

Aislamiento de cepas de *Bacillus* spp. provenientes de suelos boscosos de Puerto Rico y su potencial como antagonista del nemátodo nodulador *Meloidogyne* spp.

Por

ODÁLIZ FARÍA MEDINA

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

PROTECCIÓN DE CULTIVOS

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2013**

Aprobado por

Myrna Alameda Lozada, MS.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Lydia Rivera Vargas, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Roberto Vargas Ayala, Ph. D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Elvin Román Paoli, Ph. D.
Director del Departamento

Fecha

John Fernández Van Cleve Ph D.
Representante de estudios graduados

Fecha

ABSTRACT

The objective of this research was to identify native bacteria strains with antagonistic properties against juvenile and eggs of tomato root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). Two sampling sites located in the rainforest in the center in the island were selected. One of them was Toro Negro at Jayuya and the other one was Cerro Guilarte at Adjuntas. Criteria related to the bacterial growth on media were used to select two colonies from each sampling site. Biochemical tests such as gram staining, green malachite, catalase, oxidase, and KOH was used to characterize bacterial isolates

Antagonism potential of those selected bacterial was evaluated *in vitro* and greenhouse assay. Results showed that treatments with bacterial strains GU-2.1 and GU-4.5 decreased *Meloidogyne* spp. eggs hatch *in vitro* compare to the control ($\alpha=0.05$). In contrast, greenhouse assays showed that these tomato plants inoculated with *Meloidogyne* spp. and treated with bacterial suspension of GU-2 strain and GU-4.5 did not showed differences ($\alpha=0.05$) of the female inside the root. But difference ($\alpha=0.05$) were observed in the number of plant parasitic nematodes counted in soil after GU-2.1 treatment application. This treatment showed a reduction of plant parasitic nematode population in the soil. According to the Biolog data base, bacterial strains used in our assay were identified as *Bacillus thuringiensis*.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue identificar cepas nativas de bacterias antagonista en contra de huevos y juveniles de *Meloidogyne* spp. utilizando raíces de tomates. Toro Negro y Cerro Guilarte fueron las localidades muestreadas para el aislamiento de bacterias, localizadas en zonas boscosas en el centro de la isla. Para la selección de las colonias fueron utilizados criterios relacionados al crecimiento mostrado por los aislados. Pruebas bioquímicas como: verde malaquita, oxidasa y KOH fueron utilizadas para caracterizar los aislados bacterianos.

El potencial antagónico de estas bacterias seleccionadas fue evaluado, bajo condiciones *In vitro* e invernadero. Los resultados de las evaluaciones *In vitro* mostraron que los tratamientos GU-2.1 y GU-4.5 disminuyeron la eclosión de los huevos en comparación con el control ($\alpha=0.05$). Por el contrario en los resultados observados en el ensayo de invernadero donde se utilizó plantas de tomates inoculadas con *Meloidogyne* spp. los aislados GU-2.1 y GU-4.5 no mostraron diferencias de ($\alpha=0.05$) en relación con la formación de agallas. Mientras que diferencias de ($\alpha=0.05$) fueron observadas en el número de larvas contabilizadas en el suelo luego de haber aplicado el tratamiento GU-2.1, el cual mostró reducción. Utilizando la base de datos de Biolog todas las cepas bacterianas fueron identificadas como: *Bacillus thuringiensis*.

*A mi familia, por ser mi
cimiento y en especial a
S.Molina Avecedo por
enseñarme la lección más
importante en mi vida, creer
en Él.*

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que de una manera colaboraron para que se llevara a cabo mi proyecto de tesis. Primeramente, quiero agradecerle a Dios por todo. A mi familia, María Medina, Raúl Faría y Kelvyn Faría por ser incondicionales y acompañarme en este viaje que he dado por la vida. Carol Faría por tu ayuda, consejos y por creer en mí siempre. Hubo muchos contratiempos que pudieron quitarme del camino, pero gracias ustedes se fusionaron todos mis esfuerzos, pasiones y anhelos para alcanzar una meta más en mi vida.

Al Dr. Roberto Varga Ayala por darme la oportunidad de seguir adquiriendo nuevos conocimientos y desarrollar mis destrezas como estudiante graduada. A los miembros de mi comité la profesora Myrna Alameda y Dra. Lydia Rivera por ser mis mentoras y educadoras durante estos años. A los profesores Elide Valencia, James Beaver y Consuelo Esteves por permitir que fuera parte de sus proyectos. Al proyecto TSTAR-131 de la Estación Experimental Agrícola. Quiero agradecer por su colaboración al estudiante Rubén Irizarry y a los agrónomos Rubén Santos y Luis Collazo fueron ustedes una herramienta fundamental.

A mis compañeros Carlos Bolaño, Dainette Vázquez y Denisse Rivera por su compañía y ayuda durante este tiempo. Gracias a todas esas personas que me apoyaron por distintas vías en este proceso, me brindaron su compañía y amistad.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
RESULTADO.....	30
EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>.....	30
Aislamiento de bacterias del medio semiselectivo V8.....	37
Curvas de crecimiento.....	35
Evaluación del efecto antagónico de los aislados de <i>Bacillus</i> spp. sobre la eclosión de huevos de <i>Meloidogyne</i> spp.....	44
EXPERIMENTO DE INVERNADERO	45
Efecto de los aislados de <i>Bacillus</i> spp. sobre la eclosión de los huevos de <i>Meloidogyne</i> spp.....	45
Número de hembras localizadas en el interior del sistema radical de plantas de	

tomates.....	46
Identificación de los aislados de <i>Bacillus</i> spp.con el método de Biolog.....	48
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIÓN.....	53
RECOMENDACIONES.....	54
LITERATURA CITADA.....	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Bacterias contabilizadas en el medio según la dilución de suelo proveniente del Bosque de Toro Negro.....	29
Cuadro 2. Bacterias contabilizadas en el medio según la dilución de suelo proveniente del Bosque de Cerro Guilarte	30
Cuadro 3. Tinción Gram, oxidasa y catalasa, realizadas a las bacterias aisladas del los lugares muestreados de la localidad de Toro Negro.....	31
Cuadro 4. Crecimiento de las colonias aisladas de la localidad de Toro Negro sobre el medio de cultivo TSA.....	32
Cuadro 5. Pruebas químicas: Tinción Gram, oxidasa y catalasa, realizadas a las bacterias aisladas del los lugares muestreados de la localidad de Cerro Guilarte.....	33
Cuadro 6. Crecimiento de las colonias aisladas de la localidad de Cerro Guilarte, sobre el medio de cultivo TSA.....	34
Cuadro 7. Efecto de los aislados de <i>Bacillus</i> spp. sobre la eclosión del nemátodo nodulador <i>Meloidogyne</i> spp. a las 72 horas en experimento <i>in vitro</i>	43
Cuadro 8. Efecto de los aislados bacterianos sobre la eclosión del nemátodo nodulador <i>Meloidogyne</i> spp. en experimento de invernadero.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano para el aislado TN-2.3 según los datos de absorbancia espectrofotométrica durante 72 horas de incubación	36
Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano para el aislado TN-5.1 según los datos de absorbancia espectrofotométrica durante 72 horas de incubación	38
Figura 3. Curva de crecimiento bacteriano para el aislado GU-2.1 según los datos de absorbancia espectrofotométrica durante 72 horas de incubación.....	39
Figura 4. Curva de crecimiento bacteriano para el aislado GU-4.5 según los datos de absorbancia espectrofotométrica durante 72 horas de incubación	40
Figura 5. Tinción gram de los <i>Bacillus</i> spp. esporulados evaluados mediante ensayos antagónicos.....	42
Figura 6. Número de hembras en el sistema radical de plantas de tomates inoculadas con los aislados de <i>Bacillus</i> spp.....	45
Figura 7. Nódulos observados en el sistema radical de plantas de tomates inoculadas con aislados de <i>Bacillus</i> spp.....	46

INTRODUCCIÓN

Los bosques tropicales lluviosos de Toro Negro en Jayuya y Cerro Guilarte en Adjuntas fueron las dos localidades muestreadas para llevar a cabo esta investigación. Dada su ubicación geográfica en la Isla, ambos bosques poseen una tasa de precipitación anual promedio de 88 pulgadas de lluvia y una temperatura anual promedio de 70°F, según los datos del Servicio Nacional de Meteorología. En los bosques tropicales lluviosos localizados en las zonas centrales de Puerto Rico pueden ser fuente de extracción de un sin número de microorganismos. En comparación con otros suelos, los suelos boscosos tienen un ambiente complejo y heterogéneo los cuales contienen una diversidad significativa de microorganismos (Tiedje *et al.*,1999). Éstos microorganismos pueden ser utilizados como biocontroladores de patógenos de importancia en la agricultura. La acumulación de materia orgánica depositada por décadas, la alta tasa de precipitación pluvial y temperaturas anuales que fluctúan los 70°F, son características idóneas para el desarrollo de las comunidades bacterianas, las cuales están presentes en ambos bosques.

El entorno que compone éstos suelos aporta favorablemente a la estabilidad de las comunidades microbianas y a la variabilidad de organismos que los habitan. Las actividades agrícolas afectan la integridad de los suelos, a diferencia de aquellos que se encuentran en las zonas boscosas en donde los ciclos biológicos ocurren sin alteraciones (Cycón *et al.*, 2009). Los suelos localizados en los bosques, dan lugar al desarrollo de organismos saprófitos los cuales aportan grandes beneficios a las plantas y a su vez pudieran ser antagonistas o supresores de otros microorganismos dañinos. Un ejemplo de

ésto son los grupos que dominan y habitan el suelo y son formadores de esporas pertenecientes a la clase Bacilli del Filum Firmicutes. Este grupo de bacterias ha sido ampliamente utilizado en la agricultura para llevar a cabo el control de enfermedades y plagas. Entre los productos desarrollados comercialmente más destacados con utilidad en la agricultura, que contienen como ingrediente activo bacterias pertenecientes a la clase Bacili son: Bacillus SPP®, Ballad®, Kodiak®, Serenade® y Rhapsody® (Cawoy *et al.*, 2011). Éstos productos son utilizados en técnicas relacionadas al manejo integrado en donde se combinan con el control biológico utilizando microorganismos antagonistas o algún compuesto producidos por éstos (Khan *et al.*, 2007). La utilización de productos biológicos puede ofrecer ventajas al agricultor a diferencia de los químicos ya que éstos pueden promover un buen estado de desarrollo de las plantas y el suelo. Géneros bacterianos tales como; Agrobacterium, Paenibacillus, Bacillus, Pseudomonas y Streptomyces son microorganismos que pueden ser utilizados como agentes de control biológico a la vez que aumentan la posibilidad de obtener minerales tales como el fosfato y potasio (Gyaneshwar y Kumar, 2002).

Partiendo de las premisas mencionadas, bacterias del género Bacillus fueron aisladas de la rizósfera de los suelos de Toro Negro y Cerro Guilarte para evaluar su potencial antagonista sobre el nemátodo nodulador, *Meloidogyne* spp. en raíces de tomates. Los suelos muestreados para el aislamiento de bacterias fueron boscosos no perturbados. Dos factores óptimos presentes en ambos bosques fueron: la acumulación de materia orgánica y factores abióticos. Ambos factores propician la estabilidad y el desarrollo de comunidades de microorganismos benéficos asociados a la rizósfera de las plantas. Éstos ambientes no perturbados albergan un gran número de organismos que en

investigaciones previas los han reportado como agente antagonistas de nemátodos (Meneses, 2003).

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Nemátodos fitoparasíticos

Los nemátodos son organismos de morfología alargada, redondos y con cuerpo no segmentados que pueden medir desde 0.3 hasta más de 5 mm de largo. Éstos pueden habitar distintos lugares como lo son las hojas, raíces y suelo. Existe una gran diversidad de nemátodos habitando los suelos entre éstos se mencionan: nemátodos fitoparasíticos y nematodos de vida libre, el cual se alimentan de bacterias, hongos, algas y nematodos de especies de nematodos pequeños. Los nemátodos de vida libre pueden desempeñar un papel muy importante y generar efectos benéficos. Alrededor del 10% de las poblaciones corresponden a especies que son fitoparásitas y estas representan un importante factor de reducción de las cosechas en cultivos importancia mundial.

Los nemátodos que se caracterizan por ser parásitos de plantas, utilizan como fuente de alimentación las células de las plantas extrayendo su contenido por medio del estilete (Yépez, 1972). Uno de los síntomas más característico es la producción de agallas o nodulaciones en la raíz. Este síntoma es producido por *Meloidogyne* spp. considerado como el género de mayor importancia en la agricultura. Según datos de la Sociedad Americana de la Fitopatología, conocida por sus siglas en inglés como APS, se estima que los daños a causa de los nemátodos oscilan dentro de un 14% y las pérdidas económicas pueden alcanzar los 100 billones de dólares anuales (Mitkowski y Abawi, 2003). No se conocen los hábitats originales de éste género, sin embargo se reporta que éste posee una alta capacidad para adaptarse a distintas condiciones ambientales. Este nemátodo presenta un amplio rango de hospedero y las pérdidas varían según el cultivo.

1.2 Daños producto del parasitismo de *Meloidogyne* spp. y ciclo de vida

Los nemátodos formadores de agallas son parásitos biótrosos. Éstos organismos penetran las células de la raíz y seleccionan lugares de alimentación. Éstos poseen estructuras quimiosensoriales que le permiten establecer su hábitat característico de endoparásito sedentario, donde lleva a cabo parte del ciclo de vida y reproducción. El segundo estado juvenil conocido como J2 o larva infectiva es el que parasita a las plantas susceptibles. Los J2 son atraídos a la zona de alargamiento radical, atravesando las células de la raíz y luego migran intercelularmente. A medida que el nemátodo avanza va separando las células por la lámina media en el tejido cortical (Moroz y Hussey, 1996). Este proceso parece incluir fuerzas mecánicas y secreciones enzimáticas del nemátodo (Moroz y Hussey, 1996). Una vez que el nemátodo se establece en la raíz éste migra hacia la parte de arriba desde el centro de la raíz a la zona de diferenciación. Tres mudas acontecen dentro de la raíz antes de que los J2 se conviertan en adultos. Después del desarrollo de la hembra, posterior a la penetración del juvenil, los huevos son liberados a la superficie de la raíz en una matriz gelatinosa protectora. Los machos de este género migran hacia el suelo y no se alimentan.

En el lugar seleccionado para la alimentación, los nemátodos inducen un proceso de diferenciación que produce la formación de células gigantes las cuales son multinucleadas. Estas células gigantes tendrán como función ser la fuente alimentaria del nemátodo. La formación de las células gigantes es el resultado de divisiones nucleares repetidas de la célula nodriza inicial sin citoquinesis. Los núcleos formados de manera individual tienen un alto contenido de ADN, indicando que ha ocurrido la

endoreduplicación. Las células gigantes son metabólicamente activas, con un citoplasma bien desarrollado. La vacuola central desaparece, dando lugar a pequeñas vacuolas y al deterioro de la pared celular. Se piensa que este fenómeno aumenta la toma de solutos del sistema vascular. Las células de la corteza, el periciclo y la parénquima vascular presentan cambios y se dividen formando las agallas (Abad *et al.*; 2003). La formación de las agallas puede ser vista bajo el microscopio entre las 12 y 24 horas posteriores a la inoculación. Los nemátodos no solo cuentan con enzimas y mecanismos para la degradación de las paredes celulares del hospedante y la formación de las células gigantes. Además este grupo dispone de mecanismos adecuados para poner a trabajar a su favor el metabolismo de la planta infestada invadida. Es aquí donde comienza el daño principal que puede producir este nemátodo a su hospedero. Una vez la función del sistema radical es interrumpido, las partes aéreas de la planta se ven afectada. Los daños varían de acuerdo a la especie de nematodo que esté parasitando la planta, las densidades poblacionales que se encuentren en la raíz y las condiciones ambientales presentes. Los factores ambientales son de importancia ya que el desarrollo de los nemátodos a temperaturas altas puede acelerar el ciclo reproductivo de éstos organismos.

1.3 Importancia del los nemátodos en el cultivo de tomate

La mayoría de los nemátodos que atacan al tomate pertenecen al orden Tylenchida. Dentro de este orden, se ubican los nemátodos fitoparásitos pertenecientes al género *Meloidogyne* spp. los cuales son responsables de grandes pérdidas en el cultivo. El género incluye más de 80 especies y 11 razas. Sin embargo, las especies de mayor importancia lo son *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla* y *M. chitwoodi* por su amplia distribución geográfica y el número de plantas que parasitan (Eisenback, 1985). Este parásito posee además un amplio rango de dispersión geográfica. En suelos cultivados con tomate, donde se utilizan métodos tradicionales o tecnologías modernas tales como: sistemas de cultivos protegidos, hidropónicos, huertos intensivos e invernaderos, se ha observado altas densidades poblacionales, un amplio rango de dispersión y una alta capacidad reproductiva de este nemátodo. Las hembras pueden producir cantidades abundantes de huevos que pueden oscilar entre 300-400, según las condiciones del ambiente (Stirling *et al.*, 1979).

1.4 Control biológico con microorganismos

Dentro de la agricultura, el método utilizado para llevar a cabo el control de los nemátodos, en la mayoría de las veces, es mediante la aplicación de productos químicos. El control químico es el método más reconocido debido a los resultados positivos que presenta en cuanto a la erradicación de las plagas. Las prácticas químicas pueden representar otros problemas de índole ambiental y económica. Desde el punto de vista ambiental, suelen deteriorar las condiciones del suelo, proporcionan un grado de contaminación y acarrear problemas económicos (Street, 1969). Dentro del ámbito

económico, el uso de éstos productos, en ocasiones, puede acarrear gastos económicos elevados. Por estas razones es recomendable realizar modificaciones empleando un manejo integrado que incorpore los biocontroladores de plagas. De optar por utilizar prácticas variadas de control, se reducirá el uso de productos químicos y por ende los efectos adversos al ambiente.

Los nemátodos en el suelo interaccionan con un sin número de organismos y en ocasiones son fuente de nutrientes para hongos y bacterias que ejercen cierto control sobre el desarrollo de los nemátodos. Esto permite el utilizar hongos y bacterias para el control de nemátodos en ambientes agroecológicos creando lo que se conoce como bioplaguicidas. Entre los organismos más abundantes que habitan el suelo se encuentran las bacterias. El potencial controlador de las bacterias ha sido promovido por las extensas investigaciones que han llevado a la formulación de productos a base de *Bacillus* spp. (Schisler *et al*, 2004). Estas investigaciones han demostrado que éstos microorganismos poseen distintos mecanismos de acción en contra de los nemátodos. Organismos biocontroladores han sido aislados de suelo, plantas y tejidos (Agbenin, 2011). Si se manipula el ecosistema la proliferación de éstos biocontroladores pudiera ser aumentada. El empleo y uso de las bacterias dentro del control biológico ha demostrado ser una técnica viable para reducir las plagas en la agricultura y evitar el uso de métodos perjudiciales a los enemigos naturales de los patógenos y a otros organismos beneficiosos.

Partiendo de los beneficios económicos y ambientales que aportan el empleo de bioplaguicidas formulados a base de bacterias, en especial las pertenecientes al género *Bacillus*, fue utilizado un medio semiselectivo formulado por Turner y Backman (1991). Este medio tiene la peculiaridad de integrar antibióticos derivados de *Bacillus polymyxa*. Uno de los modos de acción de este antibiótico es el deterioro de la membrana citoplasmática de otras bacterias. El antibiótico se une a la membrana celular alterando las estructuras haciendo que ésta sea más permeable. Éste tiene acción contra la mayoría de bacilos Gram negativo con excepción del género *Proteus*.

1.5 *Bacillus* spp.

Bacillus spp. se caracterizan por la producción de numerosas colonias, de coloración blanca grisácea y márgenes irregulares. Estas bacterias producen una endospora bajo condiciones ambientales estresantes. La mayoría de las especies de *Bacillus* se caracterizan por ser organismos saprófitos del suelo y estar de forma abundante en especial en el área de la rizósfera. Investigaciones han reportado que algunas especies como *Bacillus megaterium* pueden tener la capacidad de promover el crecimiento de las plantas como *Arabidopsis thaliana* y *Phaseolus vulgaris* (Ortíz *et al.*, 2008). Otra especie de importancia es *Bacillus thuringiensis* mundialmente conocida por el efecto que tiene en contra de los insectos. Esta puede representar alrededor de 1% de los insecticidas biológicos que existen en el mercado (Knowles, 1994). *Bacillus thuringiensis* produce compuestos como bacteriocinas que inhiben el desarrollo de otros organismos a su alrededor (Gray *et al.*, 2006). Existen otros mecanismos en donde las bacterias pueden producir enzimas líticas como *B. cereus* la cual ha sido reportada como

un organismo antagonista, ya que ejerce cierto control inhibiendo el desarrollo de patógenos (Dorherty y Preece, 1988). Patógenos tales como el moho azul del tabaco causado por *Peronospora tabacinaes* es una de las enfermedades foliares tratadas con *Bacillus* spp. Esta bacteria ha sido un método de control biológico eficaz de controlar el desarrollo de este hongo (Zhang *et al.*, 2002).

Otras rizobacterias o bacterias habitantes de la rizósfera han sido estudiadas para poder determinar cuan efectivas pueden ser en el control de los nemátodos fitoparásitos (Sikora, 1992). Se ha observado que especies de *Bacillus* pueden ser antagonistas de patógenos, entre ellos nemátodos y promover el crecimiento de las plantas (Gokta, 1988). La interacción que ocurre entre un nemátodo y una planta puede ser interrumpida cuando el sistema radical es colonizado por especies de *Bacillus* como el *B. cereus* (Oostendorp y Sikora, 1990). Entre las cepas existentes de esta bacteria puede observarse variaciones significativas que van desde diferencias en la motilidad, manejo de nutrientes y procesos fisicoquímicos requeridos para el crecimiento. Estas variaciones le permiten a esta bacteria sobrevivir en diferentes nichos ecológicos.

Bacillus thuringiensis tiene la capacidad de formar cristales proteicos (*Cry*) que pueden ser extraídos y utilizados como bioplaguicidas. Los cristales proteicos de *B. thuringiensis* pueden ser específicos al hospedero, cada tipo de proteína *Cry* puede ser tóxica a ciertas especies, sin afectar organismos fuera del objetivo. Estos rangos de especificidad de hospederos entre estas especies pueden relacionarse a la clasificación taxonómica de las subespecies. Entre las subespecies de *Bacillus thuringiensis* más destacadas utilizadas como ingrediente activo en productos agrícolas se encuentran: *kurstaki*, *aizawai*, *tenebrionis* e *israeliensis*.

Productos a base de estas subespecies son manufacturados para el control de larvas en: coleópteros, mosquitos y moscas pertenecientes a la familia simuliidae y sciaridae (Weinzierl, 1996). La subespecie *kurstaki* esta posicionada entre una de las de mayor demanda para el control de lepidópteras que afectan: frutas, vegetales, árboles productores de nueces, alfalfa, maíz, algodón y soya. La resistencia de las plagas a los agroquímicos y la creciente demanda de modelos agrícolas que impulsan la protección del ambiente, ha promovido la manufactura y comercialización de productos a base de bacterias antagonistas. Entre los que se mencionan están: Dipel (subsp. *Kurstaki*), Xentaris (subsp. *aizawai*), Vectobac (subsp. *israeliensis*) manufacturados por Abbott Laboratories y Novador (subsp. *tenebrionis*) manufacturado por Novo Nordisk. Además investigaciones realizadas dentro del campo de las nematología han establecido diferencias entre las subespecies de *B. thuringiensis*: relacionadas con control de juveniles de *Meloidogyne* spp. (Carneiro, 1998).

2. JUSTIFICACIÓN:

Dentro de los géneros de nemátodos fitoparásitos de importancia para la agricultura, *Meloidogyne* spp. es uno de los más importantes debido a que afecta una gran cantidad de especies de plantas cultivadas de interés económico. Los nemátodos pertenecientes a este género causan anualmente cuantiosas pérdidas económicas en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) a nivel mundial. Los nemátodos impactan la zona de la raíz produciendo aberraciones conocidas como agallas o nódulos. Otros de los daños producido por este nemátodo es el acortamiento de la raíz perjudicando la capacidad de absorción de agua y nutrientes por la planta. La presencia de este parásito acarrea inhibición de los brotes, disminución del crecimiento y deficiencias nutricionales que se manifiestan como clorosis en el follaje (Smith *etal.*; 1997). De manera generalizada, éstos parásitos pueden interferir con la producción y translocación de sustancias provenientes de las raíces tales como las hormonas entre ellas: giberilinas, citoquininas y otras sustancias reguladoras de fotosíntesis. A consecuencia de estos cambios se reducen el rendimiento de la planta y la calidad de la cosecha.

El control de *Meloidogyne* spp. en el cultivo del tomate, se realiza generalmente mediante el uso de métodos químicos. Actualmente, nematicidas efectivos tales como: el DBCP (dibromocloropropano) y EDB (dibromuro de etileno) han sido prohibidos por ser biocidas altamente contaminantes al ambiente y perjudiciales a la salud humana. El bromuro de metilo también ha sido eliminado en algunos países y su uso futuro es muy sombrío. Los nematicidas al igual que los insecticidas y fungicidas causan altos porcentajes de contaminación ambiental en comparación con otras técnicas agrícolas. En

la actualidad el empleo de métodos no químicos como una alternativa para combatir los patógenos ha ido en aumento. Se prefieren prácticas que no tengan efecto negativo a la salud humana y al ambiente. Una de estas técnicas es la utilización de microorganismos con características antagonistas. En Puerto Rico, a pesar de que existen reportes de aislamientos de agentes antagonistas de nemátodos aún no se ha podido desarrollar un producto que este accesible a los agricultores.

El suelo es uno de los ambientes más complejos y heterogéneo con mayor diversidad significativa de microorganismos (Tiedje *et al.*, 1999). A pesar de que la microbiología de suelos ha sido estudiada durante más de cien años, muchas cepas bacterianas nuevas han sido aisladas recientemente. Entre ellas: *Acidobacteria* spp., *Actinobacteria* spp, *Bacteroidetes* spp. y *Proteobacteria* spp. (Sait *et al.*, 2002). Los microorganismos son un componente de importancia en el suelo, dada su gran abundancia, diversidad y multiplicidad en funciones metabólicas (Schloter *et al.*, 2003). Muchas de estas funciones son realizadas por las bacterias. Uno de los grupos de bacterias de mayor abundancia en los suelos son aquellas formadoras de esporas del género *Bacillus* pertenecientes al filo *Firmicutes*. Estas bacterias aportan benéficamente a la preservación del estado del suelo, ya que llevan a cabo actividades relacionadas con el ciclo de nitrógeno. La capa externa del suelo en zonas boscosas, son abundantes en materia orgánica lo que promueve una mayor actividad bacteriana, como resultado de la entrada de nutrientes por la hojarasca. (Sait *et al.*, 2002). Los bosques son zonas menos impactadas por las actividades del hombre, la cantidad de materia orgánica depositada en los suelos puede permitir un ambiente propicio para el desarrollo de bacterias con capacidad antagónica, además de ser una fuente de extracción de bacterias cultivables

(Sait *et al.*, 2002). En cambio, el aislamiento de microorganismos del suelo en ambientes agrícolas podría presentar diferencias relacionadas al número de bacterias benéficas. Las poblaciones de éstas pueden estar susceptibles a disturbios internos que pueden modificar las condiciones ambientales que permiten el desarrollo de muchas bacterias ya sea por un aumento de nuevas poblaciones, nutrientes o cambios en las propiedades físicas y químicas en el suelo dada por la aplicación de fertilizantes (Susuki *et al.*, 2005).

Bacillus spp. es la bacteria más conocida, estudiada y utilizada como agente de control microbiano. Más del 90% del mercado enfocado en el biocontrol, incluye productos a base de esta bacteria (Glare y Callaghan, 2000). Entre las características que posee es resaltada la producción de endosporas. Éstas le confieren a las cepas de *Bacillus* spp. la capacidad de sobrevivir a condiciones ambientales adversas y colonizar diversos ecosistemas. En la actualidad se ha reportado bacterias del género *Bacillus* con propiedades nematocidas y promotoras de la salud de la planta. Entre éstas se encuentran las especies: *B. amyloliquefaciens*, *B. firmus*, *B. pumilus* y *B. subtilis*. Se ha demostrado que *B. pumilus* una de las más estudiadas, puede ser capaz de secretar antibióticos que suprimen enfermedades en las plantas (Asaka y Shoda, 1996). Además, pueden presentar mecanismos antagónicos sobre las plagas y poblaciones de patógenos de distintas maneras (Brannen y Kenney, 1996) y ser promotoras de crecimiento en plantas (Gray *et al.*, 2006). *Bacillus cereus* puede producir enzimas líticas y otros antibióticos que han sido reportados con efectos antagonistas (Dorherty y Preece, 1988).

En la actualidad, la agricultura busca otras alternativas para el manejo de los patógenos. El control biológico resulta una técnica muy eficiente cuando se intenta

controlar nemátodos. Las investigaciones realizadas por Gokta y Swarup (1988) y Wei *et al.*, (2003) establecen que el uso de agentes biocontroladores pudieran ser una alternativa económicamente viable y con buenos resultados en comparación con los métodos químicos. Sin embargo, es importante identificar cepas nativas y validarlas como agentes controladores de nemátodos. Los productos biológicos disponibles en el mercado internacional implican en el trámite de permiso para su manejo. Muchos de estos productos requieren de registros en la Agencia de Protección del Ambiente de los Estados Unidos conocida por sus siglas en inglés como EPA. Las reglamentaciones de agencias federales previenen que los productos en base al control biológico causen algún efecto en el ambiente ya que no tienen competidores naturales, pudiendo ocasionar un desbalance ecológico. En muchos casos éstos no son efectivos ya que fallan en su establecimiento en el trópico al no ser organismos endémicos adaptados a este clima. Por el contrario, en el trópico las cepas nativas están adaptadas a las condiciones ambientales y de llevar a cabo un uso adecuado no representa ningún tipo de contaminación biológica.

Tomando en consideración que los nemátodos fitoparásitos del género *Meloidogyne* spp. representan importantes pérdidas en el rendimiento de las plantas parasitadas, las nuevas técnicas de manejo se enfocan en alternativas que no contribuyan con el deterioro de los suelos. En adición pretenden proteger la integridad de los microorganismos que ejercen algún tipo de interacción con los cultivos. Los suelos de la zona central de la isla posee condiciones ambientales favorables, además, son zonas protegidas por lo que se espera que albergue una variedades de especies de *Bacillus*.

El objetivo principal de esta investigación es aislar cepas nativas de *Bacillus* spp. de suelos boscosos no perturbados, con la capacidad de suprimir el desarrollo de *Meloidogyne* spp. en cultivos de tomate bajo condiciones de invernadero. Es de interés aislar cepas de bacterias de suelos que no hayan sido impactados por los productos químicos. En Puerto Rico, las aéreas boscosas se mantienen como santuario de vida silvestre y promueven una excelente oportunidad para iniciar este estudio. Los suelos agrícolas han sido impactados por actividades intensivas que han fomentado el uso indiscriminado de compuestos químicos biocidas para el control de plagas y malezas. El uso de estos compuestos podría conducir a cambios en la densidad y estructura de las poblaciones de microorganismos. A pesar de que muchos de los microorganismos del suelo poseen cierta flexibilidad a los cambios del ambiente, las comunidades expuestas a factores como estrés físico o químico tienden a disminuir la diversidad microbiana. Por lo que los procesos de selección, tratan de asegurar la estabilidad de las comunidades microbianas con pocas especies especializadas (Rainey *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

- Aislar colonias de bacterias en suelos boscosos no perturbado de Puerto Rico.
- Aislar e identificar cepas de *Bacillus* spp. que posean propiedades antagonistas sobre el nemátodo nodulador.
- Evaluar el efecto de cepas de *Bacillus* spp. contra *Meloidogyne* spp. en condiciones *in vitro* y de invernadero.

3. Materiales y Métodos

3.1 Muestreo de suelos

3.1.1 Descripción del área muestreada

El muestreo de suelo se realizó en las zonas forestales de los bosques tropicales lluviosos de Toro Negro y Cerro Guilarte localizados en los municipios de Jayuya y Adjuntas, respectivamente. Las coordenadas correspondientes al lugar de muestreo son las siguientes.

Muestreo de suelo de Toro Negro

Muestra	Coordenada Norte	Coordenada Oeste
#1	18°8'41''	066°29'05''
#2	18°116''	066°28'57.3''
#3	18°10'12.3''	066°28'57''
#4	18°10'3.6''	066°28'57.4''
#5	18°10'11.5''	066°35'17.8''

Muestreo de suelo de Cerro Guilarte

Muestra	Coordenada Norte	Coordenada Oeste
#1	18°08'43.3''	066°46'11.1''
#2	18°08'41.6''	066°46'14.7''
#3	18°09'6.4''	066°46'14.7''
#4	18°9'2.3	066°46'18.6''
#5	18°07'12.3''	066°32'7''

En las dos localidades se recolectaron cinco muestras de suelo, el área cercana al sistema radical de los árboles en donde la acumulación de materia orgánica era abundante. Las muestras (muestra compuesta) fueron tomadas al azar las cuales constaron de cinco submuestras de cada lugar seleccionado siguiendo un patrón estrella. Al momento de la recolección de éstas se les removió la capa superficial compuesta por depósitos de materia orgánica. El suelo recolectado, utilizando palas manuales de jardinería, se tomó a una profundidad promedio de 20 cm. Las muestras de suelo recolectadas fueron colocadas en bolsas de polietileno y transportadas en una nevera portátil, la cual contenía sacos de gel congelado, hasta el laboratorio. Estas muestras de suelo fueron procesadas inmediatamente una vez fueron llevadas al laboratorio.

3.1.2 Aislamiento de bacterias de los suelos muestreados

De cada muestra compuesta se seleccionaron 10g y se colocó en un Erlenmeyer de 250 ml con 90 ml de agua destilada estéril. El frasco fue sellado con parafina y papel de aluminio y colocado en un agitador mecánico por 10 minutos. Finalizado el proceso de agitación una alícuota de 1ml de la suspensión fue extraída para llevar a cabo diluciones en serie con factor de 10, utilizando tubos de ensayos con agua destilada estéril. De cada una de las diluciones en series, se inoculó 0.1 ml sobre la superficie de placas con medio semi-selectivo V8. El medio V8 fue preparado según el método descrito por Turner y Backman (1991). La alícuota fue distribuida por toda la superficie del medio V8 utilizando un dispensador plástico estéril para cada placa. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 28°C por 48 horas. Pasadas las 48 horas de incubación, se contabilizó el número de colonias que crecieron en las placas. Luego de contabilizar las colonias, se

seleccionaron al azar y aislaron 5 colonias de la dilución 10^{-2} por cada una de las muestras. Se seleccionaron un total 50 colonias entre ambas zonas boscosas muestreadas (25 colonias por localidad).

Las colonias seleccionadas fueron inoculadas por estriado y agotamiento en el medio de cultivo general para bacterias, Agar de Soya Trípico conocido por sus siglas en inglés como TSA. Las colonias re-aisladas se incubaron a una temperatura de 28°C por 24 horas. Luego de 24 horas se les realizaron las siguientes pruebas químicas: KOH y tinción Gram para descartar bacterias gram-negativas. A las colonias que resultaron ser KOH negativo y positivas a tinción gram se les realizaron las pruebas químicas de catalasa, oxidasa. Esta última prueba, comúnmente utilizada en pruebas microbiológicas, permite determinar si las bacterias aisladas poseen el complejo estructural llamado oxidasa de citocromos C. Esta proteína transmembranal convierte moléculas de oxígeno en agua. Mientras que la prueba catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Ambas pertenecen al grupo de pruebas primarias utilizadas en la microbiología para la caracterización de organismos.

3.1.3 Selección de las colonias para ensayos antagónicos

Las colonias gram positivas y KOH negativo fueron observadas bajo el lente microscópico del modelo Leica CME. Las células bacterianas fueron observadas para llevar a cabo la descripción de la morfología en detalle. A partir de la observación, fueron agrupadas según las siguientes características: elevación, márgenes y bordes. Se seleccionaron dos aislados al azar de cada una de las localidades muestreadas. Los aislados seleccionados aleatoriamente fueron del grupo de bacterias que presentó las

características de mayor frecuencia, relacionadas al crecimiento exhibido sobre el medio. A éstos se les tomaron datos relacionados a la absorbancia y transmitancia durante un periodo de 72 horas.

3.1.4 Curvas de crecimiento de las cepas utilizadas para el ensayo de antagonismo

Se seleccionaron cuatro colonias de bacterias al azar, dos de cada localidad muestreada las cuales tenían las siguientes características: gram positivas, catalasa positiva, KOH negativo, oxidasa negativo y presencia esporas. Estas se multiplicaron en placas petri con medio de cultivo TSA durante un periodo de 24 horas. Pasado las 24 horas, la masa bacteriana fue colocada en frascos nefelos con 9 ml de caldo de soya tripticasa (TSB) utilizando un asa de 10 μ L colocada. Los tubos de ensayos fueron colocados en el agitador a una temperatura de 28°C durante 72 horas. La absorbancia espectrofotométrica fue medida en intervalos de tres horas y se tomaron datos de absorbancia y transmitancia de los crecimientos de las bacterias. Los datos obtenidos fueron utilizados para graficar la curva de crecimiento. A medida que se tomaron muestras de los tubos de cristal para medir la absorbancia se realizaron tinciones Gram para observar la morfología de las células y determinar el momento en el cual las bacterias comenzaban la formación de endosporas y el periodo estacionario.

3.2 EXPERIMENTO *IN VITRO*

3.2.1 Aislamiento de larvas y huevos de *Meloidogyne* spp.

Para obtener el inóculo de *Meloidogyne* spp. se seleccionaron raíces de tomate (*Solanum lycopersicum*) previamente infestadas y mantenidas en el invernadero. Las raíces se cortaron en pedazos de 0.5 cm y agrupadas en conjuntos de aproximadamente

25 gramos. Éstas fueron lavadas con agua destilada para remover el exceso de suelo adherido al tejido. Luego fueron colocadas en frascos de 250ml los cuales tenían 100ml de una solución de hipoclorito de sodio al 2% (Barker, 1985). Posterior a este paso, se agitaron manualmente por cuatro minutos y se pasaron por un tamiz #200 seguido de otro tamiz #500. La suspensión que quedó atrapada en el tamíz #500 fue lavada con agua destilada estéril y fue recolectada en viales de 10 ml. Se estimó el número de huevos y larvas del nemátodos en la suspensión.

3.2.2 Preparación de láminas de alginato para pruebas antagónicas *in vitro*

Se preparó una solución de alginato al 2% siguiendo el procedimiento desarrollado por Chavaria-Carvajal y Rodríguez-Kabana., (2008). Tres gramos de alginato se mezclaron con 100 ml de agua destilada estéril a una temperatura de 60°C. Para obtener una solución homogénea, ésta se mezcló utilizando una licuadora a baja velocidad por aproximadamente 20 segundos. Una vez la solución con alginato se observó homogenizada, se calentó durante 30 segundos en el microondas a 80°C. Finalmente, la solución fue colocada durante varias horas en el refrigerador para eliminar las burbujas. Reposada la misma, se mezcló con la suspensión acuosa de larvas y huevos previamente desinfectada.

Las láminas de soporte se prepararon utilizando la malla de fibra de vidrio cubierto con cloruro de polivinil o comúnmente conocidos como “screens” comercial. Se prepararon 45 mallas o secciones de 2.5 x 5.0 cm, cada tratamiento constó de seis repeticiones. Los pedazos de malla fueron sumergidos en alcohol al 95% dejándolos reposar durante 12 horas para remover las impurezas. Luego, estas láminas fueron sumergidas en el alginato previamente preparado el cual tenía el inóculo de las larvas y huevos de *Meloidogyne* spp. Seguido a eso, las mallas se fijaron con una solución de CaCl₂ al 0.25M, dejándolas sumergidas por aproximadamente 5 minutos. Finalmente, las mallas fueron enjuagadas tres veces consecutivas con agua estéril.

3.2.3 Pruebas de antagonismo de aislados bacterianos

Para conocer la posible respuesta antagonista, se evaluaron cuatro aislados de bacterias bajo condiciones *in vitro*, dos aislados por cada localidad muestreada (Toro Negro y Cerro Guilarte). Para llevar a cabo el ensayo fueron utilizados frascos con 7.2 cm de profundidad. Los frascos en su interior poseían arena estéril la cual fue impregnada con 1 ml del cultivo puro de cada uno de los aislados bacterianos. Posterior a la inoculación, el alginato con los huevos y larvas fueron enterrados en la arena. Pasado cinco días de la inoculación, las mallas de alginato fueron removidas de los frascos y colocadas en placas petri que a su vez contenían 10 ml de agua esterilizada. Las mallas con el alginato, fueron sumergidas en agua e incubadas durante 72 a temperatura de 28°C. Cada una de las mallas fue colocada sobre laminillas para tomar datos relacionados a la condición de los huevos y las larvas en el alginato.

La observación de las mallas en el microscopio cubrió el área superficial de aproximadamente 130 cuadros, sin contabilizar los bordes de estas. Las larvas eclosionadas de los huevos incrustados en el alginato fueron contabilizadas. La extracción de las larvas fue llevada a cabo mediante el uso de un tamiz de numeración 500. Las larvas recuperadas del tamiz fueron observadas utilizando un microscopio y se registraron datos relacionados al comportamiento, movimiento y morfología de las larvas. Para corroborar la viabilidad de las larvas recuperadas las muestras fueron tratadas con 1ml HCl, el cual estimula el movimiento de las larvas al contacto.

3.3 ENSAYO DE INVERNADERO

3.3.1 Evaluación de la efectividad antagónica de los aislados bacterianos utilizando plantas de tomates, bajo condiciones de invernadero

Con el objetivo de determinar la capacidad antagónica de los aislados bacterianos se utilizaron 50 plantas de tomate con 60 días de germinadas. Las plantas fueron germinadas en 100 gramos de suelo “promix”, bajo condiciones de invernadero a una temperatura promedio de 33 °C.

El suelo utilizado, fue esterilizado en un autoclave por tres ciclos consecutivos a 20 lbs de presión con una temperatura de 121°C por 45 minutos. El experimento se realizó en un invernadero localizado en la finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez. Para evaluar la efectividad de los aislados bacterianos se inocularon 50 plantas de tomate con poblaciones distintas de *Meloidogyne* spp. El número de larvas y huevos de *Meloidogyne* spp. depositados en las plantas fue de: a)1,560 larvas y huevos; b) 1,755 larvas y huevos; c) 2,566 larvas y huevos; d)1,376 larvas y huevos; y e)1,766 larvas y huevos para el tratamiento control. Todos ellos depositados a una profundidad de 5cm.

Las plantas de tomate fueron inoculadas simultáneamente con los cuatro aislados previamente utilizados en el ensayo *in vitro* y los nemátodos. La formulación de los tratamientos bacterianos se realizó siguiendo el protocolo modificado de Zhang y colaboradores (2008). La masa bacteriana fue depositada en 250 ml del medio de crecimiento líquido TSB, utilizando un asa estéril de 10 µL. Una vez que las bacterias alcanzaron su fase estacionaria fueron mezcladas en 2,500 ml de buffer de fosfato. Cada

una de las plantas correspondientes al tratamiento se inocularon con 200 ml de la mezcla del cultivo con el buffer. Para cada uno de los tratamientos se realizaron 10 repeticiones.

3.3.2 Contabilización de nódulos *Meloidogyne* spp. en el sistema radical de plantas de tomates

Pasados los 21 días, el sistema radical de las plantas de tomate inoculadas fue evaluado para poder determinar la cantidad de nódulos formados. A cada una de las plantas inoculadas con las larvas se les tomó el peso del sistema radical utilizando una balanza electrónica. El peso del sistema radical de las plantas fue tomado al momento de estas haber sido extraídas del suelo inoculado con las larvas, huevos y los aislados bacterianos. El sistema radical de cada una de las plantas fue cortado aproximadamente 2cm por encima de la base del sistema radical. Para poder enumerar la cantidad de hembras de *Meloidogyne* spp. en el interior de las raíces del tomate, se utilizó el método de tinción con fucsina ácida e hipoclorito de sodio (Goodey, 1937). Las raíces descoloradas fueron observadas en el microscopio y las hembras teñidas fueron contabilizadas.

3.3.3 Contabilización de la población final de larvas de *Meloidogyne* spp. localizadas en el suelo

Para llevar a cabo la recolección de los nemátodos localizados en el suelo tratado con las bacterias se utilizó la metodología modificada de decantación y tamizado combinado con el embudo Baermann (Román, 1978). La modificación consistió de verter la suspensión por los tamices número 200 y 500 luego de disolver el suelo en agua. El suelo recolectado en el tamiz número 500 se colocó sobre rejillas de metal, con un filtro de papel y luego sobre un embudo Baermann por 48 horas a temperatura de salón (28°C). Los nemátodos fueron recolectados en viales de 9ml y contabilizados para poder determinar la población final en el suelo de las plantas. Para determinar el porcentaje de mortalidad fueron sumadas las larvas recuperadas con la cantidad de nódulos contabilizados. El total fue restado a la cantidad inicial de larvas depositadas en cada una de las plantas. El resultado dado fue dividido nuevamente por la cantidad inicial y multiplicado por cien. Para corroborar la viabilidad de las larvas recuperadas fue depositado HCl, el cual hace reaccionar a las larvas de manera inmediata al contacto.

3.4 Identificación de las bacterias aisladas de los suelos utilizando el sistema Biolog

Para llevar a cabo la identificación, de los aislados bacterianos utilizados en los ensayos de antagonismo fueron incubadas en el medio TSA a 28C por 24 horas. Pasadas las 24 horas las cepas fueron transferidas al medio llamado Medio de crecimiento Universal Biolog con 0.25% de maltosa, (Biological Universal Growth Agar- BUG; . BL-70001). Previo a la inoculación bacteriana, sobre la superficie del medio se dispersaron 100 µL de tioglicolato de sodio (BL-73011) en una solución (8 gotas en 3ml agua ó 0.4ml en 3ml agua) la cual es utilizado para retrasar el proceso de formación de esporas en las

bacterias gram positivas y producir una suspensión uniforme. Las placas inoculadas se incubaron a 30°C por 24 horas. Al finalizar el periodo de incubación las bacterias fueron removidas del medio utilizando un palillo con un algodón estéril e inoculadas en el fluido de inoculación (BL-72101) “Inoculating fluid”. Este proceso permitió disolver la masa bacteriana hasta lograr una suspensión con una turbidez de 28%. La turbidez del medio fue determinada utilizando un espectrofotómetro a un largo de onda de 590nm. Lograda la tramitancia requerida, se colocaron 150 µL de la suspensión en las Micro Placas GN2 (BL-1014) a 30 C° por un periodo de 24 horas. Al finalizar las 24 horas, las MicroPlacas fueron colocadas en el lector “Microlog” para la identificación bacteriana utilizando la base de datos del programa MicroLog 3 Versión 4.20.05.

3.5 Análisis estadístico

El conteo de los nemátodos recuperados y el número de hembras en el interior del sistema radical fueron los datos utilizados para llevar a cabo el análisis estadístico. Para inferir sobre los resultados, se realizó un análisis de varianza de los datos, utilizando el programa Infostat a un nivel de significancia de alfa (α) de 0.05. La verificación del supuesto de normalidad se hizo mediante la prueba de Shapiro-Wilks. De esta manera, se evaluó si la población estaba distribuida normalmente. Se determinó si la efectividad de los aislados de *Bacillus* spp. sobre las eclosión de *Meloidogyne* spp. fueron significativamente diferente cuando los valores de (p) fueron comparados con (α) mediante la prueba de Shapiro-Wilks.

4. RESULTADOS:

4.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

4.1.1 Aislamiento de bacterias del medio semiselectivo V8

Las colonias pertenecientes a la dilución de 10^{-2} para ambos bosques, fueron utilizadas para el aislamiento y futura utilización de ensayos antagónicos. En ésta se observó que dilución de 10^{-2} perteneciente a la localidad de Toro Negro obtuvo un promedio de 1.50×10^3 , mientras que la localidad de Cerro Guilarte obtuvo un promedio de 1.34×10^3 por gramo de suelo.

Cuadro 1. Bacterias contabilizadas en el medio según la dilución de suelo proveniente del Bosque de Toro Negro

Cantidad de bacterias contabilizadas en el medio según la dilución

Muestras	Diluciones en series (UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS)									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1	800	760	560	560	410	410	120	10	NC	NC
2	960	700	170	120	40	NC	NC	NC	NC	NC
3	880	500	320	180	30	30	NC	NC	NC	NC
4	1030	680	480	120	120	NC	NC	NC	NC	NC
5	820	720	170	140	120	120	98	NC	NC	NC

NC = No mostraron crecimiento bacteriano.

Cada valor es el promedio de tres repeticiones.

Cuadro 2. Bacterias contabilizadas en el medio según la dilución de suelo proveniente del Bosque de Cerro Guilarte

Cantidad de bacterias contabilizadas en el medio según la dilución

Muestras	Diluciones en series (UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS)									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{10}
1	1000	980	770	500	400	320	300	100	60	10
2	1250	750	750	500	450	420	120	100	60	NC
3	870	500	420	350	NC	NC	NC	NC	NC	NC
4	920	720	540	150	80	30	NC	NC	NC	NC
5	950	810	728	620	560	510	400	320	NC	NC

NC = No mostraron crecimiento bacteriano.
Cada valor es el promedio de tres repeticiones.

Cuadro 3. Pruebas químicas: Tinción Gram, oxidasa y catalasa, realizadas a las bacterias aisladas del los lugares muestreados de la localidad de Toro Negro

Bacterias aisladas utilizando el medio semi selectivo para <i>Bacillus spp.</i>			
Aislados del Bosque Toro Negro	Pruebas químicas		
	Gram	Oxidasa	Catalasa
TN1.1	+	+	+
TN1.2	+	-	+
TN1.3	+	+	+
TN1.4	+	+	-
TN1.5	+	+	+
TN2.1	+	-	+
TN2.2	+	+	+
TN2.3	+	-	+
TN2.4	+	-	+
TN2.5	+	-	+
TN3.1	+	-	+
TN3.2	+	-	+
TN3.3	+	-	+
TN3.4	+	-	+
TN3.5	+	-	+
TN4.1	N/C	N/C	N/C
TN4.2	+	-	+
TN4.3	N/C	N/C	N/C
TN4.4	+	+	+
TN4.5	+	-	-
TN5.1	+	-	+
TN5.2	+	-	-
TN5.3	+	-	+
TN5.4	+	-	+
TN5.5	+	+	+

Los datos que muestran símbolos (+) son indicativo de presentar reacciones positivas a las pruebas; mientras que los datos que mostraron reacciones negativas están identificados con el siguiente símbolo (-). Los aislados identificados como (N/C) no mostraron crecimiento en las placas del medio (TSA).

Cuadro 4. Crecimiento de las colonias aisladas de la localidad de Toro Negro sobre el medio de cultivo TSA

Bacterias aisladas utilizando el medio semiselectivo para <i>Bacillus spp.</i>			
Aislados del Bosque Toro Negro	Crecimiento de la colonia sobre el medio(TSA)		
	Configuración	Márgenes	Elevación
TN1.1	1	2	2
TN1.2	3	2	2
TN1.3	3	4	1
TN1.4	3	4	1
TN1.5	3	4	1
TN2.1	3	1	3
TN2.2	3	1	3
TN2.3	3	1	3
TN2.4	3	1	3
TN2.5	3	1	3
TN3.1	1	1	4
TN3.2	1	1	1
TN3.3	1	1	4
TN3.4	3	1	3
TN3.5	3	1	3
TN4.1	N/C	N/C	N/C
TN4.2	3	1	3
TN4.3	N/C	N/C	N/C
TN4.4	1	2	2
TN4.5	1	2	4
TN5.1	1	2	2
TN5.2	1	2	2
TN5.3	1	1	3
TN5.4	1	1	3
TN5.5	1	1	3

Los datos relacionados con la **configuración** describen la morfología de las colonias en el medio de crecimiento: (1) crecimiento de colonias redondas. (3) crecimiento de colonias concéntricas con anillos en el interior. Características relacionados con los **márgenes**: (1) bordes suaves, poco pronunciado. (2) bordes ondulados. (4) bordes irregulares. Características relacionadas con la **elevación** (1) sin crecimiento vertical. (2) crecimiento levemente elevado. (3) crecimiento altamente elevado o goteado: (N/C) colonias que no crecieron en la placa.

Cuadro 5. Pruebas químicas: Tinción Gram, oxidasa y catalasa, realizadas a las bacterias aisladas del los lugares muestreados de la localidad de Cerro Guilarte

Bacterias aisladas utilizando el medio semiselectivo para <i>Bacillus spp.</i>			
Aislados del Bosque Cerro Guilarte	Pruebas químicas		
	Gram	Oxidasa	Catalasa
Gu1.1	+	+	+
Gu1.2	+	+	+
Gu1.3	+	+	+
Gu1.4	+	+	+
Gu1.5	+	-	+
Gu2.1	+	-	+
Gu2.2	+	+	+
Gu2.3	+	+	+
Gu2.4	+	+	+
Gu2.5	+	+	-
Gu3.1	+	+	+
Gu3.2	+	+	-
Gu3.3	+	+	+
Gu3.4	N/C	N/C	N/C
Gu3.5	+	+	+
Gu4.1	N/C	N/C	N/C
Gu4.2	+	+	+
Gu4.3	N/C	N/C	N/C
Gu4.4	N/C	N/C	N/C
Gu4.5	+	-	+
Gu5.1	N/C	N/C	N/C
Gu5.2	N/C	N/C	N/C
Gu5.3	+	+	+
Gu5.4	N/C	N/C	N/C
Gu5.5	N/C	N/C	N/C

Los datos que muestran símbolos (+) son indicativo de presentar reacciones positivas a las pruebas; mientras que los datos que mostraron reacciones negativas están identificados con el siguiente símbolo (-). Los aislados identificados como (N/C) no mostraron crecimiento en las placas del medio (TSA).

Cuadro 6. Crecimiento de las colonias aisladas de la localidad de Cerro Guilarte, sobre el medio de cultivo TSA

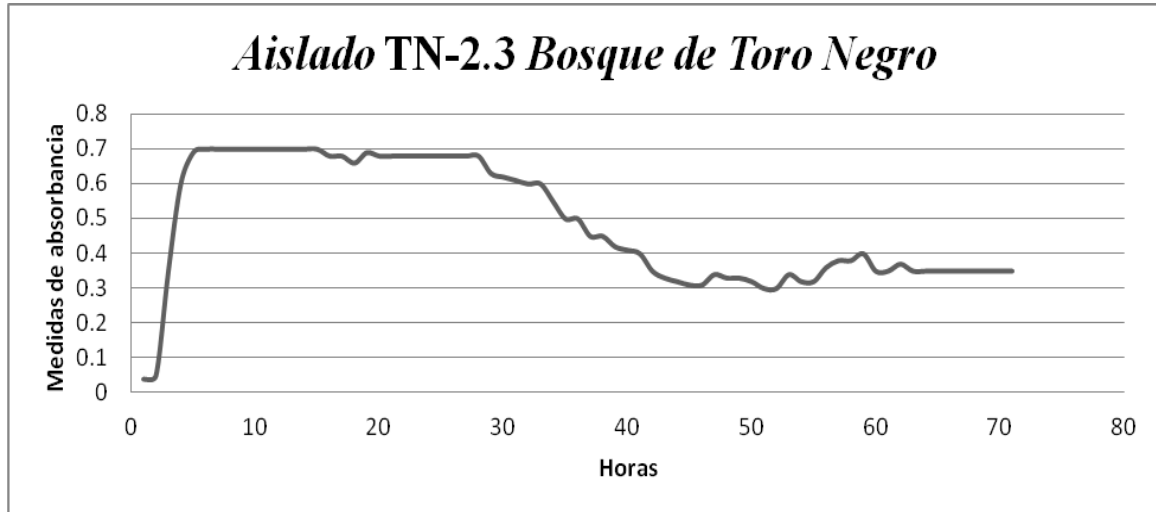
Bacterias aisladas utilizando el medio semiselectivo para <i>Bacillus spp.</i>			
Aislados del Bosque Cerro Guilarte	<i>Crecimiento de la colonia sobre el medio(TSA)</i>		
	Configuración	Márgenes	Elevación
Gu1.1	3	1	1
Gu1.2	1	1	3
Gu1.3	3	1	3
Gu1.4	1	1	3
Gu1.5	3	1	3
Gu2.1	3	1	3
Gu2.2	1	1	1
Gu2.3	1	1	3
Gu2.4	1	1	4
Gu2.5	1	1	1
Gu3.1	3	2	2
Gu3.2	3	2	4
Gu3.3	1	2	2
Gu3.4	N/C	N/C	N/C
Gu3.5	3	1	3
Gu4.1	N/C	N/C	N/C
Gu4.2	3	1	3
Gu4.3	N/C	N/C	N/C
Gu4.4	N/C	N/C	N/C
Gu4.5	1	1	3
Gu5.1	N/C	N/C	N/C
Gu5.2	N/C	N/C	N/C
Gu5.3	1	1	3
Gu5.4	N/C	N/C	N/C
Gu5.5	N/C	N/C	N/C

Los datos relacionados con la **configuración** describen la morfología de las colonias en el medio de crecimiento: (1) crecimiento de colonias redondas. (3) crecimiento de colonias concéntricas con anillos en el interior. Características relacionados con los **márgenes**: (1) bordes suaves, poco pronunciado. (2) bordes ondulados. (4) bordes irregulares. Características relacionadas con la **elevación** (1) sin crecimiento vertical. (2) crecimiento levemente elevado. (3) crecimiento altamente elevado o goteado: (N/C) colonias que no crecieron en la placa.

4.1.2 Curva de crecimiento de los aislados de *Bacillus* spp. utilizados para los ensayos de antagonismo, mediante espectrofotometría

Una vez fueron tomadas las medidas espectrofotométricas de los aislados bacterianos seleccionados, se procedió a graficar las curvas de crecimiento. Por medio de estas curvas de crecimiento se pudieron conocer los ciclos de vida de las bacterias que fueron utilizados para ensayos de antagonismo. Este ensayo permitió determinar el periodo de viabilidad de las bacterias. Este periodo de viabilidad pudo ser monitoreado mediante los procesos fisiológicos relacionados a la síntesis, crecimiento, bipartición o división celular. Éstos procesos fisiológicos ocurren mientras haya una disponibilidad de nutrientes en el medio de crecimiento, los cuales pudieron ser medidos o monitoreados por la turbidez del medio de cultivo utilizando un espectrofotómetro. El periodo de recolección de datos para graficar la curva fue de 72 horas, los cuales mostraron los siguientes resultados graficados como curvas de crecimiento bacteriano para: TN-2.3, TN-5.1, GU-2.1 y GU4.5.

Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano para el aislado TN-2.3, según los datos de absorbancia espectrofotométrica durante 72 horas de incubación

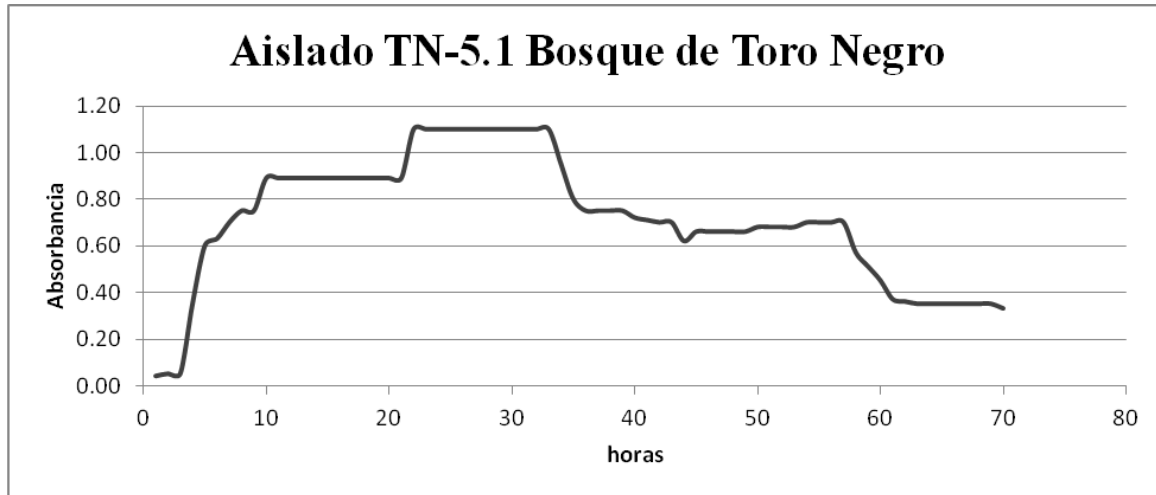


Para el aislado 1 codificado como TN-2.3 a partir de la inoculación con 10 μ L de la masa bacteriana en el medio líquido, se observó que la transmitancia aumentó drásticamente luego de la primera hora. Esto indica que la bacteria posee un crecimiento acelerado y las condiciones de medio de cultivo son óptimas para el desarrollo. El crecimiento se mantuvo constante hasta las 27 horas. A partir de las 27 horas la transmitancia, comienza a disminuir paulatinamente teniendo un descenso constante. Esto es indicativo de que la división celular a partir de las 30 horas comienza a cesar. Por lo que la disponibilidad de nutrientes en el medio para el desarrollo de nuevas cepas comienza a ser escaso.

A partir de las 23 horas comenzó a ser visible la formación de endosporas, lo cual indica que las condiciones del medio son inapropiadas para el desarrollo de las células bacterianas nuevas. La presencia de endosporas es una característica deseable, ya que

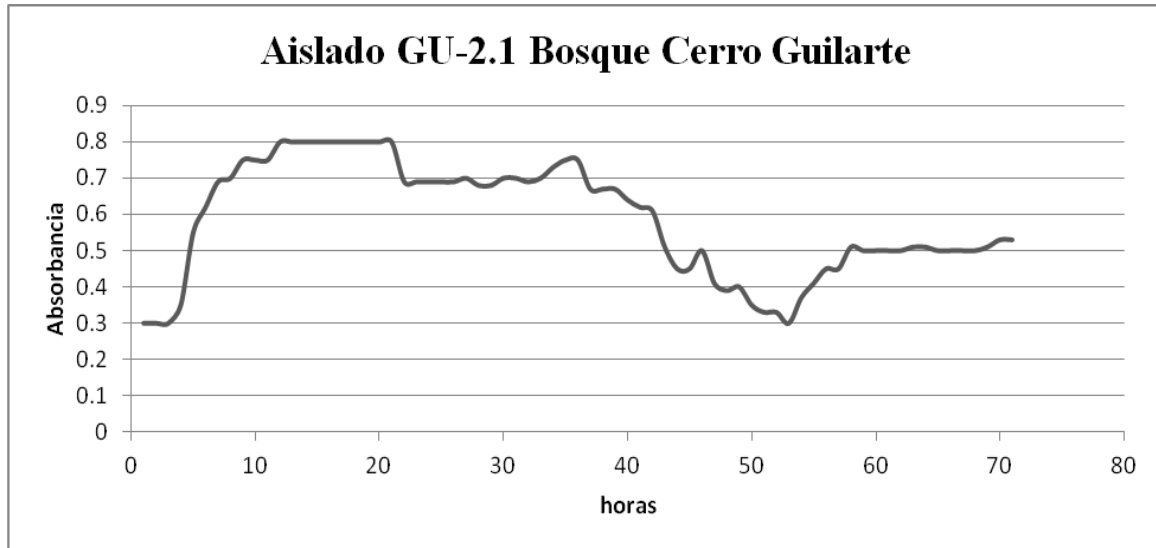
están altamente relacionadas con los procesos antagónicos dentro de la producción de bioplaguicidas (Rosas-García, 2009). Dentro del periodo correspondiente de 30 a 45 horas se observó una mayor concentración de esporas, con un promedio de 750 esporas en 2ml. A partir de las 40 horas se observó una disminución gradual en la formación de esporas. Luego de las 70 horas se observó aproximadamente 150 esporas en 5 μ L del medio de crecimiento. La última lectura fue realizada a las 72 horas, este periodo corresponde a la descendencia de células bacterianas viables, la cual culmina con la muerte de la bacteria. Las observaciones microscópicas dieron a conocer células bacterianas poco viables, las cuales tenían una tinción tenue y las esporas se observaron fuera del encapsulado. Cabe recalcar que la cantidad de esporas observada fue mínima, en comparación con las observaciones anteriores.

Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano para el aislado TN-5.1, según los datos de absorbancia espectrofotométrica durante 72 horas de incubación



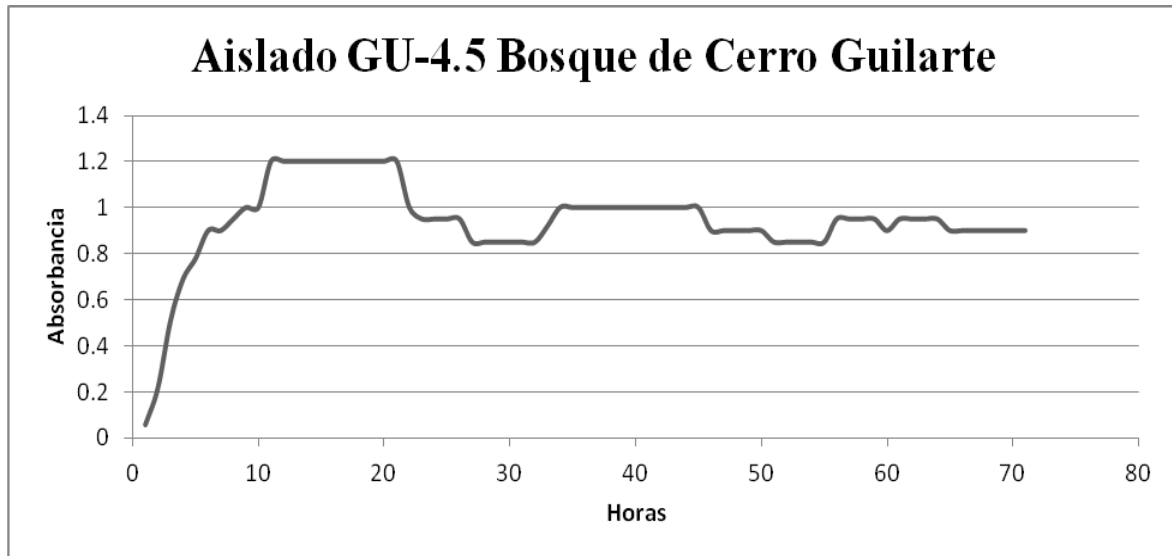
El crecimiento de las células bacterianas correspondiente al aislado enumerado como 2, codificado como TN-5.1 comenzó desde las 2 horas luego de una pequeña fase de adaptación de aproximadamente 2.5 horas. A partir de las 2.5 horas las bacterias en el medio comenzó a crecer por un periodo de 8.5 horas. El crecimiento de éstas se mantuvo constante hasta las 21 horas, aunque se observó un aumento de 0.20λ el cual se extendió hasta las 33 horas. Luego de las 33 horas se observó un descenso en la gráfica en relación a las medidas de transmitancia. Esto indica que el crecimiento y división celular en las bacterias ha comenzado a cesar. Pasada las 72 horas se observaron medidas de absorbancia que oscilan dentro de los 0.30λ . Estas medidas indican que los procesos fisiológicos continuaron ocurriendo en un grupo minoritario de células bacterianas que pudo desarrollarse dentro de un ambiente adverso. El desarrollo de las endosporas comenzó desde las 23 horas de crecimiento. La mayor cantidad de esporas se observaron entre las 26 a 35 horas, con aproximadamente 1,200 esporas en $5\mu\text{L}$. El número de esporas visibles comenzó a descender a partir de las 35 horas.

Figura 3. Curva de crecimiento bacteriano para el aislado GU-2.1, según los datos de absorbancia espectrofotométrica durante 72 horas de incubación



Durante el crecimiento de células bacterianas correspondiente al aislado enumerado como 3, codificado como GU-2.1. Se observó que la fase de crecimiento comenzó desde las dos horas luego de inoculadas e incubadas, con un valor de 0.8λ y se extendió hasta las 22 horas, luego se observó un descenso en el valor de la transmitancia. Estos valores comenzaron a descender drásticamente hasta alcanzar una medida de 0.3λ , este dato fue observado entre las 47 y 48 horas. A partir de las 48 horas se observó un aumento en la transmitancia de 0.5 el cual permaneció constante hasta después de las 72 horas. La presencia de endosporas fue observada desde las 15 horas. El mayor número de esporas fue contabilizado a partir de las 27 hasta las 38 horas con un promedio de 985 esporas en $5\mu\text{L}$. A partir de las 40 horas el número de esporas comenzó a disminuir, aunque en horas posteriores a las 60 horas se mantuvo un promedio de 420 esporas.

Figura 4. Curva de crecimiento bacteriano para el aislado GU-4.5, según los datos de absorbancia espectrofotométrica durante 72 horas de incubación



El crecimiento de las células bacterianas correspondiente al aislado enumerado como 4, codificada como GU-4.5 comienza sin fase de adaptación. Se observó que el crecimiento de esta bacteria ocurre de manera acelerada. A las 16 horas de éste haber sido colocado en el medio de cultivo e incubado, alcanzó un valor de transmitancia de 1.2λ , éstos valores están relacionados con la fase exponencial. A partir de las 17 horas, las células bacterianas comenzaron un corto periodo estacionario el cual cesó a las 22 horas. Se observó que luego de las 22 horas, que los valores de transmitancia disminuyeron levemente desde un valor inicial de 1.2λ a 0.80λ . Además, se observó un segundo periodo estacionario el cual comenzó desde las 37 horas finalizando a las 43 horas. A partir de las 43 horas los valores de transmitancia estuvieron promediados en 0.90λ . Finalmente, luego de las 72 horas los valores de transmitancia permanecieron constantes en la fase de muerte celular, los cuales oscilaron en 0.80λ , indicativo de la disminución de

los nutrientes del medio de cultivo los cuales son necesarios para el desarrollo de nuevas células bacterianas. La formación de esporas en el interior de las células bacterianas fue detectada inicialmente desde las 15 horas, periodo correspondiente a la fase de crecimiento. Durante este periodo se observaron 55 células bacterianas con esporas internas. El mayor número de esporas se observó durante la primera fase estacionaria de la bacteria la cual comenzó desde las 16 horas. A las 19 horas se observó un mayor número de endosporas con aproximadamente 985. Durante el periodo de horas correspondientes desde las 28 horas hasta las 43 se observaron números por encima de 562 esporas pero no mayor de 985.

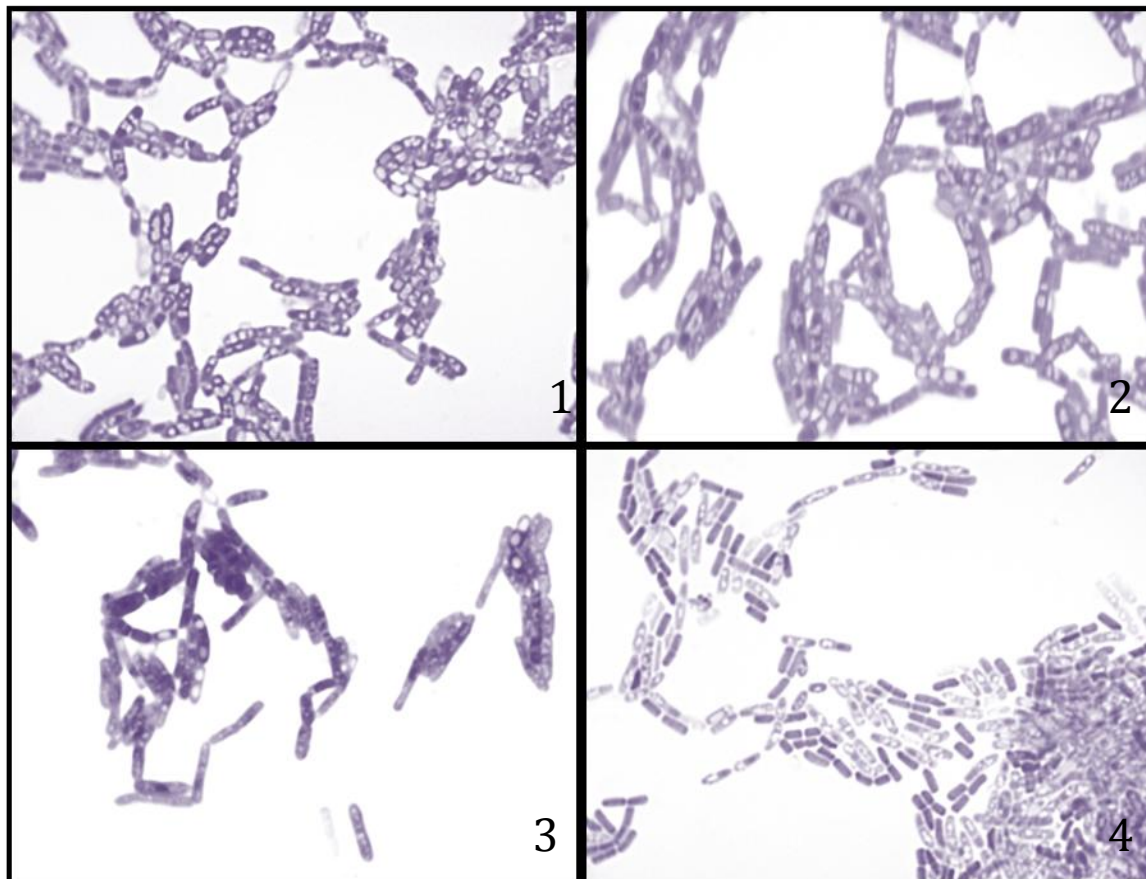


Figura 5. Tinción Gram de *Bacillus* spp. esporulados, evaluados mediante ensayos antagónicos. Células bacterianas pertenecientes a los aislados bacterianos durante el periodo de mayor esporulación. **Cuadro 1.** La mayor cantidad de esporas pertenecientes al aislado 1(TN-2.3) se observó a las 35 horas. **Cuadro 2.** Para el aislado 2(TN-5.1) la mayor cantidad de esporas se observó a las 27 horas. **Cuadro 3.** El aislado 3(GU-2.1) mostró una mayor cantidad de esporas a las 32 horas. **Cuadro 4.** Para el aislado 4(GU-4.5) se observó una mayor presencia de esporas a las 17 horas.

4.1.3 Evaluación del efecto antagónico de los aislados de *Bacillus* spp. sobre la eclosión de huevos de *Meloidogyne* spp.

Según los resultados del ensayo *in vitro*, los dos aislados bacterianos provenientes del Cerro Guilarte mostraron una reducción significativa en el número de larvas eclosionadas (Cuadro 7). Estos datos mostrados en la tercera columna revelan que el promedio de las larvas contabilizadas de la suspensión de agua estéril a las 72 horas de incubación, fueron menores que los contabilizados de Toro Negro. Sin embargo, no se encontró diferencia en cuanto al porcentaje de las larvas al reaccionar al HCl. Por otro lado, los huevos que permanecieron sin eclosionar e impregnados en el alginato, no se les observó cambios en la morfología o en la coloración. Esto indica que las colonias de bacterias depositadas pueden estar reduciendo la capacidad de movimiento y eclosión, pero sin causarles daños morfológicos a las larvas. Por lo que se confirma que estas bacterias no son parásitas de larvas.

Cuadro 7. Efecto de los aislados de *Bacillus* spp. sobre la eclosión del nemátodo nodulador *Meloidogyne* spp. a las 72 horas en experimento *in vitro*

Aislados <i>Bacillus</i> spp.	Promedio de huevos en alginato	Promedio de larvas eclosionadas	% Larvas que no presentaron respuesta al HCl
(1) TN-2.3	121	51 (b)	90(a)
(2) TN-5.1	110	35 (b)	90(a)
(3) GU-2.1	115	27 (a)	90(a)
(4) GU-4.5	126	31 (a)	90(a)
Agua estéril	126	51 (b)	50(b)

Los datos promediados con la misma letra no difieren significativamente entre sí según la prueba LSD ($\alpha=0.05$) DMS=0.67473, CV 74.0

4.2 EXPERIMENTO DE INVERNADERO

4.2.1 Efecto de los aislados de *Bacillus* spp. sobre la eclosión de los huevos de *Meloidogyne* spp.

En el ensayo de invernadero, plantas tratadas con GU-2.1 mostraron una cantidad de larvas de *Meloidogyne* spp. en el suelo menor que los otros tratamientos. Por otro lado, la bacteria TN.5.1 mostró cierto antagonismo con el nematodo pero no se detectó significancia. De manera general el tratamiento TN-5.1 redujo la cantidad de larvas visibles recuperadas en el suelo mostrando un 69% de mortalidad. El tratamiento codificado como GU-4.5 mostró valores por encima del 60% de mortalidad y el tratamiento TN-2.3 mostró valores sobre el 50% de mortalidad. (Cuadro 8). Estos resultados observados fueron similares a los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*.

Cuadro 8. Efecto de los aislados bacterianos sobre la eclosión del nemátodo nodulador *Meloidogyne* spp. en experimento de invernadero

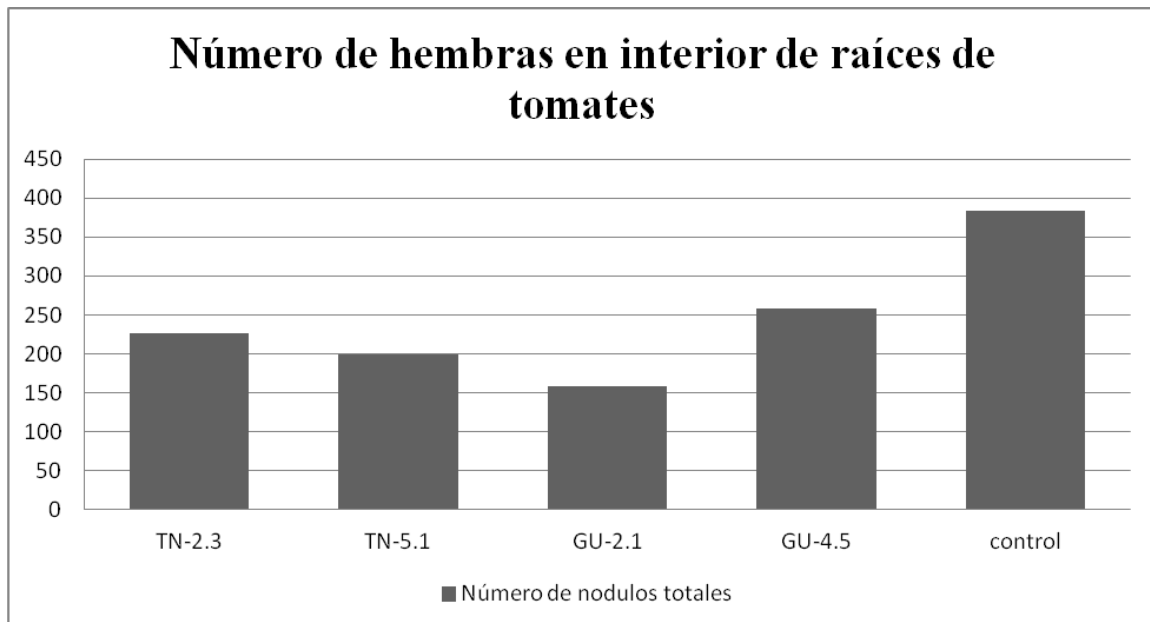
Aislados bacterianos	Promedio larvas depositadas al inicio	Promedio de la población final de larvas	Promedio Peso de raíz	Porcentaje de mortalidad de larvas
(1)TN-2.3	1560	482(a)	2.22g	55
(2)TN-5.1	1755	355(a)	1.98g	69
(3)GU-2.1	2566	285(b)	1.40g	82
(4)GU-4.5	1375	263(a)	.87g	62
agua estéril	1766	1004(a)	1g	22

Prueba LSD Fisher: Alfa=0.05, DMS=0.82211, CV 52.8 Población final de larvas

4.2.2 Número de hembras localizadas en el interior del sistema radical de plantas de tomate

Los resultados mostrados en la figura 5 indican que los aislados de *Bacillus* spp. redujeron significativamente el número de hembras en el interior de la raíz. Los tratamientos fueron comparados entre sí y se observaron diferencias numéricas entre ellos. Para un promedio de 1.50 g del peso del sistema radical fueron contabilizadas 222 hembras de las plantas tratadas con el aislado TN-2.3, para el aislado TN-5.1 fueron contabilizados 185 hembras, para el aislado GU-2.1 fueron contabilizados 179 hembras, mientras que para el aislado GU-4.5 fueron contabilizados 259 hembras. Según los datos recolectados para el control o plantas con agua estéril fueron contabilizadas 383 hembras.

Figura 5. Número de hembras en el sistema radical de plantas de tomates inoculadas con los aislados de *Bacillus* spp.



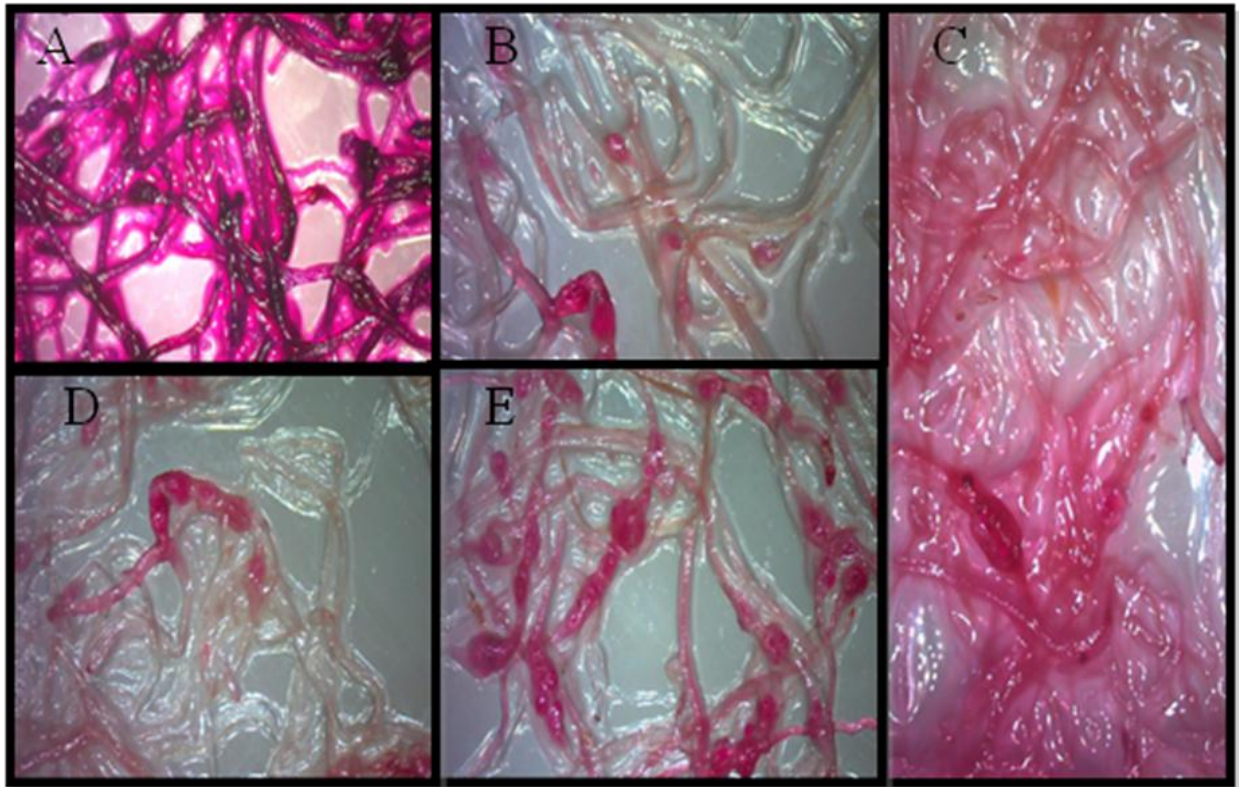


Figura 6. Nódulos observados en el sistema radical de plantas de tomates tratadas con los aislados bacterianos

La figura **A** muestra la formación de nódulos el sistema radical inoculado con TN-2.3. La figura **B** muestra los nódulos formados en el sistema radical de plantas tratadas con TN-5.1. La figura **C** representa el sistema radical de plantas tratadas con el aislado GU-2.1. Mientras que la figura **D** representa el sistema radical de plantas tratadas con GU-4.5. La figura **E** es la representación de las plantas que fueron utilizadas como control, no tratadas.

4.2.3 Identificación de los aislados de *Bacillus* spp. con el método de Biolog

Los aislados bacterianos los cuales fueron utilizados para evaluar la capacidad antagónica, sobre las larvas y huevos de *Meloidogyne* spp. bajo condiciones *in vitro* e invernadero fueron identificados. Según los resultados de la base de datos del sistema de identificación Biolog los aislados TN-1.3, TN-5.1, GU-2.1y GU-4.5 fueron identificados como *Bacillus thuringiensis*.

5. DISCUSIÓN

Al momento de realizar el aislamiento de bacterias, las muestras de suelo provenientes del Bosque Cerro Guilarte en Adjuntas mostraron un mayor número de colonias. Las comunidades de bacterias, al igual que todos los organismos vivos, tienen interacciones con el ambiente y pueden ser susceptibles a las presiones de este. Factores ambientales tales como: precipitación, grado de descomposición de la materia orgánica en el suelo, tipo de materia orgánica, temperatura y pH del suelo son algunos de los cuales pueden estar influenciando el desarrollo de los organismos. Estos factores hacen que la distribución de los organismos en el suelo no sean equitativamente distribuidos. Las bacterias, son microorganismos vivos que interactúan activamente y responden a las presiones del ambiente. Es probable que el ecosistema presente en ambas localidades, influyera en el número de colonias aisladas con el medio semiselectivo para *Bacillus* spp.

Al igual que en un ambiente natural, los factores ambientales al momento de evaluar el crecimiento de los *Bacillus* spp. bajo condiciones de laboratorio pueden influenciar en el desarrollo de las colonias. De hecho, investigaciones reportadas por Driks y colaboradores en el 2002, establecen que las diferencias relacionadas con la esporulación entre *Bacillus* spp. está mediada por genes y proteínas. Por lo que pueden observarse variaciones en la esporulación durante las fases de crecimiento de las bacterias.

En la actualidad, *B. thuringiensis* es el género con la especie más utilizado en productos para controlar biológicamente las plagas y enfermedades. Entre las

B.thuringiensis más destacadas se encuentran las: subsp. *kurstaki*, *israeliensis* y *azawai*. La producción de cristales tóxicos durante la etapa de esporulación de esta bacteria, la convierte en uno de los organismos más exitosos utilizado en los métodos de control biológico.

Por medio de esta investigación fue demostrada la capacidad antagónica de los aislados de *B. thuringiensis* bajo condiciones *in vitro*. Según los resultados observados, los aislados fueron capaces de reducir la viabilidad de los huevos de *Meloidogyne* spp. al interrumpir el proceso de eclosión de las larvas. Además, quedó demostrada que las larvas de *Meloidogyne* spp. fueron blanco de *B. thuringiensis*, cuando fue depositado HCl a la solución que contenía las larvas y solo el 10% de ellas reaccionaron. En la literatura se ha reportado que *B. thuringiensis* puede afectar el desarrollo larval en estadios j1 y j2 de *M. incognita* (Márquez *et al.*, 2006). Estas bacterias tienen la capacidad de producir la paralización de los procesos del desarrollo larval, vacuolización interna, deformación del sistema digestivo y ausencia de respuesta a estímulos luminosos (Márquez *et al.*, 2006).

Según lo observado en ensayos *in vitro* existen diferencias relacionadas con la capacidad antagónica de las cepas de *B. thuringiensis* utilizadas. En adición se ha reportado que la capacidad antagónica de *B.thuringiensis* puede ser variable. Éstos resultados se asemejan a los reportados en estudios previos, donde utilizaron 37 subespecies de *B. thuringiensis*. En este estudio se observaron diferencias que oscilaban entre un 0% a 100%, en cuanto al control de la eclosión de los huevos de *Meloidogyne* spp. (Márquez y Fernandez, 2006). Éstos resultados también coinciden con investigaciones realizados por Sharman en el (1994), donde reportaron diferencias que

fluctuaron entre 53 a 65% en el control de *M. incognita*, cuando fueron utilizadas aislados de *Bacillus thuringiensis*. Conclusiones referentes a las diferencias entre los aislados utilizados son difíciles de llevar a cabo. Ya que no fueron realizados estudios moleculares para identificar si la variabilidad antagónica está relacionada a la presencia de genes que pueden estar diferenciando a los aislados entre sub especies.

En el ensayo realizado bajo condiciones de invernadero, los resultados mostraron que hubo una reducción significativamente diferente ($\alpha=0.05$) relacionada al número de nódulos formados. Esto pudiera indicar que los aislados de *B.thuringiensis* o sus metabolitos interfirieron con la formación de nódulos. Es probable que los metabolitos que la bacteria produce, reduzcan la eclosión de las larvas resultando en menor invasión a las raíces. Otros mecanismos por parte de *B. thuringiensis* pueden estar involucrados en interrumpir la penetración de las larvas, a través del tejido radical del hospedero. Investigaciones reportadas por Mohammed y colaboradores para el año 2008 demostraron que estas bacterias pueden ser igualmente efectivas en el control de los nemátodos fitoparasítico utilizando mecanismos similares. En adición se ha reportado que los cristales proteicos solubles, son responsables de acciones nematicidas (Wei *et al.*, 2003).

Según los datos obtenidos en esta investigación, dos de los aislados GU-2.1 y GU-4.1 redujeron significativamente ($\alpha=0.05$) la cantidad de larvas localizadas en el suelo. La literatura reporta diferentes modos de acción que podrían estar relacionados a la mortandad o disminución de la patogenicidad de los nemátodos. Cambio del entorno que rodea a los nemátodos (Sikora, 1992) y la interrupción de los procesos de reconocimiento de la planta (Oosterndorp y Sikora, 1990) son algunos de los efectos creados por esta

bacteria. En nuestro experimento, puede que ambos modos estén presentes aunque es probable que el antagonismo dependiera más de un cambio en el ambiente. Estos resultados pudieran ser validados en investigaciones futuras, referentes a la caracterización de proteínas tóxicas, metabolitos o cambios en el pH inducido por las bacterias.

Los efectos relacionados a la capacidad antagonica que envuelven la producción de complejos estructurales antagonicos pueden incluir varios modos de acción. Entre los que se mencionan está la supresión de: la reproducción de los nemátodos, eclosión de huevos, supervivencia de las larvas y eliminación directa de los nemátodos fitoparasíticos (Siddiqui y Mahmood., 1999). La disminución de la población inicial de *Meloidogyne* spp. en ensayos de invernadero y la interrupción de la eclosión de los nematodos ensayos *in vitro*, son modos de acción atagónicos asociado a lo descrito por Siddiqui y Mahmood para el año 1999.

6. CONCLUSIONES

1. Se identificaron cuatro aislados provenientes de Toro Negro y Cerro Guilarte como *Bacillus thuringiensis*.
2. En los ensayos *in vitro*, los aislados de *B. thuringiensis* codificados como GU-2.1 y GU-4.5 mostraron resultados significativamente diferentes al reducir la eclosión entre un 75% en comparación con el control.
3. Plantas tratadas con los aislados de *B. thuringiensis* mostraron un número menor de hembras en el interior de las raíces que las utilizadas como control.
4. El aislado de *B. thuringiensis* codificado como GU-2 redujo significativamente el número de larvas en el suelo.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar identificación molecular para determinar si existen subespecies dentro de los aislados utilizados.
- Realizar evaluaciones para determinar la prevalencia de *B. thuringiensis* luego de esta haber sido aplicada en las plantas.
- Realizar evaluaciones para determinar la tasa de reproducción de *Meloidogyne* spp. luego de aplicar los aislados de *B. thuringiensis*.

8. LITERATURA CITADA

- Abad, P., B. Favery and R. Marie-Noelle, 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* .4:217-224.
- Agbeinin, O., 2011. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Prospects and Challenges for the Poor Africa Farmer. *Plant Protection Science*. 47:62-67.
- Asaka, O. and M. Shoda, 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied Environmental Microbiology*. 62:4081-4085.
- Brannen, P.M. and D.S. Kenney, 1997. Kodiak - a successful biological control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 19: 169-171.
- Cawoy, E., W. Bettiol, and P. Fickers, 2011. Bacillus-Based Biological Control of Plant Disease. *Pesticides in the modern world and management*. 1:273-302.
- Chavaria-Carvajal, J.A. and R. Rodriguez-Kabana, 1998. Alginate films for assessment of parasitism of *Meloidogyne incognita* eggs. *Nematropica*. 28.1:41-48.
- Drinks, A., 2002. Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cellular and Molecular Life Science*. 59:389-391.
- Doherty, M.A. and T.F. Preece, 1988. *Bacillus cereus* prevents germination of uredospores of *Puccinia allii* and the development of rust disease of leek *Allium porrum* in controlled environments. *Physiological Plant Pathology*. 22:123-132.
- Carneiro, R. I. De Zauza. L. Belarmira, 1998. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. Strain on juveniles of *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*.1:12-21.
- Cycón, M. and Z. Piotrowska-Seget, 2009. Changes in bacterial diversity and community structure following pesticides addition to soil estimated by cultivation technique. *Ecotoxicology* .18:632–642.
- Glare, T,R. and M.Callaghan, 2000. *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, U.K. 350p.
- Gokta, N., and G. Swarup, 1988. On the potential of some bacterial biocides against root-knot and cyst nematodes. *Indian Journal Nematology*. 18: 152–153.

- Goodey, T., 1937. Two methods for staining nematodes in plant tissue. *Journal of Helminthology*. 15:137-144.
- Gray, E. A. Lee and M, Souleimanov, 2006. Anovel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain Bt NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 545-554.
- Gyaneshwar, P., y N.G, Kumar. 2002. Role of soil microorganisms improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245: 83–93.
- Hussey, R., y K, Barker. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. *Plant Disease Reports* 57:1025-1028.
- Khan, A., K. Williams and H, Nevalainen, 2006. Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. *Biology Control*. 51:659-678.
- Knowles, B., 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. *Advances in Insect Physiology Academic Press*. 24:275-308.
- Márquez, M. y E, Fernández, 2006. Selección de cepas *Bacillus thuringiensis* con efecto nematocida. *Manejo integrado de plagas y agroecología*. 78:63-69
- Meneses, A. 2003. Utilización de hongos endófitos provenientes de Banano orgánico para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* Cobb, Thorne. Tesis de maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza de Costa Rico, Turrialba. 1-50.
- Mitkowski, N.A. and G.S, Abawi, 2003. Root-knot nematodes. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2003-0917-01 Revised 2011.
- Mohammed, S, M., M. Anwer, and R. Mohamed, 2008. Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 1:57-66.
- Moroz-Valerie, W. and S. Hussey, 1996. Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants. *The Plant Cell*. 1735-1745.
- Ortíz-Castro, R., E. Valencia-Cantero, and J. Lopez-Bucio, 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signals. *Plants Signals and Behavior*. 4:263-265.
- Oostendorp, M. and R, Sikora, 1990. *In vitro* interrelationship between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Journal of Nematology*. 13: 269-274.

- Rainey, P., M. Brockhurst, and A. Buckling, 2005. The cause and consequences of microbial diversity. *Biological Diversity and Function in Soil*. First edition Cambridge: University Press 83-99.
- Román, J., 1978. Fitonematología Tropical. Estación Experimental Agrícola Río Piedras, Universidad de Puerto Rico Recinto de Mayagüez. 256p.
- Rosas-García, N., 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: An environmental friendly alternative. *Recent Patent in Biotechnology*. 3:28-36.
- Sait, M., P. Hugenholtz y P.H, Janssen, 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology*. 4: 654–666.
- Schisler, D.A., P.J. Slinger y R.W, Behle. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological Control of Plant Diseases. *Phytopathology*. 11:1267-1271.
- Sharma, R.D. 1994. *Bacillus thuringiensis*: a biocontrol agent of *Meloidogyne incognita* on Barley. *Nematologia Brasileira*. 18:79-84.
- Schlöter, M.,O. Dilly y J. Munch. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environmen*. 98: 255-262.
- Siddiqui, Z.A. y I. Mahmood.1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review. *Bioresource Technology*. 2: 167-179.
- Sikora, R., 1992. Management of Antagonistic Potential in Agricultural Ecosystems for Biological control of Plant Parasitic Nematode. *Annual Riview of Phytopathology*. 30: 245-270.
- Smith,I.M., D.G. McNamara y P.R. Scott. 1997. *Meloidogyne chitwoodi*. Data Sheets on Quarantine Pest. 612-61. Quarantine Pest for Europe. Second Edition. CABI International & EPPO. UK. 1425p.
- Stirlig, D.A., P.J. Slinger, and R.W. Behle, 1979. Mode of parasitism of *Meloidogyne* spp. and other Nemaoides Eggs by *Dactylella oviparasitica*. *Journal of Nematology*. 3: 282-288.
- Street, J., 1969. Methods of Removal of Pesticide Residues. *Canadian Medical Association Journal*. 100:164-160.
- Suzuki, C. and T. Kunito, 2005. Microbial indices of soil fertility. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1062-1074.

- Tiedje, J. M., S. Asuming-Brempong and K. Nusslein, 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*. 13:109–122.
- Turner, J.T. and P.A. Backman, 1991. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*. 75: 347–353.
- Weinzierl, R.A., 1996. Pesticide and food safety: the gods honest truth is it's not that simple. *American Entology*. 42:11-13.
- Wei, J.Z., K. Hale and L. Carta, 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:2760-2765.
- Yépez, G., J. Meredith and A. Pérez, 1972. Nemátodos del banano y plátano *Musa* sp. en Venezuela. *Nematropica*. 2: 47-51.
- Zhang, S., M. Reddy and J. Kloepper, 2002. Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control*. 23:79-86.