad del agua. También brinda la posibilidad de crear nuevas estrategias y alternativas para la atención de los cultivos protegidos y el control de sus principales plagas. Contiene valor educativo, puesto que este cambio tecnológico permite sensibilizar a los productores y personal vinculado a las casas de cultivo, de la necesidad del cuidado del entorno y los cultivos; en el cual es además protagonista la fertirrigación y la fertilización de fondo de los suelos con la aplicación de materiales orgánicos y la calidad de las aguas.

2. Cuáles son las soluciones que aporta, en que lugares, proyectos etc.

La adecuada desinfección de suelos, contra nematodos, en los cultivos protegidos, ha sido, es y será el mayor reto a los resultados productivos-económicos de esta tecnología.

La principal vía de solución utilizada para este problema, el Bromuro de Metilo (BM), ha llegado a sus momentos finales. Regulaciones de carácter medio-ambiental, en primer lugar, han obligado a los productores a dejarlo de usar. Este momento ha coincidido con la proyección de nuestro estado en incrementar la tecnología de los cultivos protegidos, como una vía para el incremento de la producción de hortalizas todo el año e inclusive con un fuerte impacto social al crear puestos de trabajo en todo el país.

Para la sustitución del BM se han propuesto otras alternativas químicas como el Basamid (dazomet) y el Agrocelhone (Cloropirina + 1-3 dicloropropeno) pero ambos productos presentan inconvenientes medioambientales y prácticos que no les permitirán a mediano y largo plazo cumplir con su cometido en los cultivos protegidos.

Una alternativa de indiscutibles resultados prácticos y muy favorable al medio ambiente la constituye el bionematicida “HeberNem”.

En estos momentos, el alcance espacial del impacto de esta tecnología es parcial, puesto que se ha introducido en los Polos productivos de la Unión de Cítricos y Frutales, lo que debe ampliarse al resto de las casas de cultivos del país.

3. Si está generalizado, donde y que importancia tiene esto.

El resultado se ha generalizado en:

- § Empresa Citrícola “La Jíquima”. Holguín.
- § Empresa Citrícola “Ceballos”. Ciego de Avila.
- § Empresa Citrícola “Sierra de Cubitas”. Camagüey.
- § Empresa Citrícola “Arimao”. Cienfuegos.
- § Empresa Citrícola “Ceiba”. Provincia Habana.

Importancia:

Uno de los aspectos fundamentales de la agricultura orgánica es el relativo al concepto del Suelo y de su Fertilidad, debido que al suelo hay que considerarlo como un sistema biológico que tiene y genera vida por acción de los microorganismos presentes. Desde el punto de vista agrícola la fertilidad del suelo disminuye por la pérdida de la materia orgánica por procesos de oxidación, por la extracción de nutrientes por las plantas y por la lixiviación o lavado de las bases por altos

contenidos de humedad, que puede ocasionar incrementos de la acidez y en ocasiones efectos tóxicos debido a la alteración o desequilibrio de los componentes químicos del suelo. En este sentido la fertilidad puede ser restituida por la adición de materiales orgánicos; proporcionando a las plantas elementos nutritivos; modificando las condiciones físicas del suelo; con el aumento de la actividad biológica para un mayor aporte de energía y al proteger los cultivos de un exceso temporal de sales minerales o de sustancias tóxicas, gracias a su fuerte capacidad de absorción.

Debe conocerse que el mejoramiento de la fertilidad del suelo es consecuencia de un mejoramiento físico (estructura), químico (materia orgánica y nutrientes) y biológico (micro y macroorganismos). La fertilización orgánica mediante el uso de residuos de cosechas, compostes, estiércoles, abono verde, polvo de rocas y subproductos de animales, tiene como objetivo aprovechar los ciclos naturales de los nutrientes. Comúnmente el término orgánico se utiliza para designar los compuestos complejos del carbono; pero, en la agricultura orgánica, se califica en el sentido más amplio, los materiales compuestos, total o principalmente de sustancias de origen animal o vegetal, y hasta los minerales simples.

Los fertilizantes minerales naturales y los de origen biológico deben ser vistos solamente como un componente del sistema de nutrición y como un suplemento y no como un reemplazo del reciclaje natural de nutrientes con materiales tal como son extraídos naturalmente; deberán ser usados solamente dentro de un programa dirigido a cubrir las necesidades a largo plazo, junto con otras técnicas; evitando el utilizar productos transformados por algún tratamiento químico, como el nitrato chileno.

La generalización del bionemacida HeberNem ha permitido que los productores en las casas de cultivos reflexionen en lo anterior y puedan disponer de este producto y su alternativa como una pieza fundamental en un sistema de agricultura orgánica.

4. Análisis económico y social. (preciso, claro, con cifras donde proceda).

• Económico:

La ganancia por la aplicación de HeberNem combinado con otros antagonistas biológicos sobre los productos químicos para el control de nematodos y enfermedades es de un 40% de disminución de los costos. Para 100 ha (a proteger con HeberNem) se calculan \$500 000 CUC empleados en productos químicos para el control de nematodos y hongos en un ciclo del cultivo, esta cifra multiplicada por 2,2 ciclos al año indica un gasto de \$1 100 000 CUC que se reducirá a \$660 000 CUC con una ganancia total para los productores y el país de \$440 000 CUC anualmente.

Además de lo anterior se lograrán los siguientes avances:

Incremento de las exportaciones al mercado exigente en la eliminación de químicos tóxicos.

Se disminuyen las importaciones de químicos.

Se disminuyen los costos de producción al ser más económicamente rentable la tecnología propuesta que la del uso de químicos.

Mayor calidad (y por tanto mayor precio) de los productos agrícolas obtenidos al no ser empleados los químicos contaminantes.

• Social

La importancia social de los sistemas de producción orgánica (a los cuales se ajusta HeberNem) se fundamenta en el conocimiento profundo de los ciclos naturales de las plantas y de la biodiversidad de cada localidad por lo que favorece a los habitantes locales por su implementación y se protege el área de incursiones de las transnacionales de agroquímicos. Al considerar los precios que se reciben en el mercado internacional por los productos producidos por esta tecnología (entre un 20 - 40%) lo que ayuda a mejorar las ganancias y la calidad de vida en la población rural. Al reducirse la compra de insumos externos por el desarrollo del sistema orgánico se reducen el número de accidentes entre los trabajadores, disfrutando de un ambiente limpio y armónico donde transcurre su vida. Debe señalarse que el producto ecológico tiene superior calidad física, química y biológica para el organismo humano.

5. Avaluos:

Se anexan los AVALES de los resultados expuestos en la ponencia, aclaramos que en algunos de ellos se refieren al producto con el nombre de “BioNem”, que fue cambiado posteriormente a “HeberNem” debido a la interferencia del primer nombre con otra marca de un producto extranjero ya existente, no obstante, todos los avales se refieren también al nombre específico de la bacteria y a la cepa C-924.

1. INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que las pérdidas debido a las plagas, enfermedades y malas hierbas en las cosechas, se acercan a un 35 % en los principales cultivos de interés económico. Entre las plagas que afectan el sector agrícola y ganadero, los nematodos son responsables de pérdidas considerables, valoradas en 100 mil millones de USD anuales (Páez, 1997).

La agricultura moderna requiere de altos rendimientos para dar respuesta a las necesidades de los seres humanos; el empleo de plaguicidas químicos para lograr este objetivo ha dado resultados parcialmente satisfactorios durante varias décadas, ya que el uso de esos compuestos químicos ha originado un creciente deterioro del ecosistema, además de traer como consecuencia que los alimentos producidos bajo este régimen posean ciertos niveles de contaminación que resultan dañinos para los consumidores.

Hace más de 30 años, la escritora norteamericana Rachel Carson (citada por Sivan y Chet, 1992) en su libro "Silent Spring" pronosticó que se produciría un desastre ecológico debido al uso continuado de los plaguicidas químicos, desafortunadamente esta predicción se está convirtiendo en realidad. Por ejemplo, en los Estados Unidos, se detectaron más de 70 plaguicidas químicos (varios de ellos nematicidas) en el agua subterránea de 38 estados (Sivan y Chet, 1992).

Por otro lado, existe una creciente demanda de productos nematicidas, tanto a nivel nacional como en el mercado internacional (Páez, 1997).

Un estudio publicado por U.S. Environmental Protection Agency (EPA), indicó que en ese país se indujeron de 3 000 a 6 000 casos de cáncer por residuos de plaguicidas en los alimentos; esta cifra es similar a los riesgos producidos por la contaminación del aire, incluyendo el mal hábito de fumar, pero los plaguicidas son también los más dañinos para seres silvestres y otros organismos beneficiosos (Sivan y Chet, 1992).

Cuba no ha estado ajena a esta situación y es por ello que entre los 13 Programas Nacionales Científico-Técnicos del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente (CITMA, 1995), se encuentra definido dentro de los objetivos del “Programa de Biotecnología Agrícola”, la “Obtención y Desarrollo de Biopesticidas, Biofertilizantes, Bioreguladores y Extractos Naturales”, que a su vez contempla el desarrollo de técnicas de aislamiento, caracterización y evaluación de metabolitos microbianos para el control fitosanitario, así como estudiar los mecanismos de acción.

El proyecto desarrollado en el Centro de Ingeniería genética y Biotecnología (CIGB) para obtener nuevas cepas nematicidas, se ajustó a los anteriores objetivos, pero también tuvo incidencia en el Programa Nacional “Los Cambios Globales y la Evolución del Medio Ambiente Cubano”, al proponer la sustitución de plaguicidas químicos tóxicos (tal es el caso de los nematicidas), por productos biológicos no contaminantes.

En correspondencia con lo expuesto, se planteó como problema la búsqueda de nuevos enemigos naturales de los nematodos a partir de bacterias del suelo, capaces de actuar como nematicidas biológicos.

Aunque actualmente se conocen varios microorganismos que han sido ampliamente estudiados y reconocidos como enemigos naturales de los nematodos, pero por diversos motivos no han llegado a convertirse en nematicidas biológicos capaces de insertarse adecuadamente en los sistemas de manejo integrados y/o satisfacer todas las exigencias del mercado. Sin embargo, la riqueza microbiana del suelo contempla la existencia de miles de especies aún no estudiadas, que pudieran cumplir con todas las condiciones para convertirse en productos biológicos controlados por el hombre.

En relación con el problema planteado se estableció la siguiente hipótesis de trabajo:

- El aislamiento e identificación de bacterias del suelo con actividad nematicida y la determinación de sus mecanismos de acción, permitirá disponer de una nueva alternativa de control biológico, amigable con el ambiente y con posibilidades de incluirse en los diferentes sistemas actuales de manejo integrado de nematodos.

De esta hipótesis se deriva el siguiente objetivo general:

- Determinar y seleccionar cepas de bacterias con posibilidades de ser empleadas como nuevos nematicidas biológicos.

Para lograr el anterior objetivo general, se trazaron los siguientes **objetivos específicos**:

- Aislar bacterias del suelo con posible actividad nematicida e identificar hasta especie las que presenten esa actividad.
- Seleccionar las cepas bacterianas que poseen mayor actividad nematicida mediante experimentos *in vitro*.
- Observar los cambios ultraestructurales que ocurren en los nematodos bajo el efecto de la cepa de mayores perspectivas.
- Determinar en la cepa seleccionada las causas fundamentales que intervienen en su mecanismo de acción sobre nematodos.
- Demostrar en experimentos en macetas y de campo, la efectividad de las cepas previamente seleccionadas por su mayor actividad nematicida.

Este proyecto desarrollado en el CIGB, cumplió con los anteriores objetivos, al lograr la sustitución de plaguicidas químicos tóxicos (Bromuro de Metilo, Agrocetone y Basamid) en más de 17 ha de cultivos protegidos (hasta julio del 2005) en todo el país, por un producto biológico no contaminante que responde al nombre comercial de HeberNem y cuyo agente activo es la bacteria *Tsukamurella paurometabola* (*Corynebacterium paurometabolum*) (Steinhaus, 1941; Holt y col., 1994), cepa C-924 (Mena y col., 1994, 1996, 2000, 2002, 2003 y 2004).

Los estudios de las interacciones de HeberNem con otros microorganismos biocontroladores, biofertilizantes y con plaguicidas químicos, arrojan resultados favorables al igual que las 18 pruebas toxicológicas y ecotoxicológicas que lo ubican como un producto no tóxico y protector del medio ambiente.

En el “Manual de Aplicación del Bionematicida HeberNem” se exponen detalladamente los requisitos y procedimientos para el empleo de este producto en los cultivos protegidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Aislamiento e identificación de colonias de bacterias a partir de muestras del suelo.

En un suelo tipo “pardo mullido medianamente carbonatado” (Instituto de suelos, 1999), con alta incidencia de nematodos, se seleccionaron dos grupos de plantas de plátanos (*Musa* sp. híbrido, cultivar Macho) que presentaban diferencias en su sistema radicular y en el desarrollo del follaje. Se recolectaron segmentos de raíces de 10 cm de largo (sin desprender de ellas el suelo adherido), a una profundidad entre cinco y 30 cm. Las raíces se ordenaron e identificaron en los dos grupos: a) plantas poco afectadas y vigorosas (muestras A, B, C y D) y b) plantas con raíces afectadas y poco vigorosas (muestras W, X, Y y Z).

Las muestras del suelo se diluyeron en la proporción de un gramo en 10 mL de agua destilada estéril, seguidamente se homogenizó con agitación y fueron separadamente tamizadas por una malla de 40 μm , seguido de filtración por papel Watman número 2. Se realizaron diluciones seriadas de cada muestra y se distribuyeron uniformemente 100 μL por cada una de las placas de Petri conteniendo medio LB (Luria Bertani). Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 28 $^{\circ}\text{C}$ y las colonias aisladas en las diluciones de 10^{-6} fueron nuevamente sembradas y crecidas a 28 $^{\circ}\text{C}$ entre 24 y 72 horas (Seeley y col., 1991).

Se compararon las morfologías de los aislados procedentes de cada uno de los grupos de muestras analizados, para buscar las colonias aisladas de las plantas de plátano más vigorosas y con un sistema radicular más saludable. Paralelamente se procedió a la identificación de estas colonias mediante pruebas bioquímicas (Seeley y col., 1991; BioMérieux, 1992a, 1992b y 1992c; Holt y col., 1994).

2.2 Determinación de la actividad nematicida de las colonias de bacterias aisladas.

2.2.1 Experimentos *in vitro*.

- Colecta y desinfección de huevos y juveniles (j2) de *Meloidogyne incognita* Chitwood:

Se efectuó la extracción de ootecas del nematodo a partir de raíces de plantas de calabaza (*Cucurbita moschata* Duch.) cultivadas en invernaderos y previamente infestadas con el fitonematodo. Para ello se utilizaron un microscopio estereoscopio y agujas hipodérmicas con las puntas debidamente modificadas. Las ootecas se colocaron en agua destilada estéril en placas de Petri a 28 $^{\circ}\text{C}$ (alrededor de 50 por cada placa).

A las 72 horas emergen suficientes juveniles en su segundo estadio (j2), para comenzar el proceso de colecta y desinfección de los mismos. El agua conteniendo las ootecas y los juveniles, se filtró por un tamiz de 60 μm . A partir de ese momento la manipulación se realizó bajo condiciones asépticas (flujo laminar vertical).

Los huevos desprendidos de las ootecas, se quedaron retenidos sobre la malla de un tamiz de 30 μm , y los juveniles fueron colectadas sobre un último tamiz de cinco μm . El tamiz conteniendo los huevos o los juveniles, se introdujo Hibitane (Chlorhexidine Acetate) al 0,5 % durante tres minutos y seguidamente se efectuaron tres lavados con medio LB diluido 10 veces en agua destilada estéril (solución 1/10 LB).

Los huevos o los juveniles (según el caso) una vez desinfectados, se extrajeron del tamiz, resuspendiéndolos cuidadosamente con la solución 1/10 LB. La suspensión de huevos o de juveniles se ajustó a 100 individuos por mL de solución y se colocaron 100 μL en cada hueco de una placa de cultivo de tejidos de 96 huecos.

Para el caso de los experimentos desarrollados con juveniles, se contaron los vivos y muertos. Los conteos se confirmaron mediante tinciones con “verde malaquita”, ya que esta técnica permite conocer con mayor exactitud si los juveniles están realmente vivos o muertos (Vázquez, 1995).

En los experimentos con huevos de *M. incognita*, se contaron las larvas emergidas a los siete días.

- Experimento *in vitro* con huevos de *M. incognita*:

Las seis cepas inicialmente identificadas fueron seleccionadas para ser estudiadas en este experimento:

- 1) *Staphylococcus* sp. cepa A-241, 10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mL).
- 2) *Staphylococcus* sp. cepa A-702, 10^7 UFC/mL.
- 3) *Bacillus* sp. cepa B-813, 10^7 esporas/mL (esporas por mL).
- 4) *Pseudomonas* sp. cepa D-1035, 10^7 UFC/mL.
- 5) *Sphingobacterium spiritivorum* cepa C-926, 10^7 UFC/mL.
- 6) *Corynebacterium paurometabolum* cepa C-924, 10^7 UFC/mL.

- Experimento *in vitro* con juveniles de *M. incognita*: se emplearon las dos cepas anteriormente aisladas:

- 1) *Sphingobacterium spiritivorum* cepa C-926, 10^7 UFC/mL.
- 2) *Corynebacterium paurometabolum* cepa C-924, 10^7 UFC/mL.

Las mismas fueron comparadas con otras cepas de bacterias:

- 1) *Bacillus subtilis* cepa F 16-95, 10^7 esporas/mL.
- 2) *Bacillus thuringiensis* var. israeliensis “Bactimos WP”, 10^7 esporas/mL.
- 3) *Bacillus thuringiensis* var. israeliensis “Teknar TC”, 10^7 esporas/mL.
- 4) *Bacillus thuringiensis* cepa CIGB-9452, 10^7 esporas/mL.
- 5) *Bacillus thuringiensis* cepa CIGB-9499, 10^7 esporas/mL.
- 6) *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-3, 10^7 esporas/mL.
- 7) *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-13, 10^7 esporas/mL.
- 8) *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-21, 10^7 esporas/mL.
- 9) *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-24, 10^7 esporas/mL.
- 10) *Bacillus thuringiensis* var. tenebrioni cepa CIGB 90, 10^7 esporas/mL.

- Preparación de los Bancos de Células de Trabajo (BCT): Se prepararon siguiendo los siguientes pasos:

- 1) Se inocularon tubos de cultivo que contenían 5 mL de medio LB, con colonias características de cada cepa, previamente crecidas en placas de Petri conteniendo medio LB sólido.
- 2) Los tubos (precultivos) se incubaron durante 12 horas a 28 °C en un agitador a 100 rpm.
- 3) Se inoculó 1 mL del precultivo en frascos de cultivo (erlenmeyers) con 50 mL de medio LB.
- 4) Los frascos de cultivos se mantuvieron incubados a 28 °C en una zaranda Retomed a 100 rpm, hasta lograr una densidad óptica (DO) de 0,5 (absorbancia a 530 nm).
- 5) Los cultivos de cada cepa se mezclaron con igual volumen de una solución estéril de glicerol al 60 %, y se conservaron en alícuotas de 1 mL en frascos viales, a temperatura de –70 °C.

- Condiciones de cultivos para producir las diluciones de las cepas en estudio:

- 1) Precultivos en tubos de 5 mL: se tomaron colonias características de las placas de Petri conteniendo medio LB sólido. También se tomaron directamente alícuotas de los gliceroles del BCT para inocular en tubos de precultivos con 5 mL de medio LB, durante 12 horas, a 100 rpm y a una temperatura de 28 °C.

2) Cultivos en erlenmeyers: se midió la DO a los precultivos anteriores, a partir de condiciones previamente establecidas se tomó el volumen necesario para ajustar un erlenmeyer conteniendo 50, 100 o 200 mL de medio LB a 0,05 DO. Los cultivos se incubaron entre 16 y 120 horas, a 100 rpm y a una temperatura de 28 °C. El tiempo de crecimiento estuvo en dependencia de la cinética de crecimiento de cada una de las cepas (Seeley y col., 1991; Veloz, 1998; Expósito, 2000; Hernández y col., 2000; Álvarez, 2001; Zaldúa, 2001).

3) Determinación de la DO: se realizaron las lecturas de la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro Jenway y se efectuaron diluciones seriadas para lograr las concentraciones celulares requeridas.

- Tratamientos *in vitro* sobre los huevos y los juveniles de *M. incognita*: se aplicó 100 µL de las diferentes diluciones, a cada hueco de la placa de cultivos. Estos ya contenían el mismo volumen (100 µL) con los huevos o los juveniles de *M. incognita*, según fuese el caso. Otros huecos fueron usados como testigos, a los mismos se les aplicó 100 µL de 1/10 LB. El diseño de estos experimentos *in vitro* constó de ocho réplicas (huecos) para cada tratamiento.

- Evaluación de los experimentos *in vitro*: las placas fueron incubadas a 28 °C. Los conteos de la eclosión se realizaron a los 7 días y de los juveniles vivos a las 48 horas, usando un microscopio invertido Olympus.

- Procesamiento estadístico de los datos: se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA). Para conocer entre qué tratamientos se encontraban las diferencias significativas ($p < 0.05$), se aplicó la dística de rangos múltiples de Tukey (Lerch, 1977; Sigarrosa, 1985), y el programa SYSTAT 7.0, siguiendo las recomendaciones de Curbelo (2002) y Vázquez (2003).

2.2.1.1 Cálculo de las concentraciones letales (CL50 y CL95) de las cepas en estudio.

Para el cálculo de la concentración letal media (CL50) y de la concentración letal efectiva (CL95) se realizaron diluciones seriadas a concentraciones celulares desde 10^3 hasta 10^8 UFC/mL o esporas/mL. Se emplearon dos métodos: el recomendado por Reed y Muench (1938) y el Probit del programa SPSS 8.0. Estos se ajustaron a las condiciones de los experimentos *in vitro*, donde se emplearon juveniles (j2) de *M. incognita*, con los conteos finales de vivos y muertos a las 48 horas, en seis diluciones y ocho réplicas.

2.3 Cambios ultraestructurales en huevos y juveniles de nematodos asociados a la acción de *C. paurometabolum* cepa C-924.

El estudio ultraestructural de las células y los tejidos se realizó con el empleo de técnicas de microscopía electrónica de transmisión (MET), según lo descrito por Spurr (1969). El procesamiento de las muestras biológicas se desarrolló en cuatro pasos: la fijación, la deshidratación, la infiltración y la inclusión (Hernández, 2000; Falcón, 2000).

Las muestras procesadas fueron: huevos del zoonematodo *Haemonchus contortus* y juveniles (j2) del fitonematodo *M. incognita*, incubados a distintos tiempos con la dilución de la cepa a la CL95 previamente calculada (epígrafe 2.2.1.1) y sus testigos sin tratamiento con la bacteria.

Las secciones ultrafinas fueron realizadas con una cuchilla de diamante Diatome con ángulo de 45 grados en un ultramicrotomo NOVA de la firma LKB, con un grosor de 400-500 Å. Las mismas fueron colocadas sobre rejillas de cobre de 400 orificios, teñidas con uranil acetato saturado en metanol y citrato de plomo; fueron examinadas con un microscopio JEOL JEM 2000 EX. Los reactivos utilizados fueron obtenidos de la firma Agar Scientific de Inglaterra.

2.3.1 Cambios ultraestructurales en huevos y juveniles de *Haemonchus contortus* asociados a la acción de *C. paurometabolum* cepa C-924.

- Colecta y desinfección de huevos de *H. contortus*:

Se efectuaron colectas del nematodo *H. contortus* a partir del abomaso de ovinos (*Ovis musimon*). Se identificaron los nematodos hasta especie según Eddi (2003), y teniendo en cuenta las especies reportadas en Cuba: *H. contortus*, *H. longistipis*, *H. lunatus* o *H. similis* (Espaine y Lines, 1983).

Las hembras adultas fueron lavadas en solución fisiológica y tratadas con Hibitane al 0,5 % durante un minuto. Se colocaron alrededor de 100 individuos en un erlenmeyer conteniendo 50 mL de solución 1/10 LB, durante 8 horas a 37 °C. Desde este momento toda la manipulación se realizó bajo condiciones asépticas. El volumen total de la solución se filtró por un tamiz de 60 µm. Los huevos quedaron retenidos sobre la malla de un tamiz de 30 µm. Este se introdujo en Hibitane al 0,5 % durante tres minutos y seguidamente se efectuaron tres lavados con la solución 1/10 LB. Los huevos se extrajeron del tamiz, resuspendiéndolos cuidadosamente con 1/10 LB. La suspensión se ajustó a 2 000 individuos por mL. Para cada tratamiento se tomó 1 mL del volumen anterior, y se colocaron separadamente en una placa de cultivo de 24 huecos.

Para los tratamientos a observar por MET, se aplicó en cada hueco 1 mL de la suspensión de la cepa en estudio, a la CL95 previamente calculada (epígrafe 2.2.1.1). Los testigos consistieron en huecos que contenían huevos, a los que se les aplicó 1 mL de 1/10 LB. La placa de cultivos fue sellada con parafilm e incubada a 28 °C, se interrumpió este proceso a las 12, 24 y 48 horas para llevar a cabo los estudios.

2.3.2 Cambios ultraestructurales en juveniles de *M. incognita* asociados a la acción de *C. paurometabolum* cepa C-924.

- Colecta y desinfección de juveniles (j2) de *M. incognita*: se emplearon los mismos procedimientos que en los experimentos *in vitro* antes descritos en el epígrafe 2.2.1.
- Manipulación y distribución de los juveniles en la preparación de muestras: la suspensión de juveniles se ajustó a 1 000 individuos por mL de solución. Para cada tratamiento se tomó 1 mL y se colocaron separadamente en una placa de cultivo de 24 huecos. Para los tratamientos a observar por MET, se aplicó en cada hueco 1 mL de la dilución de la cepa en estudio, a la CL95 previamente calculada (epígrafe 2.2.1.1). Los testigos consistieron en juveniles a los que se les aplicó 1 mL 1/10 LB. La placa de cultivos fue sellada con parafilm e incubada a 28 °C, se interrumpió este proceso a las 24 horas para llevar a cabo los estudios.

2.4 Estudio del modo de acción de *C. paurometabolum* cepa C-924 sobre huevos de *H. contortus*.

Teniendo en cuenta las observaciones realizadas en el estudio por MET sobre huevos y juveniles de nematodos se diseñaron experimentos, con el objetivo de evaluar la actividad de los gases como portadores de sulfuros, y la actividad del sobrenadante del cultivo como portador de quitinasas.

2.4.1 Producción de sulfuros por *C. paurometabolum* cepa C-924.

Se tomaron muestras en tubos colectores de gases de 100 mL, de las fermentaciones en dos biorreactores de cinco litros B. E. Marubichi, donde se crecieron las cepas *Corynebacterium paurometabolum* C-924 y DSM 20162. Los biorreactores con medio de cultivo LB se esterilizaron a 121 °C y 1,02 Kg/cm² de presión, durante 20 minutos (Sambrook y col., 1989). A partir de cultivos en erlenmeyer se inoculó cada biorreactor con su respectiva cepa, a 0,05 DO. Las fermentaciones se realizaron a una velocidad de agitación de 100 rpm, pH = 7,2, a temperatura de 28 °C y 1,0 vvm (flujo de aire por unidad de volumen) durante 24 horas.

Se tomaron dos muestras simultáneas de los gases emitidos en cada biorreactor a las 16, 18, 20, 22 y 24 horas, y se procesaron de manera análoga al patrón de H₂S generado en un cromatógrafo de gases Varian.

2.4.2 Actividad quitinolítica de *C. paurometabolum* cepa C-924.

Se emplearon las cepas *C. paurometabolum* (*Tsukamurella paurometabola*) C-924 y DSM 20162, *Serratia marcescens* ATCC 13880 y *Escherichia coli* ATCC 25922 (ATCC, 2003).

Los cultivos se crecieron en erlenmeyers con 50 mL de medio LB suplementados con quitina coloidal (Sigma) al 0,01 %, a una temperatura de 28 °C y 100 rpm de agitación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 3 500 rpm y los sobrenantes se filtraron a través de dos membranas de 0,2 µm. El producto del filtrado fue sometido a ensayos de actividad en placas preparadas a partir de una suspensión coloidal de quitina (0,5 %), se adicionó agarosa hasta un 0,8 % para gelificar el medio y garantizar una porosidad que permita la mejor difusión de las proteínas. Se hicieron pocillos de 5 mm de diámetro en los que se adicionaron 100 µL de los sobrenantes filtrados.

Se realizaron tres réplicas para cada cepa en estudio y se incubaron a 28 °C en la oscuridad. A las 72 horas se realizaron mediciones del diámetro de los halos de hidrólisis de la quitina que fueron producidos por las distintas cepas, empleándose para ello un microscopio estereoscopio Olympus.

2.4.3 Efecto de los gases y el sobrenadante de *C. paurometabolum* cepa C-924 sobre huevos de *H. contortus*.

La complejidad de este experimento exigió un modelo de evaluación capaz de cuantificar los resultados en un corto período de tiempo (24 horas), por ello se emplearon huevos del zoonematodo *H. contortus*. Para la colecta y desinfección de la cantidad necesaria de huevos para el montaje del experimento, se empleó el procedimiento anteriormente descrito en el epígrafe 2.3.1.

Los huevos fueron colocados en cantidad de 100 individuos aproximadamente en 2 mL de solución 1/10 LB. Este volumen se introdujo en válvulas de seguridad para gases, que permitieron el paso del aire (y gases) a través del líquido con los huevos (ver ANEXO 1). La temperatura de trabajo fue 28 °C. Se emplearon cuatro válvulas de seguridad (réplicas) en cada uno de los siguientes tratamientos:

- 1) *C. paurometabolum* cepa C-924 a 10⁷ UFC/mL + un flujo de aire de 20 a 30 mL/minuto.
- 2) Sobrenadante de *C. paurometabolum* cepa C-924 a 10¹⁰ UFC/mL: cultivo en medio LB suplementado con quitina coloidal (Sigma) al 0,01 %, centrifugado a 10 000 rpm durante cinco minutos y filtrado por una membrana Milipor de 0,2 µm + un flujo de aire de 20 a 30 mL/minuto.
- 3) Gases (flujo de 20 a 30 mL/minuto) de *C. paurometabolum* cepa C-924, inoculada en un minibiorreactor a 10⁷ UFC/mL, en medio mínimo salino con Cisteína a 1,5 mM.
- 4) Gases de *C. paurometabolum* cepa C-924, inoculada en un minibiorreactor a 10⁷ UFC/mL, en medio mínimo salino con Alanina a 1,5 mM.
- 5) Sobrenadante de *C. paurometabolum* cepa C-924 a 10¹⁰ UFC/mL: obtenido a partir del cultivo en medio LB suplementado con quitina coloidal (Sigma) al 0,01 %, centrifugado a 10 000 rpm durante cinco minutos y filtrado por una membrana Milipor de 0,2 µm + gases (flujo de 20 a 30 mL/minuto) de *C. paurometabolum* cepa C-924, en un minibiorreactor a 10⁷ UFC/mL, en medio mínimo salino con Cisteína a 1,5 mM.
- 6) Gases (flujo de 20 a 30 mL/minuto) del medio mínimo salino con Cisteína a 1,5 mM, en minibiorreactor sin inocular con *C. paurometabolum* cepa C-924.

7) Testigo (flujo de aire de 20 a 30 mL/minuto).

El minibiorreactor se confeccionó de acuerdo a la descripción de Hernández y col. (2003) (ver ANEXO 2).

- Evaluación y procesamiento estadístico del experimento: el contenido de cada válvula se vertió en placas de 24 huecos para realizar los conteos de juveniles emergidos y huevos no eclosionados (ver ANEXO 3 A). Se empleó un microscopio invertido Olympus. Se aplicó el procesamiento estadístico antes descrito en el epígrafe 2.2.1.

2.5 Experimentos en macetas para el control de *M. incognita* y *R. similis*.

Se seleccionó un suelo tipo “pardo mullido medianamente carbonatado” (Instituto de Suelos, 1999), éste se tamizó por una malla con orificios de 0,5 cm de diámetro, para eliminar partículas indeseables; se mezclaron tres partes de suelo con una parte de arena de río lavada; la mezcla se esterilizó en autoclave vertical durante una hora a 120 °C y 1,02 Kg/cm² de presión (Sambrook y col., 1989) y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se llenaron las macetas de 1,0 L de capacidad.

2.5.1 Evaluación del control de *M. incognita* en el suelo mediante plantas indicadoras.

Para el experimento con plantas indicadoras se seleccionó la calabaza (*Cucurbita moschata* Duch.), por su alta sensibilidad a esta especie de nematodos (Vázquez, 1995). Se efectuó la extracción de ootecas y de huevos del nematodo utilizando el procedimiento antes descrito en el epígrafe 2.2.1.

Se inocularon alrededor de 500 huevos de *M. incognita*, a partir de los extraídos anteriormente, por cada una de las 50 macetas empleadas en el experimento. Seguidamente se efectuó la aplicación de las cepas en estudio a las siguientes concentraciones:

- 1) 100 mL de *Corynebacterium paurometabolum* cepa C-924, 10⁶ UFC/mL.
- 2) 100 mL de *Sphingobacterium spiritivorum* cepa C-926, 5,0 x 10⁷ UFC/mL.
- 3) 100 mL de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-3, 10⁷ esporas/mL.
- 4) 100 gramos del hongo *Paecilomyces lilacinus*, 10⁷ esporas/gramo de medio sólido.
- 5) Testigo: 1 mL del medio Luria Bertani (LB), diluido en 100 mL de agua.

Las macetas se colocaron a 4 000 lux, 12 horas de iluminación y 28 °C. Permanecieron en reposo durante tres días después de inoculados los nematodos y efectuados los tratamientos. Antes del cuarto día, se procedió a sembrar en cada maceta una semilla pregerminada de calabaza. Se continuó con un estricto régimen de riego. Se emplearon cinco tratamientos, con 10 réplicas representadas cada una por plantas de calabaza, sembradas y desarrolladas durante 60 días, se contaron los nódulos en cada planta extraída de la maceta. Se aplicó el procesamiento estadístico antes descrito en el epígrafe 2.2.1.

2.5.2 Experimento con *R. similis* en vitroplantas de banano.

Se emplearon siete tratamientos, en cada caso consistentes en 10 réplicas representadas por una vitroplanta de banano (*Musa* sp. híbrido), cultivar Cavendish. Cada una de las 70 macetas empleadas en este experimento, fue inoculada con 500 especímenes del nematodo *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949; extraídos de raíces de plantaciones de banano Cavendish mediante la técnica tradicional de licuado-tamizado (Araya y col., 1995b).

Se efectuó la aplicación de las cepas en estudio, a las siguientes concentraciones:

- 1) 100 mL de *C. paurometabolum* cepa C-924, 10⁶ UFC/mL.
- 2) 100 mL de *S. spiritivorum* cepa C-926, 5,0 x 10⁷ UFC/mL.

- 3) 100 mL de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3, 10^7 esporas/mL.
- 4) 100 gramos del hongo *P. Lilacinus*, 10^7 esporas/gramo de medio sólido.
- 5) Testigo: 1 mL del medio LB, diluido en 100 mL de agua.
- 6) *B. subtilis* cepa F 16-95, 10^7 esporas/mL.
- 7) Sincocin (McKenry, 1994): 0,1 mL del producto diluido en 100 mL de agua.

Las macetas se colocaron en un cuarto iluminado a 4 000 lux, 12 horas de iluminación y 28 °C. Permanecieron en reposo durante tres días, después de inoculados los nematodos y efectuados los tratamientos, antes del cuarto día se procedió a sembrar en cada maceta una vitroplanta de banano. Se continuó con un estricto régimen de riego. A los cinco meses de iniciado el experimento se registró la cantidad de especímenes de nematodos extraídos de cada planta, para ello se empleó la técnica tradicional de licuado-tamizado (Araya y col., 1995b) y un microscopio invertido para los conteos de especímenes de *R. similis*. Se aplicó el procesamiento estadístico antes descrito en el epígrafe 2.2.1.

2.6 Experimentos en campo.

Para los experimentos con plátano (*Musa* sp. híbrido, cultivar Macho $\frac{3}{4}$) y banano (*Musa* sp. híbrido, cultivar Cavendish), se realizó un estudio previo de la nematofauna de posibles áreas experimentales mediante la técnica de centrifugación-flotación (Jenkins, 1964). Posteriormente se parcelaron los campos más afectados por nematodos y se determinaron las poblaciones mediante muestreos de las raíces en cada parcela, la extracción de los especímenes se realizó mediante la técnica tradicional de licuado-tamizado (Araya y col., 1995a y 1995b). Los diseños experimentales se establecieron teniendo en cuenta a varios autores (Lerch, 1977; Püntener, 1981; Elena y Fernández, 1986) (ver ANEXO 4 A).

2.6.1 Efecto de distintos tratamientos nematicidas sobre las poblaciones de *R. similis* y los rendimientos en plátano Macho $\frac{3}{4}$.

Para el experimento en plátano Macho $\frac{3}{4}$, se seleccionó un área en desarrollo de tres meses de plantada en un suelo tipo “pardo mullido medianamente carbonatado” (Instituto de suelos, 1999), que no presentaba diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$) entre las parcelas trazadas, en cuanto a las poblaciones iniciales (Araya y col., 1995a y 1995b) del nematodo *R. similis* (ver ANEXO 4 A).

Las parcelas fueron marcadas sobre surcos sencillos de 10 plantones, donde cada una de ellas ocupó un área de 60 m². El régimen de riego fue de subsistencia por un sistema de aspersión portátil.

Los tratamientos se aplicaron después de conocerse los resultados del muestreo inicial y se realizó una segunda aplicación a los siete meses, en todos los casos los productos fueron aplicados uniformemente con una regadera, en un radio de 40 cm alrededor del plantón. Los mismos fueron los siguientes:

- 1) 5 L/plantón de *C. paurometabolum* cepa C-924, 10^6 UFC/mL.
- 2) 5 L/plantón de *S. spiritivorum* cepa C-926, $5,0 \times 10^7$ UFC/mL.
- 3) 5 L/plantón de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3, 10^7 esporas/mL.
- 4) 5 L/plantón de una disolución de 8 mL de Fenamifos al 40 % (Gowen, 2001).
- 5) Testigo: 5 L/plantón de una disolución del medio LB en agua, en proporción de 1/1000.

Las cepas en estudio C-924 y C-926, se prepararon para ser aplicadas a los plantones de acuerdo a los parámetros y condiciones establecidas en el epígrafe 2.2.1, a los que se adicionó el cultivo en el biorreactor de cinco litros B. E. Marubichi, con medio de cultivo LB, éste se esterilizó a 121 °C y 1,02 Kg/cm² de

presión, durante 20 minutos (Sambrook y col., 1989). A partir de los cultivos en erlenmeyer se inoculó el biorreactor a 0,05 DO, las fermentaciones a este volumen se realizaron a una velocidad de agitación de 100 rpm, pH = 7,2, a temperatura de 28 °C y 1,0 vvm (flujo de aire por unidad de volumen) de aireación y durante 11 horas.

Para el caso de *B. thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-3, se realizó el conteo de esporas del producto obtenido en el CREE del Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey, se ajustó su concentración a 10^7 esporas/mL, teniendo en cuenta los cálculos en el epígrafe 2.2.1.1.

Se realizaron muestreos de las raíces en cada parcela (Araya y col., 1995a y 1995b) a los dos, cinco, siete, nueve y 12 meses de efectuada la primera aplicación de los tratamientos. También se registraron los rendimientos en Kg por parcelas de todos los tratamientos, durante todo el tiempo de duración del experimento. Se aplicó el procesamiento estadístico antes descrito en el epígrafe 2.2.1.

2.6.2 Efecto de las cepas nematocidas sobre poblaciones de *R. similis* y los rendimientos en banano Cavendish.

Se seleccionó un área en producción de banano Cavendish, de un año de plantada en un suelo tipo “ferrítico rojo oscuro” (Instituto de suelos, 1999), que no presentaba diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$) entre las parcelas trazadas, en cuanto a las poblaciones iniciales (Araya y col., 1995a y 1995b) del nematodo *R. similis* (ver ANEXO 4 A). Las parcelas fueron marcadas sobre surcos dobles de 20 plantones, que representaban un área de 100 m². El régimen de riego fue automatizado por el sistema microjet. Los tratamientos fueron aplicados uniformemente con regadera en un radio de 40 cm alrededor del plantón a las siguientes concentraciones:

- 1) 10 L/plantón de *C. paurometabolum* cepa C-924, 10^6 UFC/mL.
- 2) 10 L/plantón de *S. spiritivorum* cepa C-926, $5,0 \times 10^7$ UFC/mL.
- 3) 10 L/plantón de *B. thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-3, 10^7 esporas/mL.
- 4) Testigo: 10 L/plantón de una disolución del medio LB en agua, en proporción de 1/1000.

No se empleó el tratamiento químico con Fenamifos, por tratarse de un campo en producción donde se corre el riesgo de intoxicación de cualquier persona al consumir los frutos (Gowen, 2001).

Las cepas en estudio C-924, C-926 y LBT-3, se prepararon para ser aplicadas a los plantones de acuerdo a los parámetros y condiciones establecidos para el experimento anterior (epígrafe 2.6.1).

Se realizaron muestreos de las raíces en cada parcela (Araya y col., 1995a y 1995b) a los dos y a los cuatro meses de aplicados los tratamientos. También se registraron los rendimientos en pesos de los racimos en Kg por parcelas de todos los tratamientos, durante seis meses a partir del inicio del experimento. Se aplicó el procesamiento estadístico antes descrito en el epígrafe 2.2.1.

2.6.3 Efecto de *C. paurometabolum* cepa C-924 en tomate afectado por *M. incognita*.

Se seleccionaron seis casas de cultivos (cultivos protegidos), cada una con un área de 378 m², ubicadas en un suelo del tipo “ferrítico rojo oscuro” (Instituto de Suelos, 1999), con grado 5 de afectación por *M. incognita* (Zeck, 1971; Grupo Nacional de Agricultura Urbana, 2000). El cultivo empleado fue tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), variedad FA 180, sometido a los siguientes tratamientos:

- 1) Casas de cultivo # 13 y # 16: se aplicó Dazomet 98 % G a 60 g/m² (Gowen, 2001).

- 2) Casas de cultivo # 5 y # 8: la mezcla empleada para conformar los cepellones (Casanova, 1999), fue regada en proporción de 10 a uno, con una solución de *C. paurometabolum* cepa C-924 a 10^7 UFC/mL. Una semana después se sembraron las semillas de tomate que se desarrollaron durante 22 días hasta el transplante. Los canteros fueron tratados siete días antes del transplante, por el sistema de riego (ferti-riego) con C-924 a 10^6 UFC/mL y a una dosis de 10 L/m^2 , a los 35 días de realizar el primer tratamiento a los canteros (28 días del transplante), se repitió la aplicación.
- 3) Casas de cultivo # 4 y # 7: fue el tratamiento testigo, se aplicaron las medidas orientadas en la Guía técnica para la producción protegida de hortalizas en Casas de Cultivo tropical con efectos de “sombrija” (Casanova, 1999) pero sin la aplicación de Dazomet u otro nematicida.

C. paurometabolum cepa C-924, se preparó de acuerdo a los parámetros y condiciones establecidas para el experimento anteriormente descrito en el epígrafe 2.6.1. La evaluación se realizó mediante muestreos a los 28 y a los 70 días del transplante; para ello se extrajeron y observaron las raíces de las plantas en 10 puntos al azar de cada una de las casas de cultivos y se promediaron los resultados de la determinación del grado de afectación de *M. incognita*, según la escala de seis grados (Zeck, 1971; Grupo Nacional de Agricultura Urbana, 2000). También se cuantificaron las producciones en kg de frutos comerciales por cada casa de cultivo incluida en el experimento.

2.7 Extensión y generalización de HeberNem en los cultivos protegidos.

Los experimentos para la extensión y posterior generalización de HeberNem (formulado líquido de C-924) fueron realizados en casas de cultivos de las provincias Holguín, Camagüey, Ciego de Ávila, Cienfuegos y posteriormente en La Habana.

Los ensayos estuvieron condicionados y amparados por las Licencias de Seguridad Biológica 11/02 y la 33/04 que da continuidad y amplitud a la primera, ambas emitidas por el centro Nacional de Seguridad Biológica. Esta última licencia con vigencia hasta el 31 de mayo del 2006 en las siguientes áreas de liberación:

1. La Jíquima. Holguín.
2. Ceballos. Ciego de Avila.
3. Sierra de Cubitas. Camagüey.
4. Arimao. Cienfuegos.
5. Ceiba. Provincia Habana.

2.7.1 Prevalencia de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 en el suelo y partes de las plantas en cultivos tratados con HeberNem.

2.7.1 Procedimiento para la determinación de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 en el suelo y partes de las plantas en cultivos tratados con HeberNem:

El objetivo de este procedimiento es determinar las concentraciones de la cepa C-924 en muestras de suelos y partes de plantas en todos los experimentos donde se ha aplicado el bionematicida Hebernem.

2.7.1.1 Consideraciones de Seguridad:

- Se usaron batas de laboratorio.
- Todas las manipulaciones microbiológicas se realizaron de forma aséptica en el gabinete de flujo laminar teniendo cuidado de evitar las contaminaciones.

- Todos los materiales a utilizar fueron esterilizados (Sambrook y col., 1989).

2.7.1.2 Equipamiento Empleado:

- Microscopio Estereoscopio.
- Contador de colonias.
- Flujo laminar vertical.
- Balanza técnica de 0,1 g de sensibilidad.
- Cuarto de incubación regulado de 30 a 35 °C.
- Autoclave vertical.
- Medidor de pH.
- Baño termostático regulado a $45 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Zaranda termostática regulada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.7.1.3 Materiales:

- Erlenmeyers de 1000 mL.
- Morteros de 150 a 200 mL.
- Tubos de ensayo de vidrio de 25 mm x 150 mm.
- Probeta de 1 L.
- Placas Petri.
- Puntas Eppendorf de 200 μL y 1 mL
- Micropipetas de 200 μL y 1mL
- Asa bacteriológica.
- Papel kraft.
- Algodón.
- Mechero de gas.
- Espátula de Drigalsky.
- Filtros 0.2 μm MiniSart.
- Tubos eppendorf

2.7.1.4 Reactivos empleados:

	Número de Parte:
Reactivos de Gram	NP 8114
Agar Triptona Soya	NP 8371
Cloruro de sodio	NP 8319
Peptona bacteriológica	NP 8190
Agar Técnico No 3	NP 8387
Hidróxido de sodio	NP 8320
Etanol natural clase B	NP 8571
Agua reactivo tipo II	NP 8475
Triptona	NP 8384

Extracto de levadura	NP 8381
Ampicillina Sal sódica	NP 8200
Kanamicina Sal Sódica	No tiene
Telurito de potasio	No tiene

2.7.1.5 Soluciones empleadas:

2.7.1.5.1 Solución salina peptonada NP 12161

Se pesó 8.5 g de NaCl y 1 g de peptona bacteriológica. Se disolvió en 1000mL de agua destilada, se ajustó el pH de 7 a 7.2 con solución de NaOH 0.1 N. Se dispensó en tubos a razón de 9 ml y en erlenmeyers a razón de 45 mL. Se esterilizó por calor húmedo en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Sambrook y col., 1989). Se conservó la solución a temperatura ambiente no más de 15 días.

2.7.1.5.2 Solución de ampicillina (50 mg/mL) NP 12331:

Se pesó 0.5 g de ampicillina y se disolvió en 10 mL de agua destilada, se esterilizó por filtración (con filtro de 0.2μ) y se distribuyó en tubos eppendorf a razón de 1 mL por tubo. Se conservó a 4 °C hasta su uso.

2.7.1.5.3 Solución de Kanamicina (50 mg/mL) NP 12888:

Se pesó 0.5 g de Kanamicina y se disolvió en 10mL de agua destilada, se esterilizó por filtración (con filtro de 0.2μ) y se distribuyó en tubos eppendorf a razón de 1 mL por tubo. Se conservó a 4 °C hasta su uso.

2.7.1.5.4 Solución de Telurito de potasio (5 %):

Se pesó 5 g de Telurito de potasio y se disolvió en 100mL de agua destilada, se esterilizó por filtración (con filtro de 0.2μ) y se distribuyó en tubos eppendorf a razón de 1 mL por tubo. Se conservó a 4 °C hasta su uso.

2.7.1.6 Medio de cultivo LB (Luria Bertani) selectivo:

Se pesó 10 g de Triptona, 10g de NaCl , 5g de Extracto de Levadura y 15g de Agar Técnico N°3, se añadieron 1000 mL de agua destilada, se homogenizaron los componentes agitando. Se ajustó el pH entre 7.2 y 7.4 con una solución de NaOH 0.1 N con la ayuda del pH metro. Se dispensó en alícuotas de 500 mL en erlenmeyers de 1000 mL. Se esterilizó por calor húmedo en autoclave a 121°C, 1 atmósfera, durante 20 minutos (Sambrook y col., 1989). Se colocó en baño de agua regulado a 45°C. Cuando el medio se encontró a 45 °C aproximadamente se suplementó con las soluciones de los antibióticos Kanamicina y Ampicillina a una concentración de 50μg/ml, además se incorporó Telurito de Potasio al 0,0025 %. Se agitó suavemente para homogeneizar. Se dispensó el medio en placas de Petri.

2.7.1.7 Procedimiento:

1. Se preparó la muestra teniendo en cuenta que: si es suelo deben mezclarse y homogenizarse todas las submuestras. En el caso de muestras de hojas, tallos, frutos o cualquier parte de la planta, se deben macerar todas las submuestras en un mortero previamente esterilizado (Sambrook y col., 1989) y homogenizar el material.
2. Se pesó 5 gramos de la muestra previamente homogenizada en la balanza técnica y se inoculó en un erlenmeyer con 45 mL de solución salina peptonada, ésta es la dilución 10^{-1} .
3. Se incubó a 30°C y 250 rpm durante 1 hora en agitación.
4. A partir de la suspensión se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-2} hasta 10^{-4} (y más en algunos casos) tomando 1 mL de la primera dilución y añadiéndolo en tubos con 9 mL de solución salina peptonada estéril.

5. Se sembraron 100 μ L sobre la superficie de 5 placas para cada dilución de las tres últimas diluciones dispersando con espátula de Drigalsky en el medio LB Selectivo.
6. Se incubó el medio a 30°C durante 4 días.
7. Se observó la morfología de las colonias al estereoscopio entre 3 y 4 días, teniendo en cuenta que en medio LBS aparecen colonias circulares, pequeñas, de aproximadamente 1.5 a 1.8 mm de diámetro, de color negro brillante con un halo blanco alrededor y que no liberan pigmentos al medio, con bordes enteros, elevación abultada o convexa, superficie lisa y consistencia grasosa. Las anteriores son las colonias características de la cepa C-924 en este medio.
8. Se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) con las características de esta bacteria presentes en las placas, escogiendo la dilución donde el número de UFC por placa estaba entre 30 y 300 y donde se apreció el crecimiento homogéneo respecto a la morfología y apariencia de las colonias.
9. Se determinó en la dilución seleccionada para el conteo el valor medio de viables, sumando los valores de UFC obtenidos y dividiendo entre 5. Se multiplicaron los resultados de los conteos por 10 y por el inverso de la dilución donde realizó el conteo. Se expresaron los resultados en UFC por mL. Se determinó el coeficiente de variación en cada conteo como criterio de veracidad de los datos.
10. Se estableció que el valor del coeficiente de variación no debía exceder el 20%. Cuando esto ocurrió, se invalidó el ensayo y se repitió el procedimiento.
11. Se Multiplicó por 3 el resultado de la viabilidad, para ajustar la viabilidad obtenida al valor real. (Esto es necesario ya que los medios selectivos sólo recuperan un por ciento del total de células existentes en la solución y para este en particular se ha determinado que este es el coeficiente por el que hay que multiplicar el valor obtenido para aproximarlos al valor real).

Para los conteos de microorganismos totales en el suelo, se empleó el mismo procedimiento pero sólo con el medio LB sin los antibióticos (Ampicillina y Kanamicina) y sin añadir Telurito de potasio. Estos conteos registraron todas las colonias (de cualquier microorganismo que creció entre las 24 horas y los 4 días).

2.7.2 Experimentos en casas de cultivos de la Empresa Citrícola “La Jíquima”, Holguín:

Se iniciaron los experimentos de campo desde el mes de marzo del 2002.

2.7.2.1 Primer experimento:

El cultivo evaluado fue el tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Var. FA-150. Se utilizó una casa de cultivos protegidos de 900 m² (0.09 ha) divididas en 16 parcelas. Se emplearon dos dosis de HeberNem (C-924) a 4L/ha y 10 L/ha aplicadas 7 días antes del transplante, un tratamiento químico (Basanid a 600 Kg/ha) y un testigo (sin tratamiento nematicida).

El tratamiento de HeberNem se realizó mediante una bomba auxiliar al sistema de riego localizado (goteo) con una norma de entrega total de 1 L por metro cuadrado y de acuerdo a los parámetros establecidos para el fertiriego en los cultivos protegidos (Casanova, 1999).

Se realizaron muestreos de suelos consistentes en tomar 10 submuestras al azar dentro de cada parcela, de aproximadamente 5 g de suelo en la zona de la rizosfera de las plantas a una profundidad entre 3 y 15 cm, las submuestras se mezclaron y constituyeron muestras de aproximadamente 50 g representativas de cada parcela, las mismas se tomaron en los tiempos: 0 días (una hora después de la aplicación), 7, 38, 60 y 90 días.

A los 60 y a los 90 días se tomaron muestras al azar del follaje y los frutos, consistentes en 10 submuestras por cada parcela, de aproximadamente 5 g de porciones de hojas en un caso y frutos en otro caso. Las submuestras en cada caso se mezclaron (por maceración en un mortero estéril) conformando dos muestras representativas de la parcela de aproximadamente 50 g de follaje y 50 g de frutos.

Las muestras fueron trasladadas y procesadas en el laboratorio de acuerdo a los procedimientos antes descritos en el inciso 2.1.

2.7.2.2 Segundo experimento en “La Jíquima”:

Se desarrolló en un diseño experimental de cuatro réplicas en dos casas de cultivos de 0.09 ha cada una, sembradas de tomate con dos tratamientos:

- 1.- Una aplicación de HeberNem (C-924) a razón de 10 L/ha, 7 días antes del transplante y
- 2.- Basamid (Dazomet) a 600 kg/ha.

El tratamiento de HeberNem se realizó mediante una bomba auxiliar al sistema de riego localizado (goteo) con una norma de entrega total de 1 L por metro cuadrado y de acuerdo a los parámetros establecidos para el fertiriego en los cultivos protegidos (Casanova, 1999).

Se realizaron muestreos de suelos consistentes en tomar 10 submuestras al azar dentro de cada parcela, de aproximadamente 5 g de suelo en la zona de la rizosfera de las plantas a una profundidad entre 3 y 15 cm, las submuestras se mezclaron y constituyeron muestras de aproximadamente 50 g representativas de cada parcela, las mismas se tomaron en los tiempos: 0 días (una hora después de la aplicación), posturas, 7, 50, y 90 días.

A los 50 y a los 90 días se tomaron muestras al azar del follaje y los frutos (flores a los 50 días) en algunos casos, consistentes en 10 submuestras por cada parcela, de aproximadamente 5 g de porciones de hojas en un caso y frutos en otro caso. Las submuestras en cada caso se mezclaron (por maceración en un mortero estéril) conformando dos muestras representativas de la parcela de aproximadamente 50 g de follaje y 50 g de frutos. Las muestras fueron trasladadas y procesadas en el laboratorio de acuerdo a los procedimientos antes descritos en el inciso 2.1.

2.7.2.3 Tercer experimento en “La Jíquima”:

En este experimento se realizaron tres aplicaciones de HeberNem (esquema actual de tratamiento) en una casa completa: la número 20 (0.09 ha, tomate) de la brigada 2. Las aplicaciones se realizaron en los siguientes momentos:

- a los 7 días antes del transplante de las posturas de tomate,
- la segunda 21 días después de la primera y
- la tercera a los 21 días de la segunda.

Hasta los 150 días se muestreó el suelo de la casa de cultivos, tomando 10 submuestras al azar de la rizosfera (ver incisos 2.2.1 y 2.2.2) en los siguientes momentos:

- siete días antes del transplante (una hora después de la primera aplicación),
- 36 días después del transplante (una hora después de la tercera aplicación),
- 60 días después del transplante,
- a los 90 días,
- a los 120 días y

- a los 150 días.

Se realizaron muestreos paralelos en la casa de cultivos 21 (aledaña a la 20) donde se empleó como tratamiento nematocida el producto químico biocida Basamid (Dazomet).

Las hojas fueron muestreadas (ver incisos 2.2.1 y 2.2.2) en toda la casa pero teniendo en cuenta que las hojas inferiores, intermedias y apicales fuesen independientes y en los momentos de 60, 90 y 120 días.

Los muestreos en frutos (ver incisos 2.2.1 y 2.2.2) se realizaron teniendo en cuenta el peine de frutos próximo a ser cosechado y en los siguientes momentos: a los 60 días (1er y 2do peines), 90 días (3er y 4to peines) y 120 días (5to y 6to peines)

Para la primera y la segunda aplicación de HeberNem se empleó una mochila con la solución del producto. En la primera se aplicaron 50 mL en cada hueco donde a los 7 días se transplantarían las posturas y en la segunda 70 mL alrededor del cuello de la raíz de cada planta.

La tercera aplicación de HeberNem y el procedimiento para los muestreos se realizó de acuerdo a lo anteriormente descrito en los epígrafes 2.2.1 y 2.2.2.

En este experimento también se estudió la microflora total del suelo, sembrando las muestras en medio LB (no selectivo) donde se realizaron los conteos de las colonias totales que aparecieron en los diferentes momentos en las casas # 20 (tratada con HeberNem) y # 21 (tratada con Basamid).

2.7.2.4 Extensión de campo realizada en las casas de cultivos de la Empresa Citrícola “La Jíquima”:

Durante la extensión del producto HeberNem en las casas de cultivos de “La Jíquima”, se realizaron muestreos del suelo, hojas y frutos en las siguientes casas de cultivos:

- Casa 20 B1 (0.04 ha, Melón de castilla)
- Casa 18 B1 (0.04 ha, Melón de castilla)
- Casa 17 B1 (0.04 ha, Melón de castilla)
- Casa 19 B1 (0.04 ha, Melón de castilla)
- Casa 22 (0.09 ha, Tomate HA 3105)
- Casa 23 (0.09 ha, Tomate HA 3105)
- Casa 12 (0.09 ha, Pimiento Dember)
- Casa 13 (0.09 ha, Pimiento Dember)

En las casas sembradas con melón y tomate se realizaron tres aplicaciones (ver epígrafe 2.2.3) y en el pimiento además se realizó una cuarta aplicación de HeberNem a los 21 días posteriores a la tercera.

Los momentos de los muestreos foliares se hicieron coincidir con la aparición de los primeros frutos en todos los casos.

Los restantes procedimientos para los muestreos se realizaron de acuerdo a lo anteriormente descrito en los epígrafes 2.2.1 y 2.2.2.

2.7.3 Experimento en casas de cultivos de la Empresa Citrícola “Sierra de Cubitas”, Camagüey:

El esquema de aplicación de HeberNem y los métodos empleados en los muestreos fueron los mismos que los antes se descritos en los incisos 2.2.1 y 2.2.2.

En este experimento se emplearon dos casas de cultivos de 0.09 ha (ambas sembradas con Tomate var. HA 3108), donde las muestras fueron tomadas de las siguientes fuentes:

- sustrato del semillero tratado con HeberNem,

- suelo aledaño al semillero no tratado,
- posturas de tomate tratadas (antes del transplante),
- posturas no tratadas (antes del transplante),
- suelo hojas, tallos y frutos de la casa 14 tratada con HeberNem,
- suelo no tratado de la casa 14,
- suelo hojas, tallos y frutos de la casa 25 tratada con Hebernem y
- suelo no tratado de la casa 25.

Los momentos de los muestreos fueron:

- una hora después de la primera aplicación de HeberNem,
- antes de la segunda aplicación y
- una hora después de la segunda aplicación.

Los frutos sólo se muestrearon después de la segunda aplicación de HeberNem, justamente cuando comenzaron a formarse a partir de las primeras flores.

2.7.4 Experimento en casas de cultivos de la Empresa Citrícola “Arimao”, Cienfuegos:

El esquema de aplicación de HeberNem y el método empleado en los muestreos se describen anteriormente en los incisos 2.2.1 y 2.2.2.

Se estudiaron dos casas de cultivos: la casa T2 (Melón de Castilla, 0.09 ha) de Cumanayagua y la casa 9 (Tomate var. FA572, 0.09 ha) del plan frutales (Cienfuegos).

Para este experimento las muestras fueron tomadas de las siguientes fuentes:

- sustrato del semillero de la casa T2 (Cumanayagua) tratado con HeberNem,
- suelo aledaño al semillero no tratado,
- posturas de tomate tratadas en el semillero de la casa T2 (antes del transplante),
- suelo hojas, tallos y frutos de las casas T2 y 9, tratadas con HeberNem,
- suelo no tratado de las casas T2 y 9,
- suelo hojas, tallos y frutos de las casas T2 y 9 tratadas con Hebernem y
- suelo no tratado de las casas T2 y 9.

Los momentos de los muestreos fueron:

- una hora después de la primera aplicación de HeberNem,
- antes de la segunda aplicación,
- una hora después de la segunda aplicación.
- antes de la tercera aplicación y
- una hora después de la tercera aplicación.

Los frutos se muestrearon antes y después de la tercera aplicación de HeberNem, en un estadio inicial de desarrollo.

2.7.5 Determinación de la efectividad técnica de HeberNem en los cultivos protegidos.

Los materiales y métodos empleados en los diseños de los experimentos se describen anteriormente en los epígrafes 2.7.2 hasta 2.7.4.

Se determinó la Efectividad Técnica (% ET) del bionematicida en el control de fitonematodos parásitos (*Meloidogyne* spp) según las siguientes fórmulas:

Determinación de la Efectividad Técnica (% **ET**¹) para casas de cultivos con antecedentes de infestaciones bajas y medias (por debajo del 50 % de infestación y/o gradología promedio hasta 2)

Fórmula Abbott:

% **ET**¹ = (1 - **Id/Ia**) x 100, donde:

Ia es el % de infestación en el ciclo del cultivo precedente,

Id es el % de infestación en el ciclo del cultivo donde se aplicó HeberNem.

Determinación de la Efectividad Técnica (% **ET**²) para casas de cultivos con antecedentes de infestaciones altas y muy altas (por encima del 50 % de infestación y/o gradología promedio de 3, 4 y 5)

Fórmula Abbott:

% **ET**² = (1 - **Md/Ma**) x 100,

donde:

Ma es el número de plantas muertas por nematodos en el ciclo del cultivo precedente,

Md es el número de plantas muertas en el ciclo del cultivo donde se aplicó HeberNem.

Determinación de la Efectividad Técnica (% **ET**³) para casas de cultivos donde se conocen los grados de afectación por cada planta muestreada (para cualquier % de infestación y/o gradología)

Fórmula Townsend-Heuberger:

Para calcular **Ia** e **Ib** = $\sum_{0}^{5} (n.v) / (5 \times N)$,

donde:

n.v: número de plantas en cada grado multiplicado por el grado correspondiente,

N: plantas evaluadas en total,

entonces aplicar la siguiente fórmula:

Fórmula Abbott:

% **ET**³ = (1 - **Id/Ia**) x 100

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento e identificación de colonias de bacterias a partir de muestras del suelo.

Se aislaron 158 colonias de bacterias de la rizosfera de plántones de plátanos (*Musa* sp. híbrido, cultivar Macho) vigorosos y poco afectados por nematodos (identificados como A, B, C y D); estos aislados diferían en su morfología de los obtenidos en las muestras de los plántones afectados por nematodos (identificados como W, X, Y y Z). Para ello se hicieron observaciones de la morfología de más de 1 000 colonias de bacterias, aisladas de cuatro lotes de muestras.

El método empleado para el aislamiento de las bacterias del suelo fue similar a otros existentes en la literatura (Seeley y col., 1991), pero en cuanto a los resultados obtenidos no existen precedentes de trabajos con estas características, ya que generalmente se emplean técnicas que van dirigidas al aislamiento de un género o una especie de microorganismo específico (Mark, 1987; Spiegel y col., 1991; Davies y Danks, 1992; Jaffee, 1992; Toda y Matsuda, 1993; Chet e Invar, 1994; Kerry, 1995; Sikora, 1995; Dunne y col., 1996; Utkhede, 1996; Ongena, 1999; Larsen, 2000; Sanyal, 2000).

De las 158 colonias inicialmente codificadas se seleccionaron sólo seis que mostraron actividad biológica sobre huevos y juveniles (j2) de *M. incognita* en experimentos preliminares *in vitro*. Estos aislados fueron identificados con los códigos: A-241, A-702, B-813, C-924, C-926 y D-1035.

- Identificación del aislado bacteriano C-926 con actividad nematicida: Cocobacilo Gram negativo, identificado por el sistema API 20 NE (BioMérieux, 1992a). El número de identidad correspondiente fue 0462304, que se corresponde con *Sphingobacterium spiritivorum*, siendo denominado como: *S. spiritivorum* cepa C- 926. Los resultados fueron confirmados con el manual Bergey's (Holt y col., 1994).

- Identificación del aislado bacteriano C-924 con actividad nematicida:
Bacilo corto Gram positivo. Como primer paso para su identificación se empleó el sistema de API 50 CH (BioMérieux, 1992b), de acuerdo a los resultados se ubicó como una especie de bacteria perteneciente al género *Corynebacterium*. Para determinar la especie se empleó el sistema API Coryne (BioMérieux, 1992c). El número de identidad resultó ser 6000004, que se corresponde con *Corynebacterium paurometabolum* (Steinhaus, 1941), siendo denominado como: *C. paurometabolum* cepa C- 924. Para confirmar los resultados de la identificación de esta bacteria, también se empleó el manual Bergey's (Holt y col., 1994).

La posición taxonómica de la bacteria *Corynebacterium paurometabolum* antes de definirse el género *Tsukamurella*, estuvo sujeta a una amplia controversia (Collins y col., 1988). Fue aislada por primera vez, de ovarios de chinches de cama (*Cimex lectularis*) (Steinhaus, 1941), y su distinción fundamental del resto de las corynebacterias está en que posee largas cadenas de ácidos micólicos (68-76 átomos de Carbono) altamente insaturados. Actualmente, junto con *Gordona aurantiaca* y *Rhodococcus aurantiacus* constituyen la especie *Tsukamurella paurometabola*. Estos microorganismos producen sulfuro de hidrógeno. Se han aislado cepas del suelo, esputos humanos, micetomas y de insectos (Holt y col., 1994). Granel y col. (1996), describieron la especie *Tsukamurella paurometabola* (*Corynebacterium paurometabolum*) como un bacilo aerobio Gram positivo, ligeramente resistente a ácidos, inmóvil, que puede ser aislada del suelo. Las

descripciones de los autores anteriores coinciden con las observaciones y los resultados de las pruebas que se realizaron para identificar la cepa C-924.

En lo sucesivo se emplearán indistintamente ambos nombres, o sea: *Corynebacterium paurometabolum* o *Tsukamurella paurometabola* ya que en un inicio se trabajó con el primero y posteriormente se adoptó definitivamente el segundo. También ha sido reivindicada con el primer nombre por sus propiedades nematocidas en una patente (Mena y col., 1996a). En la actualidad, los bancos y colecciones de microorganismos aceptan esa sinonimia (ATCC, 2003), debido en gran medida a lo controvertido que ha resultado la clasificación de esta bacteria en particular (Collins y col., 1988; Holt y col., 1994).

- Identificación de los aislados bacterianos A-241, A-702, B-813 y D-1035: Los aislados A-241 y A-702 pertenecen al género *Staphilococcus*, donde se encuentran clasificados varios patógenos al ser humano (Holt y col., 1994), además de estar ubicadas en el grupos de riesgo 3 (ATCC, 2003), por ello no se continuó su identificación hasta especie. Los aislados D-1035 y B-813 tampoco fueron identificadas hasta especie ya que fueron menos efectivas en el control de la eclosión de huevos de nematodos en experimento *in vitro* desarrollado paralelamente a la identificación.

Las seis colonias inicialmente seleccionadas para ser sometidas a estudios, fueron identificadas en los siguientes géneros y especies: *Staphilococcus* sp. cepa A-241, *Staphylococcus* sp. cepa A-702, *Bacillus* sp. cepa B-813, *Pseudomonas* sp. cepa D-1035, *Sphingobacterium spiritivorum* cepa C-926 y *Corynebacterium paurometabolum* cepa C-924.

3.2 Determinación de la actividad nematocida de las colonias de bacterias aisladas.

3.2.1 Experimentos *in vitro*.

- Experimento *in vitro* con huevos de *M. incognita*: los resultados de la eclosión de los huevos a los siete días de montado el experimento se muestran en la figura 1 (ver estadística en el ANEXO 5 B).

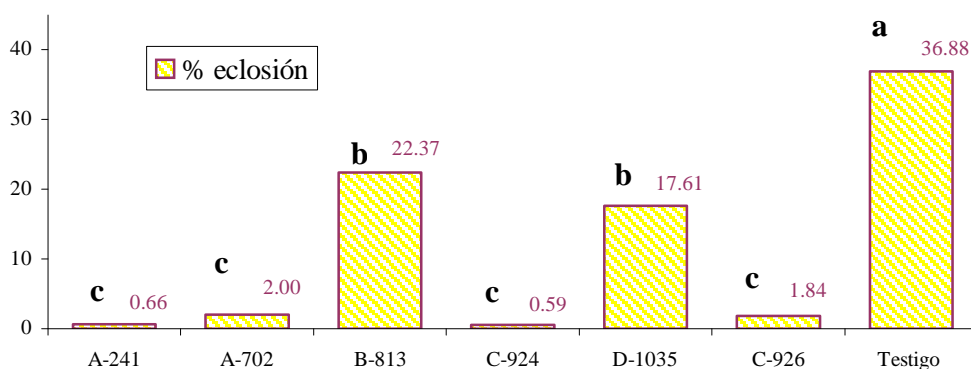


Figura 1. Eclosión de los huevos de *M. incognita* a los siete días de interacción con las cepas inicialmente seleccionadas. Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

Cuatro de las cepas: A-241, A-702, C-924 y C-926, tienen un efecto inhibitorio de la eclosión de huevos, significativamente superior a las cepas B-813 y D-1035. Se decidió continuar investigando el efecto sobre los nematodos sólo con las cepas C-924 y C-926 por las siguientes razones:

- 1) *C. paurometabolum* no presenta riesgo biológico al pertenecer al grupo 1; *S. spiritivorum* pertenece al grupo 2, por lo que ambos casos tienen menor riesgo biológico que *Staphilococcus* sp., que pertenece al grupo 3 (ATCC, 2003).

2) *C. Paurometabolum* C-924 y *S. Spiritivorum* C-926, presentaron mayores posibilidades que las restantes cepas para ser crecidas en medios de cultivos convencionales como el LB (Mena y col., 1996a y 1996b).

- Experimento *in vitro* con juveniles de *M. incognita*: En la figura 2 se muestran los resultados de las evaluaciones realizadas a las 48 horas mediante el conteo de los juveniles vivos en cada una de las ocho réplicas de los 13 tratamientos (ver estadística en el ANEXO 5 C).

El tratamiento con *C. paurometabolum* cepa C-924, resultó significativamente superior a todos los restantes. *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3 fue el segundo tratamiento en cuanto a efectividad en el control de juveniles, sólo superado por C-924 (ver ANEXO 5 A y C). *S. spiritivorum* cepa C-926 fue superado por los dos tratamientos anteriores y no tuvo diferencias significativas con respecto a *B. thuringiensis* var. *israeliensis* “Bactimos WP” y CIGB-9499 pero fue más efectivo que el resto de los tratamientos, por ello lo consideramos como el tercer tratamiento en cuanto a su efectividad sobre juveniles (j2) de *M. incognita*.

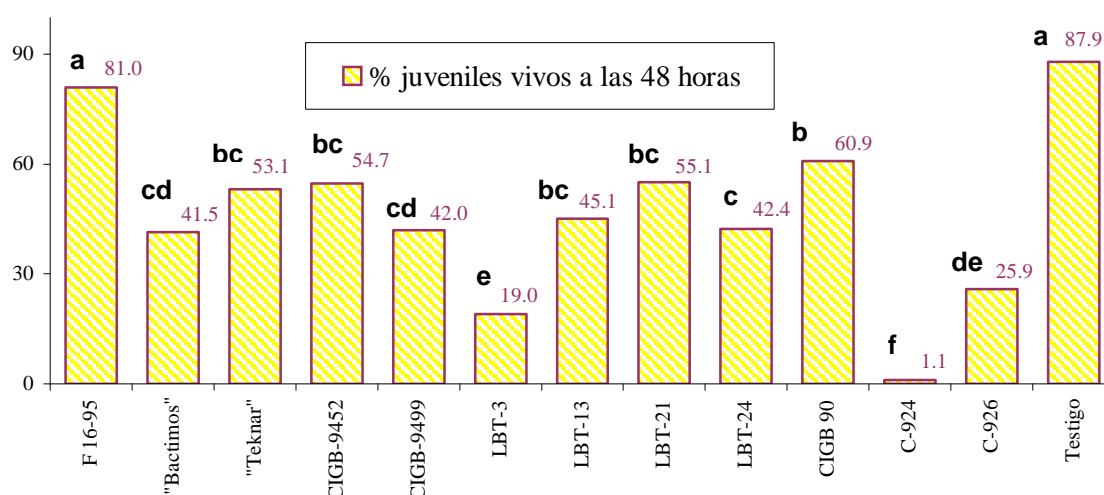


Figura 2. Porcentajes de juveniles vivos de *M. incognita* a las 48 horas de interacción con los 12 biopreparados y el testigo. Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

El efecto nematocida de las restantes cepas de *B. thuringiensis* empleadas en el experimento, se correspondió con los resultados de otros autores (Bone y col., 1987; Bottjer y Bone, 1987; Bone y col., 1988; Bone, 1989; Meadows y col., 1989; Wharton y Bone, 1989; Poinar y col., 1990; Entwistle y col., 1993; Zuckerman y col., 1993; Borgonie y col. 1995; Sharma, 1995), en cuanto a los diferentes niveles de efectividad que han sido reportados para distintas variedades y cepas de esta especie de bacteria.

B. subtilis cepa F 16-95 no presentó diferencias significativas con el testigo (sin tratamiento).

3.2.1.1 Cálculo de las concentraciones letales (CL50 y CL95) de las cepas en estudio.

En la tabla 1 se comparan los resultados obtenidos en el cálculo de las CLs con el empleo del método de Reed y Muench (1938) y el análisis de regresión Probit del programa SPSS 8.0 (ver ANEXO 5 D).

Tabla 1. Concentraciones letales (CL50 y CL95) calculadas para las cepas en estudio.

Cepas en estudio:	CL50 (Reed y Muench)	Regresión Probit (SPSS 8.0)	
		CL50	CL95
1) LBT-3 esporas/mL	$8,02 \times 10^5$	$1,149 \times 10^7$	$6,612 \times 10^7$
2) C-926 UFC/mL	$1,60 \times 10^6$	$1,687 \times 10^7$	$8,324 \times 10^7$
3) C-924 UFC/mL	$6,89 \times 10^4$	$5,014 \times 10^5$	$3,996 \times 10^6$

El análisis de regresión Probit (ver ANEXO 5 D) fue una herramienta de mayor confiabilidad estadística, además el método de Reed y Muench (1938) no está concebido para realizar el cálculo de la CL95.

C. paurometabolum cepa C-924, manifestó el mejor comportamiento en el control de juveniles de *M. incognita*, seguido por *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3 y *S. spiritivorum* cepa C-926.

La magnitud de la actividad nematocida de las tres cepas en estudio (CL50 y CL95) se corresponde con los resultados anteriormente mostrados en la figura 2; en todos los casos *C. paurometabolum* cepa C-924 tuvo mayor efectividad en el control de nematodos, que las restantes cepas.

Las CL50 y CL95 calculadas (tabla 1), se tuvieron en cuenta para los experimentos posteriores *in vitro*, en macetas y de campo. No se tomaron exactamente las CL95 calculadas para 48 horas sobre juveniles de *M. incognita*, puesto que en las condiciones reales del suelo, la interacción bacteria-nematodo, ocurre durante varios días o semanas y sobre todos los estadios de los nematodos. También se consideraron otros aspectos lógicos como es el caso de *B. thuringiensis* cepa LBT-3, donde se tuvo en cuenta que en un proceso productivo resultaría difícil ajustar los tratamientos a la CL95 antes calculada ($6,612 \times 10^7$ esporas/mL). Teniendo en cuenta lo anteriormente discutido, se establecieron como patrones experimentales las siguientes concentraciones para cada cepa:

- 1) *C. paurometabolum* cepa C-924: $1,00 \times 10^6$ UFC/mL.
- 2) *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3: $1,00 \times 10^7$ esporas/mL.
- 3) *S. spiritivorum* cepa C-926: $5,00 \times 10^7$ UFC/mL.

Los resultados de todos los experimentos *in vitro* confirmaron las mayores posibilidades de *C. paurometabolum* cepa C-924, para el control de nematodos con respecto a las restantes cepas en estudio, por ello se le dio prioridad para estudiar su mecanismo de acción.

3.3 Cambios ultraestructurales en huevos y juveniles de nematodos asociados a la acción de *C. paurometabolum* cepa C-924.

Las observaciones por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) se centraron en los posibles mecanismos de acción de los microorganismos sobre los nematodos (Bone y col., 1987; Bottjer y Bone, 1987; Bone y col., 1988; Meadows y col., 1989; Wharton y Bone, 1989; Poinar y col., 1990; Rodríguez y col., 1991; Zuckerman y col., 1993; Borgonie y col., 1995; Sharma, 1995; Current Dregs Patents, 2002). También se tuvieron en cuenta las posibilidades de que existiese un mecanismo de acción por depredación o parasitismo (Davies y Danks, 1992; Gronvold y col., 1993; Waller y Faedo, 1993a; Waller y Faedo, 1993b; Segers y Butt, 1994; Kerry, 1995; Sikora, 1995; Fernández y col., 1997; Larsen, 1999 y 2000; Sanyal, 2000; Holland, 2001; Current Dregs Patents, 2002). También se valoró la posible acción de enzimas (Rodríguez-Kábana, 1991; Spiegel y col., 1991; Mansfield y col., 1992; Toda y Matsuda, 1993; Suslow y Jones, 1994; Morgavi y Sakurada, 1996; Schrempf, 1996; Fukamizo y Brzezinski, 1997; Suslow y Jones, 1998).

3.3.1 Cambios ultraestructurales en huevos y juveniles de *Haemonchus contortus* asociados a la acción de *C. paurometabolum* cepa C-924.

- Cambios ultraestructurales en huevos de *H. contortus*:

Desde las 12 horas de iniciado el tratamiento con C-924 se detectaron alteraciones en los huevos de *H. contortus* sometidos a la acción de la bacteria (ver ANEXO 6 A). Determinados espacios vacuolares separaron la capa lipídica y la de quitina, ocupando regiones que anteriormente contenían lípidos, se manifestaron procesos degradativos en estas áreas. Muy ligados a estos espacios se observaron numerosas evaginaciones producidas en la capa externa de los huevos, lo cual aparece como el principal daño que sufre

la misma. Después de 24 horas de tratamiento con C-924 se hicieron más evidentes los efectos antes observados. Las evaginaciones se hacen más numerosas y continuas, aumentando así la deformación que sufre la capa externa (ver ANEXO 6 B).

A las 48 horas los huevos no sometidos a la acción de la bacteria mostraron un mayor grado de desarrollo, caracterizado por cambios intracelulares ocurridos en el citoplasma de los mismos y la aparición de algunas células del embrión en formación y con estructuras celulares definidas. Se observó retraso en el desarrollo de los huevos tratados en comparación con los testigos y al mismo tiempo se produjo la penetración de la capa lipídica en el interior de los espacios vacuolares formados en las áreas donde también ocurrieron las evaginaciones (ver ANEXO 6 C).

Mansfield y col. (1992), sometieron huevos de *Haemonchus contortus* a la acción de distintas enzimas (proteasas, colagenasas y quitinasas) y establecieron en sus resultados que existen determinadas acciones de las mismas sobre esta capa. Ellos demostraron que la exposición a la quitinasa depauperó los componentes fibrosos de la región media de la capa y finalmente que la colagenasa no tuvo efectos apreciables.

En nuestro estudio no se observaron los mismos efectos descritos anteriormente, ello indica que C-924 no fundamenta su efecto en una actividad enzimática simple, por lo que pudieran estar involucradas varias enzimas o metabolitos en su mecanismo de acción sobre los huevos de los nematodos.

Bone y col. (1987), demostraron cómo se altera la permeabilidad a través de la pared de huevos de *Trichostrongylus colubriformis* al interactuar con las toxinas de *B. thuringiensis* var. israeliensis. La alteración de la permeabilidad, producto de los daños que sufren las capas de la pared de los huevos, y que según Bone y col. (1987), podría inducir cambios inapropiados en su osmoticidad o flujo iónico.

En el otro sentido está la presencia de los espacios vacuolares, lo que manifiesta una posible muerte por asfixia. Estos espacios parecen contener gases. La producción de gases y efectos nematocidas fue observada en las plantaciones de arroz de Luisiana donde se comprobó la asociación entre la presencia de *Desulfotribrio desulfuricans*, la producción de sulfuro de hidrógeno y el descenso en las poblaciones de fitonematodos (Rodríguez-Kábana y col., 1965).

Los sulfuros, al igual que otros metabolitos producidos por ciertas bacterias del suelo, son inhibidores de la cadena de transporte de electrones en la respiración de los organismos aerobios. Estos bloquean el paso entre el citocromo aa₃ y el O₂ (Rodríguez-Kábana, 1991).

La disminución en la eclosión de los huevos de nematodos al interactuar con *C. paurometabolum* cepa C-924, puede estar condicionados por las dos afectaciones fundamentales observadas mediante la técnica de MET: debilitamiento de la pared de los huevos (evaginaciones) y la aparición de vacuolas.

- Cambios ultraestructurales en juveniles de *H. contortus*:

En este experimento se logró observar juveniles emergidos de huevos previamente tratados con la bacteria donde se aprecia una interrupción en la continuidad estructural de la cutícula en determinadas zonas. Es evidente que las alteraciones observadas, están relacionadas con la composición química de la cutícula de los juveniles. (ver ANEXO 6 D).

Bird, (1971) describió que la composición química de la cutícula de los juveniles de los nematodos, además de agua, es fundamentalmente de proteínas con trazas de carbohidratos y lípidos. Este autor también sugirió que al colágeno es la proteína fundamental de la cutícula, específicamente de la capa media y la capa basal

de la misma. Fetterer y Urban (1988) llegaron a la misma conclusión, cuando emplearon determinados anticuerpos específicos contra proteínas sensibles a colagenasas que reaccionaron con la capa basal y la capa media pero no así con la capa cortical externa de juveniles en tercera (j3) y cuarta etapa (j4) de desarrollo de *Ascaris suum*, demostrándose la presencia de colágeno en estas capas.

Existe presencia del colágeno durante las cuatro etapas en juveniles de *Caenorhabditis elegans* (Liu y col., 1995; Johnstone y Barry, 1996). Fetterer y Urban (1988) señalaron que existen diferencias dependientes de la etapa juvenil en cuanto a la composición química de la cutícula en este nematodo. En el caso de *Haemonchus contortus* los exoesqueletos aislados de los estadios juveniles presentaron determinada sensibilidad a las colagenasas, a diferencia de la cutícula de los organismos adultos (Rhoads y Fetterer, 1990).

Estos investigadores coincidieron con Bird (1971), en que el colágeno es la proteína de mayor abundancia en la cubierta externa de los nematodos. De hecho se han aislado varios tipos de colágenos de la cutícula que son codificados por una amplia familia de genes que permiten una expresión ordenada de los mismos. En *Caenorhabditis elegans* esta familia consiste entre 50-150 miembros (Levy y Kramer, 1993).

Por otro lado, existen especies de bacterias con actividad colagenasa, incluyendo el género al que pertenece *C. paurometabolum* cepa C-924. Labadie (1990) estudió la producción de colagenasas por *Corynebacterium rathayii*. Otros trabajos informan sobre la obtención de inhibidores de estas enzimas aisladas de *Corynebacterium rathayii* (Dive y Yiotakis, 1992; Yiotakis y Lecoq, 1994).

La acción de colagenasas bacterianas sobre el colágeno de la cutícula de nematodos fue reportada por Fujimoto (1975), quien demostró los daños provocados por la enzima aislada del *Clostridium histolyticum* sobre *Ascaris lumbricoides*. Resultados similares se obtuvieron por Waite y col. (1980), sobre la cutícula de *Nereis virens* por la acción de una colagenasa de *Vibrio* B-30.

Las observaciones por MET hechas sobre juveniles de *H. contortus* en este estudio, mostraron claramente una interrupción en la continuidad estructural de la cutícula, como consecuencia del tratamiento previo realizado con *C. paurometabolum* cepa C-924. Por todo lo anterior, es muy probable que el colágeno presente en la cutícula sea degradado por la acción de C-924.

3.3.2 Cambios ultraestructurales en juveniles de *M. incognita* asociados a la acción de *C. paurometabolum* cepa C-924.

Se estudió por MET el efecto del *C. paurometabolum* cepa C-924 sobre juveniles (j2) de *M. incognita*. Se emplearon los juveniles emergidos (j2) después de 72 horas de haber sido extraídos los huevos de las ootecas. El estudio se realizó a las 24 horas de la interacción de los juveniles con C-924 (ver ANEXO 6 E).

En el ciclo de vida *M. incognita*, no ocurren cambios en su estructura inmediatamente después que los individuos emergen de los huevos. Este parásito desarrolla el primer estadio juvenil dentro de los huevos y eclosionan como juveniles en segundo estadio (j2), que se mantienen así hasta que logran hospedarse en una planta alcanzando un mayor desarrollo (Lucas, 1986; Sijmons y col., 1991).

Unido a lo anterior, la eclosión no uniforme de los huevos de este nematodo, no nos permitió realizar observaciones detalladas del efecto de la bacteria sobre la formación del embrión. Los juveniles usados como testigos mostraron un desarrollo normal en su estructura, se destaca en ellos la presencia de vacuolas aparentemente llenas de lípidos, que constituyen reservas de los individuos. Udonsi (1984), hizo referencia a

la utilización de las mencionadas reservas por juveniles de *Necator americanus* durante el proceso de recuperación después de estar sometidos a un período de desecación.

Los juveniles de *M. incognita* que se incubaron con *C. paurometabolum* cepa C-924, mostraron una estructura bien diferente a los testigos. En primer lugar se observó poca definición de las estructuras celulares de la hipodermis, la que aparentó ser un conjunto de células muertas. Grandes vacuolas fueron observadas, pero no presentaron la misma apariencia que las vistas en los testigos, ya que no fueron observadas agrupaciones lipídicas en su interior, sino espacios vacíos que pudieran ser gases.

La aparición de vacuolas gaseosas, observadas también al microscopio óptico (ver ANEXO 5 A), está relacionada con la muerte por asfixia de los juveniles tratados con C-924 (Vázquez, 1995).

Las cutículas de los juveniles (j2) de *M. incognita* tratados con C-924 mostraron discontinuidades en su estructura, al igual que las antes descritas en las cutículas de los juveniles de *H. contortus*. Se observaron zonas en las que ha ocurrido una desaparición casi total de la cutícula, lo que constituye un efecto común visto en los juveniles de ambos nematodos.

Los efectos de las bacterias sobre los juveniles de los nematodos han sido descritos anteriormente por varios autores, a continuación presentamos dos de los casos:

Bottjer y Bone (1987), plantearon que la acción de la toxina producida por *B. thuringiensis* var. israeliensis sobre juveniles de *Trichostrongylus colubriformis*, provoca una elevada dispersión de gránulos en todo el individuo, que unido a otros factores, disminuyen considerablemente la viabilidad de los mismos.

Otro ejemplo de bacteria antagonista con nematodos es *Pasteuria penetrans*. Bird (1986), aseguró que esta bacteria es el parásito obligado más específico de los nematodos. Su modo de acción está dado por la adhesión y penetración de las esporas bacterianas en la cutícula, la formación de microcolonias ramificadas que proliferan en la cavidad del cuerpo de los nematodos hembras y la formación de endosporas que se empacan en el cuerpo de los mismos en dependencia de la producción de los huevos. *P. penetrans* presenta distintos niveles de especificidad para los nematodos *M. incognita* y *M. arenaria* (Davies y Danks, 1992). Al ser un parásito obligado se ha visto limitada su producción a gran escala y por tanto su uso comercial, no obstante se han logrado resultados favorables en su multiplicación *in vitro* (Hewlett y col., 2002).

Los daños provocados en ambos nematodos resultan similares y pueden ser el resultado de características metabólicas a estudiar en *C. paurometabolum* cepa C-924. Se deduce que en primer lugar deben ser estudiadas en esta cepa, la producción de gases tóxicos (específicamente sulfuro de hidrógeno) y su capacidad para degradar la quitina (producción de quitinasas); en segundo lugar su actividad colagenasa y proteolítica. Las observaciones realizadas en este estudio, descartaron la posibilidad de parasitismo de *C. paurometabolum* cepa C-924 sobre juveniles y huevos de nematodos. No se evidenció la posibilidad de una relación bacteria-nematodo de este tipo.

Se observó mediante MET que el conjunto de células vivas de *C. paurometabolum* cepa C-924 (ver ANEXO 6 F), impiden la eclosión de los huevos y provocan la muerte de los juveniles de nematodos.

3.4 Estudio del modo de acción de *C. paurometabolum* cepa C-924 sobre huevos de *H. contortus*.

3.4.1 Producción de sulfuros por *C. paurometabolum* cepa C-924.

En la tabla 2 se presenta un resumen del análisis de gases sulfurados emitidos. Aunque ambas cepas produjeron sulfuros, C-924 logró flujos muy superiores que la cepa DSM 20162, fundamentalmente en las

muestras de gases tomadas a las 18 y a las 20 horas de fermentación, donde llegó a ser casi cinco veces superior. Esto demuestra la alta capacidad de la cepa C-924 para producir sulfuros dentro de la especie *Corynebacterium paurometabolum* (*Tsukamurella paurometabola*).

Tabla 2. Resultados de los flujos de sulfuro de hidrógeno detectados mediante el cromatógrafo de gases, en muestras tomadas de biorreactores de cinco litros (B. E. Marubichi) a diferentes tiempos de fermentación.

Cepas	Muestras	Flujo H ₂ S mg/minuto (flujo de sulfuro detectado)				
		16 horas	18 horas	20 horas	22 horas	24 horas
C-924	1	0.0673	0.2208	0.4779	0.3578	0.0672
	2	0.0659	0.2160	0.4755	0.3552	0.0680
DSM 20162	1	0.0231	0.0416	0.1014	0.1863	0.1009
	2	0.0240	0.0422	0.1040	0.1887	0.0997

3.4.2 Actividad quitinolítica de *C. paurometabolum* cepa C-924.

A partir de las 48 horas se comenzó a apreciar una disminución en la turbidez del medio en forma de halo que evidenció la hidrólisis de la quitina (ver ANEXO 7 A). En la tabla 3 se muestran los resultados cuantitativos del halo de hidrólisis a las 72 horas.

Tabla 3. Mediciones del diámetro de los halos de hidrólisis de la quitina, a las 72 horas de adicionados 100 mL de sobrenadantes filtrados. Para letras iguales no existen diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p < 0,05$).

Cepas	Diámetro del halo de hidrólisis en mm			
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	MEDIAS
<i>S. marcescens</i> ATCC 13880	6,23	7,01	6,54	6,59 a
<i>C. paurometabolum</i> C-924	5,98	6,83	6,66	6,49 a
<i>C. paurometabolum</i> DSM 20162	0,71	0,72	0,79	0,74 b
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,00	0,00	0,00	0,00 c

C-924 mostró mayor capacidad de hidrolizar la quitina que la cepa DSM 20162, al producir un halo significativamente mayor (ver ANEXO 7 A y B). También C-924 generó un halo semejante al producido por ATCC 13880 (*S. marcescens*) que en este caso fue empleada como testigo (control positivo) por su demostrada actividad quitinolítica (ATCC, 2003). El sobrenadante de la cepa de *E. coli* ATCC 25922, utilizado como control negativo en este experimento, no produjo halo de hidrólisis.

3.4.3 Efecto de los gases y el sobrenadante de *C. paurometabolum* cepa C-924 sobre huevos de *H. contortus*.

En la figura 3 se muestra el efecto de siete tratamientos sobre la eclosión de los huevos de *H. contortus*.

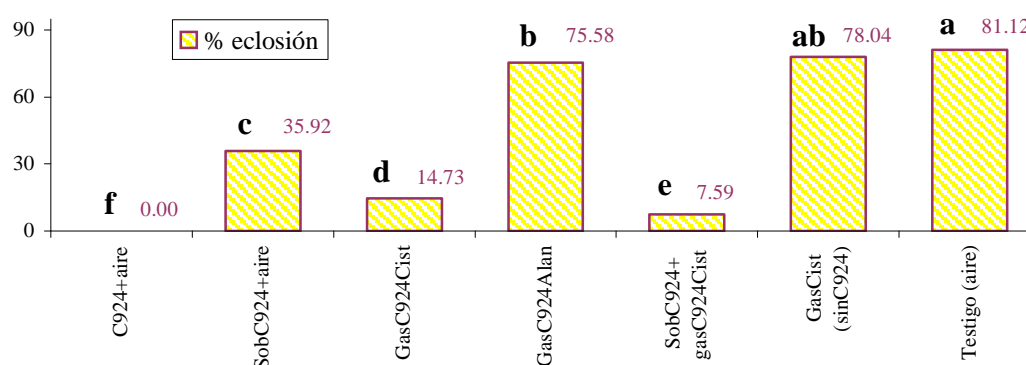


Figura 3. Eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* a las 24 horas de estar sometidos a los distintos tratamientos. Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Se observó una alta efectividad de *C. paurometabolum* cepa C-924 (C924+aire) sobre huevos de *H. contortus* al reducir la eclosión al 0,00 %, en contraposición a esto, la eclosión a las 24 horas en el testigo fue

del 81,12 %. La marcada diferencia entre ambos casos (ver ANEXO 3 A y B) permitió evaluar adecuadamente los restantes tratamientos.

En el tratamiento donde se empleó el gas producido por C-924 a partir del medio de cultivo constituido por el aminoácido Alanina (GasC924Alan), el porcentaje de eclosión de los huevos del nematodo fue semejante que en el tratamiento con el gas obtenido del medio con Cisteína pero sin crecimiento de C-924 (GasCist(sinC924)). Sin embargo, en el tratamiento con el gas producido por C-924 en Cisteína (GasC924Cist), la eclosión de los huevos fue significativamente menor que para los dos tratamientos anteriores.

En el medio cuyo sustrato fue Alanina, el microorganismo no tuvo una fuente portadora de azufre que le permitiera producir sulfuros, pero cuando C-924 creció en un medio de cultivo portador de azufre (Cisteína), se produjeron sulfuros en cantidades suficientes para afectar la eclosión de los huevos.

Al referirnos a otros aspectos de este experimento se observó que el tratamiento donde se empleó el sobrenadante de la cepa C-924 crecida en medio LB suplementado con quitina coloidal (SobC924+aire), redujo significativamente la eclosión de los huevos al ser comparado con el testigo (aire) y los tratamientos donde los gases empleados no tenían la posibilidad de contener sulfuros (GasC924Alan y GasCist(sinC924)). El resultado anterior coincidió con el obtenido por Toda y Matsuda (1993), quienes demostraron que en este género de bacterias (*Corynebacterium*) existen especies quitinolíticas con capacidades nematocidas y antiparasitarias, debido a que ellas producen quitinasas que afectan de diferentes formas a otros organismos donde la quitina es parte de su constitución estructural.

En el tratamiento donde se combinó la acción del sobrenadante de la cepa C-924 con los gases que ella produce en el medio de cultivo con Cisteína (SobC924+gasC924Cist), se observó una disminución de la eclosión de los huevos significativamente superior que en los casos donde se emplearon ambos tratamientos por separado (SobC924+aire y GasC924Cist).

De acuerdo a las observaciones sobre huevos y juveniles de nematodos realizadas anteriormente por MET (epígrafe 3.3) y a los resultados discutidos en los epígrafes 3.4.1, 3.4.2 y 3.4.3, es evidente que el efecto nematocida de *C. paurometabolum* cepa C-924 se debe fundamentalmente a la acción combinada de las quitinasas y los sulfuros producidos por la bacteria de forma simultánea.

3.5 Experimentos en macetas para el control de *M. incognita* y *R. similis*.

3.5.1 Evaluación del control de *M. incognita* en el suelo mediante plantas indicadoras.

En la figura 4 se presentan los resultados del experimento desarrollado en macetas donde se empleó calabaza (*Cucurbita moschata* Duch.) como planta indicadora.

El conteo de los nódulos producidos por *M. incognita* en las raíces de cada planta permitió conocer la efectividad de las cepas en estudio en el control de esta especie de nematodo en el suelo y al mismo tiempo compararlas entre sí (ver ANEXO 8 A). Todos los biocontroles tuvieron un efecto significativamente positivo pero sin diferencias entre ellos (Tukey, $p < 0,05$).

C. paurometabolum cepa C-924, fue el mejor tratamiento si se tiene en cuenta la concentración empleada (10^6 UFC/mL), con respecto a las restantes cepas (C-926 = 5×10^7 UFC/mL y LBT-3 = 10^7 esporas/mL).

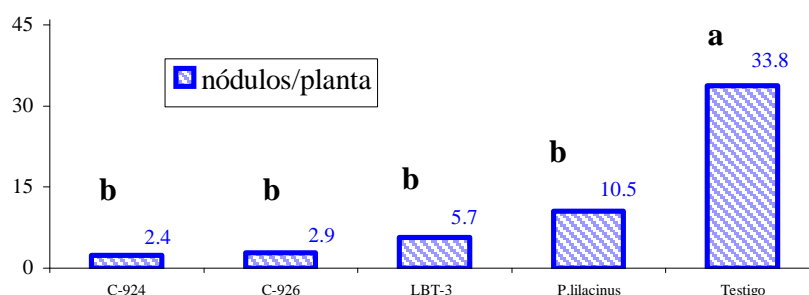


Figura 4. Nódulos de *M. incognita* por planta a los 60 días de aplicados los cuatro tratamientos y el testigo (sin tratamiento). Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

El tratamiento con *B. thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-3 (10^7 esporas/mL), mostró un efecto positivo en el control de *M. incognita*, esta observación coincidió con lo expuesto por Sharma (1995), quien expuso resultados positivos de pequeños experimentos en macetas, que demostraron control de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* y *B. thuringiensis* var. *israelensis* ante *M. incognita*, también demostró el efecto de las toxinas de *Bacillus* spp. contra *Heterodera glycines*.

P. lilacinus (10^7 esporas/g) mostró resultados discretos en este experimento ya que fue el tratamiento biológico que aparentemente mostró menor efectividad. Este resultado no se correspondió totalmente con los expresados por otros autores, ya que este hongo se encuentra entre los antagonistas naturales de los nematodos que más se ha estudiado con la idea de usarlo como un biopreparado comercial y constituye la materia prima activa en la fabricación de un nematicida nombrado BIOSTAT, efectivo contra nematodos de los géneros *Meloidogyne*, *Scutellonema*, *Pratylenchus* y *Helicotylenchus* (Segers y Butt, 1994). Holland (2001), describió al PAECIL, nombrado también como BIOACT o Nemachek, como un nematicida biológico que contiene una cepa patentada del hongo *Paecilomyces lilacinus*.

3.5.2 Experimento con *R. similis* en vitroplantas de banano.

En la figura 5 se presentan los resultados del experimento (ver ANEXO 8 B)

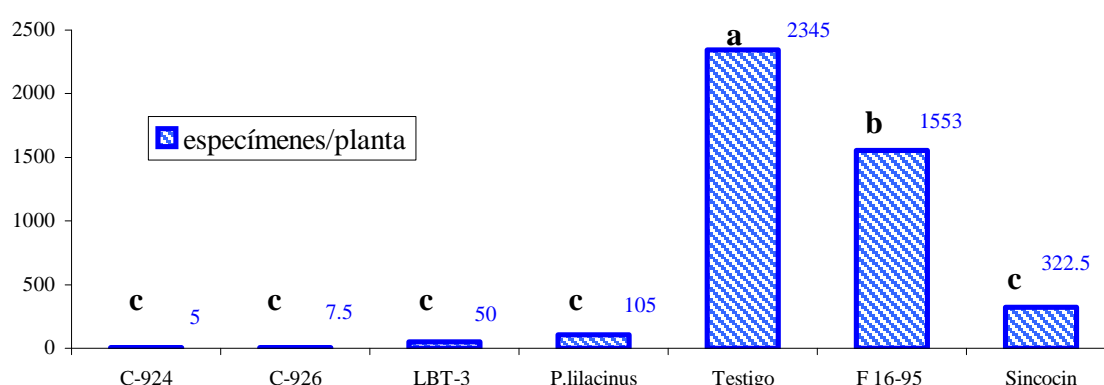


Figura 5. Especímenes de *R. similis* por planta a los cinco meses de iniciado el experimento. Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Las cepas de bacterias en estudio: C-924 (10^6 UFC/mL), C-926 (5×10^7 UFC/mL), LBT-3 (10^7 esporas/mL) y el hongo *P. lilacinus* (10^7 esporas/g), tuvieron un efecto nematicida similar. Si se tienen en cuenta las concentraciones celulares aplicadas, C-924 (10^6 UFC/mL), resultó la más efectiva de las cepas ya que presentó la población más baja de nematodos a pesar de haberse aplicado a menor concentración. No existieron diferencias significativas entre las cepas de los cuatro microorganismos y Sincocin (1 000 ppm).

El tratamiento F 16-95 (10^7 esporas/mL) mostró actividad nematicida al ser comparado con el testigo (sin tratamiento). Este resultado no coincide con el obtenido en los experimentos *in vitro* con juveniles (j2) de *M. incognita* (epígrafe 3.2.1, figura 2), donde esta cepa no tuvo actividad. El efecto nematicida de F 16-95 en macetas, puede estar dado por su influencia sobre el desarrollo de las raíces y la actividad vegetativa de las plantas (Turner y Backman, 1991; Vázquez, 1995; Jiménez, 1996). También deben tenerse en cuenta las diferencias existentes en las condiciones experimentales en las que se desarrollaron ambos eventos.

Los resultados de este experimento aportaron la novedad de que las tres cepas en estudio C-924 (10^6 UFC/mL), C-926 (5×10^7 UFC/mL), LBT-3 (10^7 esporas/mL) ejercen control sobre esta especie. *R. similis* es un nematodo endoparásito migratorio que después de penetrar en las raíces, ocupan posiciones intercelulares en el parénquima cortical donde se alimentan del citoplasma de las células vecinas, causando cavidades cuya coalescencia asemeja túneles (Loos, 1962; Gowen y Quénéhervé, 1990). La actividad *in vivo* de estas bacterias sobre este tipo de nematodos parásitos de plantas se explica porque de la misma forma que el oxígeno y el agua de la solución del suelo penetran por los túneles que abren los individuos, también fluyen por estos espacios los gases, metabolitos y células de las bacterias, en concentraciones tales que llegan a afectar los diferentes estadios presentes en el interior de las raíces.

3.6 Experimentos en campo.

Los resultados de los experimentos de campo confirmaron los obtenidos en los experimentos *in vitro* y en macetas. También se realizaron comparaciones en las condiciones reales de la producción con nematicidas químicos empleados en el control de las dos especies de fitonematodos estudiadas (*R. similis* y *M. incognita*).

3.6.1 Efecto de distintos tratamientos nematicidas sobre las poblaciones de *R. similis* y los rendimientos en plátano Macho $\frac{3}{4}$.

En la figura 6 se resumen los resultados de las evaluaciones a los dos, cinco, siete, nueve y 12 meses.

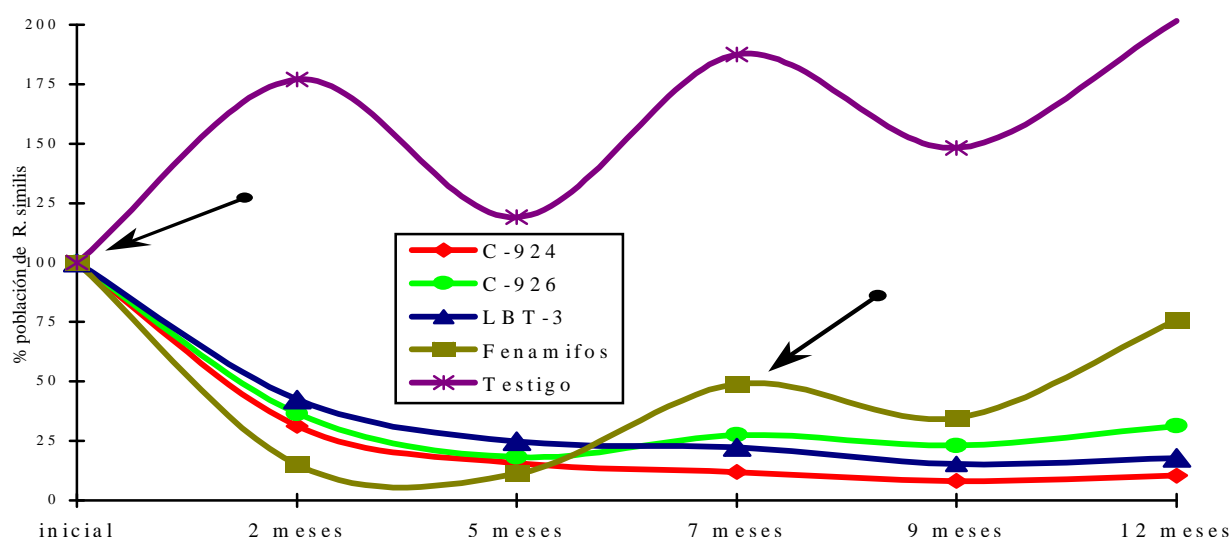


Figura 6. Comportamiento de las poblaciones de nematodos (*R. similis*), expresadas en porcentajes con relación a la población inicial, en una plantación de plátano Macho $\frac{3}{4}$, durante un año. Las flechas negras indican los momentos de las aplicaciones de los tratamientos.

Los resultados de los muestreos iniciales (antes de los tratamientos), presentaron una alta incidencia de nematodos (más de 100 especímenes por g de raíz) y al mismo tiempo no existieron diferencias significativas entre las poblaciones de nematodos presentes en cada parcela (ver ANEXO 4 A).

La primera aplicación de Fenamifos, bajó drásticamente la población de nematodos (a los dos y cinco meses), pero posteriormente subió por encima de los niveles observados en los tratamientos con las tres cepas en estudio (a los siete meses). La respuesta a la segunda aplicación del químico fue moderada.

Por su parte, las respuestas de los controles biológicos fueron inicialmente menores, pero a partir del séptimo mes y de la segunda aplicación, mantuvieron los niveles de las poblaciones de *R. similis* en niveles inferiores a los logrados por Fenamifos (Nemacur), nematicida organofosforado para el cual se ha comprobado una rápida biodegradación por la microflora del suelo, en áreas donde existió historia de aplicaciones anteriores del producto (Smelt y col., 1996). En ocasiones se ha observado su degradación en la primera aplicación (Ou, 1991). Lo anterior explica la pobre respuesta a la segunda aplicación, ya que en el área experimental se habían realizado aplicaciones de Fenamifos en años anteriores (Vázquez, 2001; Ramos, 2002).

Varios autores (Püntener, 1981; Elena y Fernández, 1986) han recomendado la evaluación de los rendimientos como el mejor indicador para conocer el efecto real de los nematicidas sobre las plantaciones. En la figura 7 se muestran comparativamente las poblaciones del nematodo *R. similis* y los rendimientos por parcela en cada tratamiento a los 12 meses de iniciado el experimento.

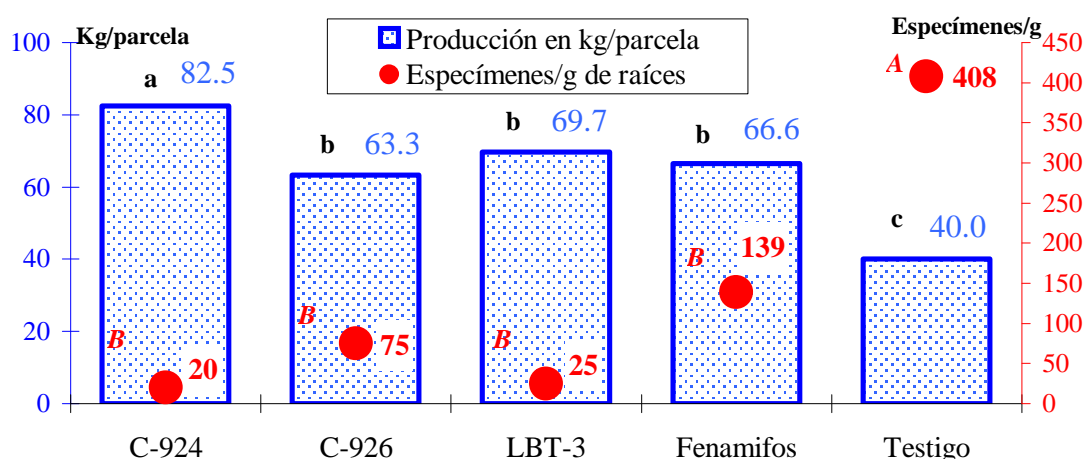


Figura 7. Producciones en Kg por parcelas de los tratamientos durante un año y poblaciones finales de nematodos (*R. similis*). Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

El método de muestreo empleado para conocer las poblaciones de nematodos (Araya y col., 1995a) en este experimento, resultó adecuado para evaluar mediante análisis estadístico el comportamiento de las poblaciones de especímenes por gramo de raíz, ya que las diferencias mostradas entre las réplicas no llegaron a ser significativas (ver ANEXO 4 B). Los mismos autores del método, coincidieron posteriormente en las variaciones de las poblaciones según el lugar del plantón donde se tome la muestra (Calvo y Araya, 2000).

En este estudio se demostró que el mejor tratamiento fue *C. paurometabolum* cepa C-924 puesto que propició el mayor rendimiento (Kg/parcela), a pesar de ser la cepa que se aplicó a menor concentración (10^6 UFC/ml). Esto también se corresponde con su efectividad sobre la población de nematodos.

Los tratamientos a partir de las cepas de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3 y *S. spiritivorum* cepa C-926, tuvieron rendimientos semejantes al tratamiento químico (Fenamifos) y superiores al testigo.

En sentido general, se aprecia que una adecuada aplicación y un correcto manejo de las tres cepas en estudio, pueden tener efecto nematicida e incrementar los rendimientos, por lo que tienen posibilidades de sustituir al nematicida químico Fenamifos, recomendado para el control de nematodos en el plátano (Gowen, 2001).

3.6.2 Efecto de las cepas nematicidas sobre poblaciones de *R. similis* y los rendimientos en banano Cavendish.

Los muestreos iniciales (antes de efectuar las aplicaciones), no presentaron diferencias significativas, con respecto a las poblaciones de nematodos cuantificadas en las parcelas de los tratamientos (ver ANEXO 4 A). Las poblaciones iniciales de *R. similis* fueron altas (por encima de 100 especímenes/gramo de raíz). Los resultados de los muestreos en cuanto a las poblaciones de *R. similis* se resumen en la figura 8.

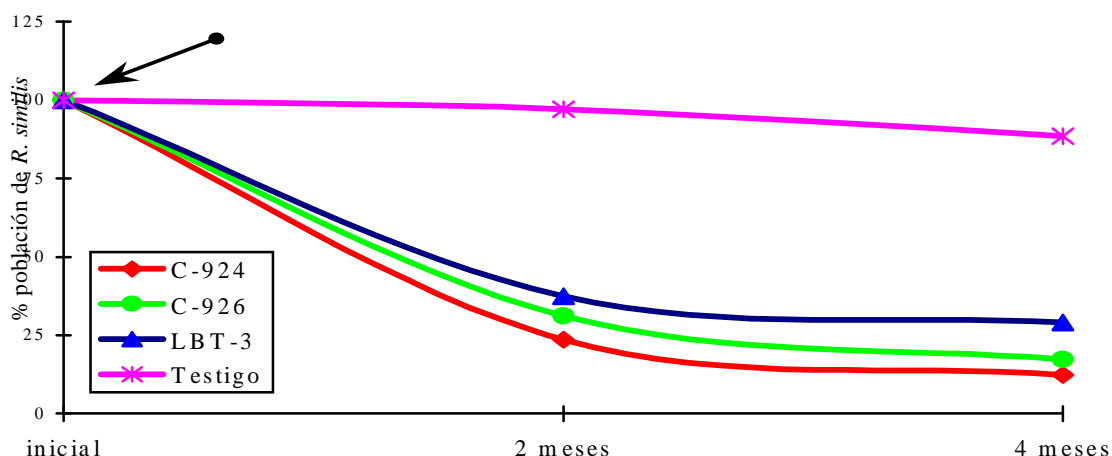


Figura 8. Comportamiento de las poblaciones de nematodos (*R. similis*), expresadas en porcentajes con relación a la población inicial, en una plantación de banano Cavendish en producción. La flecha negra indica el momento de las aplicaciones de los distintos tratamientos.

En estas condiciones experimentales también se observó una disminución de las poblaciones de nematodos (*R. similis*), con respecto a las poblaciones iniciales y al testigo, en los tres tratamientos aplicados: C-924 (10^6 UFC/mL), C-926 (5×10^7 UFC/mL), LBT-3 (10^7 esporas/mL).

C-924 (10^6 UFC/mL) disminuyó en un mayor porcentaje las poblaciones del nematodo *R. similis* que C-926 (5×10^7 UFC/mL) y LBT-3 (10^7 esporas/mL), a los dos y a los cuatro meses de efectuados los tratamientos.

Al igual que en el experimento anterior (3.6.1), se evaluó el comportamiento de la producción como indicador del efecto de los tratamientos. En la figura 9 se muestran comparativamente las poblaciones del nematodo *R. similis* a los cuatro meses de aplicadas las cepas en estudio y los rendimientos por parcela en cada tratamiento a los seis meses de iniciado el experimento (ver ANEXO 4 C).

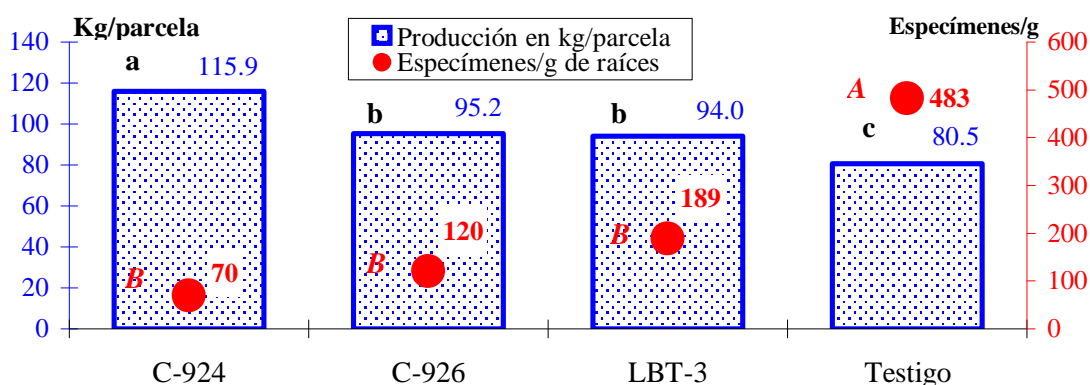


Figura 9. Producciones en Kg por parcelas de los tratamientos durante seis meses y poblaciones de nematodos (*R. similis*) a los cuatro meses, expresadas en especímenes por g de raíces. Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

Se reiteró que C-924 además de ser la cepa aplicada a menor concentración celular, resultó el mejor de los tratamientos en cuanto a la disminución de la población del nematodo *R. similis* e incrementó significativamente los rendimientos (Kg/parcela) con respecto a las otras dos cepas y al testigo. Las cepas C-926 y LBT-3 también demostraron tener un efecto significativamente positivo sobre los rendimientos del cultivo y disminuir las poblaciones de nematodos, al ser comparados con el testigo.

Las parcelas del tratamiento testigo se vieron afectadas por la caída de las plantas antes de que los frutos adquirieran las características comerciales, por ello los rendimientos se afectaron y puede ser la causa de que en seis meses se observaron diferencias significativas con relación a los tratamientos con biológicos.

3.6.3 Efecto de *C. paurometabolum* cepa C-924 en tomate afectado por *M. incognita*.

Antes de obtenerse los resultados de este experimento ya se había demostrado que la cepa en estudio de mayor efectividad en el control de fitonematodos es *C. paurometabolum* cepa C-924, por ello fue previamente seleccionada para esta prueba de campo. *S. spiritivorum* cepa C-926 no fue considerada para ser evaluada en este caso debido a que debe aplicarse a altas concentraciones ($CL95 = 5 \times 10^7$ UFC/mL), por otro lado es del grupo 2 de riesgo biológico (ATCC, 2003), lo cual impide su liberación al medio ambiente.

Los resultados que se muestran en la figura 10, indican una nueva opción para reducir las poblaciones de nematodos en esta tecnología de producción, de acuerdo a lo observado en el tratamiento hecho con C-924.

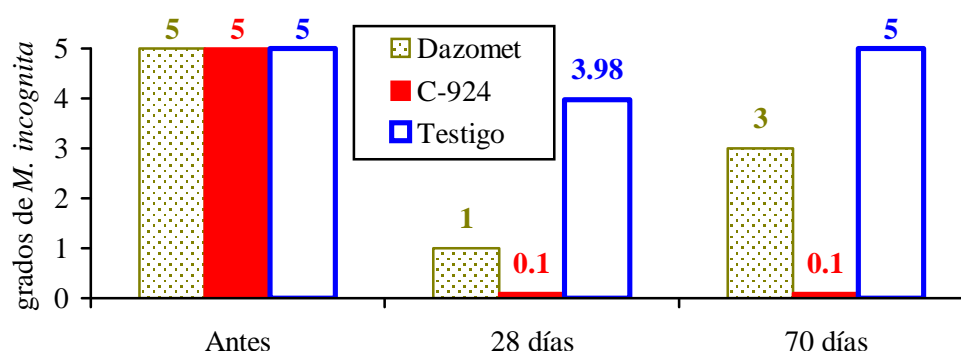


Figura 10. Resultados de los tres tratamientos con relación al grado de afectación por *M. incognita*. Las evaluaciones se realizaron antes (cultivo precedente), a los 28 y a los 70 días después del transplante.

Se apreciaron diferencias de los daños causados por el nematodo *M. incognita* en los muestreos, esto se correspondió también con el aspecto general observado en las casas de cultivo (ver ANEXO 9 A y B).

La mayor efectividad de C-924 en la reducción del grado de afectación producido por *M. incognita* pudo estar condicionada también por la protección realizada en los cepellones, donde se aplicó previamente, esto protege a las posturas en el caso de que el sustrato del semillero sea portador de nematodos, lo cual sucede con cierta frecuencia en casos donde se cometen indisciplinas técnicas por los productores (Casanova, 1999). Otro factor que pudo incidir en los buenos resultados es la aplicación inundativa al suelo de *C. paurometabolum* cepa C-924 en dos momentos, con ello logra su efecto reductor del grado de afectación provocado por nematodos durante la primera semana previa al transplante de las posturas y en la segunda aplicación del tratamiento a los 28 días de realizado el transplante (Mena y col., 2002). Este período de tiempo resulta el adecuado para reducir nuevamente las poblaciones de individuos infestivos que sobrevivieron en la primera aplicación, ya que el ciclo biológico del nematodo *M. incognita*, es de

aproximadamente 30 días para las condiciones en que se desarrolló el experimento (Vázquez, 2001). De esa forma *C. paurometabolum* cepa C-924 ejerce el control en tres momentos:

Primero: sobre los cepellones y las posturas que llegan protegidas del ataque de nematodos al campo.

Segundo: sobre las poblaciones de nematodos durante siete días antes del transplante de las posturas.

Tercero: Sobre una posible segunda generación de individuos a los 28 días de efectuado el transplante.

Mientras tanto el tratamiento con el biocida químico Dazomet, sólo tiene la posibilidad de ejercer control sobre las poblaciones de nematodos en la aplicación previa al transplante, quedando desprotegida del ataque de nematodos la etapa del semillero donde se desarrollan las posturas, así como otras vías de penetración o subsistencia de individuos infestivos durante el desarrollo del cultivo. Por otro lado, en las aplicaciones de químicos biocidas, como es el caso del Dazomet, conjuntamente con la eliminación de los parásitos, también se reducen drásticamente las poblaciones de organismos beneficiosos, entre ellos los enemigos naturales de los fitonematodos y por ello la recuperación de las poblaciones de éstos es más rápida (Abd-el-Malek y Monib, 1968; Mark, 1987; Sivan y Chet, 1992; McKenry, 1994; Smelt y col. 1996; Bello y col., 2002).

Una estrategia pudiera ser la combinación de *C. paurometabolum* cepa C-924 con otros controles biológicos de nematodos que se establecen en el suelo, por ejemplo el hongo *Pochonia chlamidosporia* (Hidalgo, 2002). Para la evaluación de los resultados finales en este experimento (figura 11) también se tuvieron en cuenta los criterios de Püntener (1981), éste aseguró que el mejor indicador de un producto nematicida está dado por los rendimientos obtenidos al final de la cosecha y las mayores afectaciones en los rendimientos provocadas por los nematodos agalladores (*Meloidogyne* spp.), se producen entre las cuatro y las seis primeras semanas en los cultivos temporales y anuales.

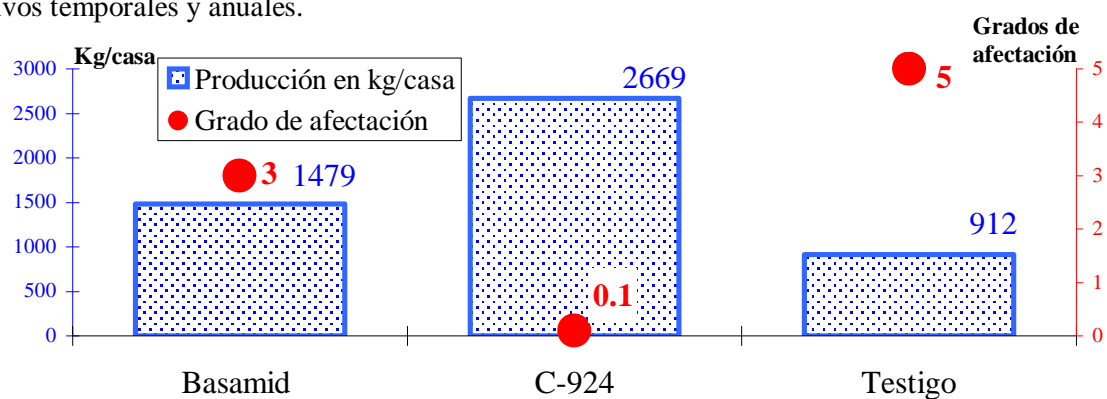


Figura 11. Resultados de los tres tratamientos con relación a la producción por casas y el grado de afectación de *M. incognita* a los 70 días después del transplante.

Aunque no se realizó un análisis estadístico que permitiese conocer la precisión de los resultados, por contarse sólo con los datos de dos réplicas en la producción por casas, se observó coincidencia con lo planteado por Püntener (1981), al corresponderse los mayores grados de afectación producidos por el nematodo *M. incognita* con los rendimientos más bajos. La evaluación integral realizada sobre los resultados de este experimento, confirman la efectividad de *C. paurometabolum* cepa C-924, en el control de *M. incognita* lo cual incrementó la producción en tomate bajo las condiciones de los cultivos protegidos.

3.7 Extensión y generalización de HeberNem en los cultivos protegidos.

3.7.1 Procedimiento para la determinación de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 en el suelo y partes de las plantas en cultivos tratados con HeberNem:

Los procedimientos empleados en los experimentos fueron funcionales y tuvieron correspondencia con otros casos en los que se ha empleado, por ejemplo, en el “Ensayo de Toxicidad/Infectividad Aguda del nematocida biológico HEBERNEM en plantas terrestres” realizado por el CENATOX, donde se estudió el comportamiento de las poblaciones de C-924 en plantas no blancos (maíz, soya y frijol), hasta los 21 días posteriores de la aplicación del producto. Además de los resultados favorables observados en ese ensayo (ver documento anexo al expediente de registro nacional de HeberNem), durante más de dos años se ha monitoreado y estudiado la prevalencia de la bacteria *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 (agente activo de HeberNem) en el suelo y en distintas partes de las plantas (incluyendo frutos), en las casas de cultivos tratadas con el bionematicida HeberNem.

Todos los experimentos y procedimientos estuvieron condicionados y amparados por las Licencias de Seguridad Biológica 11/02 y la 33/04, ambas emitidas por el centro Nacional de Seguridad Biológica.

A continuación se resumen y se discuten los resultados del estudio realizado:

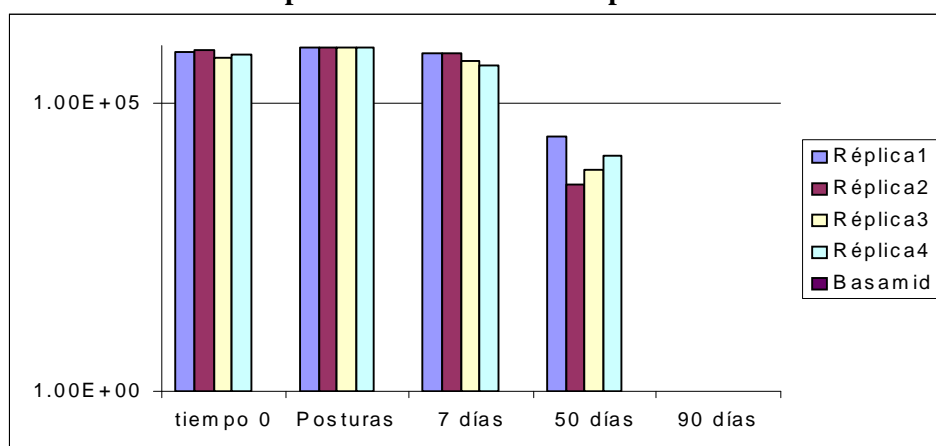
3.7.2 Experimentos en casas de cultivos de la Empresa Citrícola “La Jíquima”, Holguín:

A continuación se exponen los resultados de los experimentos de campo iniciados desde el mes de marzo del 2002.

3.7.2.1 Primer Experimento:

En el estudio de la presencia de C-924 en el suelo tipo pardo sin carbonato (Instituto de Suelos, 1999) tratado con HeberNem, no se detectaron colonias de C-924 en las áreas aledañas a las casas de cultivos tratadas ni en los pasillos o canteros no tratados.

Gráfico resumen de la presencia de C-924 en las parcelas:



Los valores observados en el gráfico anterior se expresan en unidades formadoras de colonias por gramos de suelo (ufc/g).

En los muestreos de suelos realizados a 0 días (una hora después de la aplicación), 7, 38, 60 y 90 días, no se detectó la presencia de C-924 en las parcelas testigos ni en las parcelas tratadas con Basamid.

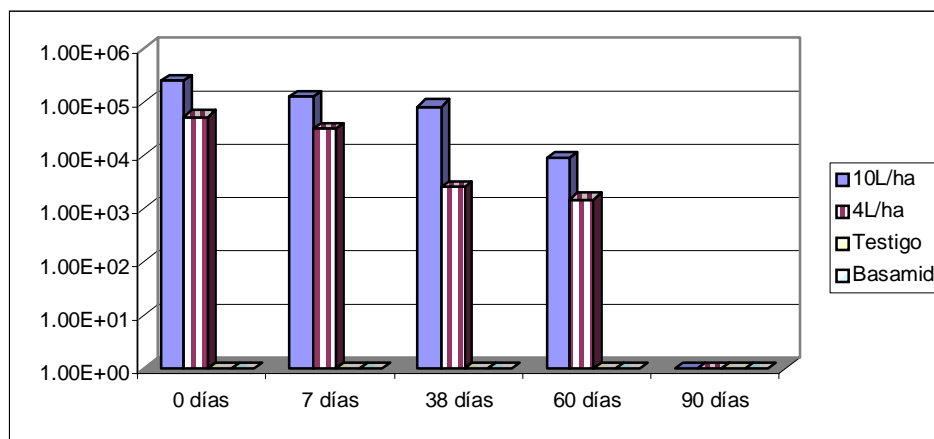
En las dos dosis aplicadas de HeberNem (C-924) de 10 y 4 L/ha se detectaron diferencias en las cantidades de ufc/g de suelo, en correspondencia con las dosis aplicadas. Por lo anterior podemos asegurar que a partir de una aplicación de HeberNem al suelo, a los 90 días su población descendió hasta niveles no detectados

por el método microbiológico empleado ($6.0E+01$) ya que para ambas dosis no se interceptó la bacteria a los 90 días posteriores al tratamiento.

En las muestras tomadas del follaje y los frutos de las plantas, no se detectó la presencia de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924 en ningún caso.

3.7.2.2 Segundo experimento en La Jíquima:

Gráfico de prevalencia de C-924 en las parcelas tratadas con HeberNem:



Los conteos de C-924 en las muestras de suelos, no mostraron diferencias entre las cuatro parcelas tratadas con HeberNem.

En las parcelas tratadas con Basamid (Dazomet) no se detectó la presencia de C-924 y tampoco en las muestras de suelo no tratado dentro de la casa de cultivo y sus alrededores.

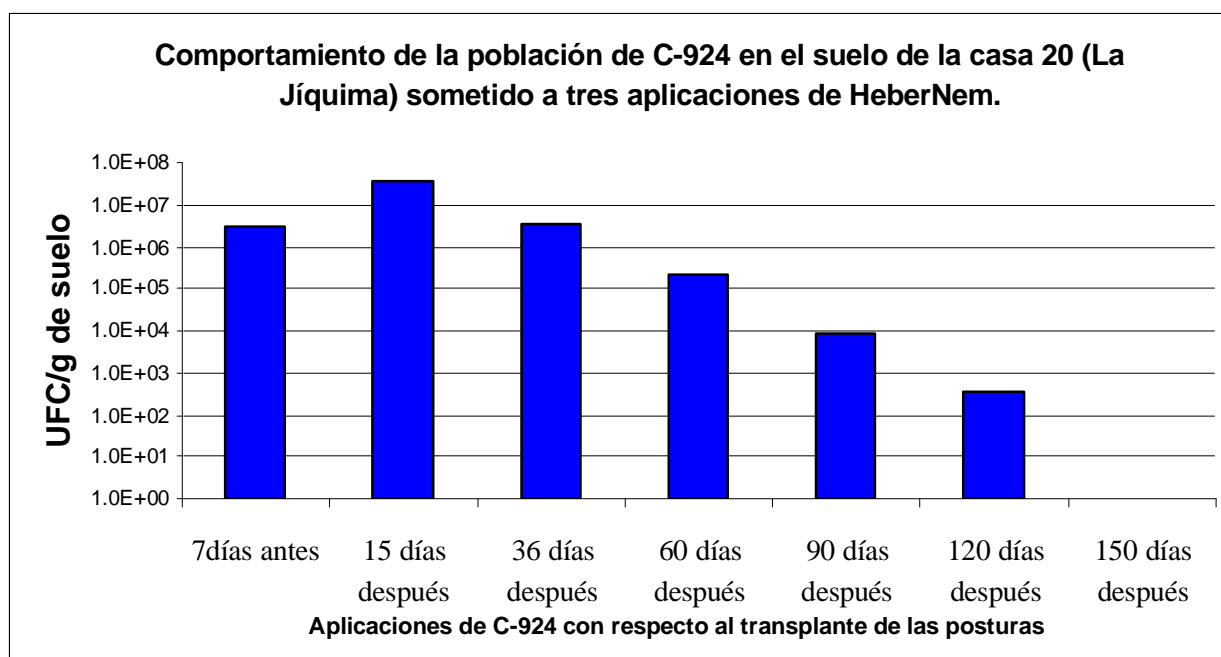
En las muestras tomadas en diferentes momentos del follaje y los frutos, no se detectó la presencia de *Tsukamurella paurometabola* cepa C-924.

3.7.2.3 Tercer experimento en La Jíquima:

En la siguiente tabla se aprecian la disminución de las poblaciones de C-924 en el suelo y la no presencia de esta bacteria en hojas y en frutos en ningún momento:

Aplicaciones de C-924	UFC/g de suelo de la muestra previamente homogenizada									
	suelo	hojas inferior.	hojas intermed.	hojas apicales	fruto (1er P)	fruto (2do P)	fruto (3er P)	fruto (4to P)	fruto (5to P)	fruto (6to P)
7 días antes	$2.96E+06$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 días después	$3.40E+07$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36 días después	$3.33E+06$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60 días después	$2.09E+05$	0	0	0	0	0	-	-	-	-
90 días después	$8.90E+03$	0	0	0	-	-	0	0	-	-
120 días después	$3.70E+02$	0	0	0	-	-	-	-	0	0
150 días después	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A pesar de que existen altas concentraciones de C-924 en el suelo, no se aisló la bacteria del follaje en ningún caso, lo cuál indica que este microorganismo no tiene posibilidades de llegar a los frutos cuando se aplica al suelo en las condiciones establecidas para el manejo de HeberNem.



En el gráfico se resumen los resultados del conteo de UFC/g de suelo sometido a tres aplicaciones de HeberNem cada 21 días con el objetivo de lograr una mayor efectividad del bionemático.

En los muestreos de suelos realizados se detectó una disminución gradual de las poblaciones de C-924 en el suelo, hasta llegar a los 150 días donde no se detectó la presencia de la bacteria.

Tampoco se detectó la cepa C-924 en el suelo no tratado dentro y en los alrededores de la casa número 20. En este caso debe tenerse presente que el medio selectivo que empleamos en nuestro trabajo es específico para *Tsukamurela paucimicrobium* cepa C-924, con el mismo es posible detectar este microorganismo a partir de concentraciones de 6.0×10^1 , por ello queda la posibilidad de que existan otras cepas de esta especie en el suelo que no crezcan con las características que las hagan contables en este medio.

A continuación se resumen los resultados de los conteos de microorganismos totales, crecidos sobre el medio de cultivo LB (Luria Bertani), a partir de muestras de suelos tomadas en distintos momentos en las casas de cultivo 20 (tratada con HeberNem) y 21 (tratada con el biocida químico Basamid).

Momentos de los muestreos:	UFC/g de suelo de microorganismos totales en medio LB (Luria Bertani)	
	Suelo Casa 20 (HeberNem)	Suelo Casa 21 (Basamid)
Antes del trasplante	5.3 E+08	4.0 E+01
15 días después del trasplante	1.5 E+09	3.3 E+06*
36 días después del trasplante	2.3 E+09	5.0 E+06*
60 días después del trasplante	4.0 E+09	7.3 E+06*
90 días después del trasplante	5.5 E+09	4.5 E+06*
120 días después del trasplante	7.0 E+09	1.3 E+07
150 días después del trasplante	6.5 E+09	4.5 E+07

* predominio de colonias del hongo *Trichoderma harzianum*, que se aplica como antagonista de hongos al momento del trasplante.

Independientemente a que el medio LB no es el ideal para que se produzca el crecimiento de todos los microorganismos del suelo, se apreció una gran diferencia en la dinámica de la población de microorganismos entre ambas casas.

Las poblaciones en la casa 20 (tratada con HeberNem) se recuperaron desde un inicio y llegaron a los parámetros normales reportados en el orden E+09 (Sivan y Chet, 1992; Wollum, 1994), mientras que para la

casa 21 (tratada con el biocida Basamid) la recuperación de la microflora total no llegó a los parámetros normales en ninguno de los momentos en que se desarrolló el estudio de la microflora total del suelo de la rizosfera.

En la casa 21 se inició el conteo con dos colonias en 5 placas de Petri (4.0×10^1 UFC/g de suelo) antes del trasplante (justamente al culminar el tratamiento con Basamid), posteriormente se produjo una recuperación aparente que se debió fundamentalmente a la aparición de colonias del hongo *Trichoderma harzianum*, que fue aplicado en el momento del trasplante como control biológico de enfermedades fungosas, esta práctica es habitual en estos sistemas de cultivos y aunque también se realizó en la casa 20, su aparición no fue predominante sobre la microflora total del suelo.

En todas las casas de cultivos estudiadas se han aplicado anteriormente biocidas (Basamid, Bromuro, etc.) que destruyen la microflora natural de los suelos, del humus y de la materia orgánica que se aplica en el proceso de preparación del suelo, por ello los microorganismos que aparecieron con mayor fuerza en la casa 21 son los que se aplican en el momento de la siembra (ej: *Trichoderma harzianum*) y otros controles biológicos, en este caso la microflora del suelo no se corresponde con la que normalmente debería aparecer, según han descrito Sivan y Chet, (1992) y Wollum (1994).

3.7.3 Experimento en casas de cultivos de la Empresa Citrícola “Sierra de Cubitas”, Camagüey:

En este experimento se obtuvieron resultados semejantes a los obtenidos en La Jíquima (ver epígrafes 3.2.1, 3.2.2. y 3.2.3), a pesar de haberse desarrollado bajo diferentes condiciones, fundamentalmente en cuanto al tipo de suelo que en Sierra de Cubitas es “ferrítico rojo oscuro” (Instituto de suelos, 1999).

El estudio realizado bajo estas condiciones específicas de tipo de suelo, permitió inferir que la cepa C-924 no se desplazó a áreas no tratadas del suelo.

En las muestras tomadas en diferentes momentos del follaje y los frutos tampoco se detectó la presencia de *T. paurometabola* cepa C-924.

En la siguiente tabla se resume la presencia de C-924 en suelo, follaje y frutos en áreas tratadas con HeberNem:

Casa/lugar	Tipo de Muestra	Fecha	suelo (ufc/g)	hojas y tallos (ufc/g)	frutos (ufc/g)
Semillero	Sustrato Semillero	31-mayo-04	4.44×10^7	-	-
Suelo aledaño al semillero	Suelo no tratado	31-mayo-04	0	-	-
Posturas (antes trasplante)	Posturas	22-junio-04	5.60×10^5	0	-
Posturas no tratadas	Sustrato no tratado	22-junio-04	0	0	-
Casa 14	1ra aplicación Después	22-junio-04	1.89×10^8	0	-
Casa 14	2da aplicación Antes	5-julio-04	1.00×10^6	0	-
Casa 14	2da aplicación Después	5-Julio-04	7.90×10^6	0	0
Suelo no tratado Casa 14	Suelo no tratado	5-Julio-04	0	-	-
Casa 25	1ra aplicación Después	22-junio-04	1.00×10^5	0	-
Casa 25	2da aplicación Antes	5-julio-04	4.00×10^4	0	-
Casa 25	2da aplicación Después	5-julio-04	8.00×10^5	0	0
Suelo no tratado Casa 25	Suelo no tratado	5-Julio-04	0	-	-

3.7.4 Experimento en casas de cultivos de la Empresa Citrícola “Arimao”, Cienfuegos:

En esta empresa se desarrollaron los experimentos en dos suelos de texturas y tipos muy diferentes entre sí y también con respecto a los lugares estudiados anteriormente. En Cumanayagua (casa T2) se evaluó un suelo pardo grisáceo sin carbonatos y franco arenoso; mientras que en Cienfuegos (casa 9) se trabajó sobre un suelo pardo con carbonatos de textura arcillosa (Instituto de Suelos, 1999).

En la siguiente tabla se resume el comportamiento de las poblaciones de C-924 en el suelo, el follaje y los frutos en las casas tratadas con HeberNem-L:

Casa/lugar	Tipo de Muestra	Fecha	suelo (ufc/g)	hojas y tallos (ufc/g)	frutos (ufc/g)
Semillero (T2)	Posturas	1-junio-04	9.20E+07	0	-
Suelo alado al semillero	Suelo no tratado	1-junio-04	0	-	-
T2 Cumanayagua	1ra aplicación Después	5-junio-04	5.38E+07	0	-
T2 Cumanayagua	2da aplicación Antes	26-junio-04	1.50E+05	-	-
T2 Cumanayagua	2da aplicación Después	26-junio-04	4.26E+07	0	-
T2 Cumanayagua	3ra aplicación Antes	17-julio-04	3.00E+05	-	0
T2 Cumanayagua	3ra aplicación Después	17-julio-04	1.21E+06	0	0
T2 Cumanayagua	Suelo no tratado	17-julio-04	0	-	-
9 Cienfuegos	Posturas	10-septiem-04	8.60E+07	0	-
9 Cienfuegos	1ra	10-septiem-04	9.00E+06	0	-
9 Cienfuegos	2da Antes	1-octubre-04	5.90E+05	-	-
9 Cienfuegos	2da Después	22-octubre-04	8.43E+06	0	-
9 Cienfuegos	3ra Antes	12-noviem-04	4.45E+05	-	0
9 Cienfuegos	3ra Después	12-noviem-04	6.30E+06	0	0
9 Cienfuegos	Suelo no tratado	12-noviem-04	0	-	-

La cepa C-924 no se desplazó a áreas no tratadas del suelo. En las muestras tomadas en diferentes momentos del follaje y los frutos, no se detectó la presencia de *T. paurometabola* cepa C-924.

En este experimento se confirmó nuevamente que C-924 no se desplaza al suelo no tratado ni llega al follaje y los frutos de las plantas.

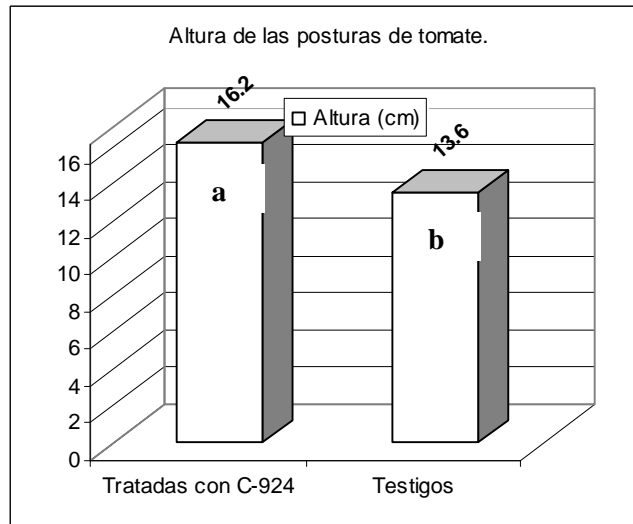
3.7.5 Determinación de la Efectividad Técnica de HeberNem en los cultivos protegidos.

Resumen sobre los resultados de los experimentos realizados en las casas de cultivos de la Empresa Citrícola “La Jíquima”, Holguín:

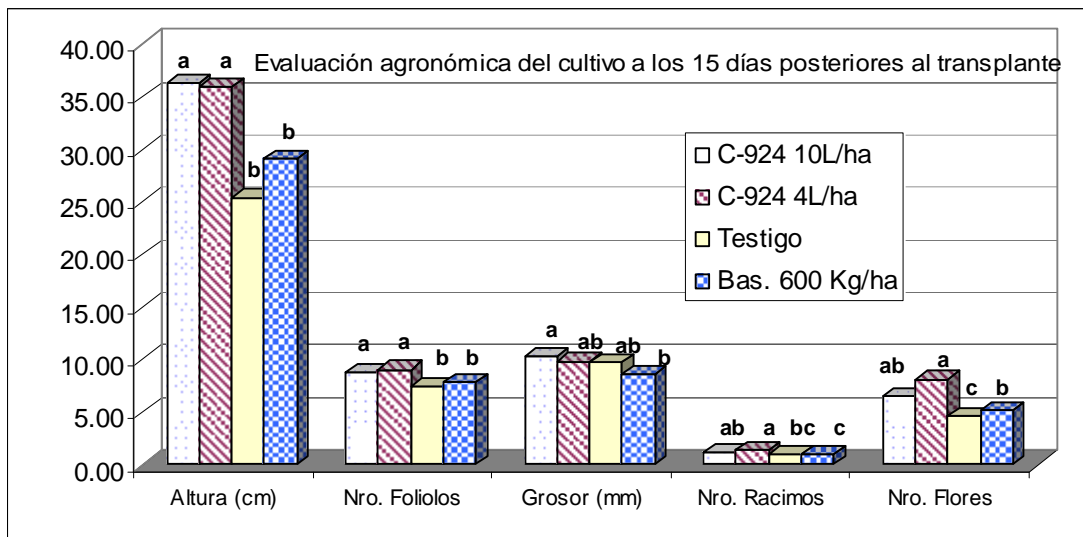
En esta empresa se iniciaron los experimentos de campo desde el mes de marzo del 2002, al amparo de la Licencia de Seguridad Biológica 11/02, desde entonces han sido tratadas con éxitos numerosas casas de cultivo, independientemente del grado de afectación de nematodos en el cultivo precedente.

Resultados del 1er. experimento en casa de cultivo. La Jíquima:

El cultivo evaluado fue el tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. Var. FA-180. Se utilizó una casa de cultivos protegidos de 900 m² divididas en 16 parcelas y despreciando los surcos de los bordes de la casa. Se emplearon dos dosis de HeberNem (C-924) a 4L/ha y 10 L/ha, un tratamiento químico (Basanid a 600 Kg/ha) y un testigo (sin tratamiento nematicida). Se realizaron evaluaciones del grado de desarrollo de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos, de los grados de afectación por nematodos y se estudiaron las poblaciones de C-924 en los suelos tratados con HeberNem y los no tratados.

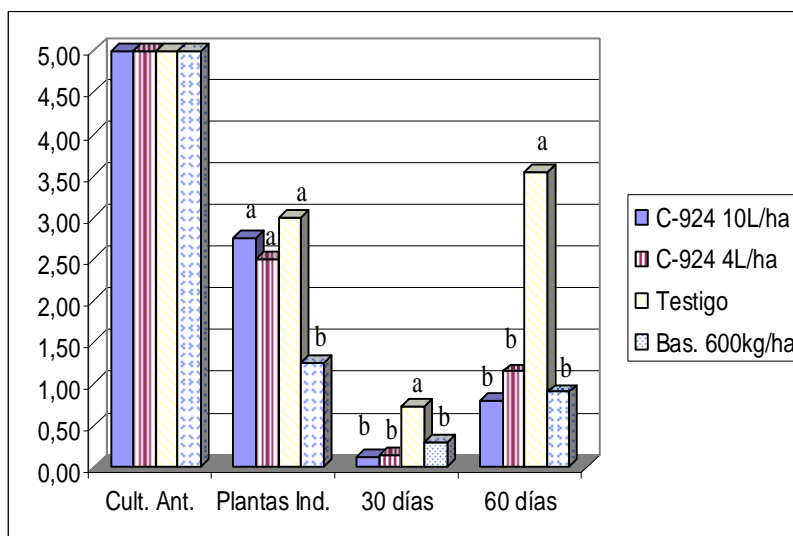


Medias con letras diferentes: difieren significativamente, $P < 0.05$ (ANOVA)



Medias con letras diferentes: difieren significativamente, $P < 0.05$ (Tukey)

Evaluación de los grados de afectación por *M. incognita* en los distintos tratamientos:



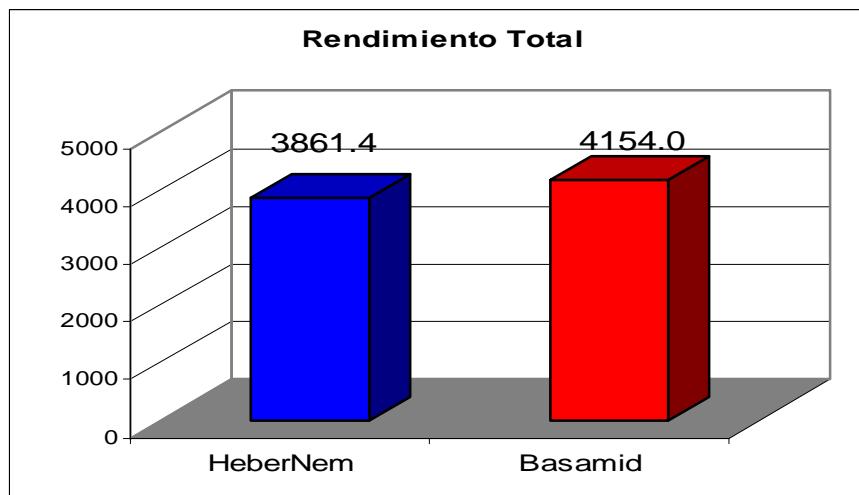
En el cultivo precedente los grados de afectación por nematodos (escala de 0 a 5) se evaluaron de grado 5 (muy alto). También se usó el método de las “Plantas Indicadoras”, en este caso, se apreció que las parcelas seleccionadas para ser tratadas con Basamid tuvieron una afectación inicial menor que las restantes. Las afectaciones por nematodos comenzaron a ser significativas a partir de los muestreos realizados a los 30 días del transplante y se acentuaron a los 60 días con relación al testigo no tratado. El tratamiento con las dos dosis de C-924 no tuvo diferencias significativas en esta etapa inicial del cultivo que es precisamente donde los nematodos inciden con mayor intensidad en el desarrollo posterior del cultivo y en los rendimientos finales.

Medias con letras diferentes difieren significativamente, $P < 0.05$ (Tukey)

Resultados del 2do. Experimento en La Jíquima:

Se desarrolló en un diseño experimental de cuatro réplicas en dos casas de cultivos sembradas de tomate con dos tratamientos:

- 1.- Una aplicación de HeberNem (C-924) a razón de 10 L/ha, 7 días antes del transplante y
- 2.- Basamid (Dazomet) a 600 kg/ha:



No hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos

En este experimento se demostró que con una sola aplicación de HeberNem se obtienen los mismos resultados productivos que al aplicar Basamid, en cuanto a la presencia de C-924 las muestras de suelos, no se observaron diferencias significativas entre las cuatro parcelas tratadas con HeberNem, en las parcelas tratadas con Basamid no se detectó la presencia de C-924 y tampoco en las muestras de suelo no tratado dentro de la casa de cultivo y sus alrededores.

Resultados del 3er. Experimento en La Jíquima:

Este experimento dio continuidad a los anteriores, pero se realizaron tres aplicaciones de HeberNem (C-924) en una casa completa (la número 20), las mismas fueron a los 7 días antes del transplante de las posturas de tomate, la segunda 21 días después de la primera y la tercera a los 21 días de la segunda. Se compararon los resultados con el de otra casa de cultivos tratada con Basamid (la número 21):

Tratamiento 1: 3 aplicaciones a 10L/ha de HeberNem:

Casa 20 (HeberNem), rendimiento: 4 920 Kg

Incidencia de Nematodos:

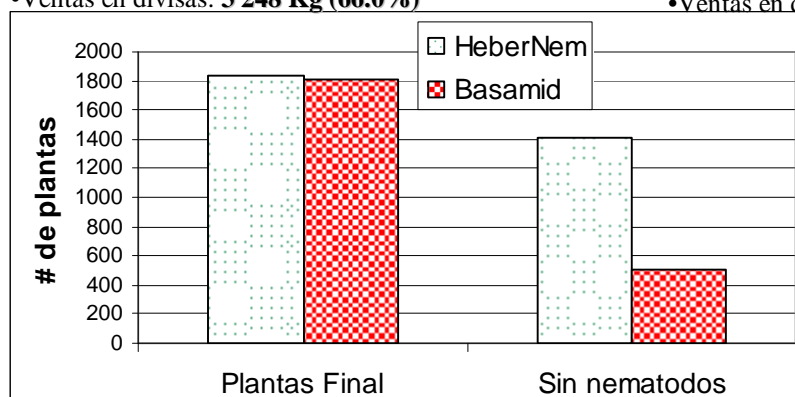
- Plantas afectadas cosecha previa: 97.3 %
- En esta cosecha: 23 %
- Grado Final: 0.99
- Ventas en divisas: **3 248 Kg (66.0%)**

Tratamiento 2: 1 aplicación a 600 Kg/ha de Basamid (Dazomet)

Casa 21 (Basamid), rendimiento: 3 687 Kg

Incidencia de Nematodos:

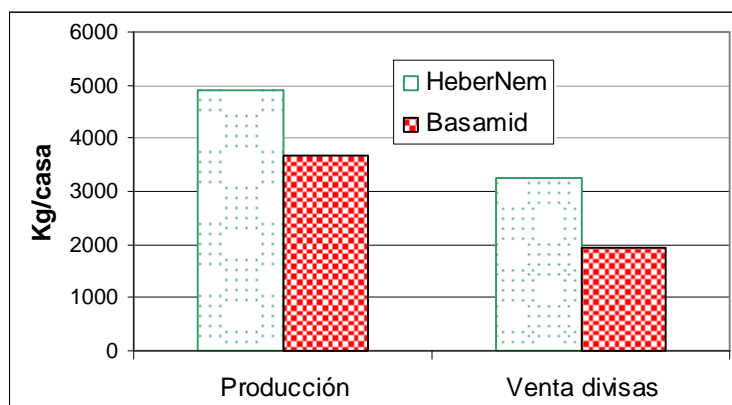
- Plantas afectadas cosecha previa: 9.2 %
- En esta cosecha: 72 %
- Grado Final: 2.10
- Ventas en divisas: **1 953 Kg (52.9%)**



En esta ocasión se realizaron tres aplicaciones de HeberNem cada 21 días con el objetivo de lograr una mayor efectividad del bionematicida.

En los muestreos de suelos realizados se detectó una disminución gradual de las poblaciones de C-924 en el suelo, hasta llegar a los 150 días donde no se detectó la presencia de la bacteria.

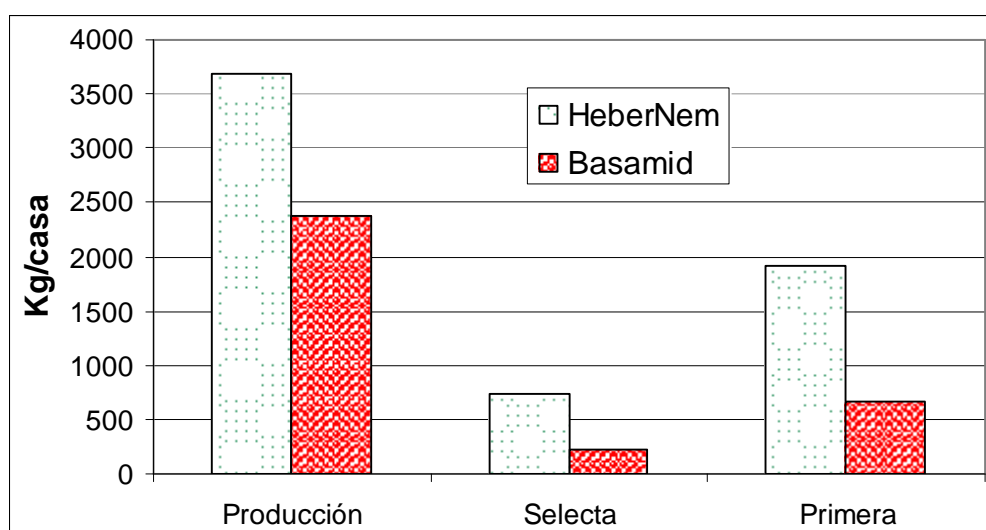
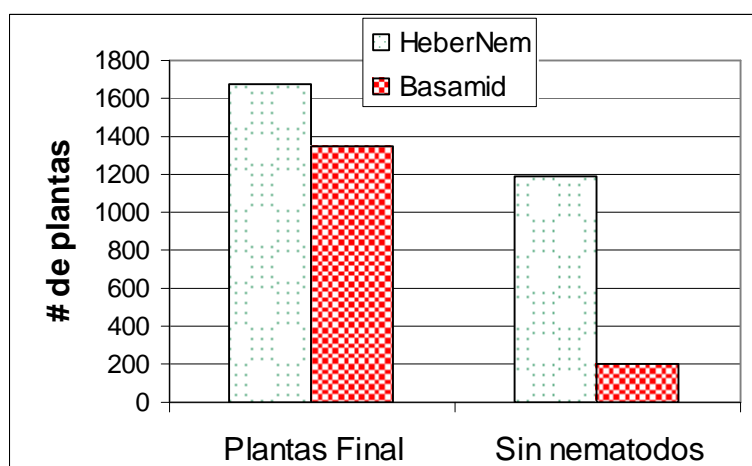
No se detectó la cepa C-924 en el suelo no tratado dentro y en los alrededores de la casa número 20.



La casa de cultivos tratada con HeberNem (casa 20) presentó mayor cantidad de plantas productivas hasta el final del ciclo del cultivo y también tuvo mayor número de platas sin nematodos, lo cual se reflejó en mejores resultados productivos al compararla con la casa donde se empleó el control químico (Basamid).

Resultados del segundo ciclo de aplicación en las casas nro. 20 (HeberNem) y 21 (Basamid) del 3er. Experimento:

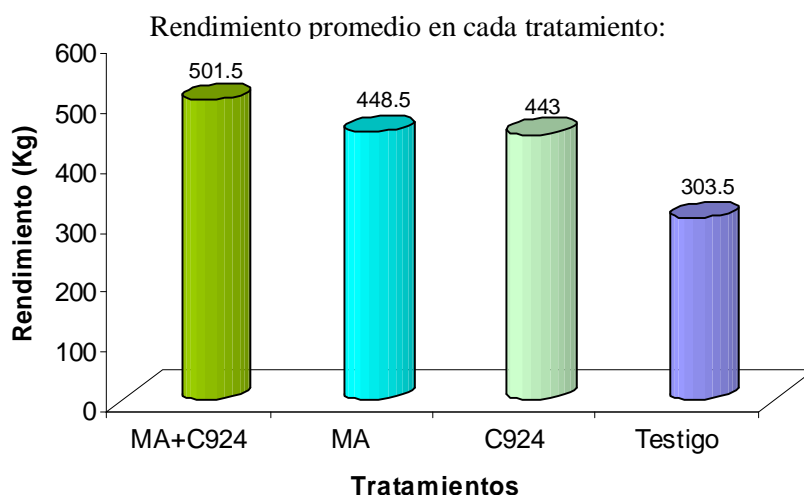
Al repetir el experimento en las mismas casas de cultivo, se obtuvieron resultados que confirmaron la superioridad del bionematicida HeberNem (C-924) sobre el control químico Basamid (Dazomet):



Las categorías de producción “Selecta” y “Primera” son las que prioritariamente se venden en divisas.

Resultado de otros experimento de campo. Aplicación combinada de C-924 con micorrizas arbusculares (MA):

M.A: <i>Glomus fasciculatum</i>	
Cultivo: Pepino	
Variables evaluadas:	
§ Altura de la planta	§ Rendimiento
§ Diámetro del tallo	§ Infestividad de las M.A
	§ Viabilidad de C-924



Se pudo comprobar en el campo, que la combinación de HeberNem (C-924) y MA (*Glomus fasciculatum*), fue muy favorable para el cultivo, esto se manifestó fundamentalmente en el incremento de los rendimientos. Estos resultados confirmaron los experimentos en macetas que mostraron compatibilidad y sinergismo entre C-924 y las micorrizas (*G. fasciculatum* y *G. clarum*).

Para el caso de otros biorreguladores del suelo (ej: *Trichoderma* y *Bacillus* spp) también se obtuvieron resultados favorables en cuanto a los estudios de interacción de la cepa C-924 con dichos microorganismos.

Resultados de la extensión de campo realizada en las casas de cultivos de la Empresa Citrícola “La Jíquima”:

Teniendo en cuenta los resultados favorables de todos los experimentos anteriores, se procedió a extender las aplicaciones a otras casas de cultivos de la empresa. Los resultados se resumen a continuación:

casa	área/ha	Cult. Anterior	Grado	Cultivo	Plantas	P.muertas	% ET Efectividad técnica	Duración del Ciclo (días)	Producción Ton/ha
					iniciales	Final			
17 (B1)	0.04	Melón	1	Tomate HA 3019	810	0	%ET ¹ = 100	110	49.9
18 (B1)	0.04	Melón	1	Tomate HA 3019	810	0	%ET ¹ = 100	110	52.8
19 (B1)	0.04	Melón	1	Tomate HA 3019	810	0	%ET ¹ = 100	110	63.8
20 (B1)	0.04	Melón	2	Tomate HA 3105	810	0.6 %	%ET ¹ = 79	110	62.9
22	0.09	Pimiento	5	Tomate HA 3105	2167	0	%ET ² = 100	110	54.4

23	0.09	Pimiento	5	Tomate HA 3105	2167	0	%ET²= 100	110	57.0
12	0.09	Tomate	5	Pimiento Dember	2167	3.1 %	%ET²= 94	215	56.7
13	0.09	Pepino	4	Pimiento Dember	2167	7.8 %	%ET²= 81	215	54.5
7	0.09	Tomate	4	Pimiento Dember	2167	1.8 %	%ET²= 96	210	32.3
8	0.09	Tomate	4	Pimiento Dember	2167	0.4 %	%ET²= 99	210	45.6
33	0.09	Pimiento	4	Tomate 9916	2167	0.3 %	%ET²= 99	110	50.2
34	0.09	Pimiento	4	Tomate 9916	2167	0.6 %	%ET²= 98	110	33.6

El éxito de las casas tratadas con este bionematicida, se deben en gran medida al conocimiento del producto que tienen los especialistas, técnicos y trabajadores de La Jíquima acerca de HeberNem.

En segundo lugar, históricamente se han hecho aplicaciones de materia orgánica y humus, esto ha permitido que los contenidos de materia orgánica de los suelos estén sobre el 3 %, este componente del suelo es vital para que C-924 permanezca mayor tiempo en el suelo y por tanto ejercer un control efectivo sobre los nematodos.

En la Jíquima también se garantiza que el producto llegue a la zona radicular de la planta ya que las dos primeras aplicaciones se realizan con mochila, siempre cuidando la uniformidad de la aplicación.

En el caso de las casas de pimiento 12 y 13, se realizó una cuarta aplicación del producto, esto puede haber influido en los bajos porcentajes de muertes de plantas por nematodos, a pesar del alto índice de afectación inicial.

Otro factor favorable en La Jíquima ha sido los resultados de los muestreos del sustrato de los semilleros y de las casas tratadas donde siempre las concentraciones de C-924 han estado por encima de 10^5 UFC/g de suelo (requerida para un control efectivo de nematodos).

En estas empresa todas las siembras realizadas desde abril del 2004 se realizan con el empleo de HeberNem, por tanto desde esa fecha no aplican químicos para el control de nematodos.

Resumen sobre los resultados de los experimentos realizados en las casas de cultivos de la Empresa Citrícola “Sierra de Cubitas”, Camagüey:

En esta empresa se desarrolló el experimento en la casa de cultivo número 14 que cumplió con los requerimientos mínimos de contenido de materia orgánica, sistema de riego, drenaje y adecuada aerotecnia, los resultados fueron los siguientes:

casa	área/ha	Cult. Anterior	Grado	Cultivo	% infest.	% ET Efectividad técnica	Duración del Ciclo (días)	Producción Ton/ha
					Final			
14	0.09	Pepino	1	Tomate HA 3108	0	%ET¹= 100	110	31.4

También se montó la experiencia en la casa número 25, pero se abortó el ensayo ya que no cumplió con la exigencia mínima del contenido de materia orgánica (3 %).

En esta empresa se confirmaron los resultados observados en “La Jíquima”, en cuanto a la efectividad de este binematicida en el control de fitonematodos parásitos, siempre que se cumplan con las exigencias del producto, como es el caso de la presencia de materia orgánica en el suelo.

En la actualidad esta empresa ha mejorado el contenido de materia orgánica en sus áreas y cuenta con 1,5 ha protegidas por HeberNem en lugar de los químicos.

Resumen sobre los resultados de los experimentos en las casas de cultivos de la Empresa Citrícola “Arimao”, Cienfuegos:

En este caso se desarrollaron los experimentos en dos lugares dentro de la empresa: Cumanayagua y Cienfuegos. A continuación se presenta la información de las casas donde se cumplieron con los requerimientos técnicos para el bionematicida y en las que se contó con los datos necesarios para determinar la Efectividad Técnica del producto (% ET):

Áreas en investigación							% infest.	% ET	Producción
Lugar	casa	área/ha	Cult. Anterior	% infest.	Cultivo	Materia Orgánica	final	Efectividad técnica	Ton/ha
Cumanayagua	T2	0.09	Tomate	50	Melón	½ del área	14	%ET ¹ = 72	31.6
Cumanayagua	P2	0.12	Tomate	40	Melón	1Lb/planta	4.3	%ET ¹ = 89	(afect. huracán)
Cienfuegos	9	0.09	Tomate	16.6	Tom.FA572	1Lb/planta	1.5	%ET ³ = 91	48.4

En estas tres casas los resultados finales fueron considerados como satisfactorios (ver la Efectividad técnica alcanzada en cada caso).

La casa P2 presentó un buen resultado en cuanto al control de nematodos, pero los rendimientos finales fueron severamente afectados al tener que quitarse los techos por la aproximación del huracán Iván. Por esta misma razón otras casas de cultivos no pudieron ser incluidas en los resultados experimentales.

En la casa número 9 de Cienfuegos se realizó una evaluación de la Efectividad Técnica evaluando los grados de afectación por cada planta muestreada (% ET³ = 91), lo cual permitió conocer con mayor certeza la eficacia del bionematicida.

Hasta el presente se ha aplicado HeberNem en 3,7 ha, pero los contenidos de materia orgánica en las casas de Cumanayagua están por debajo de los requerimientos mínimos. En el caso de las áreas de Cienfuegos, se cuenta con las condiciones necesaria y por ello todas las siembras se realizan actualmente con el uso de HeberNem en sustitución de los químicos.

Resumen sobre los resultados de los experimentos realizados en las casas de cultivos de la Empresa Citrícola “Ceballos”, Ciego de Avila:

Se desarrolló el experimento en la casa de cultivo número 1-D que cumplió con los requerimientos mínimos de contenido de materia orgánica, sistema de riego y drenaje pero tuvo dificultades con la agrotécnia, no obstante los resultados fueron los siguientes:

					% infest.	% ET	Duración del	Producción
casa	área/ha	Cult. Anterior	Grado	Cultivo	Final	Efectividad técnica	Ciclo (días)	Ton/ha
1-D	0.12	Tomate	5	Tomate 832	62	%ET ³ = 62.2	136	93.0

A pesar de no realizarse la tercera aplicación, se lograron buenos resultados, teniendo en cuenta además que la variedad de tomate empleada es altamente susceptible al ataque de nematodos.

En estos momentos esta empresa tiene un plan mensual de siembra de 1 ha con el empleo de HeberNem en sustitución de los productos químicos.

Resumen sobre los resultados de los experimentos realizados en las casas de cultivos de la Empresa Citrícola “Ceiba”, La Habana:

El experimento se desarrolló en la casa de cultivo número 11 del módulo 1. Esta casa cumplió con todos los requerimientos necesarios de contenido de materia orgánica, sistema de riego y drenaje, así como una buena agrotécnica, los resultados fueron los siguientes:

casa	área/ha	Cult. Anterior	Grado	Cultivo	% infest.	% ET	Duración del Ciclo (días)	Producción Ton/ha
					Final	Efectividad técnica		
11	0.4	Tomate	5	Tomate “Yulia”	4,5	%ET³= 95.1	126	89,6

Los resultados en el control de nematodos fueron muy positivos, al igual que los altos rendimientos de esta área que fue dedicada a la exportación.

La Empresa Ceiba ha incrementado sus planes de siembra por encima de 1 ha al mes, también está empleando el producto HeberNem en todos los sustratos de los semilleros de sus 12 ha de cultivos protegidos.

4. CONCLUSIONES

- Se reportan por primera vez a las bacterias aisladas del suelo *Sphingobacterium spiritivorum* cepa C-926 y *Tsukamurella paurometabola* (*Corynebacterium paurometabolum*) cepa C-924, por sus propiedades nematocidas.
- La actividad nematocida de *T. paurometabola* cepa C-924 en los experimentos *in vitro* presentó un marcado efecto inhibitorio de la eclosión de los huevos y disminuyó significativamente la vitalidad de los juveniles, lo cual se manifiesta en su menor CL50 y CL95 con respecto a las restantes cepas estudiadas.
- *T. paurometabola* cepa C-924 presentó mayor efectividad que las restantes cepas, en el control de fitonematodos en los experimentos en macetas, al reducir significativamente la formación de nódulos (*M. incognita*) y la población de especímenes en las raíces (*R. similis*), a pesar de haberse aplicado a la menor concentración celular.
- Se demostró por primera vez la ocurrencia de cambios y daños en la capa externa de los huevos y la cutícula de los juveniles de nematodos tratados con *T. paurometabola* cepa C-924, que junto a la aparición de vacuolas gaseosas en ambos casos, impiden la eclosión de los huevos y provocan la muerte de los juveniles.
- El modo de acción de *T. paurometabola* cepa C-924 sobre nematodos, se debe fundamentalmente al efecto combinado del sobrenadante del medio de cultivo donde crece la bacteria (quitinasas) y de los gases emitidos por la misma (sulfuros).
- *T. paurometabola* cepa C-924 (HeberNem) bajo condiciones de campo fue el tratamiento más efectivo al reducir las poblaciones de fitonematodos en plátano al 10,4 %, banano al 12,36 % y en tomate disminuyó la afectación por debajo de grado 1.
- Las exigencias para el uso correcto de HeberNem se corresponden con el manejo integrado de plagas y favorecen los cultivos protegidos en todos los sentidos (ver “Manual de Aplicación del Bionematicida HeberNem” que se anexa a la presente ponencia)
- HeberNem (*T. paurometabola* cepa C-924) constituye un nuevo aporte a las alternativas de control de nematodos que contribuirá a la disminución de los daños sin contaminar el medio ambiente.
- HeberNem sustituye productos químicos tóxicos de importación a un costo por ha de cultivos protegidos inferior al 50 %.

5. RECOMENDACIONES

- Dar cumplimiento a los requisitos y procedimientos descritos en el “Manual de Aplicación del Bionematicida HeberNem” para los cultivos protegidos (se anexa a la presente ponencia).
- Continuar con los estudios de aplicación de HeberNem en otros agroecosistemas y en otros cultivos de importancia económica.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-el-Malek, Y., y Monib, M. “The effect of DD nematocide on soil micro-organisms”. *Folia Microbiol.* Praha: 13 (4), 270-274, 1968.
- Álvarez, E. “Estudio Fisiológico para el establecimiento de las condiciones de fermentación de la cepa *Corynebacterium paurometabolum* C-924 con actividad bionematicida. Trabajo de diploma, Ingeniero Químico. Universidad de Camagüey, Facultad de Química-Farmacia, 2001.
- Araya, M.; Centeno, M. y Carrillo, W. “Densidades poblacionales y frecuencias de los nematodos parásitos del banano (*Musa AAA*) en nueve cantones de Costa Rica”. Corbana: 20 (43), 6-11, 1995a.
- Araya, M.; Carrillo, W. y Ramírez, A. “Comparación de tres métodos de recuperación de nematodos en raíces de banano *Musa AAA*”. Corbana: 20 (43), 11-17, 1995b.
- ATCC. American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA. [En línea] <http://.atcc.org/contact.cfm>, 2003. [Consulta: 23 de agosto 2003]
- Bello, A.; López-Pérez, J. A.; García-Álvarez, A., y Sanz, R. “Biofumigation and nematode control in the Mediterranean region”. *Nematology*: 4 (2), p143, 2002.
- BioMérieux S. A. Catalogue Analytique, API 20 NE. 69280 Marcy l'Etoile, France, 1992a.
- BioMérieux S. A. Catalogue Analytique, API 50 CH. 69280 Marcy l'Etoile, France, 1992b.
- BioMérieux S. A. Catalogue Analytique, API Coryne. 69280 Marcy l'Etoile, France, 1992c.
- Bird, A. F. *The Structure of Nematodes*. Academic Press, New York , USA, 279-299, 1971.
- Bird, A. F. “The influence of the actinomycete *Pasteuria penetrans* on the host-parasite relationship of the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*”. *Parasitology*: 93, 571-580, 1986.
- Bone, L. W.; Bottjer, P. K., y Gill S. S. “Alteration of *Trichostrongylus culubriiformis* egg permeability by *Bacillus thuringiensis israelensis* toxin”. *J. Parasit.*: 73 (2), 295-299, 1987.

- Bone, L. W.; Bottjer P. K., y Gill S. S. "Factors affecting the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* israelensis toxin for *Trichostrongylus culubriiformis* (Nematoda)". *Journal of Invertebrate Pathology*: 52, 102-107, 1988.
- Bone, L. W. "Activity of commercial *Bacillus thuringiensis* preparations against *Trichostrongylus culubriiformis* and *Nippostrongylus brasiliensis*". *Journal of Invertebrate Pathology*: 53, 276-277, 1989.
- Borgonie, G. "Germination of *Bacillus thuringiensis* spores in bacteriophagous nematodes (*Nematoda: Rhabditida*)". *Journal of Invertebrate Pathology*: 65, 61-67, 1995.
- Bottjer, K. P., y Bone, L. W. "Changes in morphology of *Trichostrongylus culubriiformis* eggs and juveniles caused by *Bacillus thuringiensis* israelensis". *Journal of Nematology*: 19 (3), 282-286, 1987.
- Calvo, C. y Araya, M. "Comparación de la eficacia de aplicaciones de nematocidas en banano (*Musa AAA*) usando dos sitios de muestreo". *Corbana*: 26 (53), 11-20, 2000.
- Casanova, A. Guía técnica para la producción protegida de hortalizas en Casas de Cultivo tropical con efectos de "sombrija". MINAGRI. Instituto de Investigación Hortícola "Liliana Dimitrova", 1999.
- Chet, I., e Invar, J. "Biological control of fungal pathogens". *Appl. Biochem. Biotechnol*: 48 (1), 37-43, 1994.
- CITMA. "Programas Nacionales Científico-Técnicos. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente". Edición PUBLICIEN, Ciudad Habana, Cuba, 13-15, 1995.
- Collins, M.D.; Smida, J.; Dorsh, M., y Stackebrandt, E. "*Tsukamurella* gen. nov. harboring *Corynebacterium paurometabolum* and *Rhodococcus aurantiacus*". *Int. J. Syst. Bacteriol.*: 38, 385-391, 1988.
- Curbelo, R. Comunicación personal. Especialista en Sistemas de Computación. Dirección Provincial de Suelos y Fertilizantes, calle Cacocún # 11, reparto Puerto Príncipe, Camagüey, 2002.
- Current Drogas Patents. [En línea] [http>\ ChemWeb.com](http://ChemWeb.com), 2002. [Consulta: 9 de mayo, 2002]
- Davies, K. G., y Danks, C. "Interspecific differences in the nematode surface coat between *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* related to adhesion of the bacterium *Pasteuria penetrans*". *Parasitology*: 105, 475-480, 1992.
- Dive, V., y Yiotakis, A. "Peptide inhibitors of *E. collagenolyticum* bacterial collagenase-effect of N-methylation. Consequences on biological activity and conformational properties". *Int. J. Pept. Protein Res.*: 39 (6), 506-515, 1992.
- Dunne, C., Delanny, I., Fenton A., y O'Gara, F. "Mechanisms involved in biocontrol by microbial inoculants". *Agro. plant genetics and breeding*: 16, 721-729, 1996.
- Eddi, C. Comunicación personal. Oficial superior (parasitología). Servicio de Sanidad Animal, Dirección de Producción y Sanidad Animal, Viale delle terme di Caracalla – 00100 Roma, Italia, 2003.
- Elena, J. M., y Fernández, M. Guía técnica para ensayos de variedades en campo. Estudio FAO producción y protección vegetal. Roma, Italia, 1986.
- Entwistle, P. F.; Cory, J. S.; Bailey, M. J., y Higgs, E. *Bacillus thuringiensis*, an environmental Biopesticide: Theory and Practice. John Wiley & Sons Ltd, Baffin Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England, 1993.
- Espaine, L., y Lines, R. Manual de parasitología y enfermedades parasitarias II. ISCAH, Facultad de Medicina Veterinaria. Ministerio de Educación Superior, Ciudad de la Habana, 1983.
- Expósito, M. "Cultivo de una cepa bionematicida de *Tsukamurella paurometabola* hasta escala de 50 L". Trabajo de diploma, Ingeniero Químico. Universidad de Camagüey, Facultad de Química-Farmacia, 2000.

- Falcón, V. "Expresión de antígenos de dos virus hepatotrópicos en hepatocitos y en cepas de la levadura *Pichia pastoris* transformada". Tesis de grado, Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de la Habana, Facultad de Biología, 2000.
- Fernández, A. S.; Larsen, M.; Nansen, P.; Gronvold, J.; Henriksen, S. A., y Wolstrup, J. "Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of the horse parasitic nematodes: a pilot study". *Veterinary Parasitology*: 73, 257-266, 1997.
- Fernández, E. "Relatoría del Taller de Plagas en Plátano y Banano". Talleres anuales de Generalización de Resultados. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana, 17 de enero, 2002.
- Fetterer, R. H., y Urban, J. F. "Develomental changes in cuticular proteins of *Ascaris suum*". *Comp. Biochem. Physiol.*: 90B, 321-327, 1988.
- Fujimoto, D. "Action of bacterial collagenase on *Ascaris* cuticle collagen". *J. Biochem.*: 78 (5), 905-909, 1975.
- Fukamizo, T., y Brzezinski, R. "Chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174: a comparative review of its structure and function". *Biochem Cell Biol.*: 75 (6), 687-696, 1997.
- Gowen, S., y Quénéhervé, P. "Nematode parasites of bananas, plantains and abaca". Luc M, Sikora RA, Bridge J, eds. *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. Wallingford, UK: CAB International, 431-460, 1990.
- Gowen, S.R. "Chemical control of nematodes: efficiency and side-effects". [En línea] <http://www.fao.org/docrep/v9978e/v9978e08.htm>, 2001. [Consulta: 25 de marzo, 2001]
- Granel, F.; Lozniewski, A.; Barbaud, A.; Lion, C.; Dailloux, M.; Weber, M., y Schmutz, J.L. "Cutaneous infection caused by *Tsukamurella paurometabolum*". *Clin. Infect. Dis.*: 23 (4), 839-840, 1996.
- Grupo Nacional de Agricultura Urbana. Manual técnico de Organopónicos y Huertos Intensivos. Edición AGRINFOR, Ciudad de La Habana, Cuba, 2000.
- Hernández, A.; Sánchez, H.; Olivera, V.; Expósito, M.; Gonzalez, N., y Wong, I. "Estimating the growth of *Corynebacterium paurometabolum* in heterogeneous media". *Process Biochemistry*: 35 (9), 873-876, 2000.
- Hernández, A. "Efectos ultraestructurales provocados por el *Corynebacterium paurometabolum* C-924 sobre los huevos y larvas de nematodos". Trabajo de diploma, Licenciado en Bioquímica. Universidad de la Habana, Facultad de Biología, 2000.
- Hernández, A.; Pimentel, E., y Mena, J. "Minibioreactor-gas collector for determining bacteria-produced hydrogen sulfide". *Electronic Journal of Biotechnology* (aceptado para publicar), 2003.
- Hewlett, T. E.; Gerber, J. F.; Smith, K. S., y White, J. H. "*In vitro* culture of *Pasteuria penetrans*". *Nematology*: 4 (2), p152, 2002.
- Hidalgo, L. "Desarrollo de *Pochonia chlamidosporia* como agente de control biológico de nematodos agalleros". Taller sobre el control biológico de fitonematodos, CIGB, Ciudad de La Habana, 14 de agosto, 2002.
- Holland, R. PAECILTM. [En línea] <http://www.ticorp.com.au/article1.htm>, 1998. [Consulta: 12 de noviembre 2001]
- Holt, G. J.; Krieg, R. N.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T., y Williams, S. T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition, Editorial Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 1994.
- Instituto de Suelos. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana, Cuba, 1999.
- Jaffee, B. A. "Population biology and biological control of nematodes". *Can. J. Microbiol.*: 38, 359-364, 1992.

- Jenkins, W. R. "A rapid centrifugal-flotation technique for separation nematodes from soil". *Plant Disease Reporter*: 48, 692, 1964.
- Jiménez, G. Comunicación personal. Especialista en Bacteriología. Establecimiento Provincial de Sanidad Vegetal del MINAGRI. Ave. Finlay, Km 2 ¹/₂, e/ Planta de Nitrógeno y Circunvalación Norte, Camagüey, 1996.
- Johnstone, I. L. y Barry, J. D. "Temporal reiteration of a precise gene expression pattern during nematode development". *EMBO J.*: 15 (14), 3633-3639, 1996.
- Kerry, B. "Microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes". Congreso Internacional de Nematología Tropical, Rio Quente, Brasil. Program and Proceedings: 244-250, 1995.
- Labadie, J. "Synthesis of collagenase by the phytopathogenic bacterium *Corynebacterium rathayii*". *J. Appl. Bacteriol.*: 69 (6), 828-833, 1990.
- Larsen, M. "Biological control of helminths". *Int. J. Parasitol.*: 29 (1), 139-146, 1999.
- Larsen, M. "Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi". *Parasitology*: 120, 120-121, 2000.
- Lerch, G. La Experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. 1ra. edición, Editorial Científico-Técnica, La Habana, Cuba, 1977.
- Levy, A. D., y Kramer, J. M. "Identification, sequence and expression patterns of the *Caenorhabditis elegans* col-36 and col-40 collagen-encoding genes". *Gene*: 137 (2), 281-285, 1993.
- Liu, Z.; Kirch, S., y Ambros, V. "The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene pathway controls stage-specific transcription of collagen genes". *Development*: 121 (8), 2471-2478, 1995.
- Loos, C. A. "Studies on the life history and habits of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, the cause of blackhead disease of banana". *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*: 29, 43-52, 1962.
- Lucas, B. G. "Plant parasitic nematodes of banana, citrus, coffee, grapes and tobacco". Union Carbide Agricultural Products Company, Inc., USA, 1-93, 1986.
- Mansfield, L. S.; Gamble, H. R., y Fetterer, R. H. "Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*—1. Structural components". *Comp. Biochem. Physiol.*: 103B (3), 681-686, 1992.
- Mark, T. "Biopesticide and biocontrols nematodes biologically". *Bio/Technology*: 5, p 772, 1987.
- McKenry, M. "Nematicides". *Encyclopedia of Agricultural Science*: 3, 87-95, 1994.
- Meadous, J.; Gill, S. S., y Bone, L. W. "Factors influencing lethality of *Bacillus thuringiensis* kurstaki toxin for eggs and larvae of *Trichostrongylus culubriiformis* (Nematoda)". *J. Parasitol.*: 75 (2), 191-194, 1989.
- Mena, J.; de la Riva, G.; Vázquez, R. P.; Fernández, M.; Coego, A.; García, M.; Pimentel, E.; López, A.; García, R.; Zaldúa, Z., y Mencho, J. D. "Nematicidic agent and method for the bio-control of nematodes". International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT 0397), WO 96/04749, February 22, 1996a.
- Mena, J.; Vázquez, R. P.; Fernández, M.; García, M.; Pimentel, E.; López, A.; Zaldúa, Z.; de la Riva, G. J.; Mencho, J. D.; Pérez, L.; García, R.; Coego, A.; Almazán, M.; Somontes, D.; Morán, R., y Selman-Housein, G. "New Bio-regulators to Control Plant Parasitic Nematodes". VI Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas, Acapulco, Mexico. *Memorias*: p150, 1996b.
- Mena, J.; Veloz, L.; Vázquez, R. P.; Expósito, M.; Marín, M.; Salazar, E.; León, L.; Coca, Y.; Ramírez, Y.; Rodríguez, G.; Hernández, A. T., y Pimentel, E. "Population of *Corynebacterium paurometabolum* strain C-924 in soils treated with HeberNem". *Nematology*: 4 (2), p287, 2002.

- Mena, J., y col. "Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nematodos". Biotecnología Aplicada, vol. 20, no. 4, 2003.
- Mena, J., y col. "PESTICIDAL AND ANTIPARASITIC COMPOSITIONS". US 20040071663 A1, abril, 2004.
- Morgavi, D. P., y Sakurada, M. "Electrophoretic forms of chitinolytic and lysozyme activities in ruminal protozoa". Curr. Microbiol.: 32 (3), 115-118, 1996.
- Ongena, M. "Conference on biological controls". Training program in the area of biotechnology applied to agriculture and bioindustry. Gembloux, Belgium, 1999.
- Ou, L. "Interaction of microorganisms in soil during fenamiphos degradation". Soil Sci. Soc. Am. J.: 55, 716-722, 1991.
- Páez, B. "Estudio de mercado de los nematocidas. Propuesta de estrategia de comercialización del producto cubano C-926". Consultoría Biomundi, Ciudad de La Habana, 1997.
- Poinar Jr., G. O.; Thomas, G. M., y Lighthart, B. "Bioassay to determine the effect of commercial preparations of *Bacillus thuringiensis* on entomogenous *Rhabditoid* nematodes". Agriculture, Ecosystems and Environment: 30, 195-202, 1990.
- Püntener, W. Manual para ensayos de campo en protección vegetal. División Agricultura, CIBA-GEIGY S.A. Basilea, Suiza, 1981.
- Ramos, E. Comunicación personal. Especialista en los cultivos de Plátano y Banano. Departamento de Cultivos Varios de la Delegación Provincial del MINAGRI. Calle Rosario y Tuinicú, Camagüey, 2002.
- Reed, I. J., y Muench, H. "A simple method for estimating fifty percent end points". Am. J. Hyg.: 27, 493-497, 1938.
- Rhoads, M. L., y Fetterer, R. H. "Biochemical and immunochemical characterization of 125I-labeled cuticle components of *Haemonchus contortus*". Mol. Biochem. Parasitol.: 42 (2), 155-164, 1990.
- Rodríguez-Kábana, R.; Jordan, J. W., y Hollis, J. P. "Nematodes: Biological control in rice fields- role of hydrogen sulfide". Science: 148, 524-526, 1965.
- Rodríguez, M.; de la Torre, M., y Urquijo, E. "*Bacillus thuringiensis*: Características biológicas y perspectivas de producción". Revista Latinoamericana de Microbiología: 33 (4), 280, 1991.
- Rodríguez-Kábana, R. "Control biológico de nematodos parásitos de plantas". Nematropica: 21 (1), 111-122, 1991.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd.Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., USA, 1989.
- Sanyal, P. K. "Screening for Indian isolates of predacious fungi for use in biological control against nematode parasites of ruminants". Vet. Res. Commun.: 24 (1), 55-62, 2000.
- Schrempf, H. "The chitinolytic system of streptomycetes". Advances in chitin science: 123-128, 1996.
- Seeley, H. W.; VanDemark, P. J., y Lee, J. J. Microbes in action. A Laboratory Manual of Microbiology. Fourth Edition, W. H. Freeman and Company, New York, 1991.
- Segers, R., y Butt, T. M. "The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ". Microbiology: 140 (10), 2715-2723, 1994.
- Sharma, R. D. "*Bacillus thuringiensis*: a biocontrol agent of plant parasitic nematodes". Congreso Internacional de Nematología Tropical, Rio Quente, Brasil. Program and Proceedings: 251-254, 1995.
- Sigarroa, A. Biometría y diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba, 1985.

- Sijmons, P. C.; Grundler, F. M. W.; von Mende, N.; Burrows, P. R., y Wyss, U. "Arabidopsis thaliana as a new model host for plant parasitic nematodes". The Plant Journal: 1 (2), 245-254, 1991.
- Sikora, R. "Utilization of symbiotic and mutualistic rhizosphere microorganisms for the biological control of plant parasitic nematodes". Congreso Internacional de Nematología Tropical, Rio Quente, Brasil. Program and Proceedings: 233-236, 1995.
- Sivan, A., y Chet, I. "Microbial control of plant disease". Environmental Microbiology. R. Mitchell, Wiley-Liss, Inc. Edit. 335-374, 1992.
- Smelt, J.; Vande Peppel-Groen, A.; Vander Pas, E., y Dijksterhuis, A. "Development and duration of accelerated degradation of nematicides in different soils". Soil Biol. Biochem.: 28, 1757-1765, 1996.
- Spiegel, Y.; Cohn, E.; Galper, S.; Sharon, E., y Chet, I. "Evaluation of newly isolated bacterium, *Pseudomonas chitinolitica* sp. nov., for controlling the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*". Biocontrol Science and Technology: 1, 115-125, 1991.
- Spurr, A. R. "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy". J. of Ultrastructural Research: 26, 31-43, 1969.
- Steinhaus, E. A. "A study of the bacteria associated with thirty species of insects". J. Bacteriol.: 42, 757-790, 1941.
- Suslow, T., y Jones, D. G. "Chitinase-producing bacteria and plants, patent US05502535". IBM Intellectual Property Network, 1994.
- Suslow, T., y Jones, D. G. "Chitinase-producing bacteria, patent US05776448". IBM Intellectual Property Network, 1998.
- Toda, T., y Matsuda, H. "Antibacterial, anti-nematode and/or plant-cell activating composition, and chitinolytic microorganisms for producing the same". United States Patent Number 5208159, 1993.
- Turner, J. T., y Backman, P. A.. "Factors relating to Peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*". Plant Disease: 75 (4), 347-353, 1991.
- Udonsi, J. K. "Changes in lipid contents of infective third-stage larvae of *Necator americanus* during desiccation and revival". Z. Parasitenk: 70 (1), 81-85, 1984.
- Utkhede, R. S. "Potential and problems of developing bacterial biocontrol agents". Canadian Journal of Plant Pathology: 18, 445-462, 1996.
- Vázquez, R. P. Comunicación personal. Especialista en Fitonematología. Establecimiento Provincial de Sanidad Vegetal del MINAGRI. Ave Finlay. Km 2 ^{1/2}, e/ Planta de Nitrógeno y Circunvalación Norte, Camagüey, 1995.
- Vázquez, R. P. Comunicación personal. Especialista en Fitonematología. Establecimiento Provincial de Sanidad Vegetal del MINAGRI. Ave Finlay, Km 2 ^{1/2} e/ Planta de Nitrógeno y Circunvalación Norte, Camagüey, 2001.
- Vázquez, R. Comunicación personal. Especialista en Análisis de Datos. Vice-decano de Investigaciones y Post-grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Circunvalación Norte Km 5 ^{1/2}, Camagüey 74650, 2003.

Veloz, L. “*Corynebacterium paurometabolum*: obtención de un suero policlonal para su reconocimiento inmunológico y establecimiento de un protocolo para su transformación genética”. Trabajo de diploma, Licenciado en Farmacia. Universidad de Camagüey, Facultad de Química-Farmacia, 1998.

Waite, J. H.; Tanzer, M. L., y Merkel, J. R. “*Nereis* cuticle collagen. Proteolysis by marine vibrial and clostridial collagenases”. *J. Biol. Chem.*: 255 (8), 3596-3599, 1980.

Waller, P. J., y Faedo, M. “The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: screening studies”. *Vet. Parasitol.*: 49, 285-297, 1993a.

Waller, P. J., y Faedo, M. “The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock”. *Int. J. Parasitol.*: 23 (4), 539-546, 1993b.

Wharton, W. A., y Bone, L. W. “*Bacillus thuringiensis israelensis* toxin affects egg-shell ultrastructure of *Trichostrongylus culubriiformis* (Nematoda)”. *Invertebrate Reproduction and Development*: 15 (2), 155-158, 1989.

Yiotakis, A., y Lecoq, A. “Phosphinic peptide analogues as potent inhibitors of *Corynebacterium rathayii* bacterial collagenase”. *Biochem. J.*: 303 (1), 323-327, 1994.

Zaldúa, Z. “Formulación de un bionematicida en soporte sólido”. Trabajo de diploma, Ingeniero Químico. Universidad de Camagüey, Facultad de Química-Farmacia, 2001.

Zeck, W. M. “A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations”. *Pflanzenschutz-Nachrichten, Bayer*: 24, 141-144, 1971.

Zuckerman, B. M.; Dicklow, M. B., y Marban-Mendoza, N. “Nematocidal *Bacillus thuringiensis* biopesticides”. *PCT WO 93/19604*, 1993.