

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA REPRODUCTIVA Y PATOGENICA DE DOS  
MEDIOS ARTIFICIALES PARA EL CULTIVO DE NEMATODOS  
ENTOMOPATÓGENOS DEL GÉNERO *HETERORHABDITIS SPP.***

**DANIEL GOMEZ VARGAS**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS  
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D.C  
2019**

**EVALUACION DE LA EFICACIA REPRODUCTIVA Y PATOGENICA DE DOS  
MEDIOS ARTIFICIALES PARA EL CULTIVO DE NEMATODOS  
ENTOMOPATÓGENOS DEL GÉNERO *HETERORHABDITIS SPP.***

**DANIEL GOMEZ VARGAS**

**PROYECTO DE GRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA  
AMBIENTAL**

**DIRECTOR:  
FRANÇOIS HERRERA JACQUELIN**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS  
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL  
BOGOTÁ D.C  
2019**

Nota de Aceptación

---

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

Bogotá D.C, 02 de Diciembre de 2019

*Dedico este trabajo de grado principalmente a mi familia, quién ha sido un gran apoyo durante toda mi vida para lograr grandes cosas. A mi madre, por su ternura y comprensión tan grande y a mi Padre, por su esfuerzo y cariño para salir adelante.*

## CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
3. MARCO TEÓRICO .....	13
3.1. Los nematodos entomopatógenos. ....	13
3.2. Ciclo de vida y reproducción.....	15
3.3. Simbiosis nematodo – bacteria. ....	16
3.4. Uso como control biológico. ....	17
3.5. Factores que afectan la eficacia de los nematodos.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1. Consecución y preparación de los Nematodos Entomopatógenos...20	
4.1. Aislamiento de bacterias simbiotes.....	21
4.2. Evaluación de la reproducción en medios artificiales.....	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
5.1. Medio de cultivo sólido. ....	27
5.2. Medio líquido.....	31
CONCLUSIONES .....	34
RECOMENDACIONES .....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Cantidad de nematodos contados en un área determinada de la caja Petri (0,25 cm <sup>2</sup> ).....	24
<b>Tabla 2.</b> Media de cantidad de nematodos colectados en cada medio de cultivo sólido evaluado. Fuente: elaboración propia. ....	27

## LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
<b>Gráfica 1.</b> Diagrama de proceso de consecución y material biológico. ....	20
<b>Gráfica 2.</b> Diagrama de proceso de extracción de bacteria simbiote. ....	21
<b>Gráfica 3.</b> Promedio de IJ/ 5ml de muestra de medio sólido en disolución. Fuente: Elaboración propia. ....	29
<b>Gráfica 4.</b> Cantidad de nematodos colectados por muestra en cada conteo en tratamiento 1. Fuente: Elaboración propia. ....	30
<b>Gráfica 5.</b> Cantidad de nematodos colectados por muestra en cada conteo en tratamiento 2. Fuente: Elaboración propia. ....	30

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Etapa de juvenil infectivo de <i>Heterorhabditis</i> indica .....	13
<b>Figura 2.</b> Macho del género <i>Heterorhabditis</i> . Papilas genitales. (A), espículas (B) y cola del infectivo juvenil (derecha). .....	15
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Steinernema</i> y <i>Heterorhabditis</i> . .....	15
<b>Figura 4.</b> Colonización de <i>Photorhabdus</i> (b) extendiéndose por el intestino desde la vesícula (p) hasta el ano (a). .....	17
<b>Figura 5.</b> Objetivos comunes de diferentes especies de nematodos entomopatógenos. ....	18
<b>Figura 6.</b> Medios NBTA previos a la inoculación con <i>Photorhabdus</i> .....	22
<b>Figura 7.</b> Medios NBTA después de la inoculación con <i>Photorhabdus</i> .....	23
<b>Figura 7.</b> Medios de reproducción sólidos antes de la incubación. ....	25
<b>Figura 8.</b> Medios de reproducción líquidos. ....	26
<b>Figura 9.</b> Medios de reproducción sólidos 15 días después de la inoculación. Fuente: Elaboración propia. ....	28
<b>Figura 10.</b> Muestra de individuos de <i>Heterorhabditis</i> 15 días después de la inoculación en el medio sólido. ....	28
<b>Figura 11.</b> Modelo de biorreactor diseñado con sondas, medidores y entradas de aire y agitadores para medio líquido. ....	32

## RESUMEN

El presente estudio constituye una evaluación de la eficacia de dos medios de cultivo para la reproducción de nematodos entomopatógenos para su uso como controlador biológico de plagas como coleópteros y algunos dípteros y su constitución como sustituyente de plaguicidas químicos que en la actualidad suponen un grave impacto ambiental y al ser humano. El estudio se llevó a cabo con un cultivo de *Heterorhabditis spp.*, extraídas de la cepa Tumaco obtenida a partir de un cultivo in-vivo por parte del laboratorio Perkins Ltda. Esta cepa de nematodos se desinfectó para posteriormente extraer su bacteria simbiote *Photorhabdus spp.* y hacer su aislamiento mediante un cultivo selectivo para su fase primaria. Con la bacteria simbiote aislada y la cepa desinfectada de *Heterorhabditis spp.* se evaluaría la eficacia de la reproducción de los nematodos entomopatógenos (NEP) en dos medios de cultivos artificiales, uno de composición sólida y otro líquido, cuyo principio activo se basa en caldo de Triptosa de soya (TSB) con su respectiva bacteria simbiote en un cultivo monoxénico (en relación simbiótica exclusivamente con sólo una especie de bacteria), comparando la cantidad de NEP producidos por unidad de volumen y su patogenicidad, es decir, la velocidad a la que los NEP realizan su proceso metabólico con ayuda de la bacteria simbiote dentro de su huésped, determinando de esta manera, la rapidez en que estos parásitos invaden los organismos que actúan como plaga en diferentes cultivos y causan la muerte de los mismos.

El medio de cultivo sólido generó una reproducción de NEP en concordancia estudios previos realizados, sin embargo, no fue posible realizar la comparación entre el rendimiento de los dos medios de cultivo evaluados debido a que el medio líquido evaluado no presentó reproducción y aumento de la cantidad de individuos en el mismo. Por lo tanto, se realizó un análisis de los factores que influyen en la reproducción exitosa de los Nematodos entomopatógenos en los dos medios de cultivo evaluados, y los parámetros a tener en cuenta para generar el mayor rendimiento, siendo estos principalmente, la producción y demanda de oxígeno en el medio, la temperatura, la contaminación por agentes externos al medio y la movilidad de los nematodos dentro del medio de cultivo.

**PALABRAS CLAVE:** Nematodos entomopatógenos, cultivo in-vitro, eficiencia reproductiva, control biológico.

## ABSTRACT

The present study is in regards of the evaluation of two different culture mediums and its production and yield of entomopathogenic nematodes, with the aim for its utilization as biological control, meaning the substitution of chemical pesticides which suppose a dangerous environmental and human health impact. This study was performed with a culture of nematodes from the *Heterorhabditis* gender, specially taking into account the efficiency of the reproduction and recovery of nematodes in its juvenile phase. Two artificial culture mediums, solid and liquid, were assessed creating a monoxenic culture (the nematodes are just related with its symbiont bacteria), in order to compare the amount of EPNs produced by volume unit and its pathogenicity, which means the velocity the EPNs perform its metabolic process with the support from the symbiont bacteria inside the host's body, therefore, the speed of the invasion of the host organisms that may affect crops is determined.

The assessed solid culture medium generated reproduction of EPNs according to previous studies, however, it was not possible to make the comparison between the efficiency and yields of both culture mediums, due to the fact that the liquid culture did not register an offspring and a raise in the number of individuals. As a matter of fact, an analysis of the factors that affected the successful yield and recovery of nematodes was performed in order to future to generate the maximum yield and offspring of the nematodes in different liquid culture medium in future studies, such parameters were the oxygen production and demand, temperature, contamination by external agents and the mobility of the nematodes inside the culture media.

**KEY WORDS:** Entomopathogenic nematodes, in-vitro culture, efficiency in reproduction, biological control.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de plaguicidas en todo el mundo sigue siendo una realidad, desde 1940, se ha percibido un notable crecimiento en el uso de éstos, por ejemplo, la producción total de plaguicidas en el mundo se ha incrementado de 1 millón de toneladas en 1965 hasta 6 millones en 2005, con una ligera disminución hasta el año 2015 [1]. El uso intensivo de estas sustancias en la agricultura a lo largo de la historia ha generado ciertos problemas tanto ambientales como sociales entre los que cabe mencionar la eliminación de especies no objetivo, lo que altera la composición y la salud del ecosistema, al afectar la cadena trófica; la contaminación de fuentes hídricas y el suelo, lo que incide directamente en la exposición de diferentes comunidades humanas y animales a sustancias tóxicas que pueden generar efectos graves en la salud. Cabe mencionar finalmente la resistencia que algunos insectos plaga generan hacia estas sustancias, generando la necesidad de aumentar la toxicidad de los plaguicidas utilizados [2].

Como consecuencia a esta problemática, la comunidad científica se ha visto forzada a encontrar métodos alternos para el control de plagas, entre ellos, el control biológico los cuales cabe mencionar el control con nematodos entomopatógenos cuya producción actual, genera altos costos al realizarse principalmente in-vivo, requiriendo mayor mano de obra y generando rendimientos bajos en comparación con las formas de producción in-vitro, cuyos costos pueden bajar significativamente al reducir la mano de obra requerida y generando mayores rendimientos al controlar el medio de cultivo y las condiciones en las que se reproducen los nematodos. Por este motivo, el presente estudio pretendió evaluar dos medios de cultivo para nematodos entomopatógenos, específicamente del género *Heterorhabditis*, de composición sólida y líquida basados en caldo nutriente a partir de soya y levadura con el fin de determinar cuál de estos métodos de reproducción in-vitro generaría una mayor reproducción de los Nematodos entomopatógenos, así como su patogenicidad en larvas de organismos considerados plagas de cultivos como lo son los tenebrios molineros (*Tenebrio molitor*). Esta evaluación de reproducción se llevaría a cabo mediante la incubación en un medio estéril de la bacteria simbiote del nematodo en cada medio de cultivo para la creación de un medio en donde estas bacterias degraden enzimáticamente los componentes del cultivo para así proveer nutrientes a los nematodos entomopatógenos y, por ende, garantizar su reproducción tanto asexual (partenogénesis) como sexual. Para la reproducción en medios líquidos, se realiza un análisis de distintos factores que pueden alterar la velocidad y capacidad de reproducción de nematodos entomopatógenos y las alternativas para generar una producción de nematodos en medios líquidos a gran escala con el fin de para hacer posible la reproducción de nematodos entomopatógenos a una escala mayor que genere mejores rendimientos en comparación a métodos de reproducción in-vivo y a métodos de control biológico tradicionales [3] [4].

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio comparativo entre dos medios de cultivo artificiales para dos especies de nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis spp*, con el fin de determinar la eficiencia reproductiva y patogenicidad de cada una de ellos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un cultivo de la bacteria simbiote para la creación de un cultivo monoxénico mediante su extracción de los nematodos entomopatógenos obtenidos inicialmente.
- Producir en condiciones de laboratorio dos medios de cultivo artificiales viables para la reproducción de una cepa de nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis*.
- Comparar el rendimiento reproductivo mediante un análisis estadístico entre la producción de nematodos entomopatógenos en cada medio y su patogenicidad sobre larvas de *Tenebrio molitor*.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Los nematodos entomopatógenos

Los nematodos entomopatógenos son organismos pertenecientes a la clase *Adenophorea*, orden *Rhabditida* y están divididos en dos familias principales, *Heterorhabdidae* y *Steinernematidae*, estas familias comprenden especies de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*, respectivamente. Estos organismos son translúcidos, alargados generalmente y de forma cilíndrica. Poseen sistema excretor, nervioso, digestivo, muscular y reproductivo, careciendo de sistema respiratorio y circulatorio [5] [6].

Son parásitos obligados que se desarrollan dentro de su hospedante, generalmente presentan o desarrollan alternancia de generaciones; el género *Heterorhabditis* es asexual en la primera generación, mientras que la segunda generación, se reproduce sexualmente. En el género *Steinernema*, no existen fases de No existen fases de alternancia de generaciones [7].

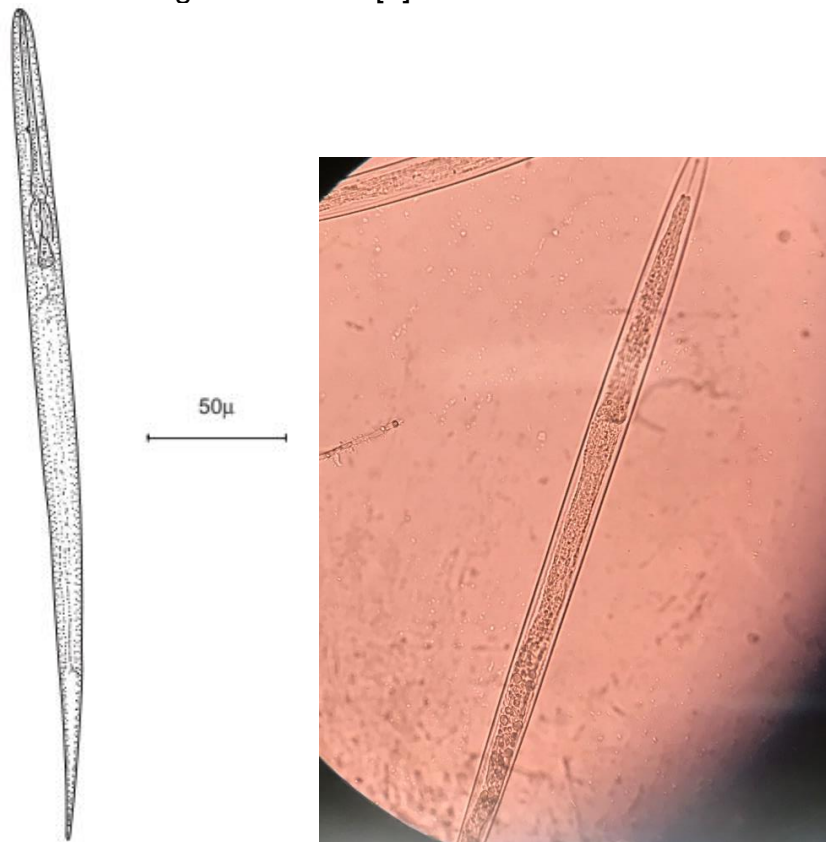


Figura 1. Etapa de juvenil infectivo de *Heterorhabditis indica* [8].

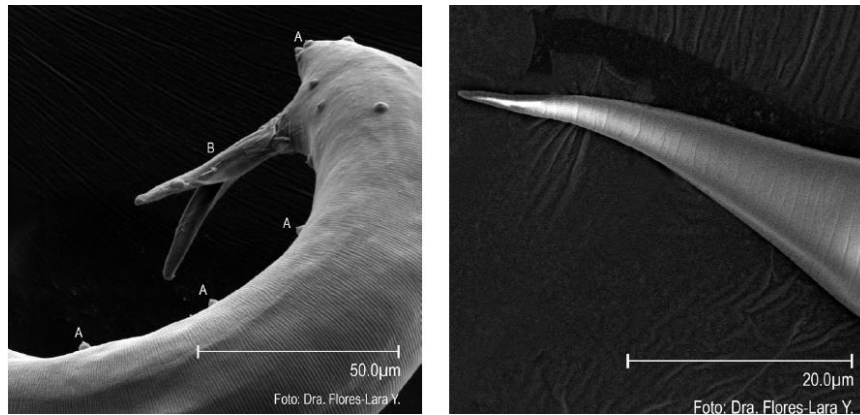
Existe una relación simbiótica entre las especies de nematodos entomopatógenos y diferentes especies de bacterias (*Xenorhabdus nematophilus* en *Steinernema* y

*Photorhabdus luminescens* en *Heterorhabditis* spp.). En esta relación mutualista, el nematodo se ve beneficiado en cuanto la bacteria que es contenida en el lumen intestinal del nematodo, mata al hospedante por septicemia dentro de la hemolinfa, e inhibiendo con sus antibióticos la presencia de otros organismos, creando un ambiente apropiado para el desarrollo del nematodo, que descompone los tejidos del hospedante, sirviéndole como nutrientes. La bacteria, a su vez, es protegida por el nematodo del ambiente externo y de posibles respuestas inmunológicas del hospedante, así como para alcanzar el hemocele de este [3] [5].

El cuerpo de los nematodos es de forma cilíndrica, alargado y no segmentado, estos organismos se conocen generalmente como gusanos redondos, debido a la forma de su cuerpo en un corte transversal. Poseen un diente dorsal en la región anterior de la cabeza, el cual les ayuda a romper la cutícula de sus objetivos para entrar a su hemoceloma. El interior de su cuerpo es un pseudohemoceloma y se encuentra cubierto por una cutícula. Los nematodos entomopatógenos no poseen sistema circulatorio o respiratorio, sin embargo, sus sistemas nervioso, reproductor y digestivo se encuentran bien desarrollados [8] [9].

Los infectivos juveniles (IJ) poseen un receptáculo bacterial donde se localizan las bacterias simbiotes de cada especie; este receptáculo se encuentra entre el esófago y la sección anterior del intestino. La presencia de este receptáculo no se relaciona directamente con la presencia de la bacteria simbiote, pues algunos infectivos juveniles axénicos (cuya relación simbiótica es exclusiva con una sola especie de bacteria) poseen esta estructura [9].

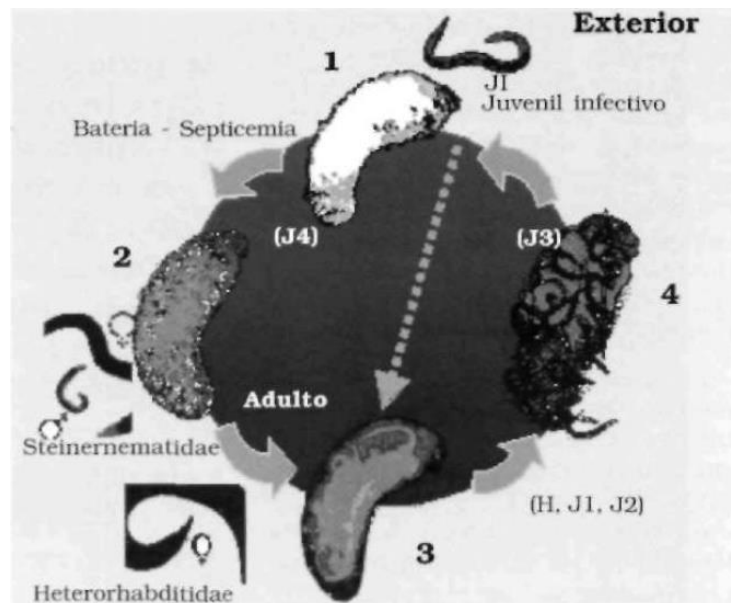
**Familia Heterorhabditidae:** En los individuos de esta familia, el poro excretor se localiza en la región posterior al anillo nervioso. Las hembras de primera generación son hermafroditas y presentan una cabeza trunca, con 6 labios cónicos y estoma ancho. Los individuos de este género poseen un sistema de reproducción con alternancia de generaciones, lo que quiere decir que genera una primera generación en donde las hembras se reproducen asexualmente, y una segunda generación de machos y hembras que se reproducen sexualmente. Los machos presentan un testículo reflejado, la cabeza de la espícula es corta y presentan una bursa con pares de papilas genitales. (Fig. 2). Las hembras de segunda generación (reproducción sexual) son más pequeñas que las de primera, y presentan una papila labial prominente. El IJ mantiene la cutícula del segundo estadio ya que este no muda y, por lo tanto, el dauer presenta una doble cutícula, la que lo protege del ambiente adverso, protege la bacteria simbiote del exterior y así aumenta su virulencia [8].



**Figura 2.** Macho del género *Heterorhabditis*. Papilas genitales. (A), espículas (B) y cola del infectivo juvenil (derecha). Fuente: [10]

### 3.2. Ciclo de vida y reproducción

El insecto que ha sido infectado muere en aproximadamente 48 horas, mientras el nematodo se alimenta de su bacteria simbiótica y de los tejidos restantes del hospedante. El infectivo juvenil o dauer, que es el tercer estadio del nematodo, muda y pasa al cuarto estadio, desarrollándose posteriormente en un adulto de primera generación. Dentro del insecto se producen de 1 a 3 generaciones hasta que los recursos se limitan en el cadáver, una vez pasados los dos estadios juveniles iniciales, en donde el nematodo obtuvo sus nutrientes, se asocia nuevamente con sus simbiositos y sale del insecto en busca de un nuevo hospedante para así, reiniciar el ciclo [10] [11].



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Steinernema* y *Heterorhabditis*. [9]

En la etapa de infectivo juvenil, el nematodo puede estar libre en el suelo y no alimentarse; en ambientes húmedos, utilizan una película de agua la cual les

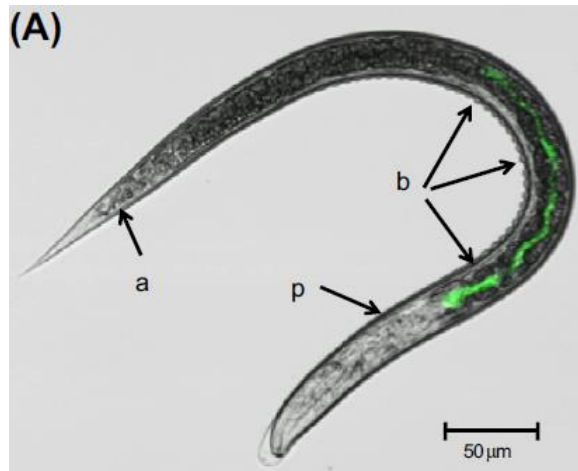
permite moverse vertical y horizontalmente para buscar su hospedero. Los infectivos juveniles generalmente se encuentran cerca de la superficie del suelo y penetran insectos móviles levantándose del substrato y saltando hacia las señales volátiles del hospedero. Las especies del género *Steinernema*, son las más comunes en el suelo y pueden permanecer en el más tiempo después de su aplicación. Por el contrario, el género *Heterorhabditis* persiste menor tiempo, pero posee mayor movilidad y, por lo tanto, es más activo en la búsqueda del insecto hospedero [8], [10], [11].

El cuerpo de los hospederos infectados tiende a presentar diferentes colores debido al pigmento producido por la bacteria simbiote de los nematodos. Los *Heterorhabditis* producen cadáveres rojos o morados y luminiscentes, debido a su bioluminiscencia [10].

### **3.3. Simbiosis nematodo – bacteria**

Los nematodos entomopatógenos (*Steinernema* y *Heterorhabditis*), se asocian simbióticamente con bacterias patogénicas pertenecientes a los géneros *Xenorhabdus* en las especies de *Steinernema* y *Photorhabdus* en *Heterorhabditis*, estas bacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se consideran patogénicas ya que su dosis letal 50 (DL50) es menor a 10.000 células de la bacteria en el hemoceloma [12]. Cada especie de nematodo se asocia específicamente con una sola especie de bacteria simbiote (*Xenorhabdus* o *Photorhabdus*) pero estas pueden asociarse simbióticamente con más de una especie de nematodos. La especificidad de esta relación posee dos características esenciales: El suplemento de nutrientes esenciales para el nematodo por la bacteria y la retención de la bacteria dentro del intestino del nematodo en etapa dauer [10].

Los infectivos juveniles de cada género pueden transportar una población de 100 a 300 unidades formadoras de colonia tanto de *Xenorhabdus* como de *Photorhabdus*. *Xenorhabdus* sp. coloniza una vesícula especializada localizada en la región anterior del intestino de las especies de *Steinernema*, esta vesícula contiene un cuerpo anucleado que ayuda a la bacteria simbiote a colonizar la vesícula [13]. Por otra parte, el género *Heterorhabditis* no contiene esta vesícula, sin embargo, su bacteria simbiote *Photorhabdus*, se adhiere a la célula valvular preintestinal, que se localiza debajo de la faringe. En el proceso de colonización, la bacteria se une a las células situadas en el extremo distal del intestino del adulto hermafrodita. Las células bacterianas se replican en vacuolas dentro de las células rectales antes de salir a la cavidad corporal del nematodo hermafrodita [14].



**Figura 4.** Colonización de *Photorhabdus* (b) extendiéndose por el intestino desde la vesícula (p) hasta el ano (a). [14]

Los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, son bacterias móviles, gram negativas, poseen forma de bastón y se consideran anaeróbicas facultativas. La especie *Photorhabdus luminescens* es bioluminiscente, y produce toxinas como la TcA, la cual es tóxica para los insectos por vía oral. Los dos géneros de bacterias simbioses presentan dos fases metabólicas, en donde que presentan diferentes características. La fase primaria produce proteasas extracelulares, lipasa extracelular, antibióticos, cristales de proteínas intracelulares y absorbe ciertos colorantes. La fase secundaria no produce estas sustancias, por lo cual no soporta la propagación in-vitro de los nematodos [10].

### 3.4. Uso como control biológico

Los nematodos entomopatógenos se aplican en su estado de juvenil infectivo y pueden ser aplicados con conjunto con otros pesticidas biológicos y/o químicos. Los nematodos se aplican generalmente en el suelo, donde tienen mayor movilidad y capacidad para encontrar a sus hospederos, sin embargo, se han realizan algunas aplicaciones foliares con especies específicas como *Steinernema feltiae* para controlar plagas presentes en las hojas como el gusano minador en la lechuga de invernadero [10].

Name of the nematode	Name of the insect pest
<i>Heterorhabditis indica</i>	<i>Helicoverpa armigera</i> <i>Spodoptera litura</i> <i>Galleria mellonella</i>
<i>H. indica</i>	<i>G. mellonella</i>
<i>Steinernema</i> spp.	<i>S. litura</i> <i>Spodoptera exigua</i> <i>Plutella xylostella</i> <i>Henedecasis duplifacialis</i>
<i>Steinernema riobrave</i>	<i>Tribolium castaneum</i> <i>Plodia interpunctella</i>

**Figura 5.** Objetivos comunes de diferentes especies de nematodos entomopatógenos.

Los nematodos entomopatógenos son altamente efectivos en diferentes plagas de gran importancia económica como las larvas de gran variedad de coleópteros, como la larva del gorgojo en cultivos de arándanos y cítricos y en algunos dípteros como las moscas de los hongos. Adicionalmente genera pocos efectos secundarios en poblaciones de insectos no objetivos y ni la bacteria simbiote ni el nematodo causa efectos en mamíferos o plantas [10]. Se ha reportado también el uso de nematodos entomopatógenos para el control de plagas de la caña de azúcar, como las larvas *Aeneolamia varia* y *M. fibriolata*, mediante el uso de *Heterorhabditis bacteriophora*, encontrando una mortalidad después de 72 horas de la aplicación de entre 71,3 y 75,4%, con dosis aproximadas de 100 millones de nematodos por hectárea de cultivo, determinando así la alta mortalidad de las especies del género *Heterorhabditis*, especialmente en el suelo, donde su movilidad es mayor y tienen mejor capacidad de encontrar un huésped para su reproducción [15] [16]. En laboratorio, especies del género *Heterorhabditis* (Cepa CB-N6), generaron una mortalidad de hasta el 96% sobre larvas o ninfas de *M. fibriolata*, mostrando una alta virulencia y reproducción en este tipo de plagas [17]. Los nematodos entomopatógenos especialmente los pertenecientes al género *Heterorhabditis* han demostrado una mayor eficacia frente a otros métodos de control biológico de larvas de coleópteros y dípteros presentes en el suelo, en raíces de cultivos frutales y tubérculos, tales como el gusano cabezudo (*Capnodis tenebrionis*) [18] y la polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*) [19] ya que, como se mencionó anteriormente, las especies de este género tienen una mejor movilidad en el suelo maximizando su capacidad de localizar un huésped para su reproducción. En *Capnodis tenebrionis*, se han reportado mortalidades de hasta 76% en cultivos frutales con la utilización de *H. bacteriophora*, teniendo en cuenta que la efectividad de la especie puede variar de acuerdo a la cepa del nematodo que se esté aplicando, ya que la localización de la cría puede afectar la capacidad del nematodo a adaptarse a diferentes climas y tipos de suelo [10] [18].

En Colombia se han realizado estudios para el control biológico con nematodos entomopatógenos especialmente para el control de plagas en cultivos de caña de

azúcar y papa, entre otros cultivos. Se han reportado estudios en el país que demuestran la presencia de especies nativas de Nematodos entomopatógenos y su potencial como controladores biológicos en plagas como *A. Varia* y *Tecia solanivora* mencionadas anteriormente en los que se mencionan diferentes cepas de *Steinernema spp.* encontrados en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Valle del Cauca y varias cepas de *Heterorhabditis bacteriophora* halladas en la zona cafetera y en el Tolima, estas últimas relacionándose con el control de la chinche de la yuca (*Cyrtomenus bergi*) [16] [20] [21].

En el país existen varios cultivos de gran interés económico que se ven afectados por diferentes plagas que disminuyen la calidad del producto, entre ellos la papa y una plaga muy común en el país, la larva de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, esta especie pertenece al orden Lepidóptera, con un ciclo de vida de 4 fases (huevo, larva, pupa y adulto) el cual demora aproximadamente de 60 a 65 dependiendo de las condiciones ambientales. Esta especie fue introducida en Colombia en 1985 desde Centroamérica, generando afectaciones en las principales zonas paperas del país, ya que las larvas que eclosionan, realizan orificios en el tubérculo, permitiendo la descomposición del mismo debido a los excrementos que dejan en el interior. Las aplicaciones y estudios que se realizaron registraron mortalidades de entre 85 a 90% dependiendo de la concentración de nematodos en la aplicación, una eficacia más alta en relación a otros medios de control biológico debido a la movilidad que poseen los nematodos para encontrar un huésped [19] [22].

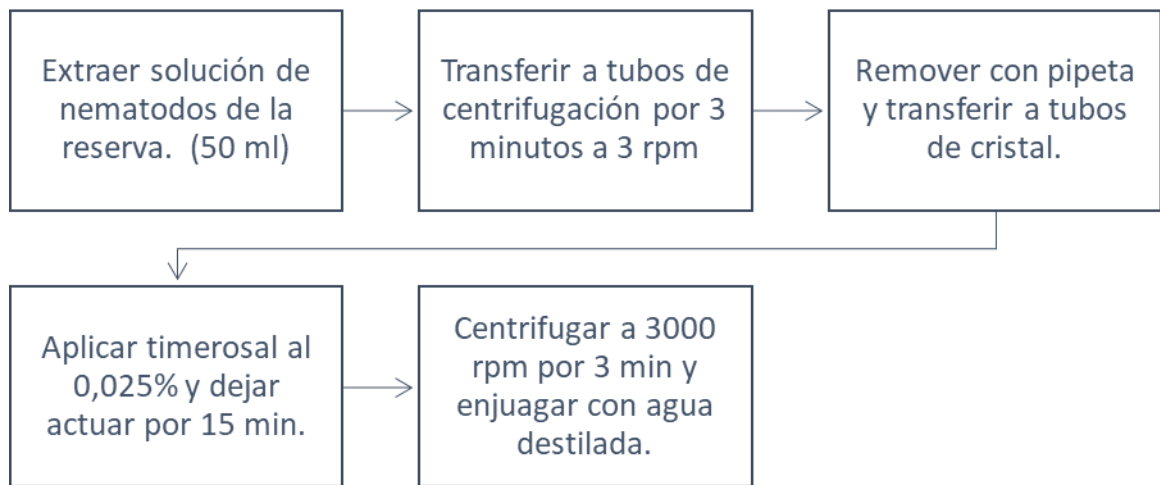
### **3.5. Factores que afectan la eficacia de los nematodos**

La temperatura es uno de los factores ambientales que más afectan la eficacia de los nematodos. Temperaturas extremas (<0°C o >40°C) pueden ser letales para estos organismos. Los infectivos juveniles son más activos entre 22°C y 32°C [6]. Algunas especies como *S. glaseri*, *S. riobrave*, *H. indica*, and *H. floridensis*, pueden ser más resistentes al calor y su eficacia puede mantenerse a temperaturas superiores a 30°C. Otras especies pueden tolerar temperaturas más bajas, manteniendo su eficacia a temperaturas menores a 15°C, tales como *H. megidis*, *S. feltiae*, and *H. marelata*. La textura del suelo es un factor determinante en la movilidad de los nematodos, los suelos arcillosos, son los que menor movilidad y eficacia brindan a los nematodos mientras que los suelos arenosos les permiten la mejor movilidad. El nivel de materia orgánica presente en el suelo y sus sólidos disueltos influyen también en la eficacia de los nematodos ya que cambia el rango de pH en la que el individuo puede sobrevivir [23]. La radiación ultravioleta en los nematodos puede causar disecación de algunas especies como *S. feltiae*. La mayoría de especies de nematodos entomopatógenos tolera la radiación UV, sin embargo, es necesario que los organismos sean aplicados a los cultivos en horas de poca radiación UV y se debe garantizar la humedad necesaria para minimizar los efectos de disecación en el suelo, especialmente a altas temperaturas [6] [16] [23] [24].

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente estudio, se contó inicialmente con nematodos entomopatógenos del género *Heterorhabditis spp.* extraídos y enviados desde un cultivo in-vivo de la cepa Tumaco en *Galleria mellonella*, provenientes del Laboratorio Perkins Ltda., estos se encontraban almacenados en esponjas.

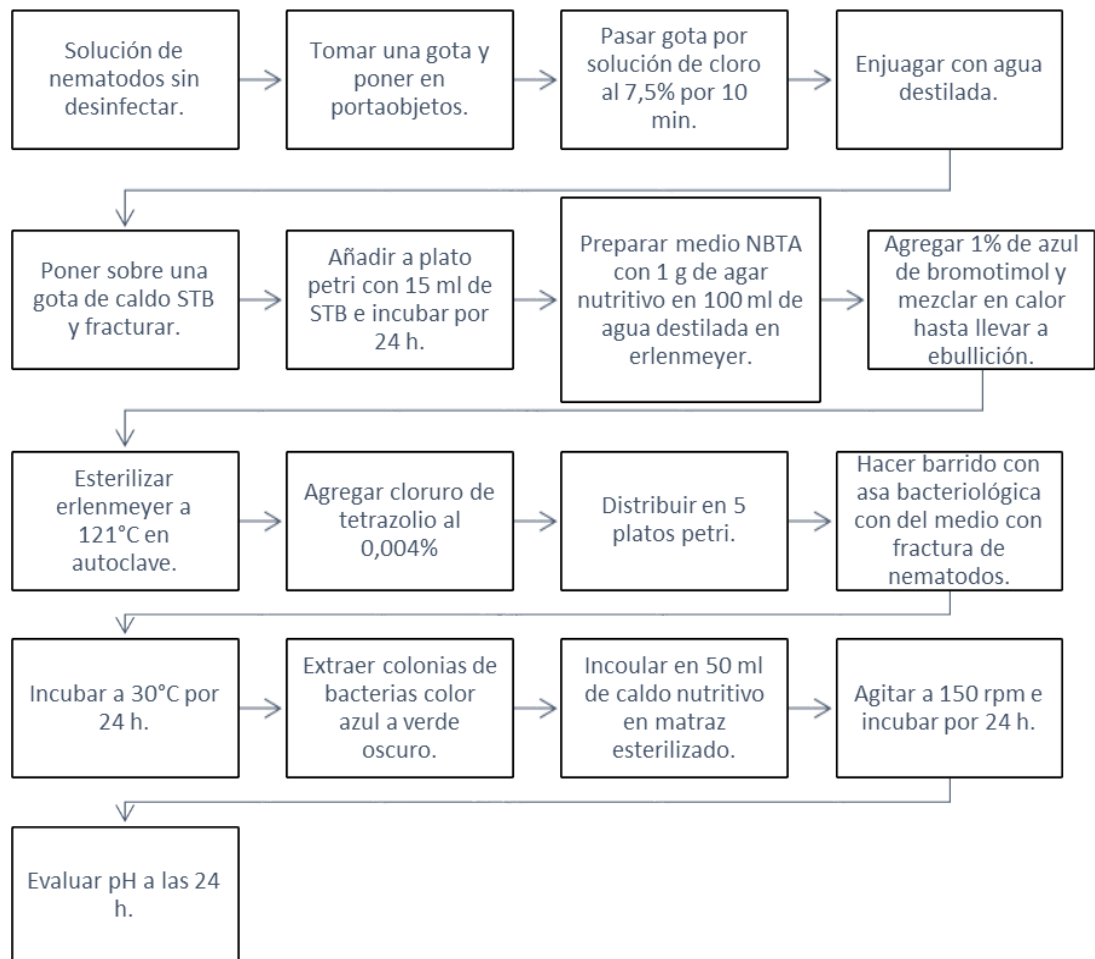
### 4.1. Consecución y preparación de los Nematodos Entomopatógenos



**Gráfica 1.** Diagrama de proceso de consecución y materia biológico. Fuente: elaboración propia.

La muestra tomada se lavó con agua destilada y se preparó una suspensión de nematodos (50 ml) a la cual se le midió la concentración inicial de nematodos la cual se transfiere a tubos de centrifugación para extraer nematodos a 3000 rpm por 3 minutos, estos son removidos con pipeta y se transfieren a tubos de cristal donde se les aplica 1 ml de timerosal al 0.025% por 15 minutos a temperatura ambiente. Los tubos de cristal se centrifugan a 3000 rpm por 3 minutos y se enjuagan finalmente con agua destilada. De esta manera, los nematodos se encontraron listos para ser inoculados a cada medio de crecimiento [4].

#### 4.1. Aislamiento de bacterias simbiotes.



**Gráfica 2.** Diagrama de proceso de extracción de bacteria simbiote. Fuente: elaboración propia.

Para la extracción de la bacteria simbiote de los nematodos, se utilizó la solución de nematodos sin desinfectar, de esta solución se tomó una gota de aproximadamente 50 µl en un portaobjetos, se pasó la gota por una solución de cloro al 7,5% y se dejó actuar por 10 min. Los nematodos se recogieron nuevamente y se enjuagaron con una gota de agua destilada, posteriormente, sobre una gota de caldo nutritivo STB (Tryptosa de soya), se maceraron en mortero y se añadieron a un plato Petri con aproximadamente 15 ml de caldo nutritivo STB en su interior, estos fueron incubados a 30°C por 24 horas.

Se preparó un medio NBTA, a partir de azul de bromotimol y agar nutritivo, con el fin de determinar la fase de disociación de la especie *Photorhabdus* ya que sólo la primera fase de la bacteria se puede utilizar para la reproducción de nematodos entomopatógenos in vitro. Las bacterias que se encuentren en fase primaria,

absorben el azul de bromotimol debido a su actividad enzimática diferente a la fase secundaria [25]. Este medio se preparó utilizando agar nutritivo (1g) en 100 ml de agua destilada en un Erlenmeyer, se agregó 1% de azul de bromotimol y se mezcló en calor hasta el punto de ebullición, este Erlenmeyer se esterilizó a 121°C durante 15 minutos en autoclave. Una vez enfriado el Erlenmeyer (40°C), se distribuyó en 5 platos Petri. En la figura 5 se muestran dos platos Petri con el medio NBTA preparado.



**Figura 6.** Medios NBTA previos a la inoculación con *Photorhabdus*. Fuente: Elaboración propia.

Los platos Petri se inocularon con las bacterias contenidas en el medio que contenía los nematodos macerados, estos platos se incubaron posteriormente a 30°C por 24 horas. Las bacterias que se encontraron en su fase primaria, es decir, cuya coloración en la colonia era de color oscuro por la absorción del colorante, se extrajeron y se inocularon en 50 ml de caldo nutritivo en un matraz previamente esterilizado. En la figura 6 se muestra uno de los platos Petri inoculados con la bacteria *Photorhabdus* [24] [4] [26].



**Figura 7.** Medios NBTA después de la inoculación con *Photorhabdus*. Fuente: Elaboración propia.

#### **4.2. Evaluación de la reproducción en medios artificiales**

Se realizó el ajuste de la concentración de nematodos a inocular preparando una suspensión de la cepa de Heterorhabditis obtenido previamente en 200 ml de agua destilada, de la cual se tomó una muestra de 5 ml que se llevó a una caja Petri de 5, se contaron los nematodos presentes en la muestra bajo el estereoscopio poniendo una lámina de acetato milimetrada debajo para así realizar el conteo en un área determinada de 0,25 cm<sup>2</sup>, posteriormente, se hizo el cálculo de la concentración por mililitro dividiendo la cantidad de nematodos contados en toda el área de la caja entre el volumen conocido de la suspensión de nematodos (5ml). Este procedimiento se realizó con 3 muestras de la suspensión de nematodos, con 5 repeticiones cada una [27].

Se tiene en cuenta la siguiente fórmula para realizar el ajuste de la concentración de los nematodos a inocular.

$$\left[ \frac{C_i}{C_f} - 1 \right] \times V_i = V_f$$

Donde:

*C<sub>i</sub>*: Concentración inicial de IJ/ml

Cf: Concentración final deseada.

Vi: Volumen de la muestra (5ml)

Vf: Volumen de agua a añadir a la solución para realizar el ajuste.

Con la fórmula de arriba se realiza el ajuste, determinando la cantidad de agua que se le debe añadir a la suspensión con el fin de obtener la concentración deseada (1000 IJ/ml).

Repetición	Muestra 1 (IJ)	Muestra 2 (IJ)	Muestra 3(IJ)
1	49	40	47
2	39	53	53
3	52	47	47
4	47	46	58
5	52	37	37
PROMEDIO	47.8	44.6	48.4
CONCENTRACION	1081,04 IJ/ml	1008,67 IJ/ml	1094,61 IJ/ml

**Tabla 1.** Cantidad de nematodos contados en un área determinada de la caja Petri (0,25 cm<sup>2</sup>).

Se obtuvo un promedio de 1061,44 IJ/ml (infectivos juveniles por mililitro de solución) para la concentración de la suspensión inicial, mediante la fórmula descrita anteriormente se determinó que la cantidad de agua a añadir para ajustar la concentración a 1000 IJ/ml era de 12.28 ml.

**Medios sólidos:** el medio que contenía las bacterias se esparció sobre el medio sólido, el cual se compone de platos Petri con 0.44 de caldo nutriente de Triptosa de soya (TSB), 0.16 g de extracto de levadura, 7.2g de harina de soya, 5.2 g de aceite de maíz y 29 ml de agua. 1 g de esponja de poliuretano se impregnó posteriormente con el medio preparado en un matraz con el fin de crear un medio tridimensional y generar mayor rendimiento. [8] [28] [29]. Se prepararon 2 medios de cultivo sólido para el estudio. Los matraces se incubaron a 28°C por 24 horas y transcurrido este tiempo, se inoculó cada medio con 10 ml de la solución de nematodos desinfectados ajustados a una concentración inicial de 1000 IJ/ml. La temperatura de la incubadora se redujo a 25°C. A los 15 y 30 días de la inoculación, se evaluó la cantidad de nematodos producidos en cada medio para cada especie (número de IJ/ ml de solución) mediante un lavado de cada medio con agua destilada y extrayendo la solución con nematodos. Posteriormente, se realizó el conteo de los nematodos utilizando una caja de Petri de 5 cm bajo el estereoscopio con una lámina de acetado milimetrada con el fin de determinar la cantidad de nematodos presentes en el área total de la caja de Petri, calculando así la cantidad de nematodos presentes en la muestra.



**Figura 8.** Medios de reproducción sólidos antes de la incubación. Fuente: Elaboración propia.

**Medios líquidos:** se diseñó un cultivo en medio acuoso, el cual contenía un medio de crecimiento compuesto de 10 g de caldo STB, 10 g de caldo nutriente, 5 g de extracto de levadura, 5 g de caseína, 0.35 g de KCl, 0.21 g de  $\text{CaCl}_2$ , 5 g de NaCl, 10 g de aceite de maíz, y 1 g de agua. [8] [27] [30]. Este medio se almacenó en un recipiente de vidrio, con agitación constante para controlar el oxígeno disuelto y el pH. El medio se inocula con la bacteria simbiote y 24 horas después, se inoculan los IJ (1000 IJ/10 ml de solución). A los 15 y 30 días de la inoculación, se evaluó la cantidad de nematodos producidos en cada biorreactor con el procedimiento de conteo mencionado anteriormente.



**Figura 9.** Medios de reproducción líquidos. Fuente: Elaboración propia.

#### **4.3. Evaluación de la patogenicidad de los nematodos cultivados.**

Para la evaluación de la patogenicidad, se propuso evaluar evaluó la infección y mortalidad por los nematodos obtenidos en los medios de cultivo en larvas de *Tenebrio Molitor*, y el conteo de nematodos dentro de ellas. Al cabo de 3 días, se verificaría la presencia de individuos de cada especie de NEP estudiada, tanto en larvas muertas como vivas. Sin embargo, como la reproducción de nematodos entomopatógenos no fue exitosa en el medio de cultivo líquido, este procedimiento no se realizó debido a la falta de datos para realizar la comparación de patogenicidad de los individuos colectados en cada medio.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectó una muestra de 2 ml del medio de cultivo, este se diluyó con agua destilada hasta completar 100 ml, este procedimiento se repitió para los dos medios de cultivo y cada tratamiento. Se toma en cuenta el número de nematodos contados en una muestra de 5 ml en una caja Petri de 5 cm, en un área determinada de 0,25 cm<sup>2</sup> con el fin de facilitar el conteo, posteriormente, se hizo el cálculo de la cantidad total de nematodos en el volumen total de la muestra haciendo una extrapolación al área total del plato Petri.

### 5.1. Medio de cultivo sólido.

Para esta evaluación se tomaron los resultados tomados por cada tratamiento del medio sólido que se realizó, es decir, dos Erlenmeyer con el medio inoculados, se realizaron 5 conteos por cada tratamiento 15 y 30 días después de la inoculación del medio de cultivo sólido, estos resultados promedio se muestran en las Tabla 1.

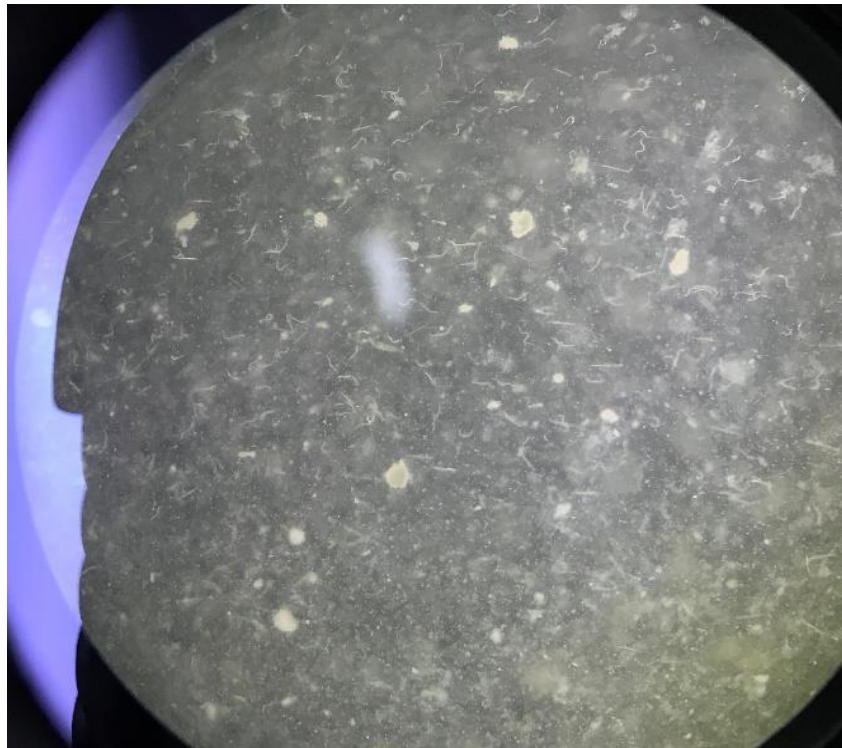
MEDIO SÓLIDO	15 DIAS (IJ/5ml)	30 DIAS (IJ/5ml)
TRATAMIENTO 1	7757,29	8288,76
TRATAMIENTO 2	7632,90	8130,45

**Tabla 2.** Media de cantidad de nematodos colectados en cada medio de cultivo sólido evaluado.  
Fuente: elaboración propia.

En las figuras 9 y 10, se muestra el medio de reproducción sólido 15 días después de la inoculación con los nematodos del género *Heterorhabditis*, cepa Tumaco; tanto externamente como en el conteo bajo el estereoscopio. Se evidencia actividad metabólica de la bacteria simbiote debido a la coloración rojiza que presenta la esponja de poliuretano impregnada con el medio de cultivo, esta coloración se da gracias a la degradación enzimática de los componentes proteínicos y lipídicos del medio la cual es aprovechada por los nematodos para alimentarse y obtener los nutrientes necesarios para su reproducción [8] [27] [29].

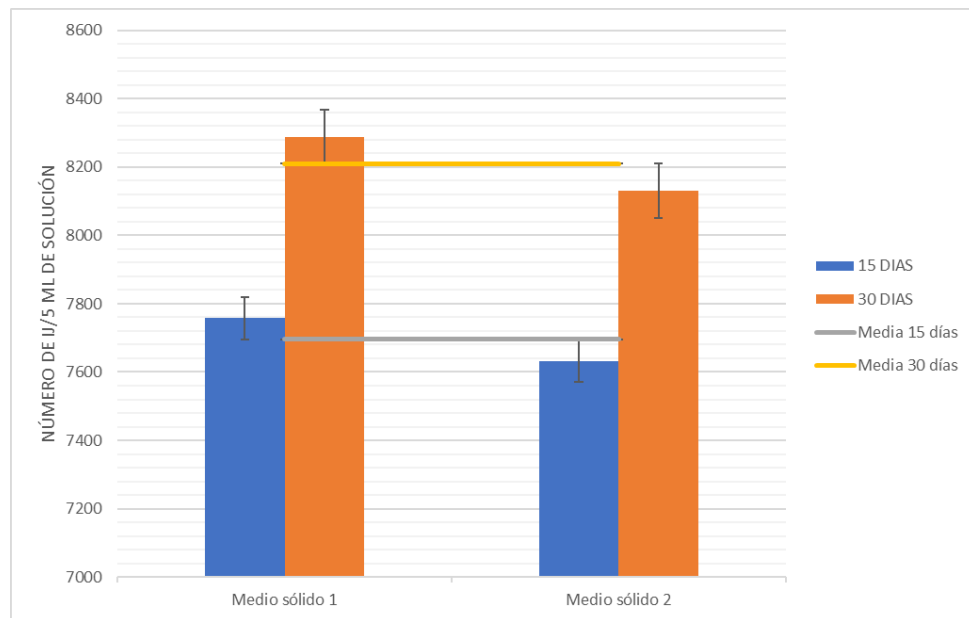


**Figura 10.** Medios de reproducción sólidos 15 días después de la inoculación. Fuente: Elaboración propia.



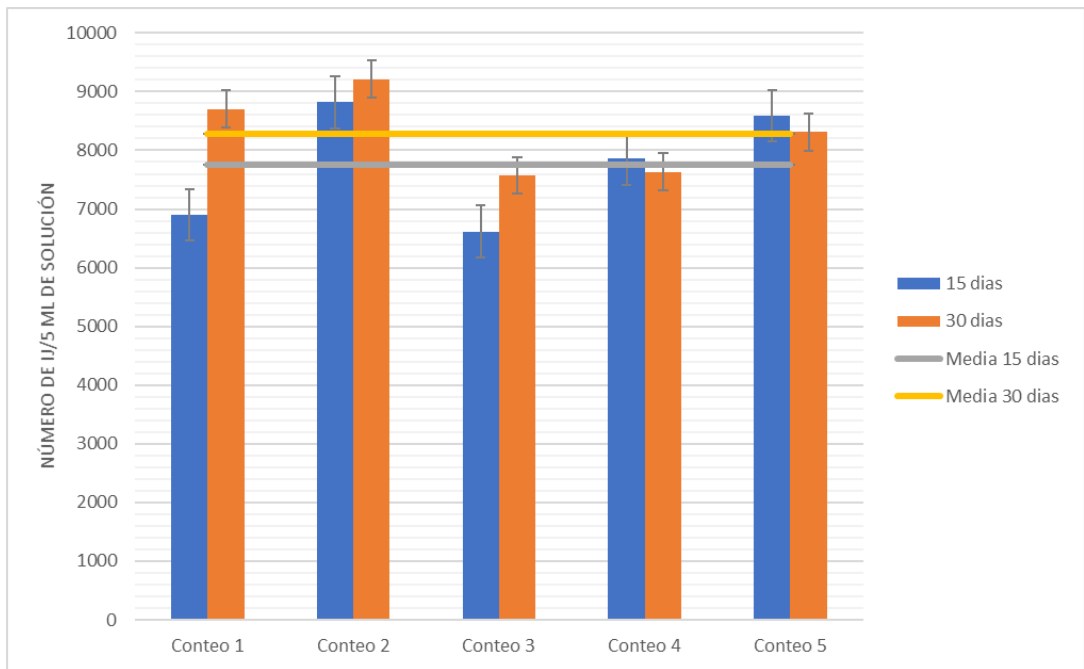
**Figura 11.** Muestra de individuos de *Heterorhabditis* 15 días después de la inoculación en el medio sólido. Fuente: Elaboración propia.

No se evidenció una diferencia significativa entre cada medio sólido evaluado, sin embargo, debido a posibles errores en la toma de muestras, se registró un valor más alto en el primer tratamiento. Se registra un aumento en la cantidad de individuos reproducidos entre los 15 días de evaluación y los 30 días en cada tratamiento de alrededor de 6%, lo cual indica que la reproducción se detiene o se ve ralentizada en después de los 15 días de evaluación. En la gráfica 3 se muestra la diferencia de reproducción de nematodos por cada Erlenmeyer entre los 15 y 30 días de incubación.

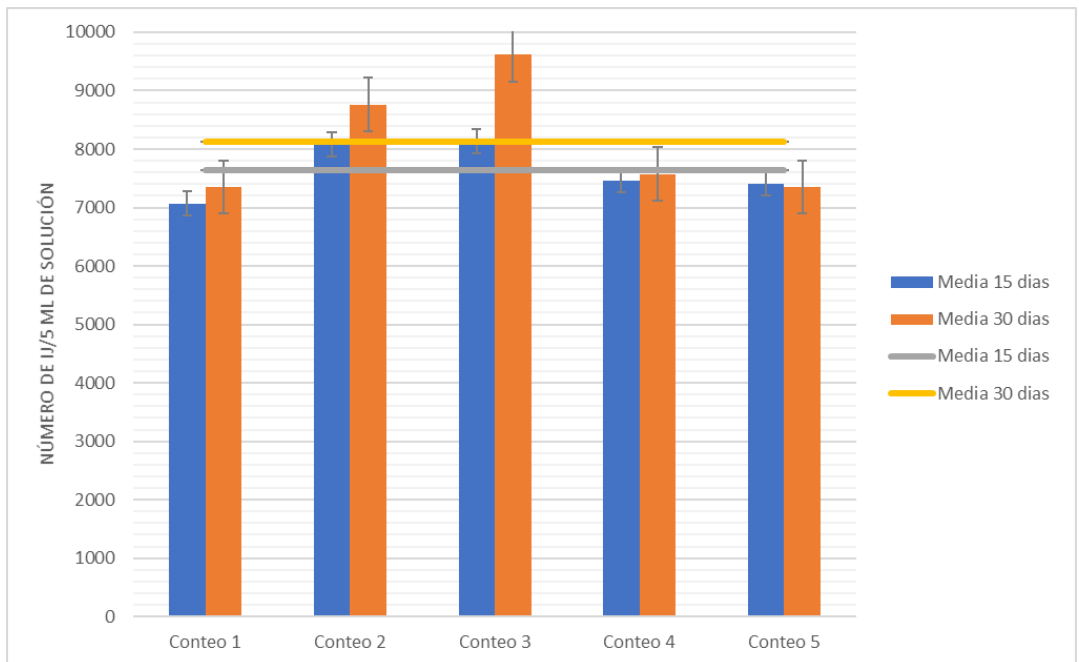


**Grafica 3.** Promedio de IJ/ 5ml de muestra de medio sólido en disolución. Fuente: Elaboración propia.

Se evaluó la diferencia entre cada repetición o conteo que se realizó en cada tratamiento del medio sólido, demostrando mayores errores sistemáticos en el muestreo del tratamiento 2, debido a los cambios en la cantidad de individuos contados en el mismo, sin embargo, no se generó una diferencia significativa entre cada medio sólido evaluado, puesto que los valores no difieren en mayor cantidad al valor promedio. En las gráficas 4 y 5 se muestran los valores de cada repetición por tratamiento evaluado.



**Gráfica 4.** Cantidad de nematodos colectados por muestra en cada conteo en tratamiento 1.  
Fuente: Elaboración propia.



**Gráfica 5.** Cantidad de nematodos colectados por muestra en cada conteo en tratamiento 2.  
Fuente: Elaboración propia.

Cultivos sólidos pueden tener mejor rendimiento debido a la mayor oxigenación y movilidad que presenta el medio en comparación con el cultivo líquido que se evaluó, en cuanto los individuos de Heterorhabditis al tener un puente o vía por

donde recorrer el medio, se garantizó una relación simbiótica efectiva con la bacteria *Photorhabdus* que a su vez pudiera transformar el medio mediante la degradación enzimática de lípidos y proteínas presentes aportando su propia biomasa para la alimentación del nematodo.

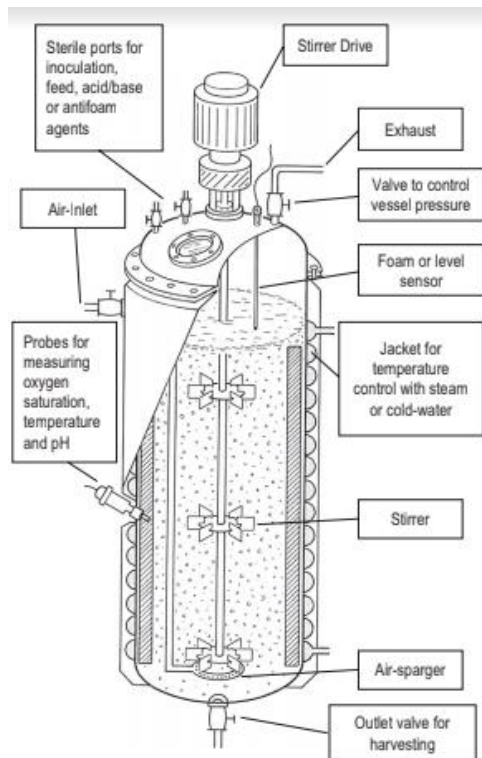
## 5.2. Medio líquido.

En la evaluación del medio de cultivo líquido con agitación que se propuso no se evidenció reproducción de los nematodos entomopatógenos, este resultado se debe en gran parte a que los individuos de *Heterorhabditis* que se inocularon al medio pudieron no alcanzar su fase adulta y reproductiva debido a distintos factores que se deben controlar en el cultivo, como la movilidad, aireación y composición lipídica y proteínica. Las especies de *Heterorhabditis* inoculadas generan generaciones amfimicticas, lo que significa que estos producen en su primera generación por reproducción asexual, huevos dentro del medio en los primeros días, y generando después, individuos de segunda generación que se reproducen sexualmente, los individuos machos copulan uniendo el lado ventral de sus colas a la bursa de la hembra, por lo cual en un medio acuoso o líquido los nematodos no pueden moverse en una dirección específica hacia la hembra para copular. [7] [30] [31]. Por lo anterior, los individuos que pueden producir descendencia son de primera generación y, por lo tanto, la capacidad de estos individuos de reproducirse sexualmente se ve limitada por la obtención de nutrientes y de copulación [32]. El medio debe brindar una buena movilidad y oxigenación que deben variar tanto en la fase de inoculación de la bacteria *Photorhabdus*, donde se registra un primer aumento en la demanda de oxígeno del medio por la actividad metabólica de la misma, como en la fase de reproducción de hermafroditas, donde necesitan más nutrientes por parte de las bacterias para la alimentación de los nematodos y así producir huevos. La agitación se debe también controlar debido a que los individuos en etapa de reproducción pueden sufrir cambios en su actividad metabólica debido al movimiento del medio de cultivo [13] [33] [34]. De esta manera, se limita la relación y actividad simbiótica con la bacteria *Photorhabdus* para de esta manera realizar la degradación enzimática de los componentes lipídicos y proteínicos que la bacteria le brinda para obtener sus nutrientes, por lo cual los infectivos juveniles no alcanzan la fase adulta satisfactoriamente y no es posible su reproducción [28] [35].

Otro factor que pudo haber afectado la reproducción en el medio de cultivo puede ser la cantidad de lípidos y oxígeno que se integró al medio de cultivo, que pudo no ser suficiente para cubrir la demanda de estos componentes por parte de la bacteria *Photorhabdus* limitando así la capacidad de la bacteria para degradar los nutrientes para el nematodo [3] [23] [35]. Debido a la distribución homogénea de nutrientes en los medios líquidos, estos pueden ser vulnerables a contaminación por parte de bacterias no simbióticas y hongos no deseados que pueden afectar también la actividad metabólica de las bacterias simbióticas y a su vez alterar el pH y la composición del medio y dado que el proceso de producción de nematodos puede

tomar hasta tres semanas, el mantenimiento de condiciones estériles en el medio líquido puede ser complejo. Se debe también, asegurar y verificar la relación simbiótica del nematodo exclusivamente con su bacteria simbiote desde el inicio de la inoculación, para así lograr el mayor rendimiento en la tasa de reproducción de los individuos [30] [36].

La disponibilidad de bacterias simbiotas para la obtención de nutrientes por parte de los nematodos se ve afectada de manera que no se tiene un método o material adecuado para el control de variación y medición los parámetros de agitación, aireación, pH y temperatura; con el fin de asegurar estos parámetros establecidos anteriormente que afectaron la producción de nematodos en el medio líquido, se debe producir el medio en un biorreactor preferiblemente de acero inoxidable, con sondas y medidores para varios de estos parámetros físicos. Se recomienda contar con un controlador de la tasa de aireación que detecte los cambios en el oxígeno disuelto y aumente o reduzca la inyección de aire estéril de acuerdo a las condiciones del medio. El pH se debe medir constantemente para detectar cambios en la actividad metabólica de la bacteria simbiote [3] [8] [27]. En la figura 11, se muestra un modelo de biorreactor que puede ser utilizado para reproducción de nematodos entomopatógenos a gran escala con sus sondas y medidores.



**Figura 12.** Modelo de biorreactor diseñado con sondas, medidores y entradas de aire y agitadores para medio líquido. Fuente: [3]

Otros parámetros que afectan en menor cantidad la capacidad del medio de cultivo para la reproducción de los nematodos entomopatógenos son, por ejemplo, la concentración del inóculo y el tiempo de reproducción o incubación [33]., debido a que la proporción de nematodos inoculados que se pueden colectar en su fase infectiva puede verse afectada. La recuperación de infectivos juveniles al final de la incubación es altamente dependiente de la concentración de dióxido de carbono en el medio de cultivo dado ya que afecta el tiempo en que el nematodo se encuentra en estadio juvenil infectivo [37], en este caso, se precisa la necesidad de válvulas de control de presión en el contenedor del biorreactor de metal para regular el paso de aire y aumentar la presión dentro del medio líquido para inyectar CO<sub>2</sub> al cultivo [3] [26].

Para generar las condiciones óptimas para la evaluación de la reproducción de nematodos entomopatógenos en un medio líquido a nivel laboratorio, se recomienda contar un recipiente hermético, en donde se puedan mantener las condiciones asépticas necesarias para el cultivo monoxénico. Adicionalmente, con aberturas para el paso de aire y agitación constante para permitir la actividad metabólica de la bacteria para poder generar el ambiente adecuado para la reproducción del nematodo y su movilidad; y finalmente, sondas para el monitoreo constante de temperatura, pH y oxígeno disuelto en el medio para controlar la actividad reproductiva y fases del nematodo.

## CONCLUSIONES

No se tiene un resultado concluyente debido a que no se tiene producción de Nematodos entomopatógenos en el medio líquido evaluado, por lo cual no fue posible determinar cuál medio de reproducción generó mayor eficiencia y patogenicidad con respecto al otro; los nematodos inoculados en el medio de cultivo sólido produjeron descendencia, sin embargo, no fue significativa en relación con otros estudios previos debido a contaminación que pudo existir en el medio.

Existen otros factores que intervienen en el rendimiento del nematodo, especialmente en medios acuosos o líquidos, como desplazamiento de fase de la bacteria simbiote, bajos porcentajes de copulación del nematodo, inóculo (bacteria/ nematodo), concentración de oxígeno, pH, temperatura, agitación, entre otros. Adicionalmente, la composición proteínica y lipídica del medio afecta la capacidad de la bacteria de degradarlas enzimáticamente.

Medios de cultivo líquidos pueden tener un mayor rendimiento si estos se realizan en biorreactores a una escala mayor que en condiciones normales de laboratorio no es posible producir, ya que se garantiza la reproducción y generación de infectivos juveniles mediante el uso de instrumentos de control para el ingreso y salida de aire, dióxido de carbono, antiespumantes y de los componentes principales del medio, así como agitadores y medidores, generando así, condiciones más favorables tanto para el nematodo como para su bacteria simbiote, acelerando y maximizando la eficiencia del cultivo de nematodos entomopatógenos en relación a un cultivo sólido.

## RECOMENDACIONES

Para estudios futuros, se recomienda generar la evaluación de los medios de cultivo líquido en una escala mayor, que pueda ser aplicado a nivel industrial, con mejores condiciones asépticas dado que los componentes del medio debido a su naturaleza rica en proteínas y lípidos, puede ser susceptible de contaminación por parte de otros microorganismos que afectan la degradación enzimática de la bacteria simbiote, se debe garantizar también la producción de oxígeno constante en el medio líquido, es por esto que se requiere un biorreactor de metal con diferentes características en su fabricación, como por ejemplo molinillos, válvulas de aire comprimido, medidores de DO, pH y temperatura.

Se sugiere de igual manera, hacer una evaluación más exhaustiva con diferentes medios de cultivo artificiales que pueden variar en su composición y el género de nematodo que se inocula teniendo en cuenta primero que todo el tipo de especie que se inocula, ya que cada género de nematodos entomopatógenos posee un método de reproducción y ecología diferente, entre ellos, el género *Steinernema*, cuya reproducción puede ser exitosa en medios líquidos, al facilitársele la relación simbiótica y la obtención de nutrientes, lo que puede mejorar la efectividad en creación de descendencia y la posterior generación de infectivos juveniles con mayor virulencia.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Rahman, «Pesticide consumption and productivity and the potential of IPM in Bangladesh,» *Science of the Total Environment*, pp. 48-56, 2012.
- [2] G. J. Devine, D. Eza, E. Ogusuku y M. J. Furlong, «Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas,» *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, vol. 1, nº 25, pp. 74-100, 2008.
- [3] A. Peters, R. Han , X. Yan y L. Leite, «Production of Entomopathogenic Nematodes,» de *Microbial Control of Insect and Mite Pests*, Elsevier, 2017, pp. 157-170.
- [4] I. Grijalva Terán, «Evaluacion de cuatro medios sólidos de crecimiento para la producción in-vitro del nematodo entomopatógeno Heterorhabditis bacteriophora,» Escuela agrícola panamericana, Zamorano, 2014.
- [5] Y. Suarez Cárdenas, L. Marrero Artabe y J. Orrely Rodriguez, «NEMÁTODOS ENTOMOPATÓGENOS: UNA ALTERNATIVA PROMISORIA PARA EL CONTROL BIOLÒGICO DE CHINCHES PENTATOMORPHAS PLAGAS DE LA SOYA.,» Universidad de Matanzas, Matanzas, 2011.
- [6] H. K. Kaya, «Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems,» de *Biological Control in Agricultural IPM Systems*, Elsevier Inc, 1985, pp. 283-302.
- [7] E. Lewis, J. Campbell, C. Griffin, H. Kaya y A. Peters, «Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes,» *Biological control*, nº 38, pp. 66-79, 2006.
- [8] S. Subramanian y M. Muthulakshmi, «Entomopathogenic Nematodes,» de *Ecofriendly pest management for food security*, Omkar, 2016, pp. 368-411.
- [9] A. Saenz, «Importancia de los nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas en palma de aceite,» PALMAS, 2005.
- [10] Y. Flores Lara y G. Fimbres Cubillas, «Potencialidad y Retos del Uso de Nematodos Entomopatógenos para el Control Biológico de plagas. I: Control biológico mediante una asociación simbiótica NEP-Bacteria,» Universidad de Sonora, Sonora, 2016.
- [11] A. R. Dillman y P. W. Sternberg, «Quick Guide: Entomopathogenic Nematodes,» *Current Biology*, vol. 22, nº 11, pp. R430-R431, 2012.
- [12] R. H. D. C. Shapiro-Ilan D.I., «Entomopathogenic nematode production and application technology,» *Journal of Nematology*, pp. 206-217, 2012.
- [13] B. N. Akhurst R.J., «Biology and Taxonomy of Xenorhabdus,» de *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*, Florida ,USA, CRC press, 1990, p. 365 pp.
- [14] E. E. Lewis y D. J. Clarke, «Nematode Parasites and Entomopathogens,» de *Insect Pathology*, California, 2012, pp. 395-417.
- [15] F. Ferrer, M. Trelles., G. Palencia, M. Navarro y R. Colmenares, «Posibilidades del uso de nematodos entomopatógenos para el control de Aeneolamia varia en caña de azúcar.,» *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, nº 72, pp. 39-43, 2004.

- [16] M. Rosero Guerrero, «Guerrero y M. Rosero, Evaluación de la virulencia de nematodos entopatógenos para el control del salivazo de la caña de azúcar *Aeneolamiavaria* (F) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE),» Universidad Nacional de Colombia, Palmira, 2011.
- [17] L. Leite, L. Machado, R. M. Goulart, F. M. Tavares y A. Batista-Filho, «Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugar cane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae).,» *Neotropical Entomology.*, vol. 35, pp. 785-790, 2005.
- [18] A. Morton y F. García del Pino, «Effectiveness of different species of entomopathogenic nematodes for biocontrol of the Mediterranean flatheaded rootborer, *Capnodis tenebrionis* (Linne) (Coleoptera : Buprestidae) in potted peach tree,» *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 97, nº 2, pp. 128-133, 2008.
- [19] K. Benitez y A. Duarte, «PROSPECCIÓN DE PATÓGENOS CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA POLILLA GUATEMALTECA DE LA PAPA (*Tecia solanivora*, FAM Gelechiidae),» Universidad Santo Tomas, Bogotá, 2016.
- [20] J. Parada, «Steinernematidae en Cundinamarca y sur de Boyacá, Colombia.,» *Nematodos entomoparásitos: experiencias y perspectivas*, pp. 10-27, 2006.
- [21] N. Lopez, «Nematodos para el control de insectos plagas.,» *Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. FNC –Cenicafé, Chinchiná (Colombia). Manizales.*, vol. 10, nº 466, pp. 150-183, 2008.
- [22] Y. P. Baquero Barragan y C. N. Suarez Quintero, «DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE USO DE LOS NEMATODOS ENTOMOFAGOS *Steinernema feltiae* (Steinernematidae) y *Heterorhabditis* sp. (Heterorhabditidae) COMO CONTROLADOR BIOLÓGICO DE LA POLILLA GUATEMALTECA DE LA PAPA *Tecia solanivora* (Gelechiidae) COMO UNA ALTER,» Universidad Santo Tomas, Bogotá, 2013.
- [23] D. Shapiro-Ilan, S. Hazir y I. Glazer, «Basic and Applied Research: Entomopathogenic Nematodes,» de *Microbial Control of Insect and Mite Pests*, Academic Press, 2017, pp. 91-108.
- [24] R. Georgis y R. Gaugler, «Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes,» *J. Econ. Entomol.*, pp. 713-720, 1991.
- [25] Y. Valdés Vázquez, A. Lobaina Audevert, M. E. Márquez Gutiérrez y M. Gómez Pacheco, «INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN LA REPRODUCCIÓN DE *PHOTORHABDUS LUMINESCENS*,» *Fitosanidad*, vol. 9, nº 2, pp. 25-28, 2005.
- [26] J. G. McMullen y P. Stock, «In vivo and In vitro Rearing of Entomopathogenic Nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*),» *Journal of Visualized Experiments*, vol. 1, nº 91, pp. 52-96, 2014.

- [27] I. Glazer y E. Lewis, «Bioassays for Entomopathogenic Nematodes,» de *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*, Wallingford, UK, CABI, 2000, pp. 229-247.
- [28] R. Han y R.-U. Ehlers, «Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the in vivo and in vitro development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*,» *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 35, nº 3, pp. 239-247, 2001.
- [29] R. U. Ehlers y R. C. Han, «Cultivation of Axenic *Heterorhabditis* Spp. Dauer Juveniles and Their Response To Non-Specific *Photorhabdus Luminescens* Food Signals,» *Nematologica*, vol. 44, nº 4, pp. 425-435, 1998.
- [30] D. I. Shapiro-Ilan, R. Han y X. Qiu, «Production of Entomopathogenic Nematodes,» de *Mass Production of Beneficial Organisms*, Academic Press, 2014, pp. 321-355.
- [31] O. Strauch, S. Stoessel y R. Ehlers, «Culture conditions define automictic or amphimictic reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*,» *Fundamentals of applied nematology*, nº 17, pp. 575-582, 1994.
- [32] O. Strauch y R. U. Ehlers, «Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of ento-,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 50, pp. 369-374, 1998.
- [33] S. Johnigk, F. Ecke, M. Poehling y R. Ehlers, «Liquid culture mass production of biocontrol nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida): improved timing of dauer juvenile inoculation,» *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 64, nº 5, pp. 651-658, 2004.
- [34] R. Ehlers y O. Strauch, «Influence of the aeration rate on the yields of the biocontrol nematode *Heterorhabditis megidis* in monoxenic liquid cultures.,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, nº 54, pp. 9-13, 2000.
- [35] C. Cho, K. Whang, R. Gaugler y S. Yoo, «Submerged monoxenic culture medium development for *Heterorhabditis bacteriophora* and its symbiotic bacterium *Photorhabdus luminescens*: protein sources.,» *J. Microbiol. Biotechnol*, nº 21, pp. 869-873, 2011.
- [36] «Influence of cell density and phase variants of bacterial symbionts (*Xenorhabdus* spp.) on dauer juvenile recovery and development of biocontrol nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda: Rhabditida).,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 84, pp. 77-85, 2009.
- [37] P. Jessen, O. Strauch, U. Wyss, R. Luttmann y R. Ehlers, «Carbon dioxide triggers dauer juvenile recovery of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis* spp).,» *Nematology*, vol. 2, nº 1, pp. 319-324, 2000.
- [38] E. L. Melo, C. A. Ortega, A. Gailgl y A. Bellotti, «Evaluación de nematodos entomopatógenos para el manejo de *Phyllophaga bicolor* (Coleoptera: Melolonthidae),» *Revista Colombiana de Entomología*, pp. 207-212, 2010.

[39] Y. Pérez Bocourt, M. E. Márquez Gutiérrez y M. Gómez, «CARACTERIZACIÓN DE LA FASE PRIMARIA DE LAS BACTERIASIMBIONTES DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS STEINERNEMA CUBANUM, HETERORHABDITIS INDICAY H. BACTERIOPHORA,» *Fitosanidad*, vol. 10, nº 3, pp. 193-195, 2006.

