

Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nemátodos

Jesús Mena Campos,¹ Eulogio Pimentel Vázquez,¹ Liuvén Veloz González,¹ Armando Tomás Hernández,¹ Licette León,¹ Yamilka Ramírez,¹ Ileana Sánchez,¹ Juan Diego Mencho,³ Alina López,¹ Merardo Pujol,¹ Carlos Borroto,¹ Eralio Ramos,⁴ José Manuel Álvarez,⁴ Marieta Marín,¹ Gilda Jiménez,² Graciela García,² Víctor M Pico,² Manuel Expósito,¹ Yaiza Coca,¹ Miguel Gómez,⁴ Amparo Olazabal,¹ Abel Hernández,¹ Viviana Falcón,¹ María C De la Rosa,¹ Ivón Menéndez,¹ Manuel Raíces¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 387, Camagüey 70100. Fax: (032) 26 1587; E-mail: jesus.mena@cigb.edu.cu ²Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal de Camagüey. ³Universidad de Camagüey. ⁴Ministerio de la Agricultura.

RESUMEN

Se desarrollaron metodologías de trabajo *in vitro*, que permitieron estudiar 158 cepas de bacterias, con ello se logró aislar, identificar y determinar una nueva cepa nematocida: *Corynebacterium paurometabolum* cepa C-924, que resultó el más eficiente biocontrolador de altas poblaciones de fitonemátodos, entre ellos *Meloidogyne incognita*. Se demostró que el mecanismo de acción de esta bacteria se debe a las quitinasas y al sulfuro de hidrógeno que produce de manera simultánea. Los estudios de las interacciones de la cepa C-924 con otros microorganismos biocontroladores, biofertilizantes y con plaguicidas químicos, arrojaron resultados favorables. Se comprobó que la población de la cepa C-924, disminuye progresivamente y en un intervalo entre 60 y 120 días, no se detectó en los suelos tratados. El mercado mundial calculado para este bionemático está entre 43 y 87 millones de USD. Por otro lado, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3 mostró control sobre huevos y larvas de nemátodos. Se demostró su efectividad en el control de altas poblaciones de los fitonemátodos *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffeae* en plátano y banano. Las Eficiencias Técnicas promediaron por encima del 80% de efectividad sobre nemátodos. En la provincia de Camagüey se han tratado más de 6 789,9 ha de plátano y banano en los últimos cinco años con la cepa LBT-3, producida en los CREE. En el país se calcula que se han tratado con este bioproducto más de 2 500 hectáreas anualmente, que representan más de dos millones de USD si se hubiesen empleado nematocidas químicos importados.

Introducción

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. El uso de sustancias químicas para el control de plagas en la agricultura ha originado un creciente deterioro del ecosistema, además de traer como consecuencia que los alimentos producidos bajo este régimen posean un alto grado de contaminación y resulten dañinos para las personas que los consumen. 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 nemátodos son responsables de pérdidas considerables, valoradas en 100 mil millones de USD anuales.

Existe una creciente demanda de productos nematocidas, tanto a nivel nacional como en el mercado internacional; por otra parte, entre los trece 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", lo siguiente:

Obtención y Desarrollo de Biopesticidas, Biofertilizantes, Bioreguladores y Extractos Naturales.

- Desarrollar técnicas de aislamiento, caracterización y evaluación de metabolitos microbianos para el control fitosanitario y la estimulación del crecimiento vegetal.

- Desarrollar formulaciones de biofertilizantes, biopesticidas y bioreguladores más eficaces y persistentes en nuestras condiciones ambientales, así como estudiar los mecanismos de acción.

- Profundizar en la ingeniería de los diferentes procesos biotecnológicos y, en especial, la fermentación en estado sólido.

El proyecto desarrollado en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) para obtener nuevas cepas nematocidas, 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 nematocidas), por productos biológicos no contaminantes.

Descripción del resultado

Novedad de la innovación

1. El aislamiento, identificación y determinación de la actividad nematocida de *Corynebacterium paurometabolum* cepa C-924 así como la determinación del modo o mecanismo de acción de esta bacteria. Estos resultados dieron lugar a las patentes

“Nematicidic agent and method for the bio-control of nematodes” (PCT 0397, WO 96/04749, 1996) y “Antiparasitic and pesticide compositions” (PCT, WO 02/052934, 11 de Julio, 2002).

2. La determinación de la actividad nematocida de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-3 y su posterior extensión a las áreas agrícolas del país, fundamentalmente en plátano y banano. Esto ha permitido un significativo ahorro de divisas al disminuir las importaciones de plaguicidas, además de incidir en la protección del medio ambiente.

Descripción de las acciones científico tecnológicas que dieron lugar a la innovación

A partir de muestras de la rizosfera de una plantación de plátanos, se realizó un estudio para aislar y determinar nuevas cepas de bacterias con posibilidades de ser empleadas como nematocidas biológicos, inocuos para el medio ambiente. Se desarrollaron metodologías de trabajo *in vitro*, que permitieron estudiar 158 cepas de bacterias.

Experimento *in vitro* con larvas de *M. incognita* Chitwood (Figura 1)

El tratamiento con *C. paurometabolum* cepa C-924, resultó significativamente superior a todos los biopreparados (Tukey, $p < 0.05$). *B. thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-3 fue el segundo tratamiento en cuanto a efectividad en el control de larvas, sólo superado por C-924 (Tukey, $p < 0.05$).

Cálculo de las concentraciones letales (CL_{50} y CL_{95})

El cálculo de la CL_{50} no mostró grandes diferencias entre los dos métodos utilizados. *C. paurometabolum* cepa C-924, tuvo el mejor comportamiento en el control de larvas de *M. incognita* Chitwood, seguido por *B. thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-3 (Tabla 1).

Modo de acción de *C. paurometabolum* cepa C-924 sobre huevos de nematodos

Teniendo en cuenta las observaciones realizadas en el estudio ultraestructural (por MET) en huevos y larvas sometidos a la acción de *C. paurometabolum* cepa C-924, se desarrollaron experimentos *in vitro* donde se evaluó la actividad de los gases como portadores de sulfuros, y la actividad del sobrenadante del cultivo como portador de quitinasas producidas por C-924. También se observó el efecto combinado de ambos factores (quitinasas y sulfuros).

De acuerdo a las observaciones sobre huevos y larvas de nemátodos realizadas por MET (Figura 2) y a los resultados observados en estos experimentos, se concluyó 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 (Figura 3).

Control de *Meloidogyne incognita* Chitwood en plantas indicadoras

C. paurometabolum cepa C-924, fue el mejor tratamiento para el control de *M. incognita* Chitwood, si se tiene en cuenta que la concentración de trabajo a la que se empleó fue de 10^6 UFC/mL (Figura 4).

El tratamiento con el biopreparado *B. thuringiensis* var. kurstaki cepa LBT-3 (10^7 esporas/mL), mostró un efecto positivo en el control de *M. incognita* Chitwood.

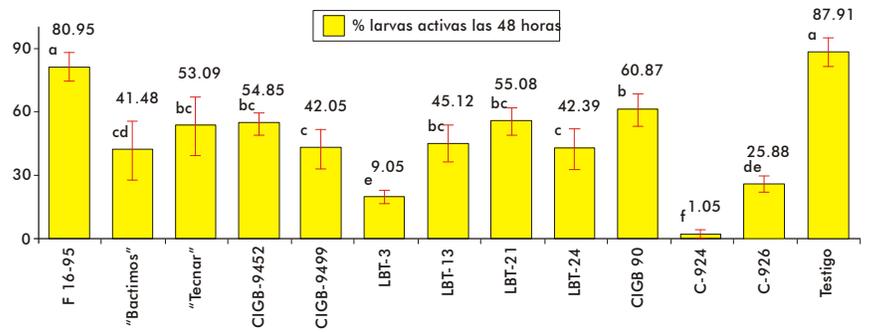


Figura 1. Porcentajes de larvas activas de *M. incognita* a las 48 horas de interacción con los 12 biopreparados y el testigo. Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$). Error Estándar = 2,419; Coefic. de Variabilidad = 0,526.

Tabla 1. Concentraciones letales (CL_{50} y CL_{95}) calculadas para las cepas en estudio.

Biopreparados (cepas)	CL_{50} (Reed y Muench)	Probit del SPSS® 8.0 for Windows®			
		CL_{50} ($p < 0.05$)	CL_{95} ($p < 0.05$)	R ²	Er. Est
1) LBT-3 esporas/mL	$8,02 \times 10^5$	$5,02 \times 10^5$	$6,11 \times 10^7$	0,9247	0,1592
2) C-926 UFC/mL	$1,60 \times 10^6$	$7,51 \times 10^5$	$1,36 \times 10^8$	0,9183	0,1537
3) C-924 UFC/mL	$6,89 \times 10^4$	$3,23 \times 10^4$	$2,54 \times 10^6$	0,9467	0,1456

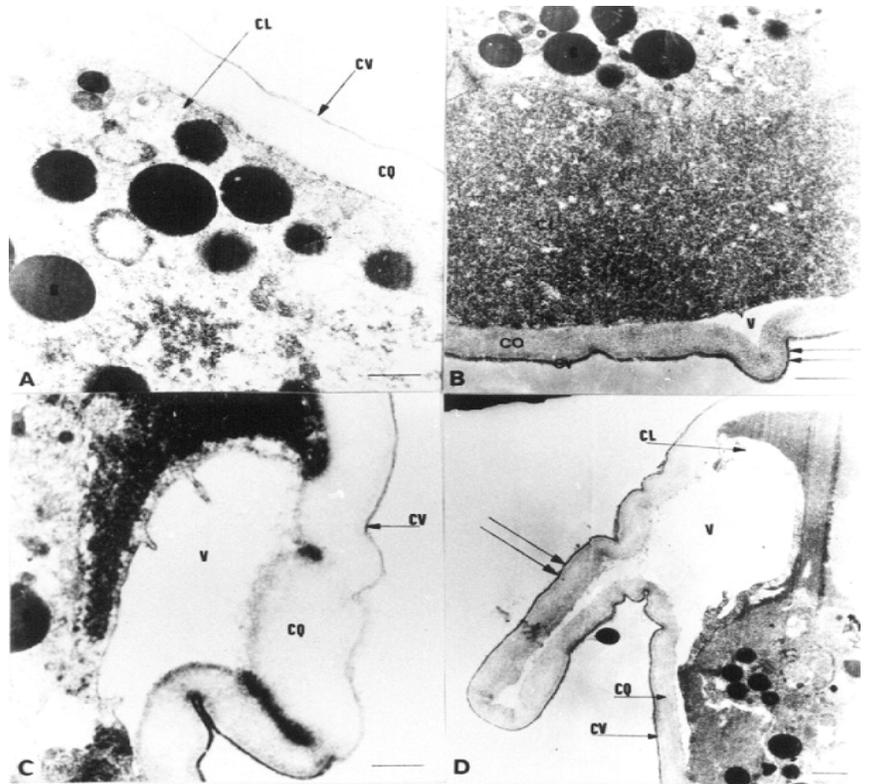


Figura 2. Microscopía electrónica de transmisión (MET) de huevos de *Haemonchus* spp. A: Parte de un huevo a las 12 horas de ser ovopositado, sin los efectos de *Corynebacterium paurometabolum* C-924. Pared del huevo con la capa vitelina (CV), capa de quitina (CQ) y capa lipídica (CL) intactas. Citoplasma con gránulos refringentes (G) dentro de límites normales. B-D: Segmento de huevos después de 12 horas de interacción con *C. paurometabolum* C-924. B: Se observa la interrupción en la capa lipídica (CL) por espacios vacuolares (V), una pequeña evaginación (se señala con doble flecha larga) de la capa de quitina (CQ) y la capa vitelina (CV) sin alteración. C: Alteración de la capa de quitina (CQ) y un amplio espacio vacuolar (V) son visibles. La capa vitelina (CV) dentro de límites normales. D: Una evaginación (doble flecha larga) de la capa de quitina (CQ), un espacio vacuolar (V), alteraciones en la capa lipídica (CL)

Efecto de distintos tratamientos nematocidas sobre las poblaciones de *Radopholus similis* Thorne y los rendimientos en plátano (*Musa sp.* Simond)

En sentido general, se apreció que una adecuada aplicación y un correcto manejo de los biopreparados, pueden tener un mejor efecto nematocida e incrementar los rendimientos a largo plazo, con respecto al nematocida químico recomendado para el cultivo: NemaCur® EC 40% (Figura 5 y 6).

Efecto de los biopreparados sobre las poblaciones de *Radopholus similis* Thorne y los rendimientos en banano (*Musa acuminata* Simond)

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 biopreparados aplicados: C-924 (10^6 ufe/mL), C-926 (10^8 ufe/mL), LBT-3 (10^7 esporas/mL).

Se apreció que el tratamiento C-924 (10^6 UFC/mL), disminuyó en un mayor porcentaje las poblaciones del nematodo *Radopholus similis* Thorne que C-926 (10^8 UFC/mL) y LBT-3 (10^7 esporas/mL), a los dos y cuatro meses de efectuados los tratamientos. En la figura 6 se muestran comparativamente las poblaciones del nematodo *Radopholus similis* Thorne y los rendimientos por parcela en cada tratamiento a los cuatro meses de iniciado el experimento. Se reiteró que C-924 además de ser el biopreparado aplicado a menor concentración celular, resultó el mejor de los tratamientos en cuanto a la disminución de la población de *Radopholus similis* Thorne y los rendimientos expresados en kg/parcelas durante cuatro meses (Tukey, $p < 0.05$) (Figura 7).

Efecto de *C. paurometabolum* cepa C-924 en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo condiciones de cultivos protegidos, con alta incidencia de *Meloidogyne incognita* Chitwood (Figura 8).

Se obtuvieron avales de los productores y fitosanitarios relacionados con este experimento, que confirman la efectividad de *C. paurometabolum* cepa C-924, en el control de *Meloidogyne incognita* Chitwood en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo las condiciones de los cultivos protegidos.

Compatibilidad de *Corynebacterium paurometabolum* cepa C-924 con plaguicidas químicos

Se trabajó con once plaguicidas químicos de los más empleados en la agricultura. Se realizaron ensayos *in vitro* y su confirmación en experimentos en macetas para el caso del producto NemaCur (Fenamiphos). Los retos se desarrollaron bajo condiciones controladas y para las evaluaciones se tuvo en cuenta la aparición de zonas de inhibición del crecimiento de C-924 al interactuar con los productos químicos. Se aplicaron tres concentraciones, entre las que se encontraban la concentración de trabajo en campo, una superior y otra inferior. Para ello se tuvo en cuenta las irregularidades que ocurren en el campo, al aplicarse los productos químicos. Se observaron diferentes comportamientos ante los agentes químicos, con diferentes rangos de sensibilidad y resistencia.

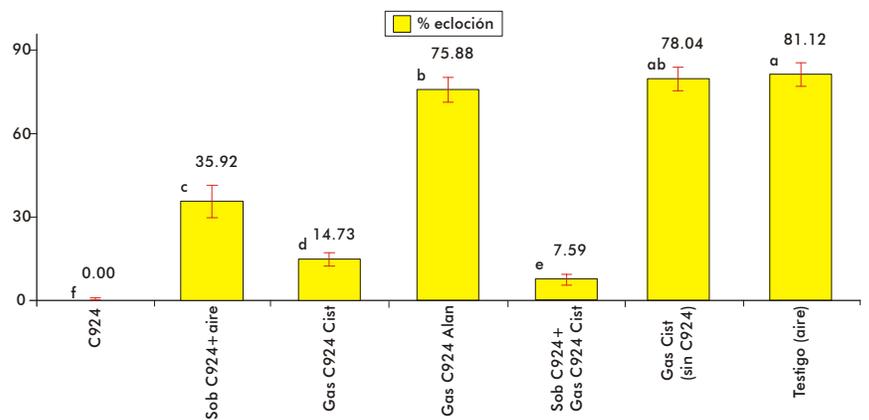


Figura 3. Eclosión de huevos de *Haemonchus* spp. a las 24 horas de estar sometidos a los distintos tratamientos. Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$). Error Estándar = 6,386; Coeficiente de Variabilidad = 0,808.

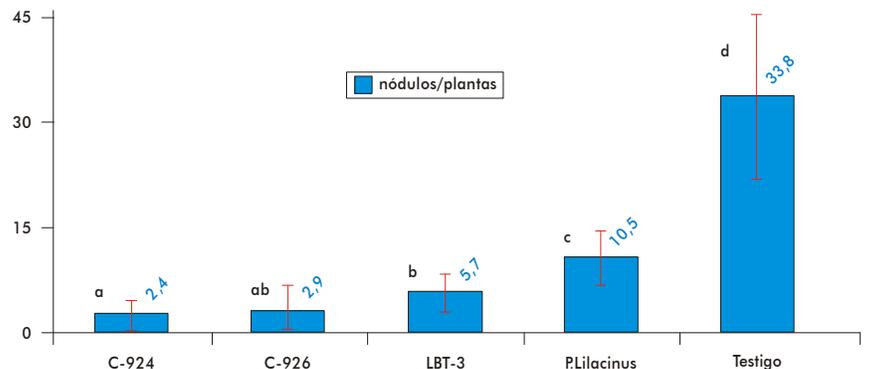


Figura 4. Nódulos de *M. incognita* Chitwood por planta a los 60 días del tratamiento con los cuatro biopreparados y el testigo. Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$). Error Estándar = 2,019; Coef. de Variabilidad = 1,291.

Se demostró en experimentos en macetas, combinando el empleo de una formulación a base de *C. paurometabolum* cepa C-924 y NemaCur, que es posible emplear este bionematocida en el manejo integrado de plagas.

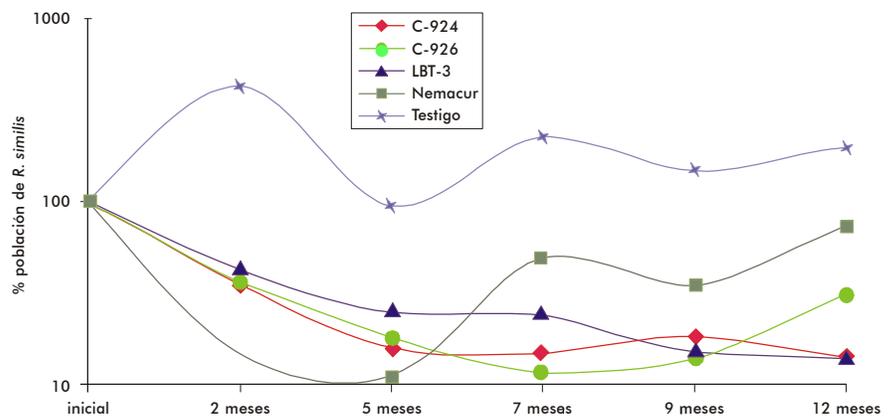


Figura 5. Comportamiento de las poblaciones de nematodos (*R. similis*), expresadas en porcentajes con relación a la población inicial, en una plantación de plátano clon Macho 3/4, durante un año. Las flechas negras indican los momentos de las aplicaciones de los tratamientos.

· **Interacciones de *C. paurometabolum* cepa C-924 con otros microorganismos**

Se realizaron ensayos *in vitro* en los que se evidenciaron las asociaciones con las bacterias *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Rhizobium phaseoli*; también con los hongos *Beauveria bassiana*, *Metharrizun anisopliae*, *Trichoderma harzianum* y *Verticillium lecanii*. Los retos se desarrollaron bajo condiciones controladas y para las evaluaciones se tuvo en cuenta la aparición de zonas de inhibición del crecimiento en los cultivos de las bacterias y detención del crecimiento radial típico de los hongos en estudio. Los resultados demostraron las posibilidades de emplear este bionemático en el manejo integrado de plagas.

· **Población de *Corynebacterium paurometabolum* cepa C-924, en suelos tratados con esta bacteria**

Se desarrolló un procedimiento para reaislar la cepa C-924 de suelos tratados con diferentes concentraciones. Para el reaislamiento diferenciado de la bacteria, se puso a punto un medio selectivo, basado en combinaciones de antibióticos y cromogénesis de las colonias por reducción del Telurito de Potasio. Los resultados confirmaron la efectividad de la bacteria en el control de *Meloidogyne incognita*, cuando la misma se encuentra en una concentración mayor de 10^5 ufc/g de suelo. Se comprobó que la población de *C. paurometabolum* cepa C-924, disminuye progresivamente y en un intervalo entre 60 y 120 días, no fue posible detectarla en los suelos tratados.

Introducción de la innovación en la práctica socio-económica

· **Desarrollo de un nuevo nematocida biológico a partir de *C. paurometabolum* cepa C-924**

Actualmente en el CIGB se encuentra en desarrollo un nuevo nematocida biológico, cuyo agente activo es la bacteria *C. paurometabolum* cepa C-924. Este nuevo producto satisface las exigencias del mercado internacional y tiene entre sus fortalezas el hecho de estar protegido por dos patentes.

· **Generalización del *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3, para el control de fitonematodos en plátanos (*Musa* spp.) y bananos (*M. acuminata* Simond)**

Las Eficiencias Técnicas realizadas en 165,44 ha, promediaron al 87,02 % de efectividad, esto demostró que la cepa LBT-3 constituye un nematocida biológico eficiente en estos cultivos bajo diferentes condiciones de campo.

Cuba contaba en 1997 con más de 103 mil hectáreas de plantaciones de plátano y banano, para las cuales se compraban anualmente por el MINAGRI 30 toneladas de Nema-cur®, que costaban al país \$300 mil USD. Esta cantidad alcanzaba para proteger un área de 1 875 ha, que representaba menos del 2% de estos cultivos.

La cepa LBT-3 se usaba anteriormente en Cuba, como insecticida para el control de lepidópteros en varios cultivos. Su empleo como nematocida biológico es un resultado del presente trabajo, que ya ha sido

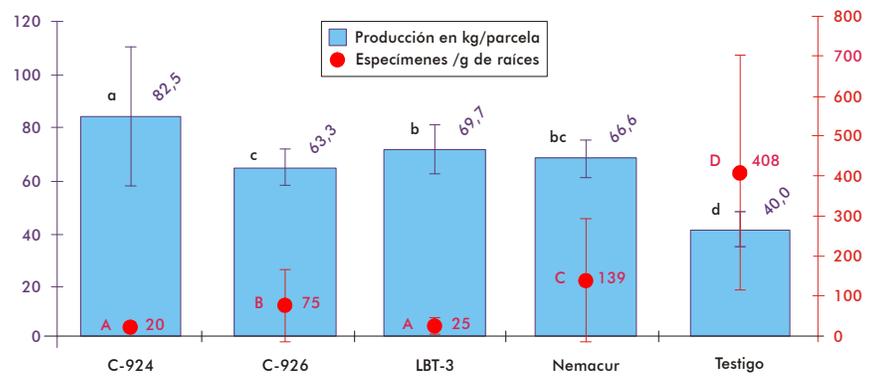


Figura 6. Producciones en kg por parcelas de los tratamientos durante un año (E. Estándar = 4,664; C. de Variabilidad = 0,401) y poblaciones finales de nematodos (*R. similis*), expresadas en especímenes por g de raíces (E. Estándar = 36,654; C. de Variabilidad = 1,124). Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

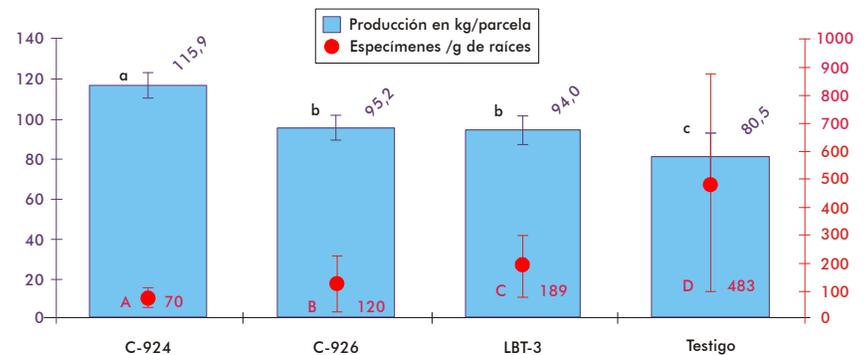


Figura 7. Producciones en kg por parcelas de los tratamientos durante cuatro meses (E. Estándar = 3,466; C. de Variabilidad = 0,144) y poblaciones de nematodos (*R. similis*) expresadas en especímenes por g de raíces (E. Estándar = 50,650; C. de Variabilidad = 0,940). Para letras iguales no existen diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$).

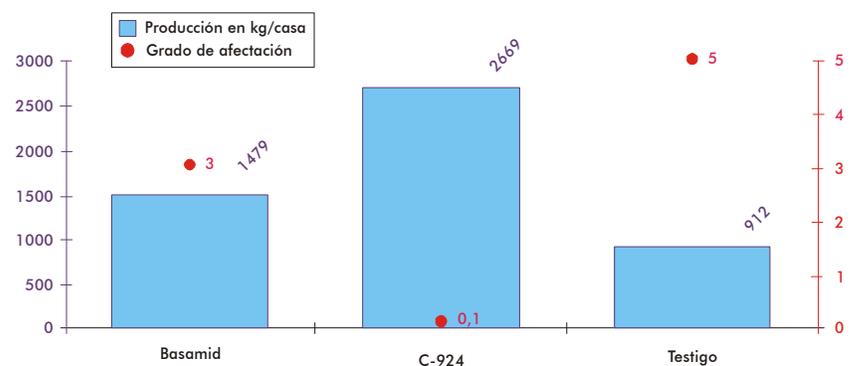


Figura 8. Resultados de los tres tratamientos con relación a la producción por casas y el grado de afectación de *M. incognita* a los 70 días después del trasplante.

introducido en la práctica productiva, fundamentalmente en la provincia de Camagüey, donde se han tratado con este nematocida biológico entre 1997 y el año 2001, un total de 6 789,9 hectáreas de plátano y banano.

El empleo del biopreparado *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3 ha sido incluido en el instructivo técnico de los cultivos del plátano y el banano como control biológico de fitonematodos.

Beneficios económicos y/o sociales

· Estudio de mercado para el bionematicida en desarrollo cuyo agente activo es *C. paurometabolum* cepa C-924

Según varios estudios [AgrEvo, 1997 y Rizobacter, 2000), el mercado mundial actual de los nematicidas se estima entre los 500 y 700 millones de USD, tomando como referencia los niveles actuales de ventas de productos para este fin. De ellos, se considera que alrededor de la tercera parte se destinan al mercado norteamericano. Si se considera sólo el 5% de posibilidades en las áreas tratables con nematicidas (en los cultivos estudiados) para ser cubiertas con el bionematicida C-924, las ventas anuales pudieran ser de \$ 43 887 072 USD en el mercado mundial, aunque en un cálculo menos pesimista, pudieran ser el doble: \$ 87 774 144 USD.

· Beneficios económicos aportados por la introducción de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3 como nematicida biológico

Cuba cuenta con más de 200 CREE (Centros de Reproducción de Entomófagos y Entomopatógenos) que pueden producir la cepa LBT-3 para la demanda nacional. El tratamiento de una hectárea de plátano o

banano en desarrollo, necesita entre 140 y 200 litros de este producto, que cuestan entre \$70,00 y \$200,00 en moneda nacional al agricultor. El mismo tratamiento con Nematicur[®] 40% (Bayer), cuesta al país entre \$160,00 USD y \$300,00 USD, esto es sin tener en consideración los equipos de protección que requiere este último producto para su aplicación. Por este concepto de sustitución de importaciones se han ahorrado al país \$300 mil USD al año.

Para todo el país se calcula, que en los últimos cinco años, fueron tratadas con el biopreparado *B. thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3, más de 2 500 hectáreas anualmente, que representan más de dos millones de USD anuales, si se hubiesen empleado nematicidas químicos importados.

Otra ventaja de este control biológico (cepa LBT-3) sobre el control químico (ej: Nematicur[®]), es que se puede aplicar en cualquier fase de desarrollo del cultivo, aunque las plantaciones estén en plena cosecha; mientras que para los nematicidas químicos esto se regula estrictamente debido al efecto tóxico de los mismos.

Colaboradores

Jesús Seoane y Félix Alvarez, del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.