



Pontificia Universidad Católica de Valparaíso -

Universidad Técnica Federico Santa María

Doctorado en Biotecnología

**PRODUCCIÓN EN MASA DE NEMÁTODOS
BACTERÍVOROS DE VIDA LIBRE AISLADOS DE
SUELOS CONTAMINADOS CON METALES
PESADOS, PARA SU UTILIZACIÓN EN UNA
METODOLOGÍA DE REMEDIACIÓN BIOLÓGICA
INTEGRAL**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico

Doctor en Biotecnología

Autor:

Benjamín Patricio Araneda Herrera

Director de Tesis:

Rolando Chamy Maggi

Octubre, 2007

I. RESUMEN

La Fundición de ENAMI, ubicada en el sector de Ventanas, al Oeste del valle de Puchuncaví, fue una fuente de contaminación por más de 35 años, por lo que los sitios aledaños se encuentran altamente contaminados con metales pesados. Estos contaminantes no son biodegradables, sino que deben ser inmovilizados mediante precipitación o complejamiento específicos, o extraídos desde los suelos mediante técnicas como la fitorremediación, precipitación química, o electrodeposición, entre otras.

Considerando que la técnica de menor costo es la fitorremediación, y siendo un sistema que requiere un largo tratamiento. Esta tesis se inserta en un proyecto que pretende desarrollar un sistema de remediación biológico integrado, que no sólo incluya las plantas sino que el efecto de organismos que favorezcan la instauración de las mismas. Resultan especialmente interesantes los nemátodos resistentes o tolerantes a los metales pesados, los cuales generalmente son bacterívoros. Consecuentemente, se ha planteado lograr una tríada Planta-Bacteria-Nemátodo utilizable como metodología de remediación de suelos contaminados con metales pesados, siendo idealmente una estrategia de remediación de mayor eficiencia, y más rápida que las metodologías basadas solo en la capacidad de la planta acumuladora.

De lo anterior, se desprende la necesidad de lograr la multiplicación *in vitro* a gran escala de los nemátodos que sean aislados de suelos contaminados con metales pesados, naciendo la Hipótesis de Trabajo “*Sería posible generar un proceso de cultivo masivo de nemátodos del género Rhabditido de vida libre aislados de la zona contaminada con metales pesados de Puchuncaví, a través de reactores de lecho líquido, mediante un adecuado manejo de las condiciones de operación*”, y en consecuencia el Objetivo General de la Tesis “*Desarrollar un proceso de propagación y cultivo en masa de nemátodos bacterívoros de vida libre, aislados desde suelos contaminados con metales pesados (zona de Puchuncaví), alimentados con enterobacterias, que permitan ser utilizados en una metodología de remediación biológica integrada*”.

En este contexto, la presente Tesis comprende, desde el aislamiento de nemátodos de vida libre de la zona de Puchuncaví, su caracterización biológica e implementación de un sistema de cultivo de los mismos. Los resultados indican que el nemátodo aislado en muestreos de suelo en la zona de Puchuncaví, corresponde a una especie perteneciente al género *Rhabditis*, lo cuales son nemátodos bacterívoros de vida libre que también pueden alimentarse de materia orgánica y no únicamente de bacterias. Esto permitió el desarrollo de un medio de cultivo sintético basado en mezcla de cereales y sales minerales y tamponantes, denominado M9C. Los estudios morfológicos y el análisis molecular de la secuencia del rDNA 18S permitieron identificar la especie como *Cuticularia sp.*, esta especie es similar a un *Cuticularia sp.* no identificado presente en Genbank, pero no idéntica, por lo que posiblemente se trate de una subespecie chilena.

Los estudios biológicos permitieron establecer que el nemátodo aislado se reproduce mediante contacto sexual, siendo la copula un proceso de aproximadamente 30 minutos. Se determinó también que las hembras fertilizadas pueden generar alrededor de 24 nuevos individuos vía huevos por cada generación, que las hembras una vez fecundadas comienzan a ovipositar después de 8 días, que los huevos presentan un tiempo de incubación de 2 a 4 días, y que los nemátodos recién eclosionados tardan entre 16 a 20 días en ser adultos. Los estudios sobre cultivos de los nemátodos en matraces permitieron establecer que la temperatura óptima de los nemátodos es 20 ± 5 °C, que su consumo individual de oxígeno en medio líquido es de 2×10^{-6} g O₂/Nem*h, y que el inóculo ideal para iniciar un cultivo es de 500 Nem/mL, y que la agitación óptima es de 100 RPM.

Por otra parte, los estudios en reactor airlift de loop externo no convencional permitieron establecer que es posible airear el reactor hasta con 0,5 vvm, siendo adecuada una condición de operación de 0,3 vvm, se determinó que al usar 0,3 vvm se obtiene un k_{La} de 25,77 h⁻¹ en medio nuevo y 5,19 h⁻¹ en medio de cultivo agotado o usado, por lo que no existen limitaciones de oxigenación en el cultivo. Los cultivos de los nemátodos en reactor airlift de loop externo no convencional permitieron obtener conteos finales de hasta 33.000 Nem/mL, por lo que esta es una alternativa viable de obtención en masa de estos nemátodos.

Los nemátodos cultivados en medio líquido fueron reingresados a un sistema sólido contaminado con metales pesados, en este caso, los suelos de Puchuncaví, y se obtuvo a los tres meses una sobrevivencia del 54 %, por lo que los nemátodos son capaces de adaptarse a sistemas contaminados con metales pesados y tolerar los mismos. Además, se demostró que nemátodos cultivados en medio líquido son capaces de sobrevivir cuando se reinoculan en medio sólido.

Los resultados experimentales han permitido dar cumplimiento a todos los objetivos específicos planteados en esta Tesis y mostrar que la Hipótesis de Trabajo es posible de ser implementada.

I. ABSTRACT

The ENAMI smelting, located in the Ventanas region west of the Puchuncaví valley, has been a significant source of soil contamination for more than 35 years, and thus the surrounding area is highly contaminated with heavy metals. These contaminants are non-biodegradable and their immobilization must be achieved by means of precipitation or the formation of specific complexes, or alternatively, they must be extracted from the ground using such techniques as filter remediation, chemical precipitation or electrodeposition, among others.

Considering that filter remediation is the technique of lowest cost, and that it requires long-term treatment, this thesis presents a project which aims to develop an integrated bioremediation system which takes into account not only the plants themselves but also organisms which promote their growth. This leads to the study of nematodes which are tolerant or resistant to heavy metals; such nematodes are generally bacterivorous. Consequently, the aim here is to find a usable plant-bacteria-nematode triple for the remediation of the heavy-metal contaminated soils. The ideal remediation strategy is considered as that which is most efficient whilst remaining quicker than approaches based solely on the capabilities presented by hyperaccumulator plants.

This basis implies the need to achieve large scale *in vitro* multiplication of the nematodes once they have been isolated from heavy-metal contaminated soil samples. This gives rise to the following working hypothesis: “*It would be possible to generate a process for the mass culture of free-living nematodes of the genus Rhabditido isolated from an area of Puchuncavi contaminated with heavy metals using a liquid media bioreactor, via the adequate manipulation of the operational conditions.*”, and also to the general thesis objective “*To develop a mass propagation and culture process for free-living bacterivorous nematodes isolated from heavy-metal contaminated soils, fed with whole bacteria, which can then be used in integrated bioremediation*”.

The present thesis also proposes the biological characterization of the nematodes and the implementation of a culture process, subsequent to their isolation from the soil samples. The results indicate that the isolated nematode from the Puchuncaví region, correspond to a species belonging to the genus *Rhabditis*, a genus of free-living bacterivorous nematodes which also feed on other organic matter and not exclusively on bacteria. This allowed the development of synthetic culture media based on a mixture of cereals, mineral salts, and buffers, denominated M9C. Morphologic study and molecular analysis of the 18S rDNA sequence allowed the identification of the species as *Cuticularia sp.* It was found to be similar, but not identical, to an unidentified *Cuticularia sp.* present in Genbank, which indicates that it is probably a Chilean subspecies.

Biological study established that the isolated nematode reproduces through sexual contact, with copulation lasting approximately 30 minutes. It was also determined that fertilized females can generate around 24 new individuals per generation; that once fertile, females begin laying new eggs after 8 days; that the incubation period of the eggs is between 2 and 4 days; and that recently hatched nematodes take between 16 and 20 days to reach adulthood. By studying nematode culture in test-tubes it was possible to establish that the optimum temperature for the nematodes is 20 ± 5 °C; that their individual oxygen consumption in liquid media is 2×10^{-6} g O₂/Nem*h; that the ideal level of inoculation to initiate cultivation is 500 Nem/mL; and that the ideal level of agitation is 100 RPM.

Additionally, studies in a non-conventional external loop airlift reactor established that it is possible to air the reactor with up to 0.5 vvm, where an adequate operational level is 0.3

vvm. It was determined that using 0.3 vvm a k_{La} of 25,77 h^{-1} is obtained in new media and of 5,19 h^{-1} in fully or partially used media. This demonstrates that limitations of the oxygenation of the culture do not exist. The nematode cultures in the non-conventional external loop airlift reactor reached final counts of up to 33.000 Nem/mL, making this a viable alternative for the mass cultivation of these nematodes.

The nematodes cultivated in liquid media were reintroduced into a solid system contaminated with heavy metals, in this case, the soils of Puchuncavi. After three months a survival rate of 54 % was observed, indicating that the nematodes are capable of adapting themselves to heavy-metal contaminated soils and of tolerating such conditions. Moreover, it was shown that the nematodes cultivated in liquid media were able to survive inoculation in solid media.

These experimental results fulfill all the objectives put forth in this thesis and show that the working hypothesis can be implemented.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problema ambiental que se aborda

Las plantas de fundición de minerales emiten contaminantes, que de no ser tratados generan daño ambiental a los ecosistemas circundantes, como es el caso del área de Puchuncaví. Es así como Fundición y Refinería Ventanas, fue por mucho tiempo un centro de importancia económica nacional, por la producción de cátodos de cobre refinados, y también de algunos metales preciosos. Pero, a la vez se trataba de una fuente de contaminantes que por 35 años afectó a la comuna de Puchuncaví con sus descargas de líquidos y emisiones gaseosas de anhídrido sulfuroso y material particulado rico en metales pesados. Esto ha traído consecuencias ambientales, ya que ha afectado directamente al ecosistema, ha deteriorado la calidad de los suelos, ha generado consecuencias socio-económicas, afectando la calidad de vida de las comunidades que habitan la zona, debido a la nula actividad agrícola que actualmente existe (Ginocchio, 1999; Ginocchio, 2000; Ginocchio *et al.*, 2002; González, 1994).

La remediación de estos suelos puede ser lograda mediante la aplicación de diferentes técnicas, siendo una de ellas la fitoremediación. Al respecto, la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, a través de un grupo multidisciplinario de investigadores de Ingeniería Bioquímica, Biología, Agronomía, Ingeniería en Construcción, entre otros, ha planteado el desarrollo de una tríada Planta-Bacteria-Nemátodo como una metodología de remediación de suelos contaminados con metales pesados, resultando idealmente una estrategia de remediación mejorada, de mayor eficiencia, y más rápida que una fitoremediación usando solamente las plantas, constituyéndose en una alternativa sustentable desde el punto de vista ambiental y económico. Sin embargo, esta propuesta enfrenta ciertos puntos críticos, que se derivan directamente de los tres elementos biológicos que se plantea utilizar. Por ejemplo, - el cultivo de plantas y el cultivo de bacterias seleccionadas podría ser estandarizado y/o escalado sin mayores problemas dado

que requieren tecnologías y técnicas que ha sido ampliamente estudiadas, y que tradicionalmente son utilizadas. Pero el cultivo en masa de nemátodos solamente ha sido posible para el caso de nemátodos entomopatógenos, usados como controladores de plagas. Estos nemátodos se desarrollan en simbiosis específicas con ciertas bacterias que estos albergan y transportan en su sistema digestivo, las cuales resultan ser letales para ciertos insectos, además de representar una dieta única para el nemátodo (Ehlers, 2001). En consecuencia, una vez aislado, seleccionado y caracterizado un nemátodo proveniente de los suelos de la zona de Puchuncaví, será necesario estudiar la factibilidad de cultivar un nemátodo bacterívoro de vida libre, y estandarizar sus condiciones de cultivo, así como también su dieta representada en la(s) bacteria(s), idealmente proveniente de la misma zona estudiada (Forst and Clarke, 2002).

Las complicaciones de los cultivos de nemátodos bacterívoros, se representan en la determinación de la dieta apropiada, ya sea mezcla orgánica compleja o tipo de bacteria a ser utilizada como alimento, la(s) cual(es) idealmente debe favorecer el crecimiento de las plantas utilizadas en la remediación, o al menos no ser dañina para las mismas, ya que éstas serán los agentes acumuladores de metales. Aspectos a determinar para establecer una metodología de cultivo de los nemátodos serán las condiciones de alimentación, pudiendo ser progresiva, co-cultivo de bacterias y nemátodos, cultivo continuo, cultivo por lotes, y también variables físicas del cultivo, como por ejemplo; luz, aireación, temperatura, agitación, geometría del reactor, entre otras variables y parámetros.

Por otra parte, es importante en este punto mencionar que el nemátodo aislado de la zona de Puchuncaví, estudiado en esta Tesis, ha sido identificado como *Cuticularia sp.* perteneciente al orden *Rhabditida*, familia *Rhabditidae*. Esta familia de nemátodos comprende varios integrantes que pueden alimentarse de bacteria y de componentes orgánicos del suelo. Los trabajos expuesto más adelante detallan condiciones de cultivo que por primera vez son descrito para *Cuticularia sp.* por lo que en sí mismos constituyen una aporte científico. Además, los resultados permiten proyectar el sistema de cultivo desarrollado para escalas mayores de producción de los nemátodos, lo que a su vez permitiría proyectar a los nemátodos insertos en un sistema de remediación biológica integral de suelos contaminados con metales pesados.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. Macro y microsistemas del suelo

La composición de los suelos puede ser muy variada, destacándose cinco componentes principales; minerales, aire, agua, materia orgánica y organismos vivos. La distribución de los constituyentes no es homogénea, observándose la existencia de capas perfectamente diferenciadas, llamadas estratos. El conjunto de estratos es lo que constituye el perfil de un suelo (Figura 2.1.) (Eweis *et al.*, 1999; Sandaa *et al.*, 2001).

Estrato A: constituye la capa superior del suelo, hasta una profundidad de unos pocos centímetros. Contiene la mayor parte de la materia orgánica del suelo y es donde tiene lugar la máxima actividad biológica.

Estrato B: formado por los productos de alteración de las rocas adyacentes, así como del material orgánico y mineral disuelto del horizonte A mediante un proceso denominado lixiviación.

Estrato C: formado por material disgregado procedente del fondo rocoso.



Figura 2.1. Perfil del suelo con indicación de los distintos horizontes.

Estudios realizados en la zona de Puchuncaví, muestran que los contaminantes metálicos están distribuidos en los horizontes A y B, y que existe un sello natural constituido por una

capa de arcilla entre el horizonte B y C, que evita mayores infiltraciones de los lixiviados generados por las aguas lluvias. Esto ha sido el fundamento para proyectar aplicaciones de metodologías de bioestabilización (ver Acápite 2.3.6.) con bacterias sulfatoreductoras anaeróbicas (Amo *et al.*, 2002), presentes en la zona bajo estudio. Esto permitiría la inmovilización de los metales que llegasen a desplazarse a zonas profundas del suelo, donde las metodologías de fitorremediación resulten ineficientes.

Un microecosistema esta compuesto por la más amplia variedad de microorganismos, entre los que se pueden mencionar algunos grupos importantes, por ejemplo; hongos y levaduras, protozoos, bacterias, microalgas, gusanos, nemátodos, etc. Donde generalmente los más abundantes corresponden a las bacterias.

2.1.1. Bacterias del suelo:

Las bacterias presentan muchas y complejas interrelaciones evolutivas, por ello existen diferentes formas de describirlas y clasificarlas. Al respecto se puede mencionar; bacterias púrpuras y verdes, cianobacterias, bacterias nitrificantes, entre otras de diversas características metabólicas (Lakzian *et al.*, 2002; Ranjard *et al.*, 2000; Kikkila *et al.*, 2001). De lo anterior, es importante mencionar que los grupos aludidos resultan importantes para estrategias de remediación y/o fertilización de suelos (Holtan-Harting *et al.*, 2002; Sánchez, 2002, Igual *et al.* 2001), por lo que no sería de extrañar que alguna bacteria típica del suelo, se transforme en un factor biológico de relevancia en el desarrollo del presente trabajo, ya que, por ejemplo; las bacterias de los géneros *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, entre otras, pueden potenciar el crecimiento de las plantas, así como ellas, al mismo tiempo, nutrirse de los exudados vegetales, pueden generar sustancias surfactantes, metaloquelantes y establecer un biocontrol de enfermedades o agentes patógenos de las plantas (Van der Ielie *et al.*, 2000; Gleba *et al.*, 1999). Un importante grupo de las bacterias del suelos, son las *Pseudomonas*, las cuales son capaces de promover el crecimiento de las plantas debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de hongos patógenos y secretar algunas sustancias biocativas (Ristaino and Thomas, 199). Estudios realizados a fines de los 70 y principios de los 80, demostraron que algunas cepas de *Pseudomonas* fluorescentes eran capaces de mejorar el

crecimiento de la papa y caña de azúcar cuando eran aplicadas a las semillas (Schroth and Hancock, 1982). Los resultados de este tipo de estudios, junto con la toma de conciencia sobre los efectos adversos de los pesticidas químicos, han propiciaron el resurgimiento a escala mundial de la investigación sobre el uso de inoculantes bacterianos para controlar patógenos y mejorar el crecimiento vegetal. De esta manera se utilizan organismos naturales (rizobacterias) para reducir los efectos de organismos indeseables (patógenos) y así favorecer la producción de cultivos vegetales. Esto se conoce como control biológico y es utilizado como una alternativa ecológica al uso de pesticidas sintéticos (Schroth and Hancock, 1982). Estas aplicaciones de bacterias en cultivos, permiten proyectar buenos resultados en sistemas de remediación que se asemejen a cultivos vegetales, por lo que un sistema de remediación basado en una triada biológica que involucre Planta-Bacteria-Nemátodo resulta factible de ser proyectada.

2.1.2. Plantas acumuladoras de metales pesados:

Muchas plantas son de importancia para el ser humano debido a su valor alimenticio o medicinal, entre otros valores agregados. Es así que, las cualidades de las plantas han dado origen a estudios enfocados a determinar la capacidad de acumulación de metales pesados en los tejidos vegetales (Van der lelie *et al.*, 2000). Se ha visto que el pH puede alterar las capacidades de acumulación, por ejemplo, pH alcalino disminuye la biodisponibilidad de metales pesados, con lo que también disminuye la acumulación de Zn, Cu, Ni y Cd en *Cichorium Intybus* (achicoria) (Anguissola *et al.*, 1999), así también se ha determinado que legumbres y ciertos granos no acumulan naturalmente metales pesados (Wang *et al.*, 2002; Bunz *et al.*, 2001; Guerinot *et al.*, 2001).

Muchos estudios se han originado desde que se descubrieron plantas capaces de crecer en suelos altamente contaminados con metales pesados (Watanabe, 2001). Se han dividido en plantas tolerantes y plantas hiperacumuladoras (Pence *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 1998). Se han determinado asociaciones favorables de plantas y microorganismos de la rhizobia y fijadores de nitrógeno (Kiikkila *et al.*, 2001). Se han comparado métodos químicos o artificiales de extracción de metales pesados con la capacidad natural de las plantas (Lombi *et al.*, 2001). Al respecto, se ha logrado identificar péptidos inducibles por la presencia de

metales pesados contaminantes, denominados fitoquelatinas, los cuales han mostrado su importancia en la conferencia de resistencia y tolerancia a los metales pesados, tanto en la planta que los genera como en bacterias de la rizósfera, aunque también este tipo de compuestos ha sido detectado en microorganismos del suelo (Ha *et al.*, 1999). Por otra parte, también se ha explorado el mejoramiento genético de las “mejores” plantas acumuladoras de contaminantes (Watanabe, 2001).

2.1.3. Los Nemátodos:

La palabra "Nemátodo" es una corrupción de nematoide, que significa "similar a un hilo". Incluye a organismos que reciben nombres comunes como "gusanos redondos", "gusanos filamentosos", "lombrices" o "anguílulas" (si bien no todos los animales que reciben estos nombres vulgares pertenecen necesariamente al grupo Nemátodos). Los nemátodos son los animales multicelulares más numerosos que actualmente viven en la Tierra. Un puñado de suelo puede contener millares de ellos. Las especies de vida libre son abundantes, y pueden presentar diversas especializaciones alimenticias. Existen nemátodos desde los polos hasta los trópicos, en todos los ambientes, incluyendo desiertos, altas montañas y profundidades oceánicas (Booolootian, 1993).

Los nemátodos son estructuralmente organismos simples, característicamente pseudocelomados, cubiertos por una cutícula proteínica. Los adultos contienen aproximadamente unas 1.000 células somáticas, y potencialmente centenares de células asociadas al sistema reproductivo. Miden desde 0,2 mm hasta más de 8 m de longitud. La mayoría de las especies de vida libre miden menos de 2,5 mm de largo, la mayoría son de aproximadamente un milímetro y muchos son microscópicos. Algunos nemátodos del suelo miden hasta 7 mm y ciertas especies marinas llegan a los 5 cm (Booolootian, 1993; Hickman *et al.*, 1986).

El cuerpo está cubierto por una cutícula resistente, la cual es una delgada cubierta quitinosa que a menudo tiene un relieve en forma de anillos y cubre faringe, digestivo posterior y otras aberturas corporales. La cutícula de la superficie corporal general suele presentar ornamentaciones (puntas duras, verrugas, costillas, espinas o sedas). A veces hay un conjunto variable de prominencias cuticulares (alas), que pueden encontrarse a lo largo de

la longitud del cuerpo, en la región cervical o en la región caudal del macho (en algunos se encuentra allí una expansión formada por tres lóbulos, con función copuladora). La cutícula, gruesa, es un producto elástico de las células epidérmicas subyacentes. Entrega un soporte resistente, protege de algunos compuestos tóxicos y permite aumentar o disminuir el volumen corporal sin cambiar la presión del líquido perivisceral. En la cutícula predominan proteínas similares al colágeno, y la capa externa contiene una proteína del tipo queratinas, cubierta por una película lipídica. En los nemátodos el crecimiento se acompaña normalmente de cuatro mudas de la cutícula. La cutícula antigua se separa de la epidermis subyacente empezando por el extremo anterior y el animal segrega la cutícula nueva. La cutícula antigua se desprende entera o en fragmentos, pero puede ser absorbida parcialmente por la nueva cutícula (Booolootian, 1993; Christie, 1970).

Debido a la falta de músculos circulares y a la abundancia de músculos longitudinales, se mueven curvándose y retorciéndose, hacia adelante y atrás, mediante ondulaciones serpenteantes en el plano dorso-ventral, por la contracción alternada de fibras musculares longitudinales ventrales y dorsales, con ayuda del hidroesqueleto formado por el fluido del pseudoceloma. El antagonista es la cutícula. Debido al espacio fluido central no segmentado, los movimientos implican siempre a todo el cuerpo. Los anillos cuticulares pueden contribuir a la flexibilidad, mientras que fibras helicoidales cruzadas impiden la flexión y formación de hernias cuando el cuerpo se dobla y aumenta la presión hidrostática. Los movimientos ondulatorios de los nemátodos de vida libre son eficaces para avanzar sólo cuando se realizan sobre partículas del substrato o contra la tensión superficial de la película de agua, lo cual permite nadar a muchas especies. Muchos nemátodos nadan intermitentemente en distancias cortas, por ejemplo las especies que habitan en los musgos, cuando la planta está anegada. Algunas especies pueden reptar. Las ornamentaciones de la cutícula les ayudan a afianzarse a algún substrato, como por ejemplo; el suelo (Booolootian, 1993; Marshall and Williams, 1980).

Los nemátodos carecen de órganos respiratorios diferenciados. Los adultos que viven como parásitos intestinales son principalmente anaerobios, en ellos falta el ciclo de Krebs y el sistema de citocromos, pero todos pueden utilizar el oxígeno si está disponible. Algunos

nemátodos de vida libre y los estados libres de algunos parásitos, son aerobios obligados, y por lo tanto poseen ciclo de Krebs y sistema de citocromos.

La reproducción es siempre sexual y la fecundación interna. Casi todos los nemátodos son de sexos separados (dioicos o bisexuales), y en la mayoría de los casos el macho es menor que la hembra. Los machos presentan caracteres sexuales secundarios, tales como glándulas ventrales y lóbulos caudales. No obstante lo anterior, existen algunos pocos nemátodos terrestres que son hermafroditas o partenogénéticos. Hay casos en que se desconocen los machos. Las especies hermafroditas son proterándricas, es decir los órganos masculinos y los espermatozoides se desarrollan antes que los órganos femeninos y los óvulos. En ellas existe un ovotestículo. En general se autofecundan. Los espermatozoides se desarrollan primero y son almacenados en las vesículas seminales. La autofecundación ocurre después de la formación y maduración de los óvulos. Periódicamente surge un pequeño número de machos que fecundan cruzadamente a los hermafroditas. Los huevos son pequeños, generalmente alargados y están rodeados por envolturas muy duras, que les permiten esperar indefinidamente la aparición de condiciones ambientales adecuadas. Existen tres cubiertas: una lipídica, otra cuticular y una tercera proteica, con ornamentaciones. [Hickman *et al.*, 1986; Marshall and Williams, 1980; Munilla, 1992; Remane *et al.*, 1980; Ruppert and Barnes, 1996].

2.1.3.1 Nemátodos del suelo:

La microfauna del suelo es variada, y algunos de sus elementos son utilizados como indicadores de calidad y/o estado de fertilidad de los suelos. Los nemátodos son gusanos circulares, casi transparentes, los cuales, dependiendo de su familia y las condiciones de vida, pueden presentar reproducción sexual o hermafroditismo. Existen nemátodos que son parásitos de plantas, otros son entomopatógenos (utilizados como bioinsecticidas, en asociación con su bacteria simbiote) y los de vida libre (Neher and Powers, 2003). Tanto los gusanos de tierra como los nemátodos del suelo, han sido objeto de estudio, y en base a su diversidad, cambios poblacionales, madurez y desarrollo, se han logrado establecer parámetros y criterios para utilizarlos como indicadores de la salud de los suelos (Conder *et al.*, 2001; Neher and Powers, 2003; Neher, 2001). Es así que, se ha logrado establecer

parámetros evaluativos propios o específicos para suelos agrícolas (Yeates and Bongers, 1999), suelos en barbecho o descanso agrícola (Pate *et al.*, 2000; Yeates, 1993), suelos nativos o no intervenidos y suelos contaminados (Neher, 2001).

Los nemátodos presentes en el suelo pueden ser clasificados según sus formas y hábitos de alimentación (Yeates *et al.*, 1993; Yeates, 1998). Es así que, se puede mencionar nemátodos que se alimentan de plantas (plantívoros), de bacterias (bacterívoros), de hongos (fungívoros), de eucariotas unicelulares, de invertebrados (rotíferos, protistas, etc), y también predadores y omnívoros (Yeates, 1998; Neher and Powers, 2003).

La presencia de nemátodos puede tener consecuencias sobre el desarrollo de las plantas, constituyéndose así los nemátodos patógenos de plantas, y también los nemátodos que generan beneficios para los vegetales (Yeates, 1998; Yeates, 1999). En este contexto, los nemátodos también se pueden ver afectados por las actividades desarrolladas en un determinado suelo, así como también, el tipo de planta cultivada puede producir cambios en sus poblaciones, diversidad y estados de madurez o desarrollo (Yeates and Williams, 2001).

Las poblaciones de nemátodos son muy sensibles a la contaminación (Neher, 2001; Jaworska and Tomaski, 1999), se producen alteraciones notorias en los estados de madurez, por ejemplo; cuando los nemátodos se enfrentan a condiciones adversas, cambian su distribución, se agregan, cambian la proporción de sexo para mejorar las posibilidades de sobrevivencia, muchos se mantienen en estados juveniles más resistentes, o también denominados “dauer”, o pasan a una quiescencia temporaria (McSorley, 2003; Anderson and Coleman, 1982; Van voorhies and Ward, 1999).

Relacionado con lo anterior, se han detectado genes involucrados en la regulación del ingreso a estados de resistencia al estrés, como el estadio dauer, estos son los genes *daf-2* y *age-1*, sobre los cuales también se ha identificado que ciertas mutaciones confieren elevada resistencia a cadmio y cobre, respecto de controles de *Caenorhabditis elegans* nativos o no mutados (Barsyte *et al.*, 2001; Sulston and Brenner, 1973).

Una estrategia de detoxificación de metales pesados identificada en la planta *Arabidopsis thaliana*, corresponde a la fabricación de fitoquelatinas, un péptido capaz de complejar los

metales (Vatamaniuk *et al.*, 2001). Este péptido es fabricado por una enzima fitoquelatina sintasa, que también ha sido reportada en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, pero no así en animales mayores, donde se han reportado sistemas de glutatión y péptidos ricos en cisteína llamados metalotioninas (Ha *et al.*, 1999). Al respecto, los nemátodos presentan un tipo de adaptación que les permiten tolerar ciertos niveles o rangos de contaminación por metales pesados, por ejemplo; también se ha detectado la presencia de fitoquelatinas derivadas de glutatión en *Caenorhabditis elegans*, péptidos que son sintetizados por una enzima sintasa codificada en un gen homólogo al de las fitoquelatinas vegetales, resultando crucial para la tolerancia del nemátodo a los metales pesados como cadmio, mercurio y arsénico (Clemens *et al.*, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001). También se ha reportado que mientras mayores concentraciones de contaminantes cobre, cromo y arsénico, aumenta la proporción de nemátodos bacterívoros y predadores, mientras que en situaciones de baja contaminación por estos metales, aumenta la predominancia de los nemátodos que comen vegetales (Bardgett *et al.*, 1994), esta situación se ve claramente reflejada en la zona de estudio, ya que en los muestreos e identificaciones de nemátodos, que el grupo de científicos del Instituto de Biología de la PUCV ha realizado, han permitido determinar que el principal grupo de nemátodos presente, corresponde a los de tipo bacterívoro de vida libre.

Los nemátodos requieren ciertas condiciones de humedad, temperatura y nutrientes para su óptimo desarrollo, no obstante, es difícil mantener o determinar el equilibrio característico para todo tipo de suelo, es por ello que los estudios que han arrojado indicadores de la salud de un suelo, se basan en el tipo de suelo, uso del mismo, características como el tamaño de poro, contenido de agua, entre otros (Yeates *et al.*, 2002).

Es posible inferir que los nemátodos juegan un rol de importancia en la dinámica de los suelos. Esto se ve reflejado en la acción de los nemátodos en la oxigenación y distribución de gases en los suelos, en la remoción o movimiento de partículas, distribución de nutrientes y materia orgánica, reciclaje de material orgánico, etc. Actividades con las cuales colaboran en el desarrollo equilibrado de la vida en el entorno de las raíces de las plantas, correspondiente a los estratos A y B de los suelos (Yeates *et al.*, 2002; Eweis *et al.*, 1999).

Si los nemátodos se relacionan activamente con bacterias del suelo y con los entornos radiculares de las plantas, pueden participar activamente en el establecimiento de ecosistemas adaptados a medios contaminados, como lo son los suelos contaminados con metales pesados (Bardgett *et al.*, 1994; Jaworska and Tomaski, 1999; Pate *et al.*, 2000). Esto permite proyectar su incorporación al sistema de remediación biológica integrado que se ha planteado desarrollar con efectos verdaderamente beneficiosos y que puedan traducirse en mejora de la eficiencia de acumulación de metales pesados y por ende de remediación de los suelos en tratamiento.

2.2. Técnicas y estrategias de remediación de suelos contaminados con metales pesados

Dentro de las alternativas para el tratamiento de suelos contaminados con metales pesados existen una variedad de técnicas que se pueden clasificar en tratamientos *in situ* y *ex-situ*, según si el tratamiento se realiza en el mismo sitio contaminado, o se extrae para un tratamiento posterior (Smith *et al.*, 1995). Las ventajas de las técnicas *in situ* son que en general presentan costos menores que las técnicas *ex situ*, ya que no existe la componente económica derivada del traslado del material a otras instalaciones, y en algunas alternativas son casi autosustentables, lo que permite un tratamiento continuo en el tiempo. Entre las técnicas *in situ* se destacan tres formas de descontaminación: i.- alternativas físicas como barreras de contención y microencapsulación; ii.- técnicas de extracción como lavado con agua, electrocinética o electrodeposición; iii.- y por último técnicas biológicas como la fitorremediación y la biotransformación. (Eweis *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1995).

2.2.1. Barreras de contención:

Dentro de las alternativas físicas, las barreras de contención constituyen técnicas de confinamiento, y consisten en la construcción de barreras superficiales y/o subterráneas, de forma que se impida la movilización de los contaminantes hacia sitios aledaños sin contaminar. Además se suele utilizar para evitar la generación de lixiviados, la entrada de contaminantes en los cursos de agua o la infiltración en las aguas subterráneas (Scherer *et al.* 2000). Esta es una técnica que se encuentra aún en desarrollo, y en la cual sólo se

persigue evitar la migración de los contaminantes a sectores aledaños pero no significa una mejora en la calidad de los suelos ni su remediación; por lo tanto, es una técnica que debe ir de la mano con tecnologías de remediación efectiva. Por último, esta técnica podría no tener sentido cuando la contaminación es por vía aérea, ya que complicaría la ubicación geográfica de las barreras, como el caso de la Fundición de Ventanas en el valle de Puchuncaví (Phillips *et al.* 2003).

2.2.2. Microencapsulación:

Consiste también en un confinamiento de los metales, pero dentro de una matriz microscópica e impermeable, lo que evita que los metales migren, o que de algún modo afecten negativamente a la salud humana o al ambiente. La Microencapsulación mantiene los contaminantes confinados, requiriendo temperaturas sobre los 1800 °C para destruir la cápsula, o la acción del ácido fluorhídrico (HF) (Smith *et al.*, 1995). La microencapsulación es una tecnología que ha dado buenos resultados con metales pesados (tales como el cromo, cobre, plomo, mercurio y zinc) metaloides (tales como el arsénico), radionucleótidos (tales como el uranio), sólidos diluidos (como los sulfatos) y ha degradado hidrocarburos (tales como gasolina y aceites combustibles) y otros productos químicos orgánicos a través de un proceso de oxidación de gran energía. Sin embargo, los costos asociados a este tratamiento son muy altos (para 10.000 toneladas de suelos por año, son del orden de los 7 millones de dólares anuales) (Smith *et al.*, 1995).

2.2.3. Inmovilización de metales:

Del mismo modo, existen métodos químicos que consisten en la inmovilización de los metales mediante sustancias complejantes o quelantes. Estas sustancias permiten disminuir la disponibilidad y los efectos nocivos de los metales pesados para los elementos biológicos del suelo, ya sean estos los microorganismos (Ochoa-Loza *et al.*, 2001), u organismos que forman parte de cadenas tróficas (flora y fauna), o también plantas de importancia económica o cultivables. En este contexto, se han realizado experiencias de precipitación química de metales (Lombi *et al.*, 2001), para lo cual se ha modificado el pH (Kinraide and Sweeney, 2003), se han usado sales de amonio (McGowen *et al.*, 2001). También se han

diseñado protocolos de lavado de los suelos que combinan sistemas de extracción de los metales, lo cuales van desde la precipitación y complejamiento, hasta la electrodeposición, entre otras estrategias.

2.2.4. Método electrocinético:

Esta tecnología consiste en remover metales y otros contaminantes del suelo por la aplicación de un campo eléctrico bajo la superficie. Este campo eléctrico induce el movimiento de iones, partículas y agua a través del suelo hacia los polos de carga opuesta. El fenómeno electrocinético ocurre cuando el líquido migra a través de un medio cargado y poroso, como arena u otro mineral particulado, el que normalmente tiene una superficie cargada negativamente (Reddy *et al.*, 2001). El campo eléctrico es aplicado a través de ánodos y cátodos ubicados en el suelo. El gradiente de concentración de los metales en el suelo se establece entre el cátodo y el ánodo (Smith *et al.*, 1995). La eficiencia de la electrocinética depende en gran parte del pH, ya que puede variar la solubilidad de los metales, permitiendo una mejor movilidad de éstos. La efectividad de la remediación electrocinética depende del suelo, por ejemplo, estudios de laboratorio determinaron que un suelo arcilloso puede ser usado como medio inmovilizador para metales pesados, por lo tanto esta técnica no es viable (Vengáis *et al.*, 2001). Otra desventaja se da al tratar suelos secos, lo que dificulta la movilización de metales. Además esta es una técnica que está aun en etapa experimental, no existiendo datos a gran escala. (Smith *et al.*, 1995). Esta técnica tampoco es aplicable a la realidad de los suelos del valle de Puchuncaví, por razones técnicas y económicas.

2.2.5. Fitorremediación:

El uso de plantas ha comenzado a ser una herramienta factible para la remediación de sectores contaminados con metales. La técnica consiste en dar las condiciones necesarias para el crecimiento y mantenimiento de las plantas por medio de la adición de nutrientes, humedad, laboreo, entre otras variables de cultivo. Esto con el objetivo de favorecer la acción acumuladora de metales de estos elementos biológicos. Este tratamiento es adecuado para grandes extensiones de terreno contaminado y para contaminación superficial, o al

menos presente hasta la profundidad del alcance de las raíces (Van der lelie *et al.*, 2000; Mench *et al.*, 2000).

La presencia de vegetación en los lugares contaminados con metales pesados ha dado origen a diversos estudios utilizando plantas como potenciales agentes remediadores. Para ello se comenzó caracterizando la población vegetal de diferentes zonas contaminadas y su clasificación como tolerantes y/o acumuladoras de metales pesados y metaloides (Miller and McFee, 1983).

De acuerdo al mecanismo de acción que el vegetal presenta sobre los metales, la técnica de fitorremediación se puede clasificar en tres grupos (Salt *et al.*, 1995; Cunninham *et al.*, 1995):

- Fitoextracción: Se utilizan plantas capaces de acumular los metales, donde el metal es transportado desde el suelo a la biomasa de la planta depositándose en raíces o sectores sobre el suelo, para posteriormente remover la planta y así extraer el metal. (LaCoste *et al.*, 2001; Bricker *et al.*, 2001).
- Rhizofiltración: Es el uso de las raíces de las plantas para absorber, precipitar, concentrar y remover los contaminantes de efluentes o sitios contaminados.
- Fitodegradación: Es el uso metabólico por parte de la planta, de los contaminantes. En este proceso la planta puede ser asistida por la degradación de contaminantes orgánicos descompuestos por la rizósfera. (Cunninham *et al.*, 1995).
- Fitovolatilización: Proceso que involucra enzimas muy específicas capaces de transformar y volatilizar los contaminantes (Wenzel *et al.*, 1999).

- Fitoestabilización: Uso de las plantas tolerantes para reducir la movilidad de metales en el suelo. Los metales se asocian a raíces, tallos y hojas, quedando retenidos por éstas (Wenzel *et al.*, 1999).

Puede resultar obvio que el tipo de planta que ha despertado mayor interés son las que acumulan metales en sus tejidos, ya que esta característica haría posible extraer los mismos desde el suelo contaminado, y disminuir así su concentración hasta lograr dar cumplimiento con las normativas ambientales vigentes. Al momento, se han reportado plantas capaces de acumular distintos metales, por ejemplo *Thlaspi caerulescens* y *Viola calaminaria* fueron las primeras documentadas con altos contenidos de metales en sus hojas (Baumann, 1985), posteriores reportes mostraron que *Thlaspi caerulescens* puede acumular zinc y cadmio en sus hojas (Zn: Cd, 39.600:1.800 ppm) (Reeves and Brooks, 1983). En 1935, Byers reportó plantas del género *Astragalus* capaces de acumular selenio hasta un 0,6 % en masa seca (Byers, 1935). Así también se ha reportado plantas hiperacumuladoras para variados metales, por ejemplo; *Astragalus racemosus* con concentraciones mayores a 14.000 ppm de selenio (Beath *et al.*, 1937), *Ipomea alpina* con 12.300 ppm de cobre (Baker and Walter, 1990), *Haumaniastrum robertii* con cobalto en concentraciones de 10.200 ppm (Brooks, 1977), *Sebertia acuminata* con más del 25 % de níquel en masa seca (Jaffre *et al.*, 1976). Recientemente, se ha reportado una especie de helecho (*Pteris vittata*) capaz de crecer en suelos contaminados con arsénico, cobre y cromo y de acumular grandes cantidades de estos metales en sus tejidos, lo interesante de esta planta es que al crecer en suelos no contaminados o bajos en estos metales crece deficientemente, por lo que se está estudiando el por qué necesita estos metales para crecer y en especial el arsénico (Ma *et al.*, 2001).

Por otra parte, es bien sabido que los vegetales responden a los estímulos de fertilización creciendo con mayor vigor, mejores tasas de ganancia de biomasa, mayor velocidad, etc. Por lo tanto, se han desarrollado metodologías de mejoramiento de la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados mediante adecuados programas de fertilización (Chaney *et al.*, 2000). A lo anterior, se suma el estudio de diferentes influencias de los metales sobre los microorganismos naturales del suelo, dentro de los cuales existen los fijadores de nitrógeno atmosférico, y se ha visto que los últimos son muy sensibles a la

presencia de metales pesados (Kinraide and Sweeney, 2003), produciéndose cambios en la diversidad y número de microorganismos vivos (Pawłowska *et al.*, 2000).

2.2.6. Bioestabilización:

En ésta técnica se utilizan microorganismos, ya sean autóctonos o nativos del suelo contaminado, o procedentes de cultivos especializados exógenos (bioaumentación), para enfrentar el problema de la contaminación. Si bien, no es posible degradar los metales pesados existentes, los microorganismos son capaces de transformarlos en otras especies químicas, para hacerlos menos biodisponibles a los seres vivos y al medio ambiente (Plaza *et al.*, 2001). Mediante la incorporación de nutrientes (bioestimulación) se favorece la creación de biomasa que acelere el proceso de remediación. En el caso específico de metales pesados, se han utilizado microorganismos para la precipitación de estos mediante su transformación en sales de sulfato o sulfuros metálicos. Esto se ha realizado usando bacterias sulfato reductoras (Tonolla *et al.* 2000), lo que aprovecha parte del “metabolismo redox” de este tipo de microorganismos para dejar los metales en sus formas insolubles o menos solubles, lo que permite disminuir su biodisponibilidad y acumulación en algún segmento de la cadena trófica (Van der lelie *et al.*, 2000).

Si se consideran las tecnologías biológicas, hay que tomar en cuenta en el suelo la presencia de sustancias tóxicas, tales como metales pesados, que dificultan el desarrollo y establecimiento de poblaciones microbianas no autóctonas y de poblaciones vegetales. Por otra parte, la escasa disponibilidad de nutrientes o la inmovilización de éstos dificultan el asentamiento de una cubierta vegetal autosustentable y fitorremediadora. Es por esto que, junto a las investigaciones y esfuerzos en las aplicaciones microbianas y vegetacionales, se hace necesario la incorporación de nuevas tecnologías para dar solución a la contaminación ambiental de suelos. Entre estas propuestas tecnológicas están el uso de la microfauna como un elemento más del microcosmos involucrado en la remediación, a través del empleo de nemátodos, y la conjugación microbiana de genes que confieran resistencia a metales pesados (Van der lelie *et al.*, 2000).

2.2.7. Utilización de nemátodos:

Los nemátodos constituyen un grupo animal de la microfauna y pertenecen a los primeros niveles tróficos del suelo, jugando un rol fundamental en los procesos de descomposición de éste (Ettema and Bongers, 1993). La fuente de alimento de los nemátodos de vida libre, como ya se ha mencionado, puede ser muy variada, siendo de especial interés los nemátodos bacterívoros y omnívoros por su versatilidad alimenticia y posibilidad de ser incluidos en procesos de tratamiento de suelos (Yeates *et al*, 1993; Yeates, 1998; Neher and Powers, 2003).

Por otra parte, el principal producto de excreción de los nemátodos del suelo es el amonio, el cual es liberado a través de su cutícula para luego ser tomado directamente por las raíces de las plantas o transformado en nitritos y nitratos por bacterias quimiotróficas (Freckman, 1988).

Dentro de los nemátodos destaca el grupo de los nemátodos bacterívoros de vida libre, los cuales son considerados colonizadores tempranos de ambientes alterados (Bongers, 1990; Bongers and Ferris, 1999). Dos familias de estos nemátodos se encontraron en los sitios contaminados con metales pesados de la zona de Puchuncaví, y por esta razón es que el proyecto multidisciplinario de desarrollo del sistema de remediación integrado por los componentes planta, bacteria y nemátodo, ha seleccionado a los nemátodos bacterívoros de vida libre.

Estos nemátodos tienen ciclos de vida cortos, altas tasas reproductivas y pueden ser particularmente tolerantes a contaminantes (Ettema and Bongers, 1993; Ettema, 1998; Gyedu-Ababio *et al.*, 1999). Muchos nemátodos bacterívoros presentan una relación “simbiótica” con la bacteria, por un lado el nemátodo se alimenta de la bacteria y esta es propagada por el mismo, debido a su movilidad, la cual comprende alrededor de un metro por estación del año. La bacteria es propagada en el suelo, ya que una vez que ingresa al aparato digestivo del nemátodo debe ser triturada y no todas las bacterias alcanzan a recibir este trato por lo que algunas de ellas aún viables son defecadas (Bird and Ryder, 1993). Este hecho es de gran importancia para lograr la recuperación del suelo, ya que si el nemátodo, por ejemplo, se alimenta de bacterias fijadoras de nitrógeno, estas son benéficas

para las plantas acumuladoras de metales pesados. De esta forma, los nemátodos actuarían recirculando los nutrientes inmovilizados.

La actividad microbiana del suelo es aparentemente crítica en la disponibilidad de nitrógeno y fósforo (Cadisch and Giller, 1997) y varios estudios han demostrado que incrementando la complejidad de la comunidad descomponedora puede aumentar la velocidad de degradación y, por lo tanto, la liberación de nutrientes desde residuos de plantas (Coûteaux *et al.*, 1991), y la potenciación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (Holtan-Hartwig *et al.*, 2002; Kinraide and Sweeney, 2003). Existen bastantes resultados que muestran un marcado aumento en el crecimiento de plantas cuando se incrementan las complejas comunidades de microfauna alimentadas con poblaciones microbianas en laboratorio. (Anderson *et al.*, 1992; Alkemade *et al.*, 1992; Bouwman and Zwart, 1994; Ingham *et al.*, 1985). Estudios en terreno han indicado que el crecimiento de nemátodos puede contribuir significativamente a la disponibilidad y al ciclo de los nutrientes de las plantas (Alkemade *et al.*, 1992; Griffiths *et al.*, 1994).

Cuando se relacionan las plantas con la remediación de suelos contaminados con metales pesados, es posible encontrar variadas especies tolerantes acumuladoras e hiperacumuladoras de metales, por lo que también es posible detectar variadas metodologías, patentes y referencias bibliográficas (Anguissola *et al.*, 1999; Pence *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 1998; Watanabe, 2001). Pero esto no se repite con los nemátodos, dado que muchos de los reportes existentes son de estudios ecológicos que los definen incluso como indicadores del impacto que la contaminación puede causar sobre los ecosistemas (Neher, 2001). También se han reportado como indicadores de la recuperación de suelos contaminados con metales pesados ya que particularmente los nemátodos bacterívoros de vida libre son considerados colonizadores tempranos de estos suelos (Bongers, 1990; Bongers and Ferris, 1999). Muchos otros reportes científicos se basan en el estudio de las capacidades fisiológicas para tolerar metales pesados, en los genes y enzimas que permiten tolerar metales pesados, incluso en las similitudes secuenciales de sus genes con los de plantas y bacterias (Ha *et al.*, 1999; Barsyte *et al.*, 2001; Vatamaniuk *et al.*, 2001). Pero no existen reportes que mencionen o clasifiquen a los nemátodos como agentes remediadores o potenciadores de la remediación de metales pesados.

En consecuencia, es factible plantear el uso de nemátodos bacterívoros de vida libre para potenciar la actividad de bacterias y plantas bioremediadoras, y que son empleadas en procesos de descontaminación de suelos. Esto, en el bien entendido que dichas bacterias pudieran constituir una dieta adecuada para sustentar el aumento poblacional de los nemátodos bacterívoros, a la vez que los nemátodos bacterívoros se relacionan indirectamente con la fertilización de los vegetales, ya que pueden potenciar el desarrollo de la rizósfera, trayendo como consecuencia, un asentamiento más estable de plantas acumuladoras de metales pesados en ambientes alterados. Por todo esto, los nemátodos constituyen un grupo importante de considerar como estrategias combinada con la fitorremediación y la bioestabilización.

2.3. Sustentabilidad de la remediación biológica integrada

Los requerimientos para el desarrollo de la metodología de remediación biológica integrada que se propone implementar, involucra necesariamente el cultivo masivo de los tres elementos que constituyen la tríada mencionada anteriormente (planta-bacteria-nemátodo). En este contexto, se puede mencionar que:

i.- Las bacterias seleccionadas para formar parte de la tríada podrán ser cultivadas de manera tradicional en reactores o fermentadores controlados adecuadamente (Van der lelie *et al.*, 2000; Eweis *et al.*, 1999).

ii.- Las plantas pueden ser obtenidas y manejadas mediante técnicas tradicionales de cultivo y propagación (Wenzel *et al.*, 1999).

iii.- No existen en la actualidad técnicas para el cultivo masivo de nemátodos encontrados en la zona de Puchuncaví. Los nemátodos con los cuales se ensayará corresponden a especies bacterívoras de vida libre, para los cuales aún no se han reportado condiciones de cultivo en reactor o en masa.

Cabe mencionar que existen pocos estudios relacionados con nemátodos bacterívoros de vida libre. En relación a estos se destacan reportes de condiciones de cultivo para *Caenorhabditis elegans* siendo alimentado con levaduras y *Escherichia coli* (Barysytte *et al.*,

2001), así como también, se han detectado levaduras capaces de matar a *C. elegans* en cultivo, lo que ha dado origen a estudios de mecanismos de acción patogénica de levaduras como *Cryptococcus neoformans*, patógeno humano que también es capaz de matar *C.elegans* (Mylonakis *et al.*, 2002). Por otra parte, se han estudiado las relaciones existentes entre bacterias que están presentes junto a nemátodos patógenos de plantas, como es el caso de *Heterodera glycines*, patógeno del poroto de soya, junto al cual se encuentran bacterias del genero *Actinomadura* y *Streptomyces* (Nuor *et al.*, 2003), y también se ha podido identificar bacterias del suelo con capacidad supresora sobre nemátodos parásitos de plantas, como lo es el caso de las especies *rhizobium* sobre *Heterodera schachtii* (Yin *et al.*, 2003).

Sin duda las simbiosis adecuadas entre bacterias y nemátodos no siempre son las ideales, puesto que los nemátodos bacterívoros de vida libre pueden no estar en presencia de las mejores bacterias como alimento. Este no es el caso de ciertos nemátodos entomopatógenos, los cuales han sido aislados junto a las bacterias simbiotes que permiten su cultivo y uso como controladores biológicos de ciertos insectos, tal es el caso de algunos nemátodos del genero *Steinernema* y *Heterorhabditis* que controlan al escarabajo japonés (Smart, 1995; McCoy *et al.*, 2002). Estos nemátodos en sus estados dauer o juveniles, mantienen en sus sistemas digestivos a la bacteria simbiote entomopatógena *Photorhabdus luminescens* (Ciche and Ensign, 2003), para la cual se han desarrollado incluso modelos matemáticos de su cultivo comercial (Lebert *et al.*, 1998).

Si bien, el cultivo de nemátodos bacterívoros de vida libre, aislados de suelos contaminados con metales pesados, no se ha llevado a escalas mayores, existen las evidencias de cultivo de los nemátodos entomopatógenos, los cuales son cultivados de manera conjunta con la cepa bacteriana simbiote que permite su uso comercial como controladores biológicos de insectos (Ehlers, 2001). Estas experiencias serán los precedentes o guías que permitirán el desarrollo de metodologías de cultivo de un nemátodo bacterívoro y una bacteria *ad hoc*. En consecuencia, se deberá determinar que cepa bacteriana, de las aisladas de los mismos suelos muestreados, resulte mejor dieta para él o los nemátodos seleccionados, tarea que esta siendo desarrollada por la contraparte técnica del Instituto de Biología de la PUCV adscrito al FONDEF “*Desarrollo de metodologías y tecnologías para la recuperación de*

suelos contaminados con metales pesados, 2003”, y posteriormente estandarizar las óptimas condiciones de cultivo de los mismos.

2.4. Cultivo de nemátodos en bioreactores

2.4.1. Transferencia de oxígeno en bioreactores

Los cultivos de material biológico en medio líquido, en volúmenes inferiores a 500 mL, se realiza preferentemente en matraces. Este tipo de cultivo presenta los siguientes problemas:

El control del pH es ó muy ineficaz ó no posible, y como la mayoría de los microorganismos cambian el pH del medio, los resultados obtenidos de experimentos en matraces siempre deben ser tomados con precaución.

La transferencia de oxígeno es menor comparada a los bioreactores de tanque agitado, y a menudo la fuente de oxígeno es la limitante del cultivo.

Las condiciones en matraces no simulan condiciones de funcionamiento reales a escala mayor. Sin embargo, permite obtener valores de condiciones de operación como temperatura, pH, concentración de nutrientes, etc.

Cuando la aireación es superficial, se proporciona una cantidad menor de oxígeno para la mayoría de los cultivos. En cambio en reactores pequeños agitados a velocidades de 600 RPM o más, la oxigenación es homogénea. Entonces la única manera de que el suficiente oxígeno se pueda transferir al medio es por agitación (De la Torre, 2003).

Los reactores agitados mecánicamente y los reactores de agitación neumática (airlift), presentan mayores tasas de transferencia de oxígeno si se comparan con sistemas de oxigenación superficial. Sin embargo, existen diferencias entre estos reactores y la principal es que los últimos contienen un tubo que genera un loop en la circulación del fluido. Este loop permite obtener algunas ventajas, como por ejemplo:

Previene la fusión de las burbuja, lo que ocurre cuando se muevan en una dirección

Distribuye igualmente tensiones o fuerzas de corte a través del reactor y proporciona así un ambiente más sano para el crecimiento de las células.

El movimiento cíclico realizado del flujo del líquido a través del reactor aumenta las tasas de transferencia de calor.

El loop divide físicamente el reactor airlift en 2 secciones. La zona vertical donde se produce la elevación de aire, lo que arrastra líquido, existiendo así una fuerza ascendente en el reactor. Esta fuerza ascendente se contrarresta por una fuerza hacia abajo, que genera un flujo descendente de líquido o zona descendente, generándose una circulación dentro del reactor (Chisti, 1998; Contreras *et al.*, 1998).

Los reactores airlift no tienen turbinas para disminuir el diámetro de la burbuja y aumentar la transferencia de oxígeno hacia el medio ($k_L a$). Para compensar para esto, se diseñan con una razón altura/diámetro más grande para mejorar eficacia de la transferencia del oxígeno, ya que: - i. se aumenta la presión en la base del reactor y aumenta la concentración de la saturación de oxígeno en la base (C^*), - ii. aumenta el tiempo en que las burbujas pasan por el reactor, aumentando el tiempo de residencia del gas (Chisti, 1998; Molina *et al.*, 1997; Gòdia and Solà, 1995).

Mientras se elevan las burbujas, transfieren oxígeno y reciben dióxido de carbono desde el medio. Si el reactor es demasiado alto, las burbujas en la parte superior serán ricas en anhídrido carbónico y pobres en oxígeno, y las células en estas zonas tendrán poca disponibilidad de oxígeno. Junto con lo anterior, también aumenta el tiempo de intercambio gaseoso, y se dificultan el control de operación de los reactores y también la construcción de los mismos.

Los reactores airlift generalmente permiten lograr mejores productividades, y la razón principal es porque distribuyen mejor las fuerzas de corte a través del reactor. Consecuentemente, las células no se exponen a las variaciones grandes en fuerzas y tensiones y pueden crecer en un ambiente físico más estable (Visnovsky *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 1996).

2.4.2. Uso de reactores para cultivo masivo de nemátodos

Los reactores usados para el cultivo de material biológico pueden tener variadas configuraciones, existiendo reactores que utilizan soportes sólidos, semisólidos y líquidos,

de agitación mecánica, hidráulica y gaseosa, entre otras variables por las cuales podrían ser clasificados (Nicolella *et al.*, 2000). Los reactores cuyo mecanismo de agitación esta basado en principios neumáticos han tenido un desarrollo relativamente reciente. Estos reactores, se pueden describir como una columna de burbujas ascendiendo por un tubo. El aire se alimenta típicamente a través de un anillo difusor en el fondo del tubo central que permite controlar la circulación del aire y del medio (Kennard and Janekeh, 1991; Marquéz *et al.*, 1999). Los flujos de aire que forman burbujas, y el gas residual son captados en la tapa superior de la columna. El líquido desgasificado entonces fluye hacia abajo y se produce una circulación y homogenización en el estanque. El tubo o reactor se puede diseñar para servir como intercambiador de calor interno, o un intercambiador de calor puede ser agregado mediante un loop externo de circulación.

Los sistemas airlift proporcionan algunas ventajas sobre bioreactores convencionales, tales como el fermentador estándar:

Diseño simple, sin partes móviles o sin agitador mecánico. Lo que se traduce en menor requerimiento de mantención, menor riesgo de defectos y fácil esterilización.

Menores fuerzas de corte y mayor flexibilidad. Este sistema puede ser usado para crecer células de plantas y animales, las cuales son muy delicadas.

Eficiente mezcla de gas.

Gran área o interfase específica de intercambio, sin grandes requerimientos de energía.

Buen control de flujos y eficiente mezcla.

Buenas definiciones de tiempos de residencia para todas las fases.

Mayor transferencia de masa, y tasa de intercambio de oxígeno en reactores de mayor presión.

Posibilidad de manejar volúmenes a escala industrial.

Mayor tasa de remoción de calor en relación a sistemas tradicionales.

Los sistemas airlift también podrían presentar algunas desventajas, como por ejemplo:

Mayor inversión inicial cuando se trata de procesos a gran escala.

Mayores cantidades de aire a inyectar cuando se requieren mayores presiones, o escalas industriales de operación.

Baja eficiencia para la compresión de gases.

Prácticamente imposible mantener un cierto nivel de sustrato, nutrientes y oxígeno, cuando se tiene un organismo circulando en condiciones “siempre cambiantes”.

Separación ineficiente de la mezcla gas/líquido cuando se llega a formar espuma.

Estas desventajas pueden y deben ser minimizadas en el diseño de sistemas airlift. Por ejemplo; si solamente una zona del reactor sirve para que los organismos se alimenten, los organismos pueden experimentar continuos ciclos de alto crecimiento, seguido de períodos de privación, resultando una baja producción de biomasa, mortalidad, y aparición de subproductos no deseados. El diseño con múltiples puntos de alimentación solucionaría este problema, especialmente si se trata de operaciones a gran escala. Situaciones similares pueden ocurrir cuando existe una sola entrada de oxígeno, por lo cual siempre se piensa en un difusor de varios puntos de entrega de gas (Sáez *et al.*, 1998; Nicolella *et al.*, 2000 Nicolella *et al.*, 2000(a)).

2.4.2.1. Principios de operación de los reactores

La fuerza de entrada del aire al reactor airlift controla la mayoría de los parámetros de operación y afecta la economía de la operación del mismo. Comparando la operación de bioreactores, este parámetro es frecuentemente de mucha importancia. Mas aún, el cálculo de éste parámetro resulta esencial. Típicamente toda la energía ingresada como agitación neumática proviene desde un gas comprimido, el gas confiere energía a través de su expansión isotérmica desde la presión hidrostática que debe vencer en la entrada del reactor hasta la parte superior del mismo. Una segunda fuente de energía es la energía cinética que el gas aporta en su entrada al medio líquido. No obstante, en la mayoría de los birreactores, la energía cinética es despreciable frente a la energía aportada mediante la expansión isotérmica del gas. Cuando la energía cinética es ignorada, la energía específica de entrada,

o la energía por unidad de volumen de líquido esta dada por la ecuación (1), la cual describe la columna de burbujas:

$$P_G / V_L = \rho_L g U_G \quad (1)$$

y para el bioreactor, la ecuación (2):

$$P_G / V_L = (\rho_L g U_{Gr}) / (1 + A_d / A_r) \quad (2)$$

Donde, tanto en la ecuación (1), como en la (2), la velocidad superficial del gas (U_G o U_{Gr}) generalmente es considerada como un promedio, o muy similar a un valor en cualquier punto axial del reactor. Por ejemplo; la energía neumática de entrada en bioreactores normalmente no excede los 3 kW/m^3 , un valor de 2 kW/m^3 ha sido muy usado como valor máximo. Pero, por otro lado, en cultivos de células animales un valor de 100 W/m^3 , es considerado normal (Chisti, 1998).

Para estimar el valor promedio de la velocidad superficial del gas (U_G), frecuentemente se utiliza la ecuación (3):

$$U_G = (Q_L R T) (h_L A \rho_L g)^{-1} \ln (1 + \rho_L g h_L / P_h) \quad (3)$$

la cual se aplica a la columna de burbujas. En esta ecuación Q_L , es el flujo molar del gas, h_L es la altura estática del gas libre de líquido, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, A es el área de la sección transversal de la columna, y P_h es la presión en la zona superior del reactor. Sin embargo, en la mayoría de los casos se asume un comportamiento de gas ideal, entonces la ecuación (4) puede ser usada para calcular la velocidad superficial hipotética del gas (U_G), que puede ser convertida en la velocidad superficial del gas (U_{Gr}) en el ascenso:

$$U_G = U_{Gr} A / A_r \quad (4)$$

Donde A es la sumatoria del área de ascenso y descenso, y A_r es el área de la sección transversal de la columna ascendente (Chisti, 1998).

Los reactores airlift han sido utilizados en variados estudios enfocados a lograr sistemas de cultivo biológico y también en aplicaciones industriales, entre ellas se puede mencionar el cultivo de bacterias, estudios para la remediación de matrices contaminadas con metales pesados, cultivo de células animales, cultivo de células vegetales, cultivo de células de insectos, etc. Por ejemplo; existen reportes de tratamiento de efluentes contaminados con cobre, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* cultivada en un bioreactor airlift, con el cual se obtuvieron excelentes formaciones de biofilm y altos rendimientos de remediación (Qureshi *et al.*, 2001). También se han reportado ensayos de degradación de metales complejados con EDTA, en reactores airlift inoculados con consorcios bacterianos (Thomas *et al.*, 1998). Los reactores airlift resultan muy atractivos y útiles cuando las células u organismos que se desean cultivar son muy sensibles y/o delicados, características que hace imposible el uso de agitación mecánica, por lo destructivo que esto podría resultar (Kennard and Janekeh, 1991; Ehlers, 2001). En este contexto, los nemátodos son organismos multicelulares frágiles y móviles, que necesitan ciertas condiciones ambientales (físicas) para su reproducción, por lo que requieren condiciones no agresivas o destructivas en el reactor en que se intente su cultivo. Es por ello que los únicos reportes de cultivo masivo de nemátodos han sido en reactores airlift, tal es el caso del cultivo de nemátodos entomopatógenos *Steinernema* y *Heterorhabditis spp.* alimentados con la bacteria simbiótica *Photorhabdus luminiscens* usada como control biológico de insectos, siendo el nemátodo el vector de dicha bacteria (Strauch and Ehlers, 1998). Estos cultivos han sido ensayados con cierto éxito en sistemas de cultivo por lotes, siendo los rendimientos menores a los observados en los cultivos de nemátodos sobre larvas de insectos (Ricci *et al.*, 2003; Ehlers, 2001; Gil *et al.*, 2002).

Recientemente, se han reportado condiciones de cultivos y complejos medios de cultivo para el nemátodo entomopatógeno *Steinernema*. Estos medios contienen peptona, hemoglobina, colesterol, extracto de levadura, aceite y extracto de hígado de pollo u otros animales, y se menciona que la calidad y biodisponibilidad de las proteínas es muy importante para una buena producción de nemátodos de este tipo, así como también la presencia de la bacteria simbiótica *Xenorhabdus sp.*, en concentraciones apropiadas (De la Torre, 2003, Young *et al.*, 1998).

Se ha descrito que cultivos de *Steinernema feltiae* en medios definidos puros y en medios alimentados con la bacteria *Xenorhabdus nematophilus* tiene una cinética que obedece a una forma sigmoideal, y que puede ser modelada usando una reparametrización del modelo de Gompertz, el cual sería como la ecuación (5) muestra:

$$C/C_0 = (C/C_0)_{\max} * e \left[-e (\mu_{\max} e / (C/C_0)_{\max} (\lambda - t) + 1) \right] \quad (5)$$

Donde, C_0 es la concentración inicial de nemátodos, C es la concentración de nemátodos al tiempo t , λ es el tiempo de la fase lag, por ejemplo, el tiempo necesario para que los nemátodos pasen desde el estado juvenil a adulto, seguido de la fertilización de los huevos, $\mu_{\max} = (d(C/C_0)/dt)_{\max}$ es el período del cultivo en que la velocidad de crecimiento es máxima correspondiente al período de mayor liberación de huevos y máxima obtención de estados juveniles. El valor asintótico de $(C/C_0)_{\max}$ es el factor de multiplicación (Chavarría-Hernández and De la Torre, 2001).

Este modelo y los resultados que las modelaciones arrojen podrían ser utilizadas para comparar las productividades y rendimientos obtenidos con diferentes medios de cultivos y/o suplemento de los mismos.

De la Torre (2003), también ha reportado que los requerimientos de oxígeno de un cultivo de *Steinernema feltiae* alimentado con la bacteria *Xenorhabdus nematophilus* presentan variaciones dependiendo de la proporción de nemátodos juveniles y adultos presentes en el medio, ya que los nemátodos juveniles a diferencia de los adultos “no comen bacterias” y por ende tienen un metabolismo basal con menor demanda de oxígeno. Con todo, la demanda máxima de oxígeno reportada es de $2,7 \times 10^{-7}$ g O_2 /Nem*h, estimando una velocidad de transferencia de oxígeno aproximada de $2,2$ g O_2 /L* h, para satisfacer estas demandas. De la Torre (2003), también hace referencia al grado de turbulencia, y al respecto se ha reportado que el número de nemátodos disminuye cuando el valor del número de Reynolds (Re) refleja altos niveles de turbulencia, por lo que concluyen que las condiciones deben permitir el acoplamiento de los nemátodos y así obtener mayores o máximos rendimientos. En este sentido, el uso de un bioreactor airlift con loop externo permite generar condiciones no homogéneas que facilitan el contacto en machos y hembras (Ehlers, 2001). En definitiva, es claro que se deben estudiar las condiciones de turbulencia

(Re) para determinar las condiciones de operación y la geometría del reactor “ideal” para el cultivo de los nemátodos y su fuente específica de alimentación. Por lo tanto, la definición apropiada de indicadores como el número de Reynolds (Re), número de Sherwood (Sh) y el k_{La} , resultan muy importantes y decisivos para la implementación de un sistema de cultivo complejo y específico como lo es una dupla de nemátodos y bacterias.

Poder controlar la composición, cantidad y velocidad del gas infiltrado en un reactor, la factibilidad de predecir los efectos de operación, las altas tasas de obtención de biomasa posibles de lograr, y la facilidad de control de la operación de los mismos, además de los reportes sobre usos de reactores airlift para el cultivo de nemátodos entomopatógenos, hace que esta sea la alternativa idónea para establecer la producción masiva de nemátodos aislados desde Puchuncaví. Por otra parte, un sistema de cultivo continuo puede ofrecer ventajas respecto al control de las condiciones internas del reactor (más constantes), pero en estos casos existe la imposibilidad de co-cultivar continua y simultáneamente los nemátodos y bacterias de las cuales éstos se alimentan. Por lo tanto, se estima conveniente ensayar y comparar sistemas de cultivo de mezcla completa y sistemas de cultivo por lotes o lotes alimentados.

3. ANALISIS DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

Dentro de las patentes que actualmente respaldan las investigaciones realizadas en bio y fitoremediación de metales pesados en suelos, es posible encontrar más de 100 patentes vinculadas a bioremediación de metales pesados, más de 30 patentes basadas en fitoremediación de metales pesados, y más de 80 patentes que relacionan nemátodos y metales pesados. Específicamente, cuando se realiza una búsqueda relacionando nemátodos y metales pesados, es posible verificar que existen 87 patentes que de alguna manera relacionan estos términos. Sin embargo, al realizar una búsqueda que relacione simultáneamente los términos fitoremediación, nemátodos y metales pesados, sólo 6 patentes se encuentran en el banco de patentes de Estados Unidos (<http://patft.uspto.gov/netahtml/search-bool.html>), las cuales se señalan a continuación:

- **6.590.140; Metal-regulated transporters and uses therefore, 6.162.900; Metal-regulated transporters and uses therefore, 5.846.821; Metal-regulated transporters and uses therefore:** Estas tres patentes relacionan genes que codifican moléculas transportadoras de metales y permiten a las plantas resistir o tolerar mejor contaminantes como los metales pesados. En ellas se habla de la fitoremediación proyectándola con plantas genéticamente mejoradas con estos genes anteriormente aludidos. Los nemátodos son mencionados como elementos que poseen proteínas y mecanismos que también permiten tolerar metales pesados, pero no son mencionados como agentes remediadores.
- **6,277,274 Method and apparatus for treating stormwater runoff:** Esta invención se basa en el desarrollo de un sistema filtrante empleado en la remediación de compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en aguas subterráneas y aguas lluvias con un funcionamiento de dos etapas. La primera consiste en un filtro que contiene suelo, materia orgánica y plantas herbáceas. Esta etapa menciona una relación ecológica entre

plantas y la fauna del suelo, en la cual se incluye los nemátodos y todos los habitantes del suelo en general. La segunda etapa presenta un segundo filtro en el cual la separación de los contaminantes es realizado por métodos físicos.

- **6,489,537 Phytochelatin synthases and uses therefore:** Esta patente está relacionada con diversos usos de la enzima fitoquelatina sintetasa, presente en plantas, y también detectada en levaduras y nemátodos. Uno de los usos mencionados es la fitoremediación, y también se proyecta su aplicación en el desarrollo de vegetales transgénicos que posean la capacidad de resistir la presencia de metales pesados. No obstante, las alusiones a nemátodos no los relaciona organismos vivos directamente involucrados en el proceso de remediación.
- **6,569,321 Method and apparatus for treating stormwater runoff:** Esta patente está vinculada a la patente N° 6,277,274 señalada anteriormente, siendo una variación de la misma. En este registro se hacen más amplias las aplicaciones de sistemas de filtración de aguas, se mencionan conceptos de fitoremediación, se incorpora el concepto de bioretención, se habla de aplicaciones en aguas de riego (agricultura), entre otros. Sin embargo, la alusión a los nemátodos no es mayor que la mencionada en el caso anterior.

Entonces, es factible la posibilidad de desarrollo y registro de nuevas estrategias de remediación incluyendo sistemas biológicos que interaccionen entre sí para un fin común y donde los nemátodos sean una parte activa del proceso. Además, no existen registros de patentes para el cultivo de nemátodos bacterívoros de vida libre en reactores alimentados con enterobacterias, por lo que esto también puede constituirse en una metodología patentable.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las plantas acumuladoras de metales pesados constituyen el agente remediador de la estrategia integrada de remediación biológica integrada planteada en el proyecto “*Desarrollo de metodologías y tecnologías para la recuperación de suelos contaminados con metales pesados, 2003*”. La Escuela de Agronomía de la PUCV, que participa en este proyecto, estudia y selecciona las plantas idóneas para realizar la captación de los metales contaminantes a través de sus raíces (Raven and Edwards, 2001), ya que no tan solo el agua y los nutrientes son absorbidos por estos tejidos de las plantas, sino que también los metales contaminantes (Pederson *et al.*, 2002). Al respecto, las raíces también son capaces de captar sustancias bioactivas como lo son, por ejemplo; ácidos orgánicos y fitohormonas producidas por algunas bacterias de la rizósfera, sustancias que pueden estimular el crecimiento vegetativo (Trujillo-Roldán *et al.*, 2003; Cunninham *et al.*, 1995).

La interacción entre las bacterias de la rizósfera y las plantas se ve importantemente facilitada por la acción de nemátodos de vida libre. Esto debido a que su poco eficiente sistema digestivo, su movilidad, y las secreciones amoniacales que liberan al medio promueven un enriquecimiento microbiológico y nutricional de la rizósfera (Alkemade *et al.*, 1992; Griffiths *et al.*, 1994). Por estas razones resulta muy atractivo el planteamiento del proyecto anteriormente citado, ya que existen variados reportes que indican las mejoras en las tasas de crecimiento y metabolización de nutrientes cuando el complejo bacterias de la rizósfera – planta, esta complementado con nemátodos, incluso cuando estos son parásitos de raíces (Tu *et al.*, 2003; Ibewiro *et al.*, 2000). Sin embargo, como ya se ha expuesto, los nemátodos bacterívoros de vida libre, presentes en la zona contaminada de Puchuncaví, no han sido cultivados con el fin de obtener grandes masas de los mismos, a diferencia de nemátodos entomopatógenos y patógenos de plantas que han sido ensayados en sistemas de control biológico (Strauch and Ehlers 1998; Ehlers, 2001; Shapiro-Llan and Gaugler, 2002).

Respecto de los nemátodos de vida libre, recientemente se ha reportado la obtención de grandes cantidades de nemátodos no bacterívoros, en un medio de cultivo sintético constituido con extractos de levaduras y harinas vegetales, para elaboración de alimento para peces (Ricci *et al.*, 2003). En consecuencia, todo lo anteriormente expuesto respalda la necesidad de desarrollar una metodología y condiciones óptimas de cultivo de los nemátodos bacterívoros aislados desde los suelos contaminados con metales pesados de la zona de Puchuncaví.

La evidencia que existe sobre las potencialidades y efectividad de fitoremediación de metales pesados, o la fitoextracción de metales mediante plantas hiperacumuladoras de metales pesados, y la posibilidad de que esta capacidad sea aumentada por poblaciones bacterianas de la rizósfera. Así como también, la potencialidad de estimular la diversidad poblacional de los ecosistemas de suelos cuando hay una elevada población de nemátodos, y al mismo tiempo, la posibilidad de manipular la colaboración entre éstos elementos biológicos para la instauración de ecosistemas en los suelos alterados por la presencia de contaminantes, permite plantear que; “la utilización simultánea de bacterias y nemátodos tolerantes a la contaminación por metales pesados y plantas acumuladoras de metales pesados, permitiría el desarrollo de una metodología de remediación de suelos contaminados con metales pesados mejorada, de mayor o elevada eficiencia y que permita proyectar mejorías en relación a tiempos más cortos de tratamiento”, planteamiento que concuerda con la hipótesis de trabajo del proyecto de remediación biológica integrada que se plantea para la zona de Puchuncaví, en cual se enmarca el desarrollo de la presente tesis.

En definitiva, y en consecuencia de lo anterior, la hipótesis de trabajo de esta tesis plantea que: “Sería posible generar un proceso de cultivo masivo de nemátodos del género *Rhabditido* de vida libre aislados de la zona contaminada con metales pesados de Puchuncaví, a través de reactores de lecho líquido, mediante un adecuado manejo de las condiciones de operación del mismo”.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un proceso de propagación y cultivo en masa de nemátodos bacterívoros de vida libre, aislados desde suelos contaminados con metales pesados (zona de Puchuncaví), alimentados con enterobacterias, que permitan ser utilizados en una metodología de remediación biológica integrada.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sobre las muestras extraídas del sector de Puchuncaví, se desarrollarán los siguientes objetivos específicos para dar cumplimiento al objetivo general anteriormente planteado:

1. Aislar los nemátodos bacterívoros de vida libre de suelos contaminados con metales pesados en la zona de Puchuncaví.
2. Identificar la especie de nemátodo bacterívoro de vida libre aislado.
3. Caracterizar el mecanismo de reproducción y el ciclo de vida del nemátodo bacterívoro de vida libre aislado.
4. Establecer las condiciones de cultivo y de mantención del nemátodo bacterívoro de vida libre aislado.
5. Determinar las condiciones de cultivo del nemátodos bacterívoros de vida libre aislado en cultivos líquidos matraces.
6. Estudiar la cinética del cultivo del nemátodo bacterívoro de vida libre aislado en reactores de mezcla completa de agitación mecánica.
7. Estudiar las condiciones de operación para el cultivo del nemátodo bacterívoro de vida libre aislado en un reactor de lecho circulante de agitación neumática diseñado para estos efectos.
8. Evaluar la sobrevivencia de los nemátodos cultivados en medio líquido, en sustrato sólido (suelo) contaminado con metales pesados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Metodologías experimentales

A continuación se exponen procedimientos y metodologías que serán asumidas como base para el desarrollo de los diferentes experimentos.

7.1.1. Muestreo y aislamiento de nemátodos de vida libre

La zona geográfica estudiada corresponde al sector Oriente respecto de la ubicación de la chimenea de la Fundición Ventanas de ENAMI, comuna de Puchuncaví. En este sector se ha reportado que en los primeros 20 cm del suelo es posible encontrar concentraciones de Cu que van desde los 45,4 a 3.718 mg/Kg, mientras que para Zn 124,8 a 174,4 mg/Kg, para Pb 21,3 a 353 mg/Kg, para Cd 0,05 a 1,5 mg/Kg, y para el Fe 47.531,3 a 50.261 mg/Kg (Ginocchio *et al.* 2004). El área de muestreo corresponde aproximadamente a 0,4 km², comprendida entre las siguientes coordenadas geográficas; al Norponiente 32°44'17.68''S, 71°25'20.58''O, al Nororiente 32°44'18.30''S, 71°25'08.93''O, al Surponiente 32°44'36.03''S, 71°25'20.61''O, y al Suroriente 32°44'36.63''S, 71°25'08.25''O. Estos suelos se caracterizan por presentar una granulometría fina (arenosa), por lo cual a veces son también llamados dunas estabilizadas. El área de estudio presenta baja humedad y poca vegetación. Para la toma de muestras se escogieron lugares que presentaran áreas verdes y mayor humedad en comparación con el entorno inmediato.

Las campañas de muestreo de los suelos realizadas el año 2004, en las fechas 21 de Marzo, 03 de Abril, 26 de Mayo, 11 de Agosto, en las cuales se tomaron muestras en 6, 40, 8 y 4 puntos diferentes respectivamente. En la 1^a, 2^a y 3^a campaña de muestreo de suelos, se tomaron muestras de aproximadamente 500 g de suelo, se procesaron 100 g de cada una de las muestras, y en estas ocasiones no fue posible aislar nemátodos bacterívoros de vida libre, lo cual fue coincidente con la pronunciada sequía del sector. La 4^a campaña de muestreo de suelos, realizada después de avanzada la estación de lluvias, fue desarrollada

tomando muestras de aproximadamente 1000 g de suelo, se procesó la totalidad de la muestra y se calculó la población de nemátodos obtenida por cada 100 g de suelo. Los lugares de muestreo seleccionados fueron los sectores de mayor humedad, privilegiándose los sectores con cubierta vegetal.

El aislamiento de los nemátodos de vida libre se realizó a partir de muestras de 100, 500 y 1000 g de suelo (McCoy *et al.*, 2002). Cada muestra fue colocada en un balde con 1 a 2 L de agua. Se mezcló y dejó reposar durante 5 a 10 s para permitir que las partículas grandes decantaran. La suspensión obtenida fue pasada por tamices de 500 micras (35 mesh), 250 micras (60 mesh), 106 micras (140 mesh), 53 micras (270 mesh), y finalmente 38 micras (400 mesh), colectando en cada caso el agua y las partículas retenidas en cada tamiz. La suspensión final fue traspasada a embudos de vidrio, los cuales se prepararon poniendo una rejilla plástica y papel filtro (papel tisú). Para evitar fugas de agua, el extremo del embudo de vidrio tiene adosada una manguera flexible, la cual se cerró herméticamente con una pinza. Las muestras se mantuvieron de esta forma durante 48 Hr, y luego fueron colectadas en frascos de 50 mL y refrigeradas a 4 °C durante 12 Hr, de manera que los nemátodos decantaran. Finalmente, las muestras fueron concentradas a volumen de 10 mL, esto con ayuda de una pizeta, obteniéndose los nemátodos en una concentración que facilitó el análisis microscópico.

Después de los análisis morfológicos, taxonómicos y moleculares se determinó que el nemátodo usado en todos los experimentos de esta Tesis pertenece al género *Cuticularia* y que probablemente sea una especie *Cuticularia sp.* chileno. Estos análisis se describen más adelante.

7.1.2. Conteo de nemátodos

El recuento de los nemátodos se realizó en un portaobjetos excavado (3 excavaciones), donde se ubicó una alícuota de 0,1 mL de la muestra recientemente homogeneizada por agitación. El análisis se hizo bajo microscopio. Este conteo se realizó mínimo 3 veces por muestra, de manera de obtener un conteo promedio representativo de cada conteo realizado. Los valores determinados se registraron como nemátodos por mililitro (Nem/mL) (Nuor *et al.*, 2003). Estos conteos se realizaron con una frecuencia diaria cuando se realizaron

estudios cinéticos del cultivo en medio líquido. Los índices de viabilidad podrán ser obtenidos mediante el conteo de los nemátodos que presenten motilidad (McCoy *et al.*, 2002). Los conteos u observaciones bajo microscopio también son usados para determinar el estado de madurez de los nemátodos, proporción de estados juveniles y adultos, presencia de huevos, entre otras variables propias del cultivo y reproducción de los nemátodos (Yeates, 1998; Yeates *et al.*, 1999).

7.1.3. Caracterización morfológica de los nemátodos

Veinticinco especímenes de cada estado de desarrollo de los nemátodos fueron examinados (adultos y jóvenes) vivos y muertos por shock térmico generado al incubarlos en suero salino a 60 °C. Los nemátodos se fijaron en formalina trietanolamina (TAF) (Courtney *et al.*, 1955) y fueron montados en glicerina anhidra (Seinhorst, 1959). Los especímenes se montaron en portaobjetos provistos de pequeños bordes de vidrio para evitar aplastarlos al poner sobre ellos el cubreobjetos. Las observaciones se hicieron utilizando un microscopio Olimpo BX81 equipado con lente diferencial de contraste e interferencia (Stock *et al.* 2004). Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital.

7.1.4. Caracterización molecular de los nemátodos

La caracterización molecular de la especie fue hecha por el análisis de la secuencia del DNA de la subunidad ribosomal menor 18S (18S rDNA). Cincuenta especímenes se usaron para la extracción de los ácidos nucleicos. Una vez triturados y homogeneizados los nemátodos, los ácidos nucleicos fueron obtenidos usando fenol-cloroformo, y luego aplicando una precipitación etanólica con acetato de amonio, según lo descrito por Ausbel *et al.* (1989). El pellet resultante se lavó con etanol 70%, y resuspendió en tampón TE (pH 8,0), luego fue tratado con 50 µg de RNAsa A (1 h a 37 °C), y el ADN se recuperó utilizando precipitación con etanol. El ADN extraído fue cuantificado por espectrofotometría en el rango UV, y luego 100-200 ng se utilizaron para la reacción de PCR (Polimerase Chain Reaction).

El PCR fue utilizado para amplificar una porción del gen de la subunidad menor ribosomal utilizando el par de partidores 18S1A (5' a 3', posición 7122 a 7138, secuencia

GGCGATCGAAAAGATTAAGCCATGCA), y 18S3B (5' a 3', posición 803 a 787, secuencia GGCGATCGATTGGCAAATGCTTTCGC), y el par 18S4A (5' a 3', posición 747 a 759, secuencia GGCGATCGACGCGAGGTGAAAT), y 18S5B (5' a 3', posición 1486 a 1469, secuencia GGCGATCGAGACGGGCGGTGTGTACAA) (Baldwin *et al.*, 1997). Las amplificaciones se realizaron en 25 µL de reacción que contenían 0,5 µM de cada primer, 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfatado, y una concentración de 2 mM de MgCl₂. Los parámetros del ciclo de PCR incluyeron la desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguido por 32 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, y 72 °C por 7 min.

Los fragmentos amplificados se separaron en geles de agarosa y se purificaron con un juego de extracción de gel de Qiagen. Los fragmentos se secuenciaron utilizando Kit de secuenciación “BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems, ROCHE). El análisis de la secuencia se llevó a cabo empleando el secuenciador automatizado ABI 377 (ABI, Perkin- Elmer).

La secuencia de la subunidad 18S del nemátodo aislado se comparó con la de un nemátodo clasificado como *Cuticularia sp.* no identificado presente en GenBank (Ref. N° U81583), encontrándose un alto nivel de similitud con dicha secuencia. Esta comparación fue realizada utilizando la herramienta BLASTN de Genbank.

La secuencia de 18S del nemátodo aislado ha sido depositada en el banco de datos de GenBank, lo cual constituye un aporte científico de la presente Tesis.

7.1.5. Medio de mantención de los nemátodos

Durante los ensayos de mantención en el tiempo de los nemátodos, éstos fueron almacenados a temperatura ambiente y bajo refrigeración (4 – 10 °C) en agua destilada estéril (Nuor *et al.* 2003), en suero fisiológico estéril (NaCl 0,9 %) (McCoy *et al.*, 2002), y en tampón M9 estéril. El tampón M9 está constituido por: 6 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 5 g/L NaCl y 0.25 g/L MgSO₄.7H₂O, en agua destilada (Brenner, 1974).

Los medios, tampones, agua, y materiales fueron esterilizados por autoclavado.

7.1.6. Medios de cultivo

Los nemátodos fueron cultivados en diferentes medios de cultivo, los que se describen a continuación:

Medio STB (Buecher and Popiel, 1989): 3% p/v caldo de soya tripticaseína y 0.5% p/v extracto de levadura.

Medio P1 (modificado de Friedman *et al.*, 1989): 2% p/v harina de soya desgrasada, 0.5% p/v extracto de levadura, 1% p/v yema de huevo deshidratada grado alimentario, 0.5% p/v NaCl y 4% v/v aceite de maíz grado alimentario.

Medio P2 (modificado de Surrey and Davies, 1996): 2.3% p/v extracto de levadura, 1.25% p/v yema de huevo deshidratada grado alimentario, 0.5% p/v NaCl y 4% v/v aceite de maíz grado alimentario.

Medio ABP (modificado de Buecher and Popiel, 1989): 3% p/v agar soya tripticasa, 0.5% p/v extracto de levadura, 4×10^{-5} % p/v colesterol.

Medio NBTA (Akhurst, 1980): 2.3% p/v agar nutritivo, 0.025% p/v azul de bromotimol y 0.004% p/v cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).

Medio M9: KH_2PO_4 3 g/L, Na_2HPO_4 6 g/L, NaCl 5 g/L, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L, (Brenner, 1974), Aceite de canola 10 ml/L, *Escherichia coli*, 10^7 Bact/mL.

Medio Vegetal: Manzana fresca 20 g/L, Tomate 20 g/L, Papa 20 g/L, Zanahoria 20 g/L, Tierra de hoja 100 g/L, Agua destilada.

Medio M9C: en tampón M9, se disolvió una mezcla cereal Trigo: Maíz: Avena: Arroz; proporción 1:1:1:1, que permitió obtener la siguiente composición con cada litro de medio; Proteínas 0,501 g, Grasas 0,075 g, Carbohidratos 3,895 g, Fibra dietética 0,150 g, Oligosacáridos 0,095 g, Sodio 9,750 mg, Potasio 8,500 mg, Vitamina A 37,500 ug ER, Vitamina C 4,000 mg, Vitamina D 30,500 ug, Vitamina E 0,300 mg ET, Tiamina (B1) 0,045 mg, Niacina (PP) 0,240 mg, Vitamina D60,013 mg, Ac. Fólico 4,500 mg, Vitamina B 120,025 ug, Biotina 0,165 ug, Ac. Pantoténico 0,055 mg, Calcio 20,750 mg, Hierro 0,600

mg, Fósforo 13,000 mg, Yodo 8,000 ug, Zinc 0,500 mg. Además este medio se complementó con 0,5 g/L, Glucosa 4 g/L, KCl 8,5 g/L, Aceite de maravilla 10 g/L.

Para los casos en que fue necesario preparar medio sólido para los nemátodos (placas de agar), el medio M9C, se complementó con 15 g/L de agar.

Respecto del cultivo de bacterias, estas fueron crecidas en el medio EP, que se describe a continuación:

EP: Extracto de levadura 05 %, Peptona 3 %, en agua destilada.

EP sólido: EP complementado con Agar al 2,3 %.

Los medios, tampones, agua, placas y matraces fueron esterilizados por autoclavado.

7.1.7. Inóculo de nemátodos

Se generó un inóculo común para ser utilizado en todos los experimentos en que se compararían medios de cultivo o condiciones de incubación. Este inóculo fue fabricado cosechando alrededor de 30 placas Petri inoculadas con 500 a 2.000 nemátodos cada una, e incubadas alrededor de 35 d, temperatura ambiente, y en oscuridad. Luego de obtener una gran cantidad de nemátodos en agua destilada estéril se determinó una densidad de 15.000 Nem/mL. Esto constituyó el stock de nemátodos para inocular los siguientes experimentos.

7.1.8. Cultivo de los nemátodos en medio sólido

El cultivo de los nemátodos en medio sólido fue desarrollado en placas Petri. En un inicio, con el fin de mantener vivos y en buenas condiciones a los nemátodos se cultivaron en placas cuyo inóculo fue de una densidad de 500 nemátodos para cada placa Petri. Para los estudios del ciclo de vida y reproducción de los nemátodos, los inóculos en las placas siempre fue el mismo y se usó 2.300 nemátodos por cada placa.

7.1.9. Cultivo de nemátodos en medio líquido

Los cultivos en medio líquido de los nemátodos fueron desarrollados utilizando un inóculo de 400 Nem/mL. Los cultivos se desarrollaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL de volumen con un volumen total de medio M9C de 50 mL máximo. Las condiciones de funcionamiento determinadas para el Shaker Orbital de sobremesa, correspondió a una velocidad de agitación de 100 RPM (una vez determinada la agitación óptima). Cuando se realizaron cultivos en medio líquido utilizando el reactor airlift de loop externo no convencional, se procedió al llenado del reactor con el medio M9C, y posteriormente a su autoclavado. Una vez enfriado el reactor y el medio a temperatura ambiente, se procedió a la conexión de la línea de aire, cuyo flujo se regulaba con un rotámetro (0,1 a 1 L/min), y posteriormente se procedió a la inoculación con los nemátodos a una densidad final de 500 Nem/mL. En los cultivos se usaron flujos de aireación de 0,3 vvm, pero en las determinaciones de k_{La} , se usaron flujos desde 0,1 hasta 0,5 vvm.

Para determinar la agitación óptima de incubación de los nemátodos en un medio líquido, se realizaron varios cultivos de los nemátodos en un medio M9 + Oil, incubándolos a diferentes condiciones de agitación, siendo las demás condiciones iguales y constantes para todos los cultivos experimentados. La temperatura de incubación correspondió a la temperatura ambiental (20 ± 5 °C), el tiempo de incubación fue de 22 d. Para todos los cultivos se utilizó medio M9C + Oil, matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo, y un inóculo proveniente común para todos los ensayos (mismo stock) de 500 Nem/mL (25.000 nemátodos iniciales). Cada incubación fue realizada en duplicado en shakers orbitales de sobremesa marca Stuart.

7.1.10. Determinación de bacteria(s) utilizable(s) como alimento

Para determinar si la mejor dieta para los nemátodos consiste en una bacteria en particular se realizaron cultivos en tampón M9 complementado con Colesterol (5 ug/mL), y se alimentó con diferentes bacterias a una concentración final de 10^7 , 10^8 y 10^9 Bact/mL. Se incubó a 100 RPM de agitación, a temperatura ambiente, durante 28 d. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de M9 cada uno. Los cultivos se realizaron en

duplicado. Las bacterias utilizadas para este ensayo fueron las que se resumen en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Bacterias utilizadas como alimento de los nemátodos.

ESPECIE	CEPA	REFERENCIA
<i>Acinetobacter</i>	<i>sp.</i>	Juni 1972.
<i>Gluconobacter</i>	<i>sp.</i>	Skerman <i>et al.</i> 1980.
<i>Azospirillum</i>	<i>brasiliense</i>	Tarrand <i>et al.</i> 1978.
<i>Azotobacter</i>	<i>viniladii</i>	Skerman <i>et al.</i> 1980.
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	Stein <i>et al.</i> 1984.
<i>Nitrobacter</i>	<i>vulgaris</i>	Bock <i>et al.</i> 1990.
<i>Azotobacter</i>	<i>chroococum</i>	Malik 1988.
<i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>	Pringsheim 1950.
<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	Morin <i>et al.</i> 1986.
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i>	Timm <i>et al.</i> 1990.
<i>Escherichia</i>	<i>coli OP 50</i>	Brenner 1974.
<i>Xenorhabdus</i>	<i>nematophilus</i>	Chavarría-Hernández and De la Torre. 2001.
<i>Pseudomonas</i>	<i>sp.</i>	Palleroni 1980.

Las bacterias, una vez cultivadas en medio EP, centrifugadas, lavadas y resuspendidas en agua destilada, para evitar agregar medio EP a los nemátodos. Los resultados de estos ensayos permitirán comprar los factores de reproducción (RF) obtenidos con cada bacteria, determinándose de esta manera cual resulta ser mejor dieta para los nemátodos.

Para determinar el sistema adecuado de alimentación de las bacterias, y una vez determinada la concentración óptima de bacterias a alimentar, se realizan cultivos de nemátodos alimentados por pulsos de bacterias en un régimen definido cada 2 y cada 4 d. Al final de los cultivos se evalúa y compara los RF obtenidos.

7.1.11. Estudio del efecto de la temperatura sobre los nemátodos

Nemátodos provenientes de cultivos realizados en matraces con medio M9C, fueron colectados, lavados con agua destilada y suspendidos en un pequeño volumen de agua destilada estéril. Se tomaron 23.500 individuos adultos y juveniles para ser incubados en botellas provistas de una tapa hermética de goma que permite la introducción de un aguja para extraer muestras de gas sin alterar la atmósfera interior en este proceso (Ver Figura 7.1.). Las botellas fueron incubadas a diferentes temperaturas por un período de alrededor de 22 h, luego del cual se tomó una muestra de gas desde la atmósfera en la cual se incubaban y se midió la baja de oxígeno que esta presentaba, comparándola con una atmósfera incubada en las mismas condiciones pero sin nemátodos. La proporción de llenado de las botellas fue 5% de su capacidad con líquido conteniendo los nemátodos (5 mL), y el resto del envase vacío para no generar cambios significativos en los muestreos de gases (95 mL de aire). Las mediciones fueron realizadas en duplicado tomando 100 μ L de volumen de gas e inyectándolos en un cromatógrafo de gases marca Varian Star 3400 (Figura 7.1), donde se midió el área bajo la curva y se comparó las áreas medidas respecto a inyecciones del gas (O_2) puro.



Figura 7.1. Derecha; cromatógrafo de gases usado en la determinación de oxígeno presente en las botellas. Izquierda; Botellas de incubación para análisis de gases.

7.1.12. Estudio de la cinética de crecimiento en reactor de agitación mecánica

Se utilizó un reactor de 3 L marca Applikon, Biocontroller ADI 1010, y Bioconsole ADI 1025 (Figura 7.2). Este reactor está provisto de un sistema de agitación mecánico constituido por un eje central que termina en un sistema de aspas (paletas), que mezclan el medio líquido al ser rotadas por un motor eléctrico dispuesto en la parte superior del reactor. La velocidad de trabajo fue de 100 RPM, velocidad con la cual se obtuvo un 65 % de saturación de oxígeno en el medio. El inóculo de nemátodos usado en estos ensayos es de 2.000 Nem/mL.



Figura 7.2. Imagen del reactor de mezcla completa de 3 L marca Applikon, Biocontroller ADI 1010, y Bioconsole ADI 1025. Utilizado en experimentos de cultivo en tanque agitado.

7.1.13. Diseño de reactor airlift de loop externo no convencional

La Figura 7.3., muestra el esquema de un reactor airlift de loop externo no convencional. Este diagrama fue usado como base para el diseño del reactor de cultivo de los nemátodos. El construyeron 2 reactores de similares dimensiones. El primero de diseño compacto en metacrilato (comúnmente llamado acrílico) transparente con tapas solamente en la parte superior, las cuales se sostienen por 4 tornillos y se sellan con una empaquetadura de goma. El segundo de vidrio pirex, desarmable en 2 partes, con uniones americanas confeccionadas en bronce dispuestas en el tubo descendente (TD) y la unión transversal (UT) del reactor, y con partes móviles en la parte superior (tapas) de ambos tubos ascendente y descendente, así como también en el extremo de ingreso de aire. Este diseño permitió mejoras prácticas para el proceso de esterilización del reactor y el medio de cultivo, así como para el montaje del mismo. El reactor podía ser dividido en dos partes, una conteniendo la zona de desaceleración (ZD), la entrada de aire y parte del tubo descendente (TD) y del tubo ascendente (TA), y la otra con la mayor porción del tubo descendente.

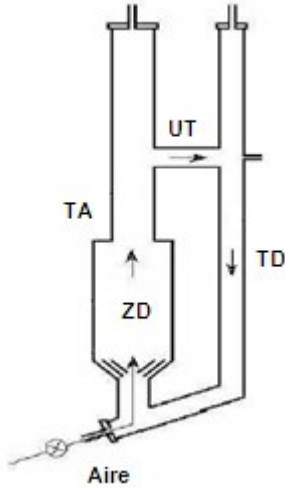


Figura 7.3. Esquema de Airlift de loop externo no convencional.

La Tabla 7.2., resume las dimensiones del reactor airlift de loop externo diseñado y usado en los cultivos de nemátodos.

Tabla 7.2. Medidas y razones geométricas del reactor airlift de loop externo no convencional utilizado en los experimentos.

Parte del Reactor	Parámetro	Unidad (cm)
Zona de Desaceleración	Altura, H	16
	Diámetro, D	6
	Relación H/D	2,67
Tubo Ascendente	Altura, H	23
	Diámetro, D	3
	Relación H/D	7,67
Unión Transversal	Largo, L	10
	Diámetro, D	1,5

Tubo Descendente	Altura, H	50
	Diámetro, D	2
	Relación H/D	25
Reactor	Volumen total	870 cm ³
	Altura total	60

7.1.14. Estudio de la cinética de crecimiento en reactor airlift de loop externo no convencional

Los cultivos realizados en el reactor airlift de loop externo no convencional fueron puestos en marcha una vez que el reactor fue llenado de medio de cultivo, esterilizado por autoclavado, y enfriado hasta temperatura ambiente. Los inóculos usados en estos cultivos fueron de 320 Nem/mL. La aireación fue de 0,3 vvm. La temperatura de incubación corresponde a la temperatura ambiente. La duración de los cultivos fue desde 30 a 45 d. Para la confección de las curvas de cinética de crecimiento del cultivo, diariamente se tomaron muestras de 0,1 mL en triplicado, las que se sometieron al proceso de conteo de nemátodos registrándose el tiempo de cultivo y la densidad de nemátodos presente en el medio de cultivo en las unidades días y Nem/mL, respectivamente. Luego se realizaron curvas tiempo de cultivo (t) versus concentración de nemátodos (C), y tiempo de cultivo (t) versus factor de reproducción (C/C₀), las que se analizaron usando el modelo reparametrizado de Gompertz (Chavarría-Hernández and De la Torre, 2003).

7.1.15. Estudio del consumo de O₂ en airlift de loop externo no convencional

La determinación del consumo de oxígeno de los nemátodos cultivados en el reactor airlift de loop externo no convencional fue realizada disponiendo un sensor de oxígeno disuelto (OD) en la parte superior del tubo descendente (TD) del reactor. Mientras se continuaba

con la aireación, se midió el OD hasta obtener una lectura constante, y luego se detuvo la aireación, iniciándose el registro el OD cada 1 a 2 min. También se tomaron muestras del cultivo para realizar un conteo de los nemátodos presentes en el medio, de manera de obtener un valor de consumo de O₂ característico para un cultivo de “x” densidad poblacional. Un procedimiento similar fue realizado en los cultivos desarrollados en matraces Erlenmeyer.

7.1.16. Estudio del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_La) en airlift de loop externo no convencional

El coeficiente de transferencia de oxígeno (K_La) puede ser calculado mediante el método directo. El balance de oxígeno, en el reactor se describe de acuerdo a la siguiente expresión:

$$dC_L / dt = k_L a (C^* - C_L) - r_0$$

Asumiendo el estado estacionario, la ecuación se iguala a cero, y se obtiene una expresión para calcular K_La (h⁻¹):

$$k_L a = r_0 / (C^* - C_L)$$

Donde:

C_L : concentración de oxígeno disuelto en el líquido. Variable que será medida con electrodo de oxígeno (O₂ en mg/L).

C* : concentración de saturación de oxígeno. Es función de la presión y temperatura del sistema, se determina mediante la Ley de Henry, que determina la fracción molar. En la práctica se medirá la saturación de oxígeno con electrodo de oxígeno.

r₀ : velocidad de consumo de oxígeno (Carvalho, 1999).

7.1.17. Estudio de la velocidad de circulación del líquido y tiempo de mezcla en airlift de loop externo no convencional

La determinación de la velocidad de circulación de líquido en el reactor airlift de loop externo no convencional fue realizada disponiendo un sensor de pH en la parte superior del tubo descendente (TD) del reactor. Mientras se mantuvo la aireación (0,3 vvm), se midió el pH hasta obtener una lectura constante, y luego se agregó un pulso de 3 mL solución de 1 M de NaOH en la zona de desaceleración (ZD), y se midió con cronómetro el tiempo que el sensor de pH tardó en detectar el cambio de pH en el medio. Se asume que el ingreso del pulso de NaOH y la detección del pH son instantáneos. Se midió la distancia desde el lugar de introducción del pulso de NaOH y el sensor de pH, y se calculó la velocidad del líquido (cm/seg). Por otra parte, se registró el tiempo necesario para que la lectura de pH, después de registrar el pulso de NaOH, fuese estable. Con esto se logró determinar el tiempo de mezcla del medio de cultivo, o el tiempo en que el medio es homogéneo nuevamente.

7.1.18. Estudio de la influencia de los nemátodos sobre la capacidad acumuladora de metales pesados de las plantas

Para determinar si existe efecto de los nemátodos sobre la capacidad acumuladora de las plantas usadas en fitorremediación, se diseñó un experimento en el que se concentraron los nemátodos hasta una densidad de 600 Nem/mL y se resuspendieron en tampón M9 (McCoy *et al.* 2002, Tu *et al.* 2003). Luego se aplicaron en una relación de 1.000.000 Nem/m² de suelo (cuadro de 10 x 10 cm, 100.000 Nem), se prosiguió el cultivo de las plantas (Dedal de oro, *Eschscholtzia californica*) por un período de 3 meses (en presencia de los nemátodos). Luego se analizó la cantidad de metales pesados en las raíces y las hojas de las plantas cultivadas en suelos provenientes de la zona de Puchuncaví.

7.1.19. Cultivo de las plantas acumuladoras de metales pesados

Durante el mes de diciembre de 2005 se inició un cultivo de plantas acumuladoras de metales (Dedal de oro, *Eschscholtzia californica*). Las plantas se cultivaron en suelos contaminados de la zona de Puchuncaví, hasta el mes de marzo de 2006, mes en el cual se aplicaron los nemátodos. La aplicación de los nemátodos se realizó haciéndola coincidir

con uno de los riegos del cultivo de plantas (según lo descrito en 7.1.18). El cultivo se continuó manteniendo (en presencia de los nemátodos) hasta el mes de junio (3 meses). La detención de este experimento consistió en la cosecha de las plantas, se pesaron sus raíces y su follaje, y se analizaron los metales pesados en estas fracciones. Mientras que los nemátodos fueron aislados desde todo el suelo presente en los maceteros usados para el experimento.

7.1.20. Estudio de la sobrevivencia de los nemátodos cultivados en medio líquido sobre sustrato sólido contaminado con metales pesados

Al pasar los 3 meses de ensayo de fitorremediación descrito en los acápites 7.1.19., y 7.1.20., fue recuperada la totalidad de la población de nemátodos presente en el suelo de cada macetero. Esta recuperación fue realizada procesando por tamizado la totalidad de la tierra contenida en cada macetero. Posteriormente, se realizó el conteo de los nemátodos obtenidos, y estos valores fueron comparados con los nemátodos usados inicialmente, calculándose de esta manera la sobrevivencia de los nemátodos.

7.1.21. Análisis estadístico de los datos

En todos los casos en que las mediciones y/o conteos se realizaron por triplicado, se calculó la desviación estándar de los valores respecto del valor promedio.

Para determinar si existen diferencias de distribución de los datos de las diferentes curvas que describen los distintos experimentos de cultivo de nemátodos, primero se procedió a determinar el coeficiente de regresión (R^2) de cada curva determinada experimentalmente.

Para determinar si la similitud de los datos experimentales es estadísticamente significativa, se realizó un conjunto de análisis estadísticos. A partir del cálculo de algunos estadígrafos se determinó la pertinencia de aplicar a los datos un test paramétrico (Análisis de Varianza o ANOVA y/o test t-Student) o un test no paramétrico (Kruskal-Wallis). Debe tenerse en consideración, al respecto, que para aplicar un análisis paramétrico a los datos es preciso que éstos cumplan dos requisitos (requisitos de Simpson):

i) tanto la uniformidad como la kurtosis estandarizada debe encontrarse entre en el rango de ± 2 , y

ii) debe existir homogeneidad de varianza, lo cual se prueba a través del test de Cochran. En este último caso, cuando el valor de p-value es $>0,05$, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las varianza de los grupos comparados con un 95% de confianza y, por lo tanto, hay homogeneidad de varianza (Patil 1975).

Para analizar los valores descriptores de las curvas de cultivo de los nemátodos en el reactor airlift de loop externo no convencional, se utilizó el método de los mínimos cuadrados para determinar si el modelo matemático de Gompertz reparametrizado modela o no los datos obtenidos experimentalmente, determinando la menor sumatoria de error o error acumulado y en esta condición determinar usando el modelo los valores de μ_{\max} , $(C/C_0)_{\max}$, y λ , para compararlos luego con los observados experimentalmente. Este método esta basado en el cálculo de la diferencia existente entre un valor teórico calculado utilizando el modelo matemático usado y el valor obtenido experimentalmente, las diferencias son elevadas al cuadrado y luego todos éstos valores son sumados para determinar el error acumulado menor, de esta manera es posible comparar si un modelo o ecuación se ajusta o describe mejor que otro los datos experimentales.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento de nemátodos bacterívoros de vida libre

8.1.1. Muestreos de suelos contaminados con metales pesados

La zona geográfica estudiada corresponde al sector Oriente respecto de la ubicación de la chimenea de la Fundición Ventanas de ENAMI. Las campañas de muestreo de los suelos realizadas el año 2004, se resumen en la Tabla 8.1. La 1ª campaña de muestreo de suelos se realizó el día 21 de marzo, ocasión en la cual se tomaron muestras de aproximadamente 500 g en 6 puntos de la zona en estudio, se procesaron 100 g de suelo de cada una de las muestras y se aislaron muy pocos nemátodos, por lo que no fue posible aislar una especie o variedad de vida libre y bacterívora. La 2ª campaña de muestreo fue realizada el 3 de abril donde se muestrearon 40 puntos del terreno, de la misma forma se procesaron 100 g de cada muestra y la cantidad mayor de nemátodos que se pudo aislar fue 320 individuos, no siendo posible aislar bacterívoros de vida libre. La 3ª campaña fue realizada el 26 de mayo en 8 puntos diferentes a los anteriores, con resultados negativos nuevamente. Para la realización de la 4ª campaña de muestreo se esperó hasta avanzada la época de lluvias, por lo que se desarrolló el 11 de Agosto en 4 puntos escogidos según la presencia de vegetación y humedad (ver Figura 8.1.), se procesó el total de la muestra, obteniéndose un conteo total de nemátodos de hasta 950 individuos por cada 100 g de suelo.

Después del cuarto y último muestreo fue posible aislar una variedad de nemátodos de vida libre y bacterívoros, los cuales fueron objeto de estudio de esta tesis.



Figura 8.1. Fotografía de los suelos húmedos muestreados en el Valle de Puchuncaví. Muestreo realizado el 11 de Agosto de 2004.

Las dificultades para el aislamiento de una variedad de nemátodo bacterívoro de vida libre fue específicamente la baja densidad poblacional que éstos presentaban durante los muestreos en época seca, ya que si bien estaban presentes algunos individuos en los conteos post-procesamiento de las muestras, no era posible su aislamiento y multiplicación. En consecuencia, el aislamiento y posterior multiplicación de los nemátodos solo fue posible cuando éstos aumentaron en población. Esto ocurrió durante el mes de agosto, solo una vez transcurridas varias lluvias, de manera que el microecosistema del suelo se encontraba estimulado y con las condiciones necesarias para el crecimiento de la especie aislada.

Tabla 8.1. Fechas de muestreo de suelos en la zona de estudio.

Año 2004	Nº MUESTRAS	RECUESTO TOTAL DE NEMÁTODOS (100g suelo)
21 de Marzo	6 *	18 a 120
03 de Abril	40 *	11 a 320
26 de Mayo	8 *	120 a 400
11 de Agosto	4 **	190 a 950

* Procesamiento de 100 g de suelo.

** Procesamiento de toda la muestra (muestras de 200 a 1000 g).

8.1.2. Aislamiento del nemátodo desde muestras de suelo

Las muestras tomadas en la 4ª campaña de muestreo de suelos (11 de Agosto de 2004), fueron procesadas y tamizadas con el objeto de enriquecer o concentrar los nemátodos existentes en el menor volumen posible de agua. La Figura 8.2., muestra distintos estadios de aislamiento y purificación de los nemátodos observados bajo el microscopio.

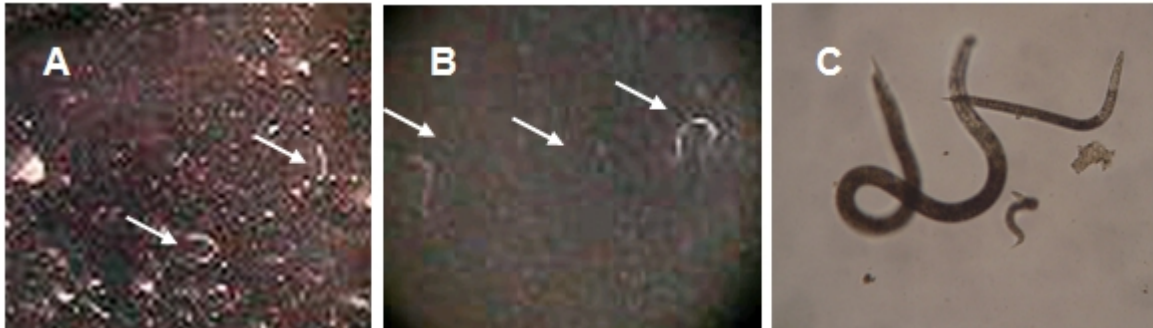


Figura 8.2. Aislamiento, enriquecimiento y limpieza de los nemátodos presentes en las muestras de suelo. **A**, primera observación después del tamizaje. **B**, después del filtrado en papel filtro (tisú). **C**, después de la concentración de nemátodos en los embudos.

8.2. Identificación de la especie del nemátodo aislado.

8.2.1. Caracterización morfológica de los nemátodos

Veinticinco especímenes adultos y veinticinco juveniles fueron examinados tanto vivos como muertos, lo último fue logrado mediante un shock térmico a 60 °C en suero salino. Tanto las observaciones de especímenes vivos y muertos, como los fijados en glicerina, permitieron realizar observaciones de comparación y capturas fotográficas que permitieron establecer que morfológicamente la especie corresponde a una variedad de *Cuticularia sp.* Cepa chilena. La Figura 8.3., muestra las descripciones morfológicas de *Cuticularia oxycerca*, una especie descrita por De Man en 1895 y republicada por Andrassy en 1983. Con esta descripción se realizaron comparaciones de las fotografías y mediciones realizadas a los especímenes estudiados.

Las observaciones permitieron constatar que morfológicamente el nemátodo bajo estudio, es similar y concuerda con las descripciones reportadas para *Cuticularia oxycerca*. La

Figura 8.4., muestra las fotografías obtenidas de cada una de las partes del cuerpo del nemátodo y que coinciden con la descripción reportada en Andrassy, 1983. Donde A, representa la región esofágica, B el extremo anterior, C el extremo posterior de la hembra, y D el extremo posterior del macho.

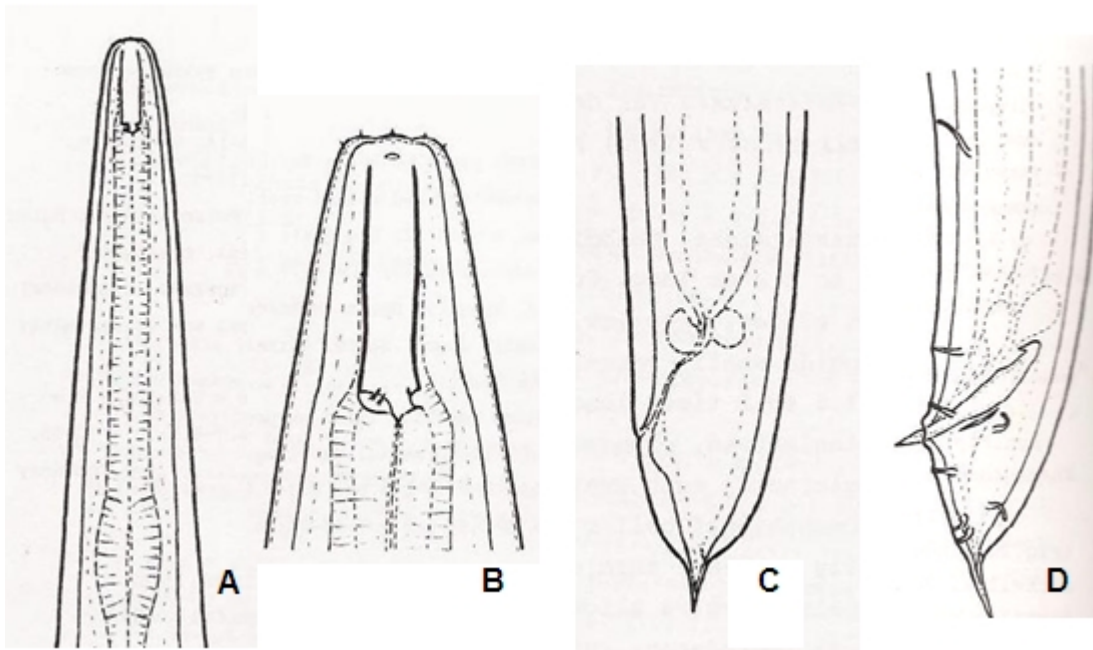


Figura 8.3. Según la descripción morfológica de *Cuticularia oxycerca* realizada por De Man (1895), publicada en Andrassy, 1983. A; región esofágica 510x. B; extremo anterior 500x. C; extremo posterior de la hembra 650x. D; extremo posterior del macho 650x.

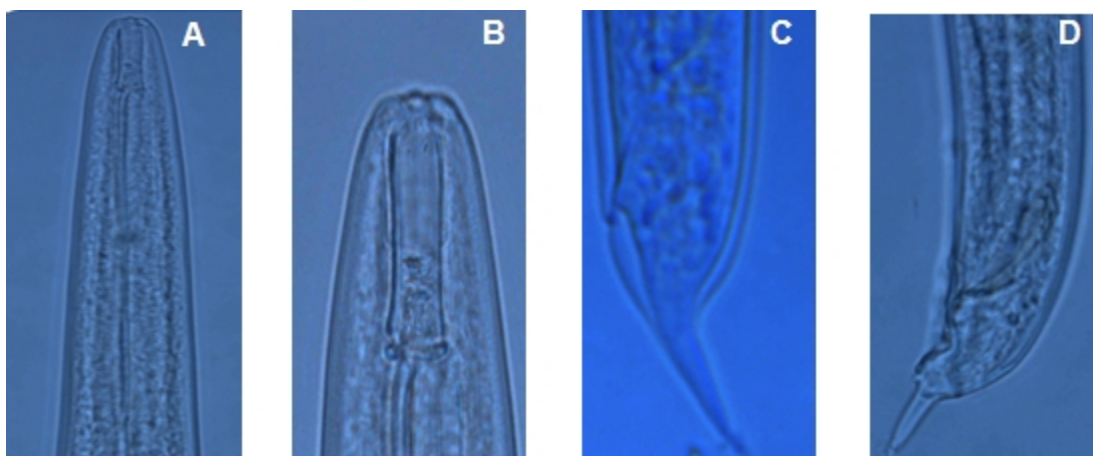


Figura 8.4. Comparación de la morfología del nemátodo estudiado con *Cuticularia oxycerca*. Fotografías tomadas bajo microscopio con 40x de aumento. Donde **A**, representa la región esofágica, **B** el extremo anterior, **C** el extremo posterior de la hembra, y **D** el extremo posterior del macho.

8.2.2. Caracterización molecular de los nemátodos

La caracterización molecular de la secuencia del DNA de la subunidad ribosomal menor 18S (18S rDNA) del nemátodo bajo estudio, dio como resultado una secuencia de 1360 pares de bases (1360 pb), la cual se expone en la Figura 8.5.:

```
TGTTGTTGACTCTGAATAACTTAGCTGATCGCATGGTCTTGTACCGGCGACATATCTTTCAAGTAT
CTGCCTTATCAACTTTCGATGGTAGTTTATGTGCCTACCATGTTGCAACGGGTAACGGAAAAATAAG
GGTTTGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
ATTACCCACTGGAGGTGCTCCAAGGTAGTGACTAACAAATAACGAGACCGTCTTCTATGAGGCCGGT
TATCGGAATGGGTACAATTTAAACCCTTTAACGAGGATCTATGAGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATTCCAGCTCTCAAGGTGTATATCCCTATTGCTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGA
TCTCCGCCTCAGGACGTGGTCCGCCTTTAGGTGTGTA CTGCGATCCTAGGCAGTTACTGCTGGTTTT
TCAGCCGGTGGCCTTAACTGGTTGCCGGTTGTGGCTAGCGAGTTTACCTTGAGTAAATCAGATTGC
TCAAGAAAGGCGTTTCGCCTGAATGTTTGTGCATGGAATAATGGATTAGGACTTCGGTTCTGTTTT
GTTGTTTTTCTGAACTGAAGTAATGATTAAGAGGAACAGACGGGGGCATTTCGTATCGCTGCGTGAG
AGGTGAAATTCNTGGACCGCAGNGGGACGCCCAANAGCGAAAGCATTTCGCCAAGAATGTCTTCATT
AATCAAGAACGAAAAGTCAGAGGTTGGAAGGCGATTAGATACCGCCCTAGTTCTGACCGTAAACTAT
GCCATCTAGCGATCCGGTGGGGTTATTTCGCCTCGCCGGGAGCTTCCC GGAAACGAAAAGTCTTTTCG
GTTCCGGGGGTAGTATGGTTGCAAAAGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACACCAGGAG
TGGAGCCTGCGGGTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTCACCCGGCCCGGACACC GTTAGGATTG
ACAGATTGAAAGCTCTTTCTCGATTTGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCG
ATTTGTCTGGTTTATTCCGATAACGAGCGAGACTCTAACCTACTAAATAGTTTTCACGATTTTCGGG
TCGTGTGAACTTCTTAGAGGGATAAAGCGGTGTTTAAACCGCACGAGATTGAGCGATAACAGGTCTGT
GATGCCCTTAGATGTCCGGGGCTGCACGCGCGCTACACTGGAAGGATCAGCTGGTTCGCCCATTGCC
GAAAGGTAATGGTAAACCGTTGAAAACCTTCCGTGACCGGATAGGGAATTGTAATTATTTCCCTT
GAACGAGGAATTCCTAGAAGTGTGAGTCATCAGCTCAC
```

Figura 8.5. Secuencia 18S rDNA.

La secuencia de la subunidad 18S del *Cuticularia sp.* chileno, aislado en Puchuncaví, se comparó con la de otro *Cuticularia sp.* no identificado presente en la base de datos de GenBank (Accesion Number U81583), encontrándose un alto nivel de similitud con dicha secuencia. La comparación o alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el software Basic Local Alignment Search Tool Software (BLAST) (Altschul, *et al.* 1997.), disponible en la página WEB de National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://ncbi.nih.gov/BLAST/>). La Tabla 8.2 resumen los mejores alineamientos

encontrados al comparar la secuencia de la subunidad 18S rDNA del nemátodo estudiado y las secuencias de nemátodos presentes en el banco de datos de GenBank.

Tabla 8.2. Detalles de los 10 mejores alineamientos realizados con BLASTN.

Datos desde BLASTN		Resultados del alineamiento utilizando BLASTN				
1	2	3	4	5	6	7
U81583	<i>Cuticularia sp</i>	1 / 181	170 5	1358 / 1360	99	0 / 1360
AF08302 3	<i>Poikilolaimus oxycerca</i>	1 / 201	141 7	1170 / 1218	96	3 / 1218
AF08302 2	<i>Poikilolaimus regenfussi</i>	1 / 196	140 3	1056 / 1109	95	3 / 1109
U81588	<i>Rhabditis myriophila</i>	636 / 788	167 5	718 / 725	99	0 / 725
AF08299 4	<i>Oscheius sp.</i>	636 / 822	170 9	717 / 725	98	0 / 725
U13936	<i>Rhabditis myriophila</i>	636 / 800	168 6	717 / 725	98	1 / 725
AF08301 9	<i>Oscheius insectivora</i>	494 / 682	171 5	824 / 868	94	4 / 868
AF08302 1	<i>Pellioditis marina</i>	494 / 680	170 8	810 / 869	93	5 / 869
AF08300 0	<i>Rhabditella sp.</i>	636 / 816	170 4	692 / 727	95	3 / 727

AF08302	<i>Caenorhabditis sonoreae</i>	494 / 673	170	801 / 869	92	5 / 869
6			3			

1: Accesion number.

2: Organismo al cual corresponde la secuencia presente en Genbank, con la cual se compara.

3: Relación numérica con la cual se corresponde la secuencia estudiada con la secuencia de Genbank. Por ejemplo; 1/181, la semejanza se corresponde desde el nucleótido 1 de la secuencia estudiada con la posición 181 de la secuencia de Genbank.

4: Longitud de la secuencia de Genbank.

5: Largo de la secuencia con la cual la secuencia estudiada es similar.

6: Porcentaje de identidad entre las secuencias comparadas.

7: Espacios en los que no se encuentra nucleótidos comparables.

Al analizar el alineamiento de la secuencia estudiada con la secuencia U81583 (*Cuticularia sp.* de GenBank) (1ª línea en la Tabla 8.2.), se puede ver que la secuencia U81503 posee un largo total de 1705 pb (Columna 4), y que el primer nucleótido de la secuencia estudiada se corresponde o alinea con la base número 181 de esta secuencia (Columna 3), y que desde esta posición en adelante se corresponden 1358 pb de las 1360 totales (Columna 5), por lo que se entrega un valor de identidad en el alineamiento de 99% (Columna 6). Este valor resulta interesante ya que no fue necesario agregar espacios vacíos para que el algoritmo corrija deleciones o espacios presentes en la secuencia (Columna 7). No obstante, se debe destacar el hecho de que la secuencia 18S secuenciada desde el nemátodo *Cuticularia sp.* cepa chilena, es 345 pb más pequeña que la encontrada en GenBank (1705 pb -1360 pb = 345 pb). Sumando a esto que el trozo alineado de 1360 pb presenta 2 nucleótidos distintos, podría ser posible inferir que se trata de una variedad nueva de *Cuticularia*.

Una de las herramientas que BLAST permite usar es la visualización del linaje de las especies almacenadas en el banco de datos. Es así que el *Cuticularia sp.* presente en el

banco de datos posee un número de identificación taxonómica (*Cuticularia sp.* (U81583). *Taxonomy ID:* 55804; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=55804>). La Figura 8.6. muestra un árbol taxonómico en el cual se puede apreciar el género *Cuticularia* de manera aislada y con los representantes identificados con la secuencia (U81583), y la cepa chilena. La herramienta de BLAST que permite realizar vinculaciones taxonómicas esta basada en el Método de Jukes - Cantor (<http://helix.nih.gov/docs/gcg/distances.html>), el cual es un modelo que mediante la aplicación de un algoritmo calcula la probabilidad de sustitución en un sitio (al principio el modelo era para nucleótidos, pero esto fácilmente puede ser substituido para codones o aminoácidos), generando una matriz de distancias con las cuales se construye gráficamente el árbol taxonómico. De este modelo también podemos sacar un fórmula para calcular la distancia entre 2 secuencias. La idea principal detrás de este modelo es la suposición de que la probabilidad de cambio de un sitio respecto de otro es siempre igual. Este método también, asume que los sitios diferentes que se estudian, son independientes.

Una descripción del linaje del nemátodo aislado desde la zona de Puchuncaví sería el expuesto en la Tabla 8.3.:

Tabla 8.3. Taxonomía de *Cuticularia sp.* cepa chilena.

Taxonomía de <i>Cuticularia sp.</i> según banco de datos GenBank
Organismos Celulares
<u>Superreino:</u> <i>Eukaryota</i>
Grupo <i>Fungi / Metazoa</i>
<u>Reino:</u> <i>Metazoa</i>
<i>Eumetazoa</i>
<i>Bilateria</i>
<i>Pseudocoelomata</i>

<u>Phylum:</u> <i>Nematoda</i>
<u>Clase:</u> <i>Secernentea</i>
<u>Subclase:</u> <i>Rhabditia</i>
<u>Orden:</u> <i>Rhabditida</i>
<u>Suborden:</u> <i>Rhabditina</i>
<u>Superfamilia:</u> <i>Rhabditoidea</i>
<u>Familia:</u> <i>Rhabditidae</i>
<u>Genero:</u> <i>Cuticularia</i>
<u>Especie:</u> <i>Cuticularia sp. cepa</i> chilena

La secuencia de *Cuticularia sp. cepa* chilena ha sido depositada en el banco de datos de GenBank ([DQ385848](https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2024-dq385)). En el Anexo 1, se muestra un resumen de los antecedentes publicados en la página (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=88659683>).

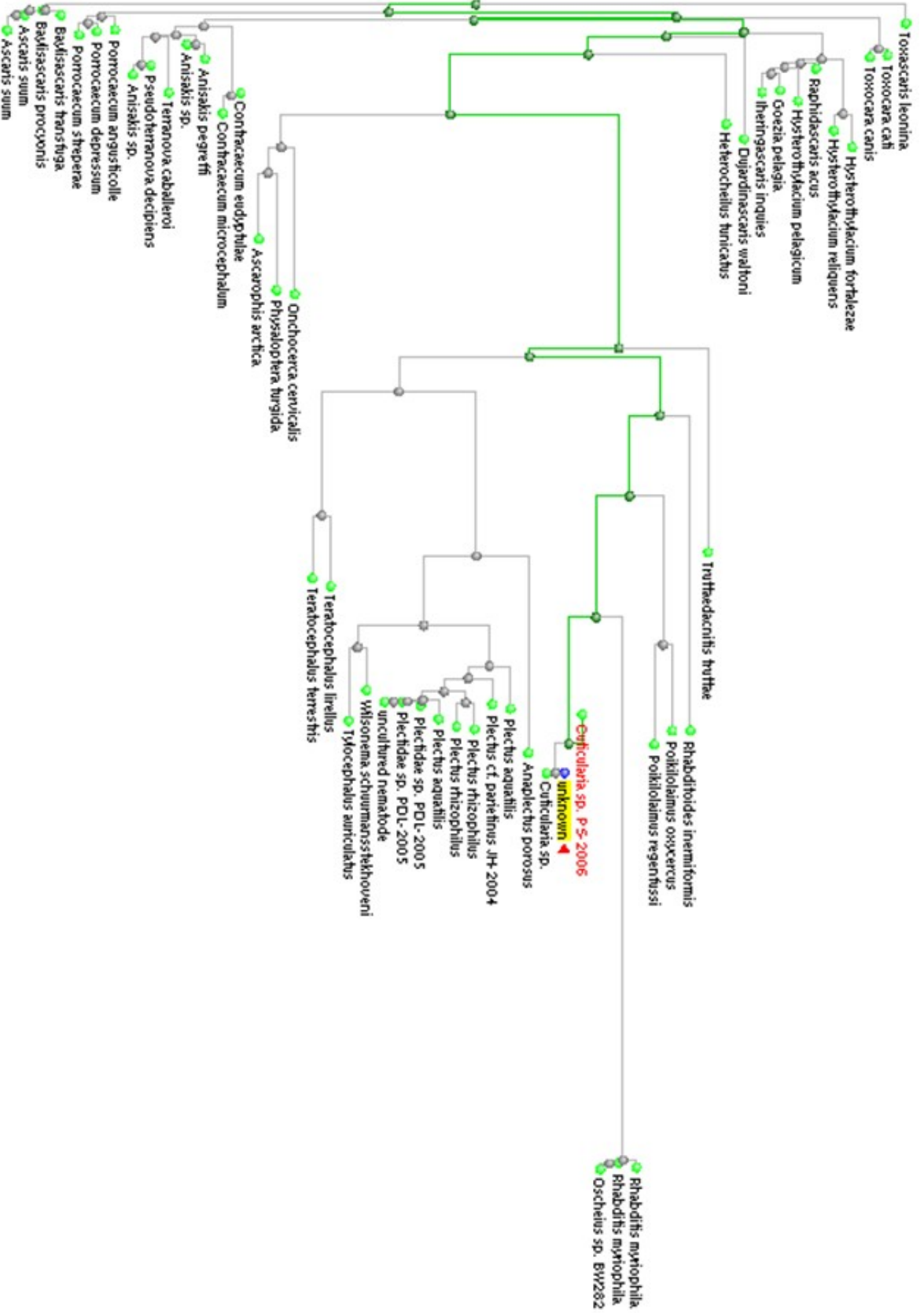


Figura 8.6. Árbol taxonómico en que es posible ubicar el género *Cuticularia* (*Cuticularia* sp. PS-2006).

8.3. Caracterización de mecanismo de reproducción y ciclo de vida del nemátodo aislado

8.3.1. Observaciones realizadas en cultivo en placas de agar

La Figura 8.7., muestra los cambios poblacionales que ocurren con los nemátodos inoculados sobre las placas con medio M9Cs. Este tipo de experimentos tuvo una duración de 30 d y la población inicial (inóculo), en todos los casos fue de 2.300 nemátodos por placa, y el promedio de la población final obtenida en cada placa fue de 55.900 nemátodos. Con este conteo final es posible calcular un $RF=24,3$ (Factor de Reproducción, $RF=Nemátodos\ totales / Inóculo$).

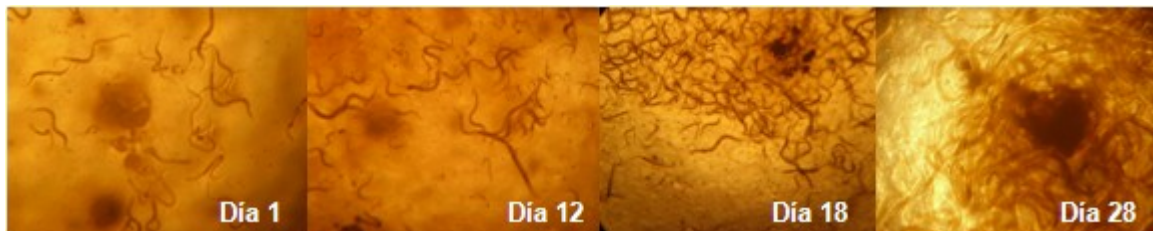


Figura 8.7. Fotografías de los cambios poblacionales de los nemátodos cultivados en placas de agar. El día 1, corresponde a los individuos del inóculo, día 12 corresponde al período en que se produce la oviposición, día 18 corresponde a la población eclosionada desde los huevos, y día 28 corresponde a la población total hacia el final del cultivo.



Figura 8.8. Nemátodos en cultivo en placas de agar. A, hembra con 20 huevos en su interior. B, hembra con 18 huevos en su interior.

En la Figura 8.8., se muestran 2 hembras que contienen huevos en su interior. Estas fotografías corresponden al período de oviposición, durante el cultivo en placas de agar de los nemátodos.

El conteo de la cantidad de huevos que 50 hembras presentaban en su interior permitió determinar que la cantidad de huevos observados en el interior de las hembras es ligeramente menor al RF calculado con los cultivos en placas de agar (24,3), esto puede ser debido a las hembras ya han ovipositado algunos huevos, o simplemente que éstas pueden generar más huevos a medida que estos maduran y son ovipositados.

Los cultivos sobre agar permitieron realizar una primera estimación acerca de la capacidad reproductiva de los nemátodos, la cual se determinó, en un principio, entre 20 a 25 nemátodos por cada nemátodo presente en el inóculo (RF=24,3). No obstante, este valor corresponde a un primer acercamiento al verdadero potencial reproductivo de los nemátodos ya que al realizar cultivos sobre agar M9Cs complementado con grasa animal (extracto de carne de cerdo), fue posible obtener un RF=47. Este hecho es un indicador de que el potencial reproductivo de los nemátodos esta directamente relacionado con su estado nutricional y que en su dieta juega un papel importante las fuentes de grasas, lípidos y colesterol.

8.3.2. Observaciones realizadas en cultivos líquidos

Por su parte, los cultivos en medio líquido permitieron lograr observaciones y registros fotográficos de la reproducción sexual de los nemátodos. La Figura 8.9., muestra la copula entre un macho que se enrolla alrededor de una hembra. Las observaciones bajo lupa microbiológica permitieron determinar que este proceso tiene una duración máxima de 30 min.

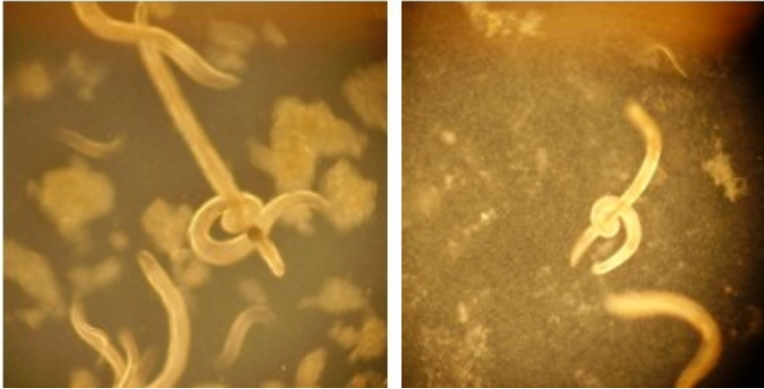


Figura 8.9. Fotografías logradas en cultivo en medio líquido. A y B, copula de un macho enrollado alrededor de una hembra.

Esta observación permite dilucidar la necesidad de que exista contacto entre ambos sexos para la reproducción del nemátodo, lo cual resultaba imposible de observar en el medio sólido de las placas de agar. El requerimiento de la cópula sexual entre los nemátodos representa un desafío para los sistemas de cultivo que se deban implementar. Esto debido a que las condiciones de cultivo deben permitir este tipo de contacto físico entre los nemátodos.



Figura 8.10. Cultivo en medio líquido. Período correspondiente a la oviposición, se pueden apreciar numerosos huevos en el medio.

Respecto de la capacidad reproductiva de los nemátodos, las observaciones realizadas en cultivos líquidos de 12 d en que los huevos están libres en el medio (Figura 8.10.). Los huevos comenzaron a aparecer el día 8 y su eclosión se inició el día 10. Luego estos procesos (oviposición y eclosión) fueron simultáneos hasta el día 16, por lo que la cantidad de huevos en el medio se incrementó desde el día 8 hasta el día 12, luego del cual fue mayor el proceso de eclosión que el de oviposición y se produjo una disminución diaria de los huevos presentes en el medio. El cultivo líquido no aumentó su población total de nemátodos a partir del día 16.

Las observaciones diarias realizadas en muestras tomadas desde cultivo en medio líquido permitieron caracterizar la evolución poblacional de los nemátodos en el cultivo. La Figura 8.11., muestra la evolución poblacional de los nemátodos durante un cultivo de 20 d.

En el gráfico representado en la Figura 8.11., es posible observar que los huevos comienzan a aparecer a partir del día 2 del cultivo, y su aparición se hace más notoria a partir del día 7. La cantidad de huevos en el cultivo es máxima en el día 12 y a partir de este día comienzan a disminuir, casi desapareciendo hacia el día 18, esto último debido al proceso de eclosión de los mismos. Por su parte, los individuos infantiles o recientemente eclosionados comienzan a aparecer el mismo día que los huevos pero muestran un aumento sostenido

hasta el día 18, por lo que los huevos siguen eclosionando después de que las hembras han detenido el proceso de oviposición, esto es debido a que existen días de incubación que necesariamente deben transcurrir entre la oviposición y eclosión de los huevos. Estos antecedentes son específicos para *Curicularia sp.*, esto dado que las características reproductivas y de ciclo de vida son propias de cada especie, en consecuencia no es posible comparar el ciclo de vida determinado con el ciclo de vida de nemátodos entomopatógenos por ejemplo, ya que éstos últimos son los que han sido ampliamente utilizados en sistemas masivos de cultivo y utilizados como referencia para estos experimentos. A modo comparativo, se puede mencionar que los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditis* son hermafroditas por lo que pueden autofecundarse por lo que el ciclo reproductivo se completa en pocos días, generando cientos de miles de nuevos individuos (Gil *et al.* 2002, Georgis *et al.* 1991).

La Tabla 8.4. muestra algunos de los datos incluidos en la gráfica de la Figura 8.12. Con los datos de la línea correspondiente al día 20 del cultivo se puede determinar un RF=8,75 ($21.880/2.500 = 8,75$), cuyo valor es bastante más bajo que en cultivos en placas de agar, donde se registró un RF=24,3. La proporción de machos y hembras sexualmente maduros que componen la población adulta en este cultivo líquido es 60% machos y 40% hembras, por lo que en el día 12 del cultivo, de los 2.500 adultos, 1.000 corresponden a hembras ovipositoras. Al considerar la cantidad de huevos presentes en el medio (7.250 huevos) y de individuos infantiles (14.740 infantiles), es posible estimar que cada hembra potencialmente puede generar alrededor de 22 nuevos individuos ($7.250 \text{ huevos} + 14.740 \text{ infantiles} = 21.990$, entonces $21.990/1.000 = 22$ nuevos individuos por hembra).

Tabla 8.4. Evolución poblacional de un cultivo líquido de nemátodos. Valores \pm Desv.Est.

Día	Adultos	Juveniles	Huevos	Infantiles	Total
1	2.320 \pm 6	170 \pm 2	10 \pm 0	10 \pm 0	2.510 \pm 4
12	2.500 \pm 4	80 \pm 2	7.250 \pm 32	14.740 \pm 24	17.320 \pm 46
20	2.300 \pm 4	10 \pm 1	380 \pm 6	19.570 \pm 26	21.880 \pm 44

Si se analiza con este mismo razonamiento, los cultivos en placas de agar, los cuales se inoculan con 2.300 nemátodos, de los que 920 corresponden a hembras ovipositoras (40%), y si se considera que cada placa genera 55.900 nemátodos al ser cosechadas, es posible decir que cada hembra potencialmente genera 58 nuevos individuos ($55.900 - 2.300 = 53.600$ nemátodos generados, $53.600 / 920$ hembras = 58 nemátodos generados por hembra). Estos valores permiten calcular un RF para las placas de agar igual a 24,3 ($55.900 / 2.300 = 24,3$).

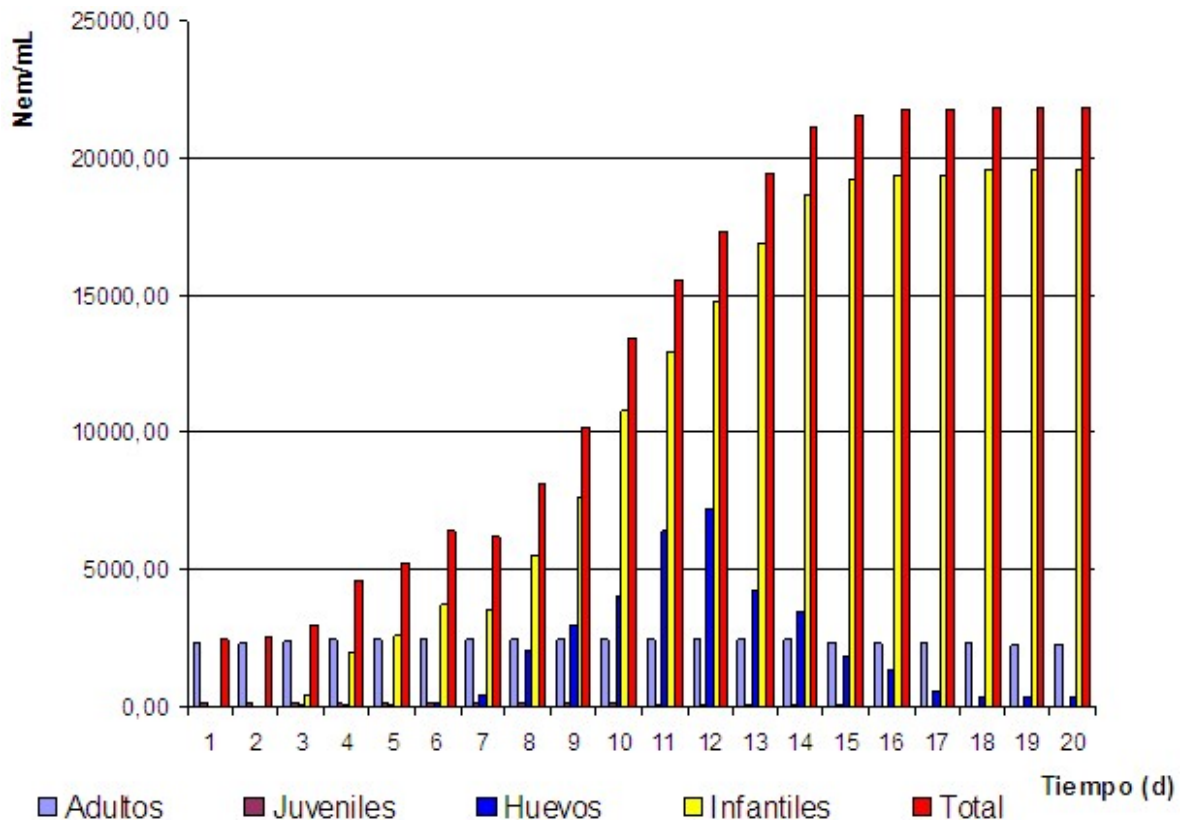


Figura 8.11. Evolución poblacional de los nemátodos en un cultivo líquido.

La Tabla 8.5., muestra un resumen de estos datos comparativos entre cultivos sólidos y líquidos de los nemátodos, los valores se muestran con la desviación estándar generada de los conteos por triplicado de cada punto. Las diferencias en la capacidad de reproducción de los nemátodos es un indicador de que los cultivos líquidos disminuyen su capacidad proliferativa. Esto puede ser debido a mayores dificultades de contacto sexual entre machos y hembras.

Tabla 8.5. Capacidad de reproducción de los nemátodos en cultivos sólidos y líquidos. Valores \pm Desv. Est.

Cultivo	Inóculo	Hembras ovipositoras	Conteo Final	Nemátodos por hembra	RF
Agar	2.300*	920 \pm 2	55.900 \pm 8	58	24,3
Líquido	2.500*	1.000 \pm 2	21.880 \pm 3	22	8,7

* Desviación estándar generada en los conteos por triplicado de los inóculos. Desv. Est. = \pm 3.

Existen marcadas diferencias en la capacidad reproductiva de los nemátodos entre los cultivos sólidos y líquidos, siendo mayores en los cultivos sólidos sobre agar. Esto puede ser debido fundamentalmente a que los nemátodos requieren tener contacto sexual para su reproducción, a diferencia de otras especies que son o pueden ser hermafroditas, como es el caso de los nemátodos entomopatógenos *Heterorhabditis* (Georgis *et al.* 1991). Este contacto sexual puede verse disminuido, respecto de su frecuencia en el medio líquido, debido a que existen menores posibilidades de encuentros físicos entre los machos y hembras. Esto se ve reflejado en el hecho de que los cálculos muestran que las hembras fecundadas en el medio líquido generan aproximadamente 22 nuevos individuos cada una, mientras que en medio sólido este número es 58. Perfectamente puede darse la situación de que en el medio líquido muchas hembras no hayan tenido contacto sexual o fecundación.

Respecto de los tiempos necesarios para que las hembras puedan ovipositar, este tiempo fue estimado en ambos tipos de cultivos en 8 d. Mientras que el período de incubación de los mismos varía entre 2 y 4 d para comenzar a observar eclosión de los mismos.

Cuando se considera el número de nemátodos del inóculo, es posible estimar que en medio líquido se generan aproximadamente 9 nemátodos por cada nemátodo inicial, mientras que en medio sólido se producen cerca de 25 nemátodos por cada nemátodo inoculado.

Finalmente, el tiempo de generación de toda la nueva generación de nemátodos de un cultivo es de 18 a 20 d, por lo que este sería el período de tiempo base necesario para

incubar un cultivo en algún sistema de cultivo a mayor escala de los nemátodos. Esto difiere mucho de los nemátodos utilizados como modelo de cultivo en esta Tesis, ya que los nemátodos entomopatógenos pueden generar cientos de miles en una generación en un período total de 12 días (De la Torre. 2003, Gil *et al.* 2002).

8.3.3. Estudio del efecto de la temperatura sobre el consumo de oxígeno de los nemátodos en condiciones basales

La Tabla 8.6., muestra un resumen de las mediciones de área bajo la curva realizadas para la detección de oxígeno. Se calcularon los gramos de oxígeno consumido a partir de las diferencias de área entre la medida y la obtenida de una inyección de oxígeno puro (patrón). La Figura 8.12., muestra una representación gráfica del Consumo de Oxígeno por hora versus la Temperatura de incubación, y el Consumo de Oxígeno por Hora por Nemátodo versus la Temperatura de incubación.

Al observar los datos obtenidos y las representaciones gráficas es posible observar que el consumo de oxígeno aumenta desde los 15 °C hasta los 25 °C, y disminuye notablemente cuando los nemátodos son incubados a 31 °C. El aumento del consumo de oxígeno a medida que se aumenta la temperatura puede representar el estado metabólico en que se encuentra el nemátodo, el cual es influenciado directamente por la temperatura, siendo este mayor a temperaturas cercanas a los 25 °C, mientras que a mayores temperaturas comienza a verse afectado su metabolismo, tal vez funcionando deficientemente, o tal vez simplemente el nemátodo inactiva algunas funciones metabólicas básicas para soportar un estrés térmico, o pero aun comienza a perder viabilidad.

La determinación de un mayor consumo de oxígeno de parte de los nemátodos a temperaturas cercanas a los 25 °C hace pensar que esta es la temperatura a la cual esta especie se encuentra mas “cómoda”, pudiendo ser la temperatura óptima para su desarrollo y cultivo.

Por otra parte, como la temperatura determinada se acerca a las condiciones de temperatura que se presentan habitualmente en el laboratorio, es que se ha optado por desarrollar los experimentos a temperatura ambiental, la cual fluctúa alrededor de los 20 °C (± 5 °C).

Tabla 8.6. Determinación de consumo de oxígeno en estado basal.

INCUBACION		AREA BAJO LA CURVA		OXIGENO CONSUMIDO			
°C	h	DETECTADO O*	CONSUMIDO O	g totales	g O ₂ /h	g O ₂ /Nem	g O ₂ /Nem*h
15	22,20	44.468 ± 112	1.603	0,39	0,02	1,66 x 10 ⁻⁵	7 x 10 ⁻⁷
22	22,36	43.823 ± 98	2.249	0,56	0,03	2,39 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁶
25	22,00	41.163 ± 106	4.908	1,24	0,06	5,27 x 10 ⁻⁵	2 x 10 ⁻⁶
31	22,10	44.106 ± 89	1.965	0,51	0,02	2,15 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁶
Nemátodos incubados				23.500			
Área patrón para cálculos				46.071 (100 µL de O ₂)			

* Los valores representan el promedio de 3 mediciones ± desviación estándar.

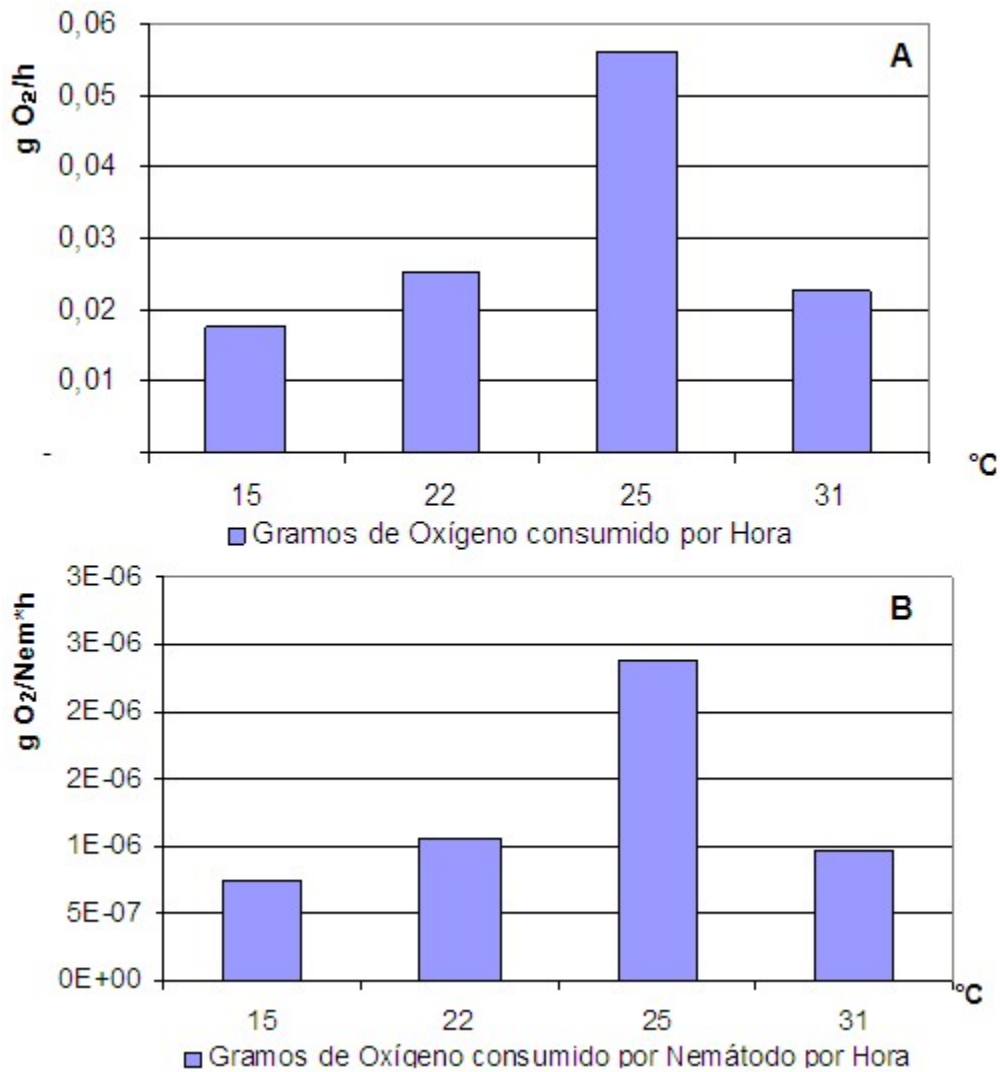


Figura 8.12. Gráficos de consumo de oxígeno de los nemátodos en función del tiempo en condiciones basales. A; representación gráfica del consumo promedio de oxígeno de toda la población de nemátodos (23.500 Nem, grO₂/h). B; representación gráfica del consumo individual de oxígeno (grO₂/Nem*h).

Los 23.500 nemátodos incubados a temperaturas cercanas a la ambiental (20 °C ± 5 °C) presentan una tasa de consumo de oxígeno de $2,39 \times 10^{-5}$ g O₂/h a 22 °C, y $5,27 \times 10^{-5}$ g O₂/h a 25 °C, mientras que el consumo individual promedio es de 1×10^{-6} g O₂/Nem*h a 22 °C, y de 2×10^{-6} g O₂/Nem*h a 25 °C. Considerando que los nemátodos incubados se encontraban en condiciones basales (sin medio de cultivo o estímulo para reproducirse), es que se tomará este valor como un requerimiento base que se debe aportar en los sistemas de cultivo que se ensayaran mas adelante.

A modo comparativo, De la Torre (2003) reporta consumo de oxígeno de los nemátodos entomopatógenos al 5^{to} día de cultivo de 1×10^{-5} g O₂/Nem*h, un valor 5 veces mayor al determinado en condiciones basales de *Cuticularia sp.* esto es en agua, sin nutrientes, por lo que es posible estimar que sus requerimientos de oxígeno pueden ser mayores a los de los nemátodos entomopatógenos, si *Cuticularia sp.* se encuentra en un estado metabólico activado.

8.4. Estudio de medios de cultivo y condiciones de mantención de los nemátodos

Variables importantes para lograr mantener vivos los nemátodos y promover su reproducción, corresponden a las condiciones de almacenamiento y mantención en el tiempo de los mismos, y al medio de cultivo apropiado para permitir su crecimiento y reproducción.

8.4.1. Estudio de las condiciones de almacenamiento y mantención

Para determinar el medio y condiciones bajo las cuales sea posible almacenar los nemátodos por largos períodos de tiempo, se distribuyeron 1.000 nemátodos en frascos de vidrio previamente esterilizados. Los frascos se almacenaron en los medios que se describen en la Tabla 8.7. bajo refrigeración (4 a 10 °C) y a temperatura ambiente (20 ± 5°C) por un período de hasta 6 meses. Periódicamente se observó la cantidad de nemátodos que aún permanecían vivos (móviles). Es así que, por ejemplo, en el transcurso de los 2 primeros meses los nemátodos almacenados en los medios ricos en proteínas y nutrientes (STB, P1, P2 ABP) presentaron una disminución de viabilidad casi del 100% para todos los casos.

Las mejores condiciones de almacenamiento son bajo refrigeración, ya sea agua destilada o suero fisiológico. La disminución de viabilidad en un plazo de 6 meses es solo del 15%, por lo que estas soluciones y temperaturas fueron las utilizadas para almacenar y guardar los inóculos o stock de nemátodos usados en los experimentos.

Tabla 8.7. Porcentaje de viabilidad de los nemátodos almacenados en diferentes condiciones.

Temperatura	ALMACENAMIENTO DURANTE 6 MESES							
	MEDIO							
	H ₂ O dd	NaCl 0,9 %	STB	P 1	P 2	ABP	M9	M9C
4 a 10 °C	15%	15%	95%	92%	100%	93%	24%	68%
20 ± 5°C	22%	26%	98%	100%	100%	100%	38%	98%

Una razón por la cual los nemátodos disminuyen su viabilidad en medios ricos en nutrientes, es la proliferación de bacterias en el medio. Esto puede generar concentraciones elevadas de sustancias tóxicas para los nemátodos. Las bacterias pueden ser inoculadas en este medio por los mismos nemátodos, ya que estos presentan bacterias en su sistema digestivo, por lo que resulta prácticamente imposible separarlas de los nemátodos al momento de almacenarlos.

8.4.2. Estudio del medio de cultivo apropiado para cultivos en placas de agar

Se realizaron cultivos sólidos sobre placas de agar preparadas con diferentes medios de cultivos (M9C, M9 + Oil, STB, P1, P2, Extracto de carne de cerdo, y distintas bacterias). La Tabla 8.8., muestra los conteos finales y RF obtenidos en los distintos medios de cultivos. Los medios P1 y P2 con y sin bacterias, no permitieron lograr desarrollo de los nemátodos, sino que por el contrario los nemátodos inoculados murieron en un corto período de tiempo. En el caso de los cultivos realizados en medio STB y STB complementado con extracto de carne de cerdo, los conteos finales fueron mejores cuando a la superficie de la placa (antes de inocular nemátodos) se le inoculaba bacterias, y la que permitió mejores resultados en *Xenorhabdus nematophilus*, la bacteria simbiote de nemátodos entomopatógenos (Chavarría-Hernández and De la Torre, 2001). Los cultivos

realizados sobre M9 complementado con aceite vegetal (M9 + Oil) permitieron lograr mejores resultados cuando a la superficie del agar se agregaron bacterias, siendo los mejores resultados con *Pseudomonas sp.*

Por otra parte los mejores resultados de estos cultivos sólidos fueron obtenidos con el medio M9C, sin agregar bacterias (RF=24), aunque si bien los valores de conteo final obtenidos cuando se agregó bacterias son similares, fueron mayores con el medio libre de éstas.

Los resultados indican que los medios ricos en nutrientes complejos (STB, P1, P2, y otros) resultan tóxicos para los nemátodos. No obstante, los resultados mejoran cuando se agregan bacterias sobre estos medios, lo que puede ser un indicador de que el metabolismo de las bacterias sobre el medio de cultivo libera sustancias mas simples que pueden ser utilizadas por los nemátodos, además de las mismas bacterias utilizables como alimento, lo cual esta descrito para nemátodos entomopatógenos, los cuales permiten obtener mejores resultados en cultivos donde la bacteria usada se encuentra en fase 1, es decir en un estado metabólico activo (Akhurst 1980, Ehlers *et al.* 1990). Esto contrasta de buena manera cuando se analizan los resultados de cultivos en medio M9C, un medio rico, pero de compuestos simples, si se comparan con extractos de carne y mezclas proteicas. Las bacterias en estos cultivos disminuyen los conteos finales, lo que puede ser debido a que estas consumen componentes útiles para los nemátodos por lo que más bien compiten con éstos por los nutrientes.

Por otra parte, es sabido que los nemátodos presentan limitaciones nutricionales lipídicas, esto es debido a que poseen una limitada capacidad de sintetizar lípidos (Abu Hatab and Gaugler 1999), por lo que los sistemas de cultivo contemplan la adición de fuentes de lípidos y colesterol, componentes del medio de cultivo que podrían limitar el crecimiento de la población de nemátodos en cultivo (Gil *et al.*, 2002). Este antecedente también es aplicable a *Cuticularia sp.* dado que el medio M9C cuando no es complementado con aceite de maravilla (vegetal), lo conteos finales son mucho más bajos.

Tabla 8.8. Conteos finales de nemátodos cultivados en placas de agar con diferentes medios de cultivo (Valores \pm Desv. Est.).

Placas de Agar, Incubadas a 25 °C, durante 21 d			
Medio	Nemátodos		RF
	Inoculo*	Conteo Final**	
M9C + Oil + X. nem.	2.300	52.920 ± 11	23
M9C + Oil + E. coli	2.300	54.020 ± 9	23
M9C + Oil + P. sp.	2.300	22.420 ± 6	10
M9C + Oil	2.300	55.900 ± 8	24

M9 + Oil + X. nem.	2.300	16.640 ± 6	7
M9 + Oil + E. coli	2.300	20.160 ± 7	9
M9 + Oil + P. sp.	2.300	33.840 ± 7	15
M9 + Oil	2.300	21.700 ± 7	9

STB + C. Cerdo + X. nem.	2.300	22.410 ± 6	10
STB + C. Cerdo + E. coli	2.300	10.570 ± 5	5
STB + E. coli	2.300	5.670 ± 4	2
STB + X. nem.	2.300	8.000 ± 6	3
STB + C. Cerdo	2.300	6.840 ± 6	3
STB + C. Cerdo	2.300	7.070 ± 6	3

P2 + X. nem.	2.300	1.320 \pm 1	1
P2	2.300	-	-

* Desviación estándar del conteo de los inóculos. Desv.Est. = \pm 3.

** Valores promedio \pm Desv. Est.

Los resultados indican, *a priori*, que el mejor medio de cultivo para sustrato sólido es un medio rico en nutrientes, pero nutrientes de baja complejidad química, es decir, extractos vegetales ricos en carbohidratos, vitaminizado, tamponado y complementado con fuente de lípidos, como lo es el medio M9C.

8.4.3. Estudio de la influencia de la densidad del inóculo de nemátodos usado en el conteo final de nemátodos cultivados

De manera paralela a los ensayos realizados en placas de agar, se realizó un ensayo en medio líquido M9 + Oil, con diferentes inóculos de nemátodos, alimentado con E.coli (10^9 Bact/mL concentración final en el medio). Los cultivos se realizaron en matraces erlenmeyer de 250 mL de capacidad, en los cuales se dispuso 50 mL de medio e inóculos comprendidos entre 570 a 2.800 Nem/mL. Los cultivos fueron realizados en duplicado, y se incubaron a temperatura ambiente con una agitación de 100 RPM por 30 d.

La Tabla 8.9., muestra los conteos finales y RF calculados con los distintos cultivos realizados con diferentes inóculos de nemátodos. El coeficiente de correlación lineal de los conteos finales y los inóculos es de $R^2=0,981$, y de los RF con los inóculos es de $R^2=-0,931$ (ver Figura 8.13.). Si bien estos valores no representan una excelente linealidad de los datos, se acercan mucho a la linealidad, lo que indica una posible inhibición de la capacidad de reproducción de los nemátodos según la población de los mismos.

De estos resultados se desprendió que es apropiado trabajar con inóculos no mayores a los 500 Nem/mL, lo que se aplicó en los experimentos desarrollados en matraces y en el reactor.

No existen estudios que relacionen la densidad del inóculo con los conteos finales de los cultivos en las publicaciones existentes sobre nemátodos entomopatógenos. Pero si se considera que este tipo de nemátodos solamente necesita que un individuo infecte a un insecto hospedador para generar cientos de miles de nuevos nemátodos, es posible pensar que podrían existir limitaciones en este sentido. Las densidades de inóculo que las experiencias de Chavarría-Hernández and De la Torre (2003) reportan son aproximadamente 500 Nem/mL para cultivos de *Steinernema feltiae*, el mismo valor determinado en estos estudios con *Cuticularia sp.*, mientras que Gil et al. (2002) utilizan inóculos de 4.000 a 6.000 Nem/mL para cultivos en matraces de *Heterorhabditis bacteriophora*, sin duda un valor mucho más alto que el determinado para *Cuticularia sp.* Estas diferencias muestran que las limitantes de densidad del inóculo usado al inicio de un cultivo pueden ser propias de cada especie.

Tabla 8.9. Conteos finales y RF obtenidos en cultivos iniciados con distintos inóculos.

Inoculo *	Conteo Final *	RF
570 ± 2	16.520 ± 11	29
1.170 ± 2	22.130 ± 9	19
1.790 ± 3	24.210 ± 9	14
2.800 ± 3	29.140 ± 10	10

* Valores promedio ± Desv. Est.

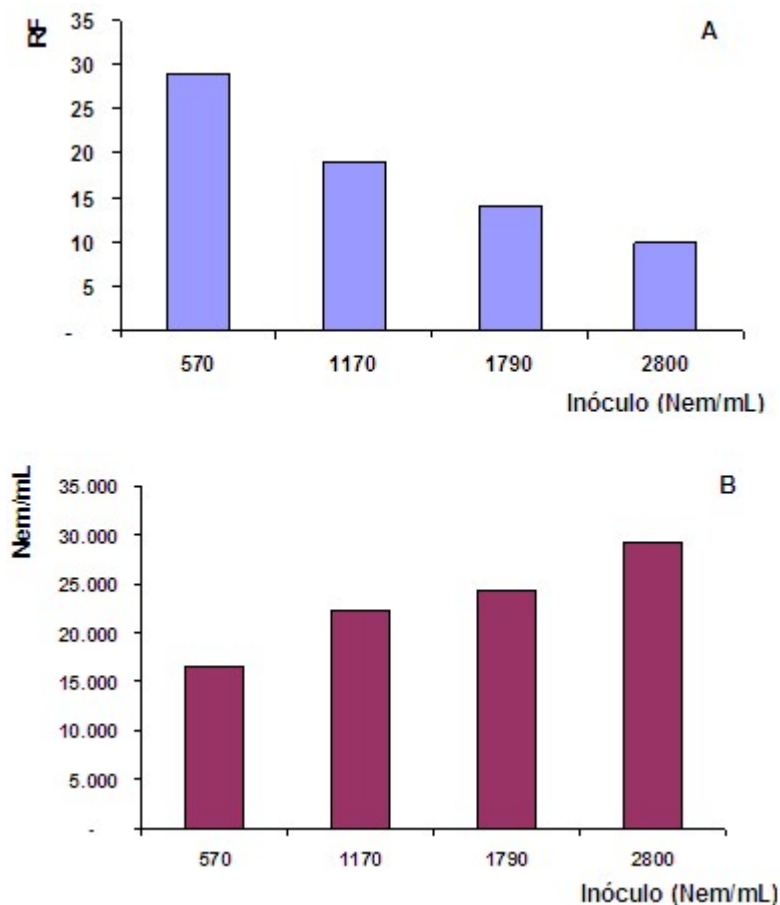


Figura 8.13. Estudio de la influencia de la densidad del inóculo en el conteo final obtenido en cultivos líquidos de nemátodos. A; representación gráfica de los RF obtenidos con diferentes inóculos. B; representación gráfica de los conteos finales obtenidos con diferentes inóculos. Valores promedio.

8.4.4. Estudio del medio de cultivo apropiado para cultivos líquidos

Se realizaron cultivos en triplicado utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de cultivo. Se incubaron a temperatura ambiente, con una agitación de 100 RPM, y por un período de tiempo de 28 d.

La Tabla 8.10., resume los conteos finales y RF calculados para cada medio de cultivo ensayado. Como se mencionó anteriormente los medios nutritivos de compleja composición resultan tóxicos para los nemátodos (medios STB, P1, P2, y ABP). A modo de ejemplo; cuando se realizaron cultivos en medio P2 los nemátodos morían progresivamente

durante la primera semana de incubación. Pero se realizaron cultivos en diferentes diluciones de este medio (1:8, 1:16, y 1:32), fue posible ver crecimiento de los nemátodos pero con conteos finales muy bajos (2.630 (RF=12), 4.200 (RF=17), 4.130 (RF=14), respectivamente).

Los resultados obtenidos con los medios preparados en tampón M9 indican que son medios apropiados para estimular la reproducción de los nemátodos, siendo los mejores resultados con el medio cereal complementado con aceite vegetal (M9C + Oil), donde se obtuvo un conteo final de 33.000 Nem/mL (RF=103).

Tabla 8.10. Conteos finales y RF obtenidos en cultivos con diferentes medios líquidos.

Medio de cultivo	Inóculo (Nem/mL)*	Final (Nem/mL)*	RF
STB	200 ± 1	180 ± 1	1
P1	200 ± 1	40 ± 1	0
P2	200 ± 2	22 ± 0	0
ABP	200 ± 1	1.110 ± 2	6
M9	50 ± 0	120 ± 1	2
M9 + Oil	50 ± 0	1.551 ± 1	31
Extracto vegetal	410 ± 1	12.000 ± 5	29
M9C	320 ± 1	32.000 ± 6	100
M9C + Oil	320 ± 1	33.000 ± 6	103

* Valores promedio ± Desv. Est.

Estos cultivos fueron realizados sin agregar bacterias al medio de cultivo, por lo que se evidenció que el nemátodo es capaz de alimentarse de compuestos orgánicos. Esto muestra la posibilidad de cultivar el nemátodo sin ser alimentado con bacterias sino que en un

medio químico artificial. Esta conclusión surgió debido a que en los medios de cultivo se encontró que las bacterias no sobrepasaron densidades de 10^3 Bact/mL al final del cultivo.

Estos experimentos en medio líquido confirman que el mejor medio de cultivo para *Cuticularia sp.* es M9C, el cual presenta una composición basada en compuestos relativamente simples respecto de la composición de los medios típicamente usados para el cultivo de nemátodos entomopatógenos.

8.4.5. Estudio de la(s) bacteria(s) utilizable(s) como alimento

Para determinar si la mejor dieta para los nemátodos consiste en una bacteria en particular se realizaron cultivos en tampón M9 complementado con Colesterol (5 ug/mL), y se alimentó con diferentes bacterias a una concentración final de 10^7 Bact/mL. Se incubó a 100 RPM de agitación por un período de tiempo de 28 d. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de M9 cada uno. Los cultivos se realizaron en duplicado. Las bacterias utilizadas para este ensayo fueron: *Acinetobacter*, *Gluconobacter*, *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter Viniladii*, *Bacillus subtilis*, *Nitrobacter*, *Azotobacter chroococum*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Xenorhabdus nematophilus*, y *Pseudomonas sp.*, las cuales fueron inicialmente crecidas en medio EP, centrifugadas, lavadas y resuspendidas en agua destilada, para evitar agregar medio EP a los nemátodos.

La Tabla 8.11., muestra los valores RF y conteos finales que fue posible obtener al utilizar las diferentes bacterias como única fuente de alimentación de los nemátodos. Por su parte, la Figura 8.14., muestra la representación gráfica de los valores de RF y conteos finales (Nem/mL) obtenidos en cada uno de los ensayos realizados. Estos resultados muestran que los nemátodos pueden ser alimentados con *Escherichia coli*, *Xenorhabdus nematophilus*, y *Pseudomonas sp.*, ya que son las bacterias con las que se obtienen mejores resultados (RF= 22, 34 y 35, respectivamente).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en los cultivos realizados en placas petri, es posible ver que existen grandes diferencias entre ambos tipos de cultivo (sólido y líquido) al estar presente *Pseudomonas sp.*, siendo el mejor resultado en este caso. Estas diferencias

pueden estar dadas por la composición lipídica y proteica de las bacterias, siendo más beneficiosa la composición química de esta bacteria para los nemátodos, o simplemente su maquinaria enzimática hace que su presencia haga que el nemátodo aproveche de mejor manera o más fácilmente los componentes del medio (Gil *et al.*, 2002, Akhurst 1980). Por otra parte, la versatilidad que las *Pseudomonas* presentan para alimentarse de diferentes fuentes de alimento hace pensar que tanto este tipo de bacterias como *Xenorhabdus nematophilus*, pueden ser lo suficientemente complejas en su composición, y al mismo tiempo ricas en enzimas que facilitan el proceso digestivo de los nemátodos.

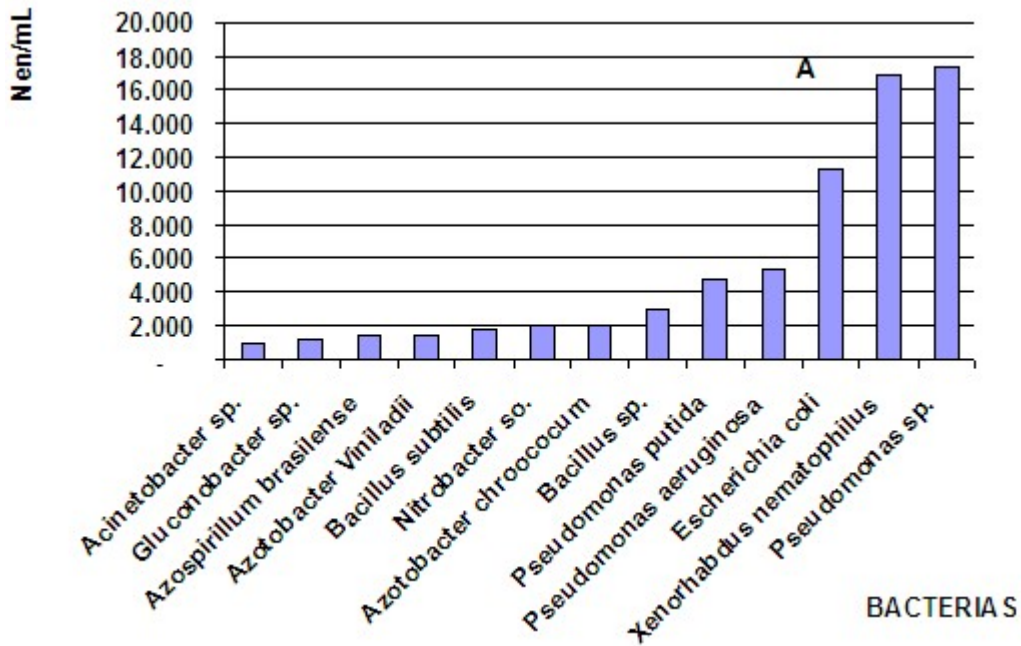
Respecto de la concentración de bacterias utilizada, es posible que esta no sea la adecuada por lo que una vez determinada la(s) bacteria(s) apropiadas para alimentar los nemátodos se procedió a determinar qué concentración de las mismas es la adecuada como dieta.

Tabla 8.11. Conteos finales y RF obtenidos en cultivos con diferentes bacterias como alimento.

Inoculo	500 ± 1 (Nem/mL)	
Bacteria	Conteo final (Nem/mL)*	RF
<i>Acinetobacter</i>	910 ± 2	2
<i>Gluconobacter</i>	1.160 ± 2	2
<i>Azospirillum brasilense.</i>	1.450 ± 3	3
<i>Azotobacter Viniladii</i>	1.480 ± 2	3
<i>Bacillus subtilis</i>	1.750 ± 2	4
<i>Nitrobacter</i>	2.050 ± 2	4
<i>Azotobacter chroococum</i>	2.070 ± 3	4
<i>Bacillus sp.</i>	2.950 ± 2	6

<i>Pseudomonas putida</i>	4.720 ± 2	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5.310 ± 3	11
<i>Escherichia coli</i>	11.240 ± 4	22
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	16.860 ± 4	34
<i>Pseudomonas sp.</i>	17.350 ± 5	35

* Valores promedio ± Desv. Est.



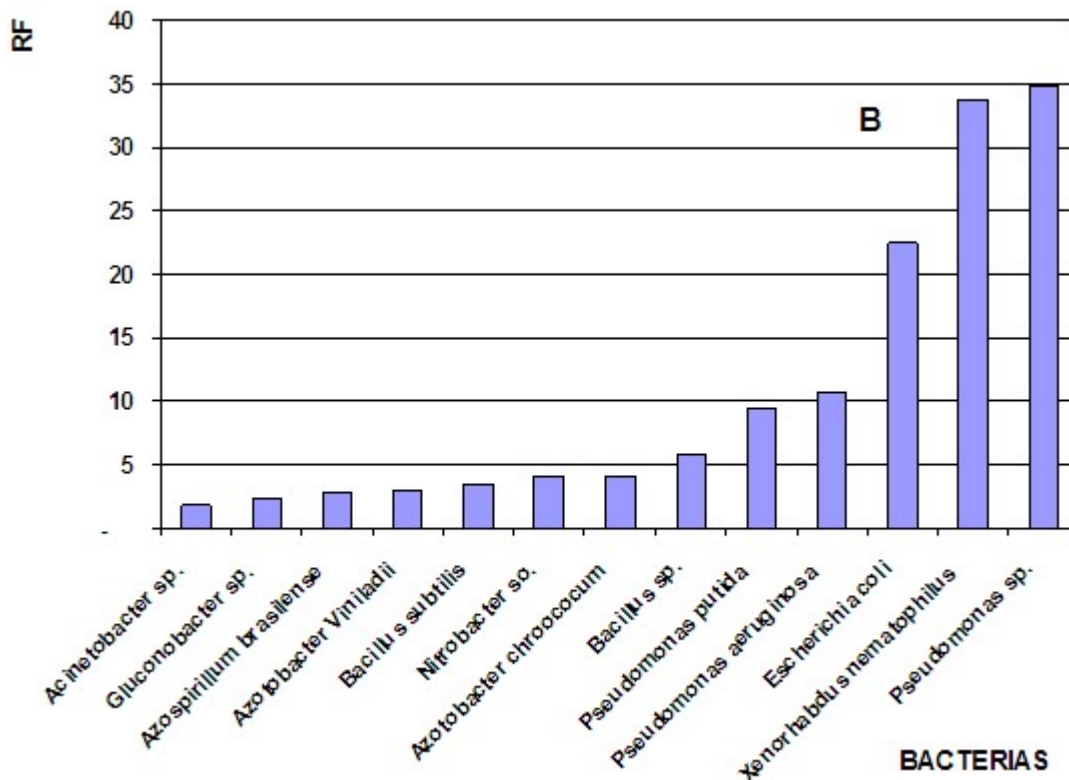


Figura 8.14. Cultivos de nemátodos alimentados con diferentes bacterias. A; representación de los conteos finales obtenidos en cultivos líquidos con diferentes bacterias. B; representación de los valores de RF obtenidos en cultivos líquidos con diferentes bacterias. Valores promedio.

8.4.6. Estudio de la concentración apropiada de bacterias utilizable como alimento

Para determinar la concentración apropiada de bacterias que los nemátodos requieren para alimentarse y no tener falta de alimento o inhibición por exceso del mismo se diseñaron los siguientes experimentos:

El primero, basado en las concentraciones de *Xenorhabdus nematophilus* (10^9 Bact/mL) (Chavarría-Hernández and De la Torre, 2001) usada para cultivar nemátodos entomopatógenos, se realizó un cultivo en matraces, usando 50 mL de tampón M9 con colesterol (5 ug/mL), un inóculo de 2.500 Nem/mL, 100 RPM de agitación, a temperatura ambiente. La incubación se realizó durante 20 d. La alimentación de las bacterias fue administrada mediante pulsos de alimentación, los cuales fueron agregados los días 1, 4, 7,

10, 13, 16 y 19 del cultivo. Esto pensando en mantener la concentración invariable y “óptima” para los nemátodos durante todo el cultivo.

La Tabla 8.12., muestra los resultados de estos cultivos, y evidencia una pequeña mejora en los resultados cuando se utiliza 2×10^9 Bact/mL como alimentación. No obstante, estos son resultados que se consideraron insatisfactorios. Además, es importante mencionar que estos experimentos fueron realizados antes de conocer la incidencia negativa que los grandes inóculos tienen en la capacidad de reproducción de los nemátodos.

Tabla 8.12. Cultivos realizados con diferentes concentraciones de *E.coli* alimentada en pulsos.

INÓCULO (Nem/mL)	2.500 \pm 3				
	Concentración de <i>E. coli</i> (Bact/mL)*				
	1×10^9	2×10^9	4×10^9	6×10^9	8×10^9
Conteos finales (Nem/mL)	19.980 \pm 4	21.880 \pm 3	21.050 \pm 5	18.900 \pm 4	19.020 \pm 4
RF	8	9	8	8	8

* Valores promedio \pm Desv. Est.

El segundo experimento consistió en 3 cultivos con diferentes inóculos alimentados los días 1, 6, 12 y 16 con *E.coli* en diferentes concentraciones (10^7 , 10^8 , y 10^9 Bact/mL). La Tabla 8.13., muestra los resultados de estos experimentos, y se puede apreciar que se obtiene un mejor valor de RF con concentraciones de 10^8 y 10^7 Bact/mL.

Tabla 8.13. Cultivos realizados con diferentes concentraciones de *E.coli* alimentada en pulsos.

INÓCULO (Nem/mL)*	2.440 \pm 2	1.790 \pm 1	1.64 \pm 2
	Concentración de <i>E. coli</i> (Bact/mL)		

	1×10^9	1×10^8	1×10^7
Cultivo	Conteos finales (Nem/mL)*		
1	21.890 ± 5	-	-
2	-	18.040 ± 4	-
3	-	-	16.910 ± 4
RF	9	10	10

* Valores promedio \pm Desv. Est.

El tercer experimento consistió en cultivos con un inóculo igual para todos los ensayos, pero mucho más pequeño que en los experimentos anteriores. Se compararon los conteos y RF obtenidos al alimentar los nemátodos con *E.coli* y *X.nem.* en dos concentraciones 10^6 y 10^7 Bact/mL. La diferencia principal con los experimentos anteriores es que estos cultivos fueron de mezcla completa inicial, es decir, las bacterias se agregaron al inicio de manera única (no en pulsos). La Tabla 8.14., muestra que los resultados se obtienen con bacterias en una concentración de 10^7 Bact/mL, y que al comparar entre *E.coli* y *X.nem.*, se obtienen mejores RF con *E.coli* (RF=79) respecto de *X.nem.* (RF=60).

Tabla 8.14. Cultivos realizados con diferentes concentraciones de *E.coli* y *X.nem.* alimentadas una única vez e inicialmente en el cultivo.

INOCULO (Nem/mL)*	115 ± 0			
	Concentración de <i>E. coli</i>		Concentración <i>X. nem.</i>	
	1×10^6	1×10^7	1×10^6	1×10^7
Conteos finales *	2.430 ± 3	9.050 ± 4	1.790 ± 2	6.940 ± 4
RF	21	79	16	60

* Valores promedio \pm Desv. Est.

Los resultados muestran que la concentración de bacterias debe ser del orden de 10^7 Bact/mL. No obstante, los resultados obtenidos en los cultivos líquidos de los nemátodos utilizando el medio M9C sin bacterias superan por mucho los resultados obtenidos al crecer los nemátodos con bacterias como fuente de alimento. Por esta razón y para simplificar el cultivo de los mismos, en adelante se optó por el medio sintético M9C sin bacterias para los ensayos de cultivo en reactor.

8.5. Estudio de las condiciones de cultivo de nemátodos bacterívoros en matraces

Como se ha expuesto anteriormente, la temperatura de incubación que ha permitido obtener mejores resultados es la ambiental (20 ± 5 °C), por lo que esta condición se ha asumido para todos los cultivos. Por otra parte, para realizar ensayos y estudios cinéticos de los cultivos líquidos de nemátodos es necesario determinar algunos parámetros de operación, entre los que resultan críticos, la velocidad de agitación de los matraces, y la demanda de oxígeno de los nemátodos.

8.5.1. Estudio de la influencia de la agitación en los cultivos líquidos en matraces

La Tabla 8.15., muestra los resultados de las incubaciones realizadas bajo diferentes velocidades de agitación del equipo utilizado, las que variaron desde 30 a 230 RPM. Por su parte la Figura 8.15., muestra el gráfico de RPM versus Conteo Final. Los recuentos finales de nemátodos (y también los RF) aumentaron a medida que se aumentaba la agitación, desde los 30 RPM (8.940 Nem/mL, RF=17,9), hasta los 130 RPM (22.200 Nem/mL, RF=44,4), pero a mayores valores de RPM los conteos finales fueron menores.

Tabla 8.15. Resumen de resultados de los estudios de agitación óptima para cultivos en medio líquido en matraces.

RPM	INÓCULO*	CONTEO FINAL	RF
30	500	8.940 ± 4 a	18

50	500	16.580 \pm 4 b	33
80	500	21.540 \pm 5 b	43
100	500	22.130 \pm 5 b	44
130	500	22.200 \pm 4 b	44
150	500	21.120 \pm 4 b	42
180	500	19.450 \pm 3 b	39
200	500	18.650 \pm 3 b	37
230	500	12.136 \pm 3 a	24

* Desviación estándar generada en el conteo del inóculo. Desv. Est. = \pm 1.

Letras iguales denotan que entre los datos no hay diferencias estadísticamente significativas.

Determinación del intervalo de confianza [14,4 : 27,1].

Al analizar los valores de concentración de nemátodos obtenidos en los cultivos, así como los valores de RF, es posible observar que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos entre 50 y 200 RPM. Considerando que algunos autores como Gil *et al.* (2002) utilizaron 100 RPM para el cultivo de *Heterorhabditis bacteriophora*, mientras que Strauch and Ehlers (1998) utilizaron 180 RPM para la misma especie, y por otra parte De la Torre (2003) reporta 170 RPM para *Steinernema feltiae*, es que se puede estimar adecuado el uso 100 RPM como velocidad óptima de cultivo para los experimentos de cultivo de *Cuticularia sp.* Esto debido a que a menores velocidades de agitación es posible que se limite el cultivo por el pobre aporte de oxígeno hacia el medio, y a mayores velocidades es posible que se dificulte el contacto entre los individuos de diferente sexo, por lo que se disminuye la fertilización de las hembras, y consecuentemente el número de huevos producidos.

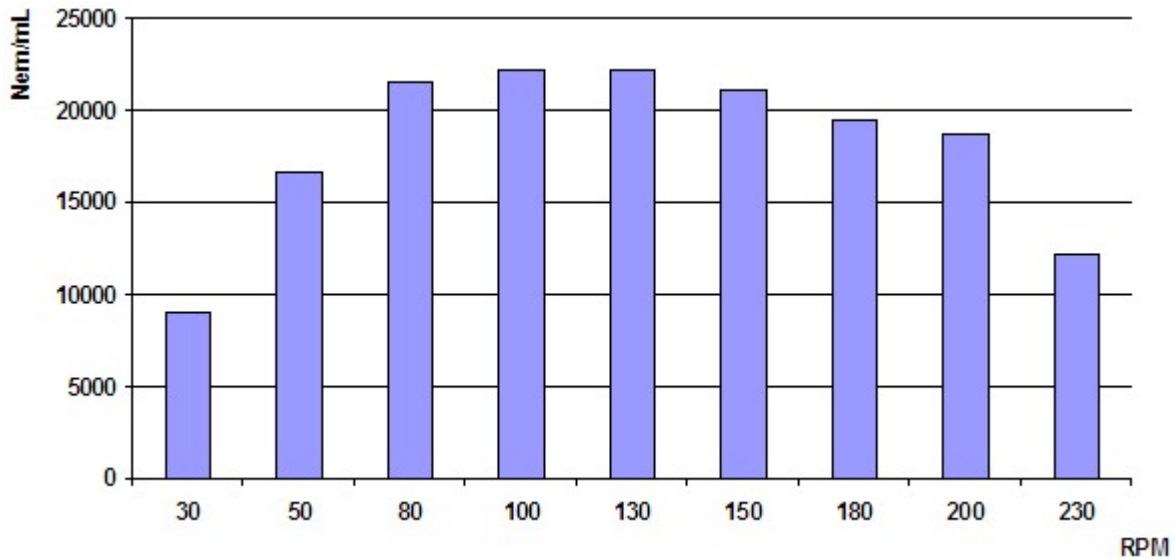


Figura 8.15. Representación gráfica de los estudios de agitación óptima para cultivo en matraces. Valores promedio.

8.5.2. Ensayos de crecimiento de nemátodos desarrollados en matraces

Una vez determinada la velocidad óptima para realizar cultivos en matraces, fueron realizadas estudios para determinar la curva de crecimiento de los nemátodos en medio líquido. La velocidad de agitación usada fue de 100 RPM. En matraces se realizaron variados experimentos, dentro de los que se puede mencionar el cultivo de los nemátodos en diferentes diluciones del medio P2. Al respecto, la Tabla 8.16, muestra los valores determinados en cada conteo diario de nemátodos realizados por 18 d de ensayo, mientras que la Figura 8.16., muestra las representaciones gráficas de estas mediciones realizadas en diferentes diluciones de medio P2 con las bacterias *E. coli* y *X. nem*. Los resultados de estos experimentos han sido expuestos en la sección 8.4.4., en los cuales se obtuvo los siguientes conteos finales y RF; para dilución 1:8, 2.630 (RF=12), para dilución 1:16, 4.200 (RF=17), y para dilución 1:32, 4.130 (RF=14). Finalmente, la cuarta gráfica de la Figura 8.16., muestra un resumen de todos los cultivos ensayados y comparaciones entre las curvas de crecimiento logradas con *E. coli* y *X. nem*.

Estos resultados contrastados con los excelentes resultados obtenidos con el medio M9C permitieron descartar los cultivos en medios líquidos complejos.

Tabla 8.16. Datos obtenidos de los cultivos realizados en matraces en diluciones de medio P2 con las bacterias *E. coli* y *X. nem.*

Día	Nem/mL \pm Desv.Est. (C/Co)					
	E. coli			Xen. Nem.		
	DILUCIONES DE MEDIO P2					
	1:8	1:16	1:32	1:8	1:16	1:32
1	220 \pm 0 (1)	250 \pm 0 (1)	300 \pm 0 (1)	200 \pm 0 (1)	200 \pm 0 (1)	300 \pm 0 (1)
2	220 \pm 0 (1)	250 \pm 0 (1)	300 \pm 0 (1)	200 \pm 0 (1)	200 \pm 0 (1)	300 \pm 0 (1)
3	220 \pm 0 (1)	250 \pm 1 (1)	310 \pm 1 (1)	200 \pm 0 (1)	200 \pm 1 (1)	390 \pm 1 (1)
4	260 \pm 0 (1)	380 \pm 0 (2)	1.200 \pm 1 (4)	200 \pm 1 (1)	1.020 \pm 1 (5)	420 \pm 1 (1)
5	450 \pm 0 (2)	520 \pm 1 (2)	1.250 \pm 1 (4)	520 \pm 1 (3)	1.160 \pm 1 (6)	890 \pm 2 (3)
6	800 \pm 1 (4)	880 \pm 1 (4)	1.480 \pm 1 (5)	920 \pm 2 (5)	1.420 \pm 1 (7)	1.420 \pm 3 (5)
7	990 \pm 1 (5)	1.800 \pm 2 (7)	1.550 \pm 2 (5)	1.630 \pm 2 (8)	1.560 \pm 2 (8)	1.780 \pm 4 (6)
8	1.245 \pm 1 (6)	1.970 \pm 3 (8)	2.080 \pm 3 (7)	2.500 \pm 3 (13)	1.560 \pm 1 (8)	1.395 \pm 3 (5)
9	1.270 \pm 1 (6)	2.600 \pm 2 (10)	2.890 \pm 3 (10)	2.430 \pm 3 (12)	1.560 \pm 1 (8)	1.870 \pm 3 (6)
10	1.480 \pm 1 (7)	3.820 \pm 3 (15)	3.420 \pm 3 (11)	2.860 \pm 4 (14)	1.930 \pm 1 (10)	2.440 \pm 4 (8)
11	2.120 \pm 4 (10)	4.200 \pm 3 (17)	3.200 \pm 4 (11)	3.540 \pm 3 (18)	1.900 \pm 2 (10)	3.400 \pm 4 (11)
12	2.630 \pm 3 (12)	3.630 \pm 4 (15)	4.130 \pm 4 (14)	3.560 \pm 4 (18)	2.430 \pm 3 (12)	3.420 \pm 4 (11)
13	1.980 \pm 2 (9)	3.980 \pm 4 (16)	3.780 \pm 3 (13)	3.640 \pm 5 (18)	2.130 \pm 3 (11)	3.740 \pm 4 (12)
14	1.600 \pm 2 (7)	3.750 \pm 5 (15)	3.120 \pm 4 (10)	3.680 \pm 4 (18)	2.210 \pm 3 (11)	4.180 \pm 4 (14)

15	1.720 ± 2 (8)	3.760 ± 3 (15)	3.000 ± 4 (10)	3.800 ± 3 (19)	3.660 ± 5 (18)	4.650 ± 5 (16)
16	1.850 ± 2 (8)	2.890 ± 2 (12)	2.390 ± 4 (8)	3.800 ± 3 (19)	3.710 ± 5 (19)	4.750 ± 5 (16)
17	1.790 ± 2 (8)	2.450 ± 2 (10)	2.430 ± 3 (8)	3.320 ± 3 (17)	2.810 ± 4 (14)	3.280 ± 5 (11)
18	1.580 ± 2 (7)	2.230 ± 2 (9)	1.500 ± 2 (5)	3.020 ± 3 (15)	1.950 ± 3 (10)	940 ± 1 (3)

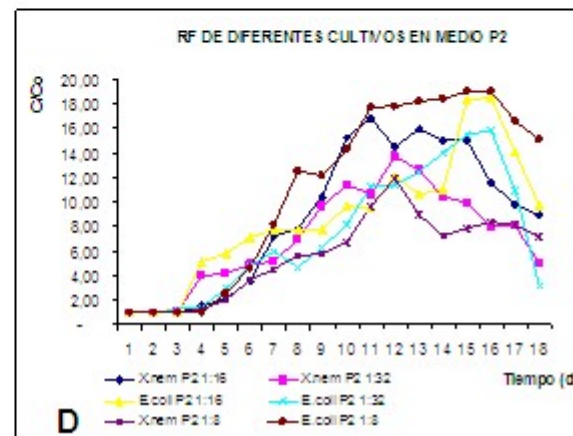
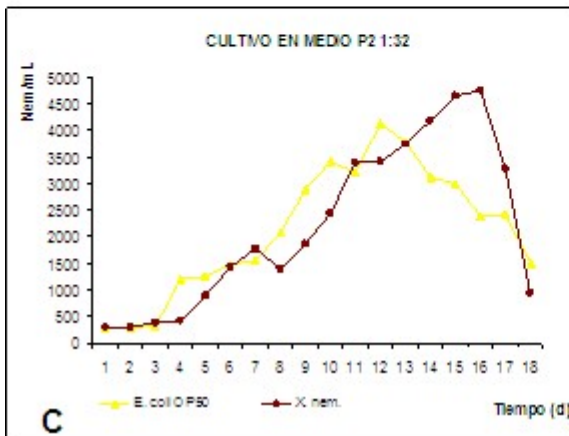
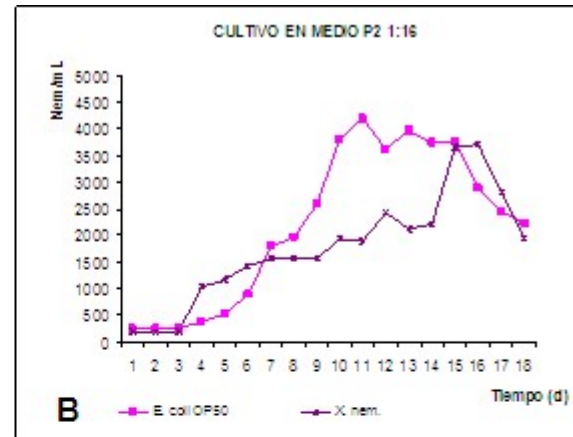
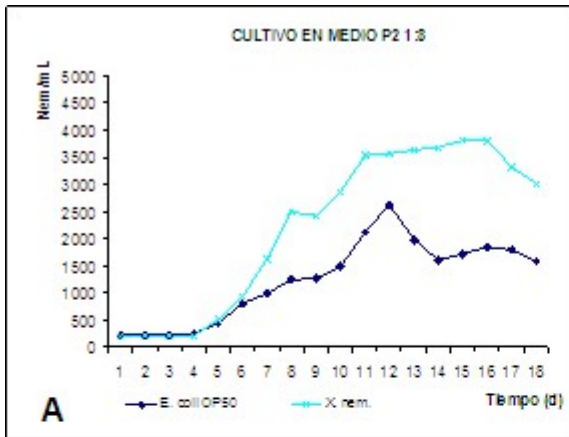


Figura 8.16. Curvas de crecimiento de los cultivos de nemátodos realizados en matraces con diferentes diluciones de medio de cultivo P2 alimentados con las bacterias *E. coli* y *X. nem.* A; dilución 1:8 de medio P2. B; dilución 1:16 de medio P2. C; dilución 1:32 de medio P2. D; resumen de la variación de RF & Tiempo (d) en las diferentes diluciones de medio P2.

Para determinar el consumo de oxígeno de los nemátodos en un cultivo activo en matraces se realizó un experimento que consistió en un cultivo en triplicado. Este cultivo se desarrolló en medio M9C. Se utilizaron matraces de 250 mL con un volumen de 50 mL de donde se inocularon 300 Nem/mL. Cuando los cultivos se encontraban con un título a los 1.100 Nem/L (día 13 del cultivo), se procedió a colectar los nemátodos y reunirlos en un solo matraz de 500 mL que contenía un volumen total de medio de cultivo de 250 mL, obteniéndose un título de nemátodos de 1.067 Nem/L, todos nemátodos en condiciones metabólicas activas.

En este matraz se realizaron tres mediciones de consumo de oxígeno utilizando el siguiente procedimiento; se procedió a incorporar aire a través de una piedra porosa hasta obtener una lectura constante del porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (68,62 %). Una vez obtenida esta situación se comenzó a medir la baja del porcentaje de oxígeno cada minuto por un período de 30 min hasta obtener un porcentaje de oxígeno disuelto cercano al 30 % (27,95 %). La Figura 8.17., muestra la baja del porcentaje de oxígeno en el medio de cultivo, en la gráfica se incorpora la desviación estándar de cada medición, siendo la línea continua la descrita por los valores promedios. Al analizar la correlación entre los tiempo (h) y los gramos de oxígeno disuelto en el medio ($\text{g O}_2/\text{L}$) es posible observar linealidad entre los datos ($R^2=-0,9955$). De esta expresión de la recta es posible obtener la pendiente cuya unidades son $(-)\text{g O}_2/\text{L}\cdot\text{h}$, como el volumen del ensayo es de 250 mL (0,25 L), es posible obtener $(-)\text{g O}_2/\text{h}$, lo que corresponde la velocidad específica de consumo de oxígeno ($q\text{O}_2$). Si se asume que el consumo de oxígeno es igual para todos los nemátodos incubados, es posible calcular $q\text{O}_2\cdot X$, y se obtiene la velocidad de consumo de oxígeno específica para 1 nemátodo.

La Tabla 8.17., resume los cálculos realizados con los datos obtenidos desde la gráfica expuesta en la Figura 8.17.

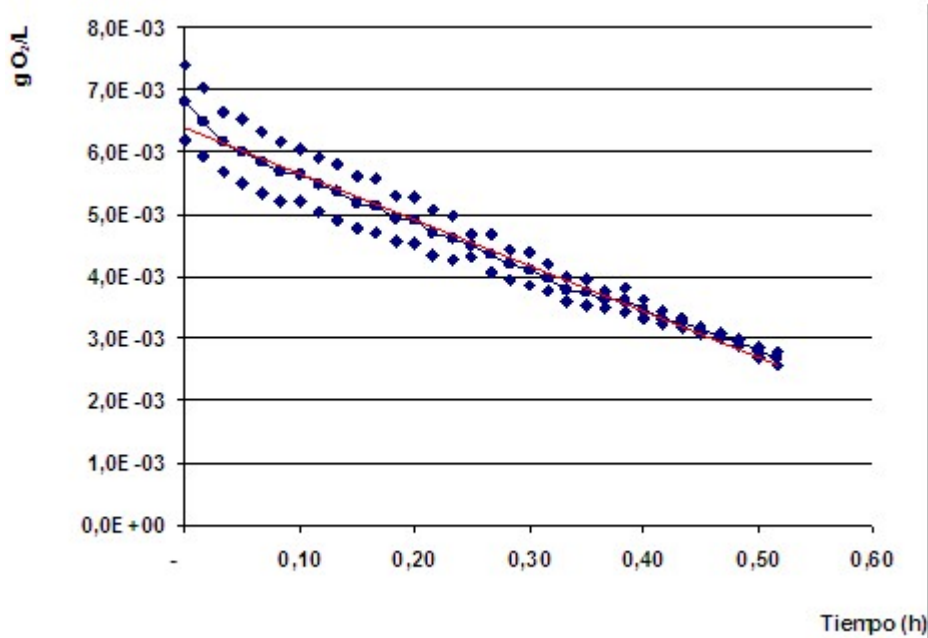


Figura 8.17. Gráfico del consumo de oxígeno de los nemátodos en un cultivo en matraz. Rojo; representación teórica lineal. Azul; representación de la curva experimental. Se incluye Desviación estándar de cada punto experimental.

Los valores expuestos en la Tabla 8.18., muestran que el cultivo de nemátodos requiere oxígeno $1,84 \times 10^{-3} \text{ g O}_2/\text{h}$, un valor más alto que el determinado para los nemátodos en condiciones basales ($2,389 \times 10^{-5} \text{ g O}_2/\text{h}$ a $22 \text{ }^\circ\text{C}$, y $5,268 \times 10^{-5} \text{ g O}_2/\text{h}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), mientras que el consumo individual de un nemátodo es de $6,88 \times 10^{-6} \text{ g O}_2/\text{Nem} \cdot \text{h}$, 6 veces mayor a los consumos individuales registrados en condiciones basales ($1 \times 10^{-6} \text{ g O}_2/\text{Nem} \cdot \text{h}$ a $22 \text{ }^\circ\text{C}$, y de $2 \times 10^{-6} \text{ g O}_2/\text{Nem} \cdot \text{h}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Tabla 8.17. Obtención de la velocidad específica de consumo de oxígeno de los nemátodos en cultivo.

PARAMETRO	VALOR	UNIDADES
Pendiente de la recta	$-7,34 \times 10^{-3}$	$\text{g O}_2/\text{L} \cdot \text{h}$
Volumen del ensayo	0,25	L
q_{O_2}	$1,84 \times 10^{-3}$	$\text{g O}_2/\text{h}$

$qO_2 * X$	$6,88 \times 10^{-6}$	$g O_2/h*Nem$
X	1.067	Nem/L
R^2	-0,9955	-

Estos valores de consumo de oxígeno son mayores a los descritos para cultivos de nemátodos entomopatógenos, para los cuales se ha reportado valores que van desde $2,9 \times 10^{-10} g O_2/Nem*h$ (para juveniles), hasta $2,8 \times 10^{-8} g O_2/Nem*h$ (para adultos) (De la Torre, 2003). Esto puede ser debido al ciclo de vida de los nemátodos, el cual es muy diferente, ya que los nemátodos entomopatógenos presentan una etapa de su desarrollo en condiciones pobres de aerobiosis, ya que deben reproducirse dentro del insecto muerto que han infectado, y en este período el intercambio de gases ocurre solo por difusión, mientras que *Cuticularia sp.* cepa chilena se desarrolla en los primeros 10 centímetros del suelo, el cual, dependiendo de la granulometría no debería presentar limitaciones de oxígeno para los nemátodos.

8.6. Estudio cinético del cultivo de nemátodos bacterívoros en reactores de mezcla completa

Se utilizó un reactor de 3 L marca Applikon, Biocontroller ADI 1010, y Bioconsole ADI 1025 (Figura 7.2.), a una velocidad de trabajo fue de 100 RPM. Esta velocidad de agitación de las aspas permitió obtener una saturación de oxígeno de 65 % en el medio de cultivo, siendo la velocidad de agitación mínima posible de usar para intentar un cultivo líquido en un reactor de mezcla completa. Desafortunadamente la velocidad de giro de las aspas de homogenización del reactor generaron daños severos sobre los frágiles cuerpos de los nemátodos y la viabilidad de un inóculo inicial de 2.000 Nem/mL descendió en 4 h hasta solo 110 Nem/mL. En consecuencia, este sistema de cultivo resultó inviable e imposible de implementar con buenos resultados, por lo que se descartó realizar otros experimentos en este tipo de reactores.

8.7. Estudio de las condiciones de operación para el cultivo de nemátodos bacterívoros en un reactor de lecho circulante diseñado para estos efectos

8.7.1. Diseño y construcción del reactor airlift de loop externo no convencional

Los ensayos y experimentos de cultivo de los nemátodos en un reactor de lecho circulante fueron realizados en un reactor airlift de loop externo no convencional construido especialmente para estas investigaciones en vidrio esterilizable con uniones de bronce y sellos de goma. La Figura 8.18., muestra un esquema de un diseño geométrico de un airlift de loop externo no convencional y una fotografía del reactor construido y utilizado en los experimentos. La zona ZD es la zona de desaceleración en la cual se acumulan la mayor fracción de nemátodos adultos (mayor densidad), lo que facilita la copula entre los de diferente sexo.

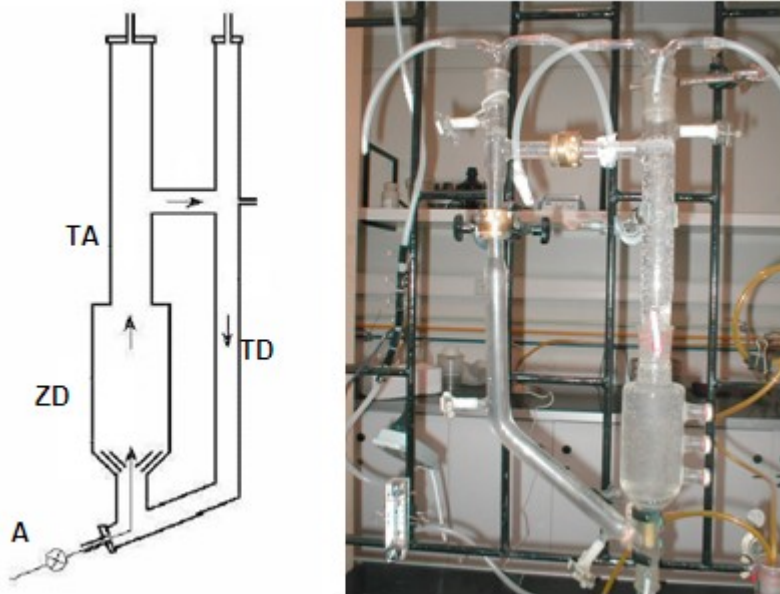


Figura 8.18. Izquierda; esquema de un reactor airlift de loop externo no convencional. A; entrada de aireación. ZD; zona de desaceleración. TA; tubo ascendente. TD; Tubo descendente. Derecha; fotografía del reactor airlift de loop externo no convencional desarrollado y utilizado en los experimentos de cultivo con los nemátodos.

La zona TA corresponde al tubo o sección ascendente. La zona TD corresponde a la sección descendente, y la letra A representa la entrada del aire al sistema. En la fotografía, es posible apreciar que en la zona ZD se han instalado tubos para tomar muestras, y que la parte superior de ambos lados pueden ser separadas del reactor para efectos de medición de algún parámetro, aseo y puesta en marcha del reactor.

8.7.2. Estudio del cultivo de nemátodos en un reactor airlift de loop externo no convencional

En el reactor se realizaron estudios de la cinética de crecimiento de los nemátodos, para ello el reactor se lleno con medio M9C nuevo y se esterilizó mediante autoclavado. Luego de enfriarlo hasta la temperatura ambiental, se procedió a conectar la aireación e inocular los nemátodos en el sistema de cultivo.

La Figura 8.19., muestra la evolución del cultivo en el reactor. En este caso se realizaron 3 experimentos con el mismo inóculo (320 Nem/mL), y a partir de un mismo stock de nemátodos, los cuales fueron crecidos con una aireación constante de 0,3 vvm.

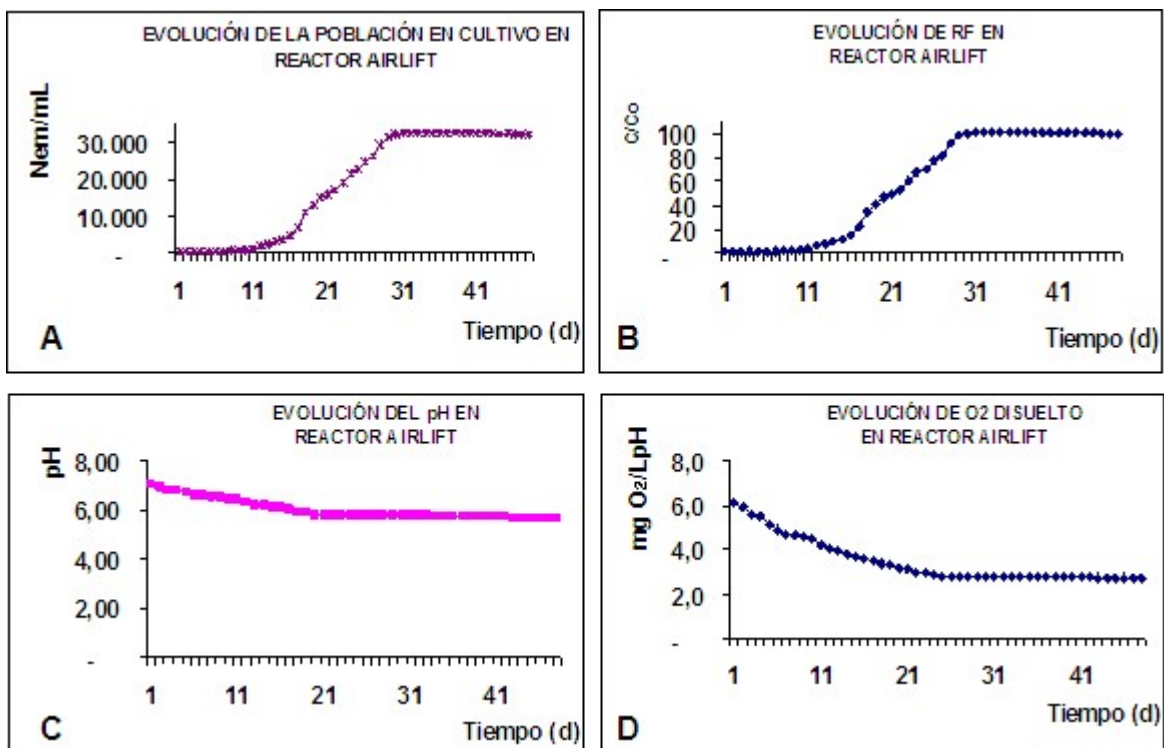


Figura 8.19. Curvas descriptoras del cultivo de nemátodos en reactor airlift de loop externo no convencional. A; gráfico de evolución poblacional de los nemátodos en cultivo, Nem/mL & Tiempo (d). B; gráfico de evolución del RF & Tiempo (d). C; gráfico de variación del pH & Tiempo (d) en el cultivo. D; gráfico de evolución de la concentración de Oxígeno disuelto & Tiempo (d).

Los cultivos desarrollados en el reactor airlift de loop externo no convencional permitieron obtener títulos finales de 33.000 Nem/mL, a partir de un inóculo de 320 Nem/mL. Estos valores reflejan un factor de reproducción RF=103, el valor más alto entre los ensayos de cultivo que se han desarrollado (placas de agar, matraces y reactor), lo que resulta auspicioso para el uso de este tipo de reactor en el cultivo de *Cuticularia sp.* cepa chilena.

Por otra parte, el valor de pH del medio cambia a medida que transcurre el cultivo, variando desde 7,01 a 5,64, valor que no afecta la integridad o viabilidad de los nemátodos. Asimismo, la saturación de oxígeno del medio también disminuye, ya que parte en 76% (6,1 mg O₂/L) y termina en 34% (2,7 mg O₂/L), lo que no resulta limitante para el cultivo.

8.7.3. Estudio del consumo de oxígeno del cultivo en airlift

En el cultivo desarrollado en el reactor airlift, después de alcanzar los valores más altos de población de nemátodos, se detuvo la aireación cuando se observó que el porcentaje de saturación del medio era constante (7,62 mg O₂/L), luego de detener la aireación se registró el descenso del oxígeno disuelto por un período de tiempo de 30 min. La aireación usada en este cultivo fue de 0,3 vvm.

La Figura 8.20. muestra la gráfica del descenso de la concentración de oxígeno disuelto, y la Tabla 8.18., muestra los cálculos obtenidos desde los datos registrados y graficados.

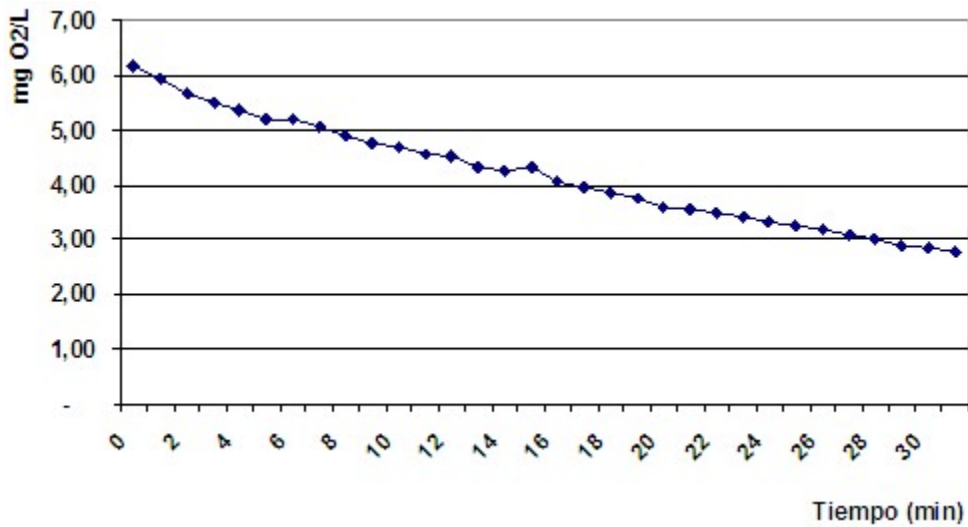


Figura 8.20. Curva de consumo de oxígeno de los nemátodos en el reactor airlift de loop externo no convencional. Valores promedio de 3 experimentos.

Tabla 8.18. Parámetros de consumo de oxígeno de un cultivo de nemátodos en el reactor

PARAMETRO	VALOR	UNIDADES
Pendiente de la recta	$-1,36 \times 10^{-2}$	g O ₂ /L*h
Volumen del ensayo	0,87	L
qO ₂	$1,18 \times 10^{-2}$	g O ₂ /h
qO ₂ * X	$1,94 \times 10^{-6}$	g O ₂ /h*Nem
X	6.090	Nem/L
R ²	-0,9927	-

airlift de loop externo no convencional.

Los valores expuestos en la Tabla 8.18., muestran que el cultivo de nemátodos en el reactor requiere oxígeno $1,18 \times 10^{-2}$ g O₂/h, un valor más alto que registrado para los nemátodos

cultivados en matraces ($1,84 \times 10^{-3}$ g O₂/h), y por ende mayor al determinado para las condiciones basales de los nemátodos ($2,389 \times 10^{-5}$ g O₂/h a 22 °C, y $5,268 \times 10^{-5}$ g O₂/h a 25 °C).

La Tabla 8.19., resume el consumo de oxígeno de los nemátodos en las diferentes condiciones en que ha sido posible determinarlo. El consumo de oxígeno es mayor en cultivos desarrollados en el reactor airlift, pero el consumo individual de los nemátodos es el mismo orden, entre 1×10^{-6} y $6,98 \times 10^{-6}$ g O₂/h*Nem.

Tabla 8.19. Consumo de oxígeno de los nemátodos en distintas condiciones de cultivo.

CONDICION	qO ₂	qO ₂ * X
Condiciones basales (22 C°)	$2,39 \times 10^{-5}$	1×10^{-6}
Cultivo en matraces	$1,84 \times 10^{-3}$	$6,88 \times 10^{-6}$
Cultivo en airlift	$1,18 \times 10^{-2}$	$1,94 \times 10^{-6}$
UNIDADES	g O ₂ /h	g O ₂ /h*Nem

8.7.4. Estudio de la transferencia de oxígeno usando medio de cultivo nuevo y agotado en el reactor airlift de loop externo no convencional

Se midió la transferencia de oxígeno al medio nuevo y a un cultivo de 30 d. Se utilizó diferentes flujos de aireación (vvm). Se determinó el aumento del % de oxígeno disuelto en función del tiempo mientras se aireaba a 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, y 0.5 vvm. Todas las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente.

La Figura 8.21., muestra las curvas de evolución de oxígeno disuelto en el reactor a diferentes flujos de aireación (vvm), así como también muestra el análisis de linealidad realizado a los diferentes valores de k_La obtenidos para cada vvm usado.

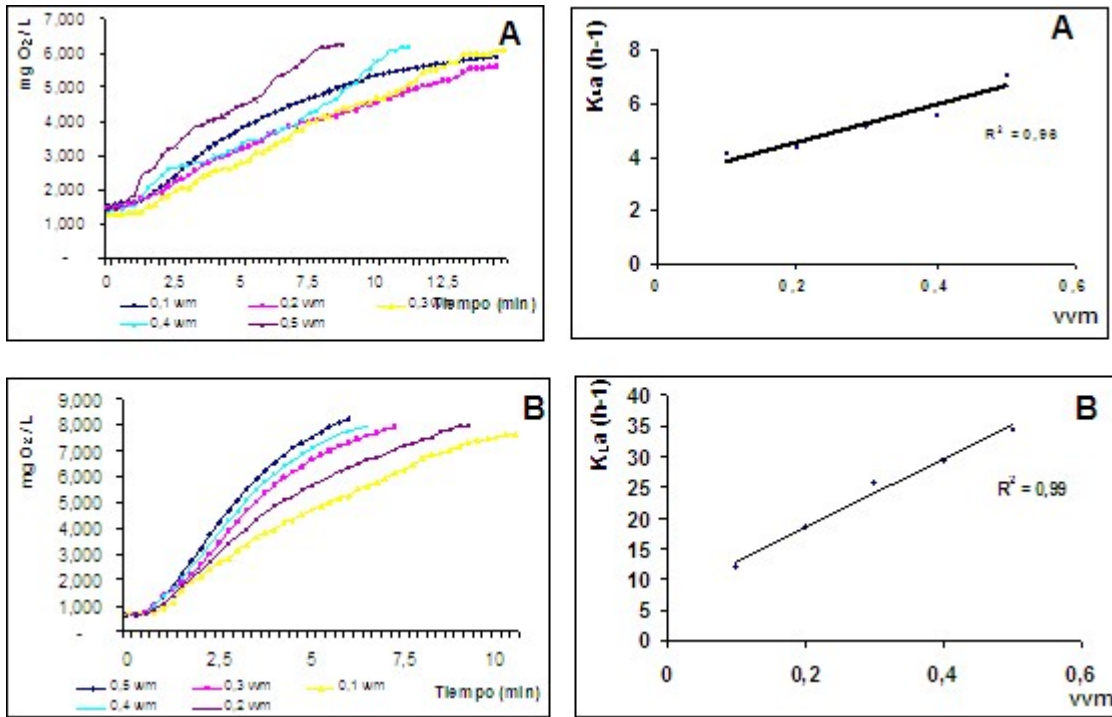


Figura 8.21. Curvas de oxígeno disuelto y análisis de linealidad de k_{La} a diferentes vvm. A; experimentos realizados en medio de cultivo usado. B; experimentos realizados en medio de cultivo nuevo.

La Tabla 8.20., muestra un resumen de los valores de k_{La} graficados en las curvas de linealidad de este parámetro en función de vvm. Es posible apreciar que existe un buen índice de correlación entre 0,1 y 0,5 vvm y el k_{La} (linealidad), lo que permite disponer de un dato de escalamiento del reactor.

Tabla 8.20. Resumen de valores de k_{La} a diferentes vvm en medio nuevo y agotado en el reactor airlift de loop externo no convencional.

VVM	MEDIO NUEVO	MEDIO AGOTADO
	k_{La} (h ⁻¹)	k_{La} (h ⁻¹)
0,1	11,98	4,15
0,2	18,49	4,35

0,3	25,77	5,19
0,4	29,44	5,59
0,5	34,37	7,03
R ²	0,993	0,960
Pendiente	55,74	7,00
Ecuación	$K_{La} = 55,74 * vvm + 7,28$	$K_{La} = 7 * vvm + 3,16$

El coeficiente de transferencia de oxígeno es mayor en el medio nuevo, por lo que la viscosidad aumentada del medio agotado (30 d de cultivo) dificulta el intercambio gaseoso desde el aire al medio. Si se consideran los valores calculados en la sección 8.7.3., donde $q_{O_2} = 1,18 \times 10^{-2} \text{ g O}_2/\text{h}$, y consideramos la saturación de oxígeno máxima (equilibrio) como $C_L^* = 7,6 \times 10^{-3} \text{ g O}_2/\text{L}$, y $C_L = 7,6 \times 10^{-4} \text{ g O}_2/\text{L}$, es posible utilizar la ecuación $k_{La \text{ req}} = q_{O_2}/(C_L^* - C_L)$, de donde es posible calcular el k_{La} requerido por el cultivo estudiado. El valor de $k_{La \text{ req}}$ obtenido es $1,72 \text{ h}^{-1}$. Este valor es pequeño si se compara con los valores de k_{La} obtenidos en medio nuevo y medio agotado. En consecuencia, es posible asegurar que el cultivo no presenta limitaciones de oxigenación y también que el reactor cumple con las necesidades de transferencia de oxígeno que el sistema de cultivo requiere.

8.7.5. Estudio de la velocidad de circulación del líquido y tiempo de mezcla

Se determinó la velocidad de circulación del líquido cuando se usa un flujo de aireación de 0,3 vvm. Las mediciones realizadas consistieron en el tiempo que un sensor de pH demora en detectar un pulso de pH (alcalino, NaOH, pH=12) inyectado a 50 cm de distancia lineal del sensor.

Se realizaron 10 mediciones de tiempo (10 pulsos), se registró el tiempo entre la inyección y la detección del cambio de pH, y también el tiempo que se tardaba en desaparecer la alteración de pH, es decir, cuando la medición de pH fue estable (tiempo de mezcla). Los registros de estas mediciones se exponen en la Tabla 8.21.

De las 10 mediciones de tiempo se calculo un promedio (6,2 seg) y como la distancia recorrida fue siempre 50 cm, la velocidad del líquido corresponde a $v=50/6,2$ (8,1 cm/seg). Esta velocidad corresponde a la velocidad del líquido en la zona TA del reactor (tubo ascendente). Esta velocidad del fluido podría ser comparable con lo descrito por Young *et al.* (1998), donde se reporta una velocidad de la partícula (individuo juvenil; IJ) como 0,05 cm/seg, sólo si en éste último caso se supone que la densidad de la partícula es igual a la del medio, siendo así la velocidad determinada es mucho más alta que la reportada. Esto es un reflejo de la buena mezcla lograda en el reactor, pero además puede ser un indicador de que la velocidad es demasiado elevada y podría dificultar el contacto entre los distintos sexos de *Cuticularia sp.*, sin duda este es un aspecto que debe ser dilucidado en estudios posteriores.

Al utilizar una aireación de 0,3 vvm la perturbación de pH inyectada tarda 17,8 seg en desaparecer, por lo que en este caso, donde no se tienen entradas ni salidas de material del reactor, es posible decir que este correspondería al tiempo de mezcla del medio.

Tabla 8.21. Datos y cálculos de velocidad de fluido y tiempo de mezcla en el reactor airlift de loop externo no convencional.

Pulso pH	Tiempo (seg)	Tiempo (seg) para que pH sea estable
1	5,3	20,2
2	6,0	15
3	6,2	18,5
4	5,8	18,4
5	8,5	15,5

6	5,7	18,4
7	5,1	17,9
8	6,8	17,2
9	6,0	18,1
10	6,4	19,2
Promedio (seg)	6,2 ± 0,91	17,8 ± 1,50
Velocidad liquido (cm/seg)	8,1	
Distancia (pulso al detector) (cm)	50	
vvm	0,3	

8.7.6. Estudio cinético del cultivo de nemátodos en el reactor airlift de loop externo no convencional

Se realizaron tres experimentos para el cultivo de los nemátodos en el reactor arilift de loop externo no convencional. Cada dato determinado (conteo) esta expresado en Nem/mL y es el resultado de 3 conteos bajo microscopio de una misma muestra.

Se calculó el coeficiente de regresión (R^2) de cada curva determinada experimentalmente. Los valores de R^2 encontrados para las 3 curvas se exponen en la Figura 8.22. las cuales fueron confeccionadas con los datos experimentales 1, 2, y 3 expuestos en la Tabla 8.23. Los valores de R^2 determinados son similares entre sí, siendo $R^2=0,9227$ para el experimento 1, $R^2=0,9199$ para el experimento 2, y $R^2=0,9137$ para el experimento 3.

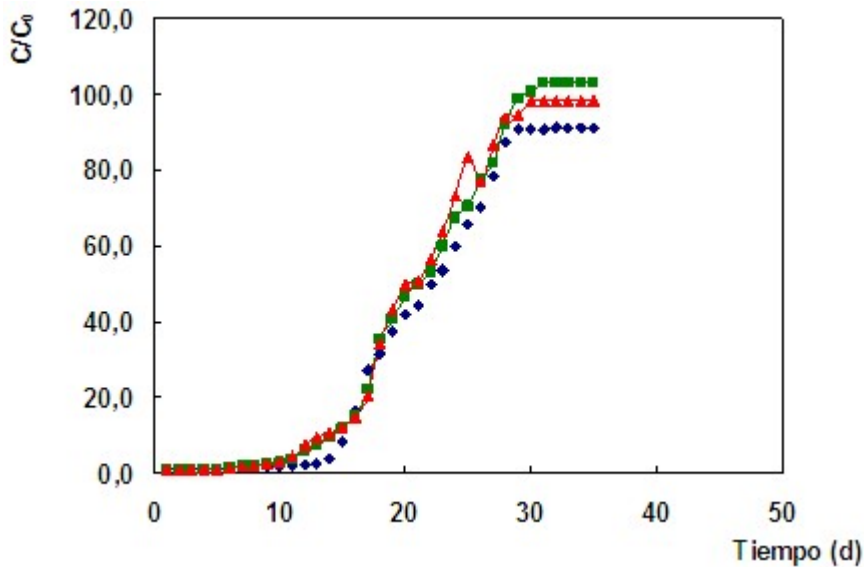


Figura 8.22. Tres curvas de crecimiento independiente de nemátodos en el reactor airlift de loop externo no convencional. Según datos expuestos en Tabla 8.24. Verde; experimento N° 1. Rojo; experimento N° 2. Azul; experimento N° 3.

Para determinar si la similitud de los datos experimentales es estadísticamente significativa, se realizó un conjunto de análisis estadísticos. Los resultados arrojados por el test estadístico (Tabla 8.23.), indican que aunque la kurtosis y la uniformidad estandarizada para los tres grupos de datos no se encontró en el rango de ± 2 , valor de p-value para el test de Cochran fue $>0,05$ (1,0). Esto indica que con un 95% de confianza que es posible asegurar que los datos no presentan diferencias estadísticamente significativas, lo que se confirma con los valores similares encontrados para los coeficientes de regresión.

En vista de que la kurtosis estandarizada determinada se escapa de los valores ± 2 , se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. En la Tabla 8.22., se observa que el valor de p-value para este test es $>0,05$, (p-value = 0,661701); por lo tanto, no existen diferencias significativas entre los tres grupos de datos con un 95% de confianza.

Tabla 8.22. Resumen de los estadígrafos y test estadístico de comparación de los tres grupos de datos obtenidos de cultivo en airlift.

GRUPO DE DATOS	UNIFORMIDAD ESTANDARIZADA	KURTOSIS ESTANDARIZADA
----------------	---------------------------	------------------------

								R
	Nem/mL	Nem/mL	Nem/m L	C/Co	C/Co	C/Co	C/Co	
1	320	320	320	1,00	1,00	1,00	1,00	$\pm 0,00$
2	320	318	320	1,00	0,99	1,00	1,00	$\pm 0,00$
3	320	322	318	1,00	1,01	0,99	1,00	$\pm 0,01$
4	330	323	330	1,03	1,01	1,03	1,02	$\pm 0,01$
5	350	348	343	1,09	1,09	1,07	1,08	$\pm 0,01$
6	380	393	400	1,19	1,23	1,25	1,22	$\pm 0,03$
7	550	550	450	1,72	1,72	1,41	1,61	$\pm 0,15$
8	640	700	510	2,00	2,19	1,59	1,93	$\pm 0,25$
9	730	780	560	2,28	2,44	1,75	2,16	$\pm 0,29$
10	890	948	580	2,78	2,96	1,81	2,52	$\pm 0,50$

11	1.150	1.356	600	3,59	4,24	1,88	3,24	$\pm 1,00$
12	1.910	2.400	620	5,97	7,50	1,94	5,14	$\pm 2,35$
13	2.430	2.990	800	7,59	9,34	2,50	6,48	$\pm 2,90$
14	3.020	3.410	1.200	9,44	10,66	3,75	7,95	$\pm 3,01$
15	3.800	3.880	2.600	11,88	12,13	8,13	10,71	$\pm 1,83$
16	4.880	4.800	5.300	15,25	15,00	16,56	15,60	$\pm 0,69$
17	7.100	6.500	8.700	22,19	20,31	27,19	23,23	$\pm 2,90$
18	11.230	10.980	10.100	35,09	34,31	31,56	33,66	$\pm 1,51$
19	13.000	13.760	12.000	40,63	43,00	37,50	40,38	$\pm 2,25$
20	15.000	16.000	13.400	46,88	50,00	41,88	46,25	$\pm 3,35$
21	16.000	16.230	14.200	50,00	50,72	44,38	48,36	$\pm 2,84$
22	17.000	18.120	16.000	53,13	56,63	50,00	53,25	$\pm 2,71$

23	19.230	20.340	17.100	60,09	63,56	53,44	59,03	± 4,20
24	21.540	23.400	19.200	67,31	73,13	60,00	66,81	± 5,37
25	22.600	26.700	21.050	70,63	83,44	65,78	73,28	± 7,45
26	24.800	24.690	22.430	77,50	77,16	70,09	74,92	± 3,41
27	26.300	27.800	25.060	82,19	86,88	78,31	82,46	± 3,50
28	29.500	30.100	28.010	92,19	94,06	87,53	91,26	± 2,75
29	31.650	30.240	29.030	98,91	94,50	90,72	94,71	± 3,35
30	32.200	31.420	29.050	100,63	98,19	90,78	96,53	± 4,19
31	33.000	31.450	29.110	103,13	98,28	90,97	97,46	± 5,00
32	33.000	31.450	29.200	103,13	98,28	91,25	97,55	± 4,88
33	33.000	31.450	29.230	103,13	98,28	91,34	97,58	± 4,83
34	33.000	31.450	29.230	103,13	98,28	91,34	97,58	± 4,83

35	33.000	31.450	29.230	103,13	98,28	91,34	97,58	$\pm 4,83$
----	--------	--------	--------	--------	-------	-------	-------	------------

La Figura 8.23, muestra una representación gráfica de la curva de cultivo de los nemátodos en el reactor airlift. Esta curva fue confeccionada con los valores promediados de los conteos obtenidos en los mismos días de cultivo en los tres experimentos independientes que se muestran en la Tabla 8.24 ($R^2=0,9209$). El gráfico de la Figura 8.23 también incluye la representación en barras de la desviación estándar de cada punto. Al respecto, llama la atención que magnitud de la desviación estándar es mayor hacia el final del cultivo, esto puede ser explicable por las magnitudes de los conteos, ya que es muy posible que exista mayor imprecisión en los conteos cuando la población de nemátodos es también mayor.

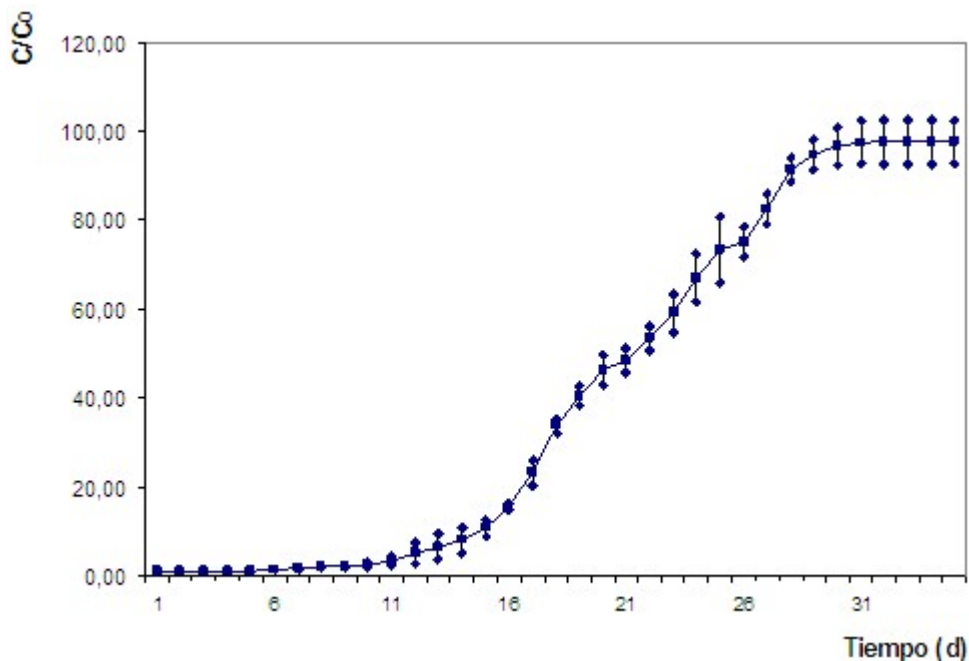


Figura 8.23. Curva promedio de la cinética de crecimiento de los nemátodos en el reactor airlift de loop externo no convencional. Según los datos expuestos en la Tabla 8.23.

Según la reparametrización del modelo de Gompertz (Chavarría-Hernández and De la Torre, 2001), la expresión del modelo aplicable a un cultivo de nemátodos entomopatógenos es:

$$C/C_0 = (C/C_0)_{\max} * e [-e (\mu_{\max} e / (C/C_0)_{\max} (\lambda - t) + 1)]$$

Donde las variables experimentales son C/C_0 , que corresponde a la concentración de nemátodos (C), dividida por el inóculo de nemátodos agregado (C_0), por lo que es un número adimensional, y el tiempo (t) que corresponderá al tiempo de cultivo transcurrido al momento de tomar la muestra y contar los nemátodos del cultivo.

Los términos $(C/C_0)_{\max}$ corresponde al valor de RF máximo y coincide con el valor asintótico de la curva. El μ_{\max} , corresponde al período en que obtenemos la velocidad máxima de aparición de nemátodos en el medio de cultivo, por lo que es coincidente con el proceso de eclosión de huevos, y con la pendiente de la zona lineal de la curva. El valor de λ corresponde al tiempo que demora el cultivo en comenzar a aumentar su concentración. En este caso corresponde al período de tiempo necesario para los nemátodos copulen, depositen sus huevos y estos comiencen a eclosionar, es decir la fase lag del cultivo.

La Figura 8.24., muestra las comparaciones de la curva promedio obtenida de las curvas experimentales (tres) con la descrita por el modelo, y es posible apreciar su semejanza. Pero para dilucidar si la ecuación reparametrizada de Gompertz modela los datos experimentales, se realizó un análisis aplicando el método de los mínimos cuadrados, encontrándose que el modelo si se ajusta a los datos experimentales o dicho de otro modo si modela la información obtenida experimentalmente. Los errores acumulados obtenidos para las diferentes curvas fueron 520 para el experimento 1, 365 para el experimento 2, 1.049 para el experimento 3 y 293 para la curva promedio. De éste análisis estadístico es posible obtener los valores de las variables de la ecuación que presentaron el error mínimo y corresponden a las resumida en la Tabla 8.24., donde se muestran los valores de las variables cinéticas de los cultivos de *Cuticularia sp.* en el reactor airlift de loop externo no convencional.

Tabla 8.24. Valores de los parámetros cinéticos del cultivo de *Cuticularia sp. cepa chilena*

PARAMETRO	VALOR OBTENIDO DESDE		UNIDADES
	EL MODELO	EXPERIMENTOS*	

$(C/C_0)_{\max}$	105,43	$97,58 \pm 4,83$	-
μ_{\max}	20,45	$21 \pm 1,12$	d^{-1}
λ	13,98	$12,82 + 0,08$	d

* Cálculos realizados con los datos de la curva promediada.

Los valores de los parámetros cinéticos característicos del cultivo de *Cuticularia sp.* obtenido a través del modelo matemático coinciden en gran medida con las observaciones realizadas durante el estudio del ciclo de vida del nemátodo, puesto que, por ejemplo; en las observaciones experimentales se determinó un tiempo lag de 12 d para comenzar a ver eclosión de huevos, y el modelo arroja un tiempo (λ) de 13,98 d para la fase lag del cultivo, pero, por su parte, el valor obtenido desde los datos de la curva promedio arrojan un valor de $12,82 \pm 0,08$, lo que prácticamente coincide con las observaciones experimentales anteriores al uso del reactor airlift. Si bien, entre el modelo y lo experimental hay una diferencia de casi 1 d, esto es totalmente explicable por la variación experimental.

Por otra parte, el valor calculado desde el modelo para C/C_0 es de 105,43, mientras que el valor máximo determinado desde la curva promedio es de $97,58 \pm 4,83$, mientras que el máximo valor detectado experimentalmente es de 103, un número muy cercano que no presenta diferencias estadísticamente significativas con el modelo reparametrizado de Gompertz. Cuando se analiza el valor de μ_{\max} obtenido desde el modelo matemático (20,45), es posible notar que prácticamente no difiere del calculado con los datos de la curva experimental promedio ($21 \pm 1,12$). Estas observaciones y comparaciones, y el error acumulado menor obtenido (293) permiten aseverar que los datos de cultivo de *Cuticularia sp.* se ajustan al modelo reparametrizado de Gompertz.

Por otra lado, la utilización del reactor airlift de loop externo no convencional permitió obtener mejores resultados que en los cultivos ensayados en placas Petri y matraces Erlenmeyer, obteniéndose los mayores conteos finales y los mejores factores de reproducción (RF) con *Cuticularia sp.* Al respecto, la Tabla 8.25., muestra un resumen de los mejores resultados obtenidos en los cultivos realizados en placas Petri, matraces y en el reactor airlift.

Tabla 8.25. Comparación de los RF obtenidos en los distintos cultivos de nemátodos ensayados.

CULTIVO	INOCULO	CONTEO FINAL	RF
	Nem/mL	Nem/mL	Ci/Cf
Placas de agar	2.300 ± 3	55.900 ± 8 (***)	24
Matraces	500 ± 1	22.200 ± 5	44
Airlift de loop externo no convencional	320 ± 0	33.000 ± 4	103
Modelo Entomopatógenos			
Matraces (*)	500	14.700	29
Tanque agitado (*)	2.000	90.000	45
Airlift de loop interno (*)	500	60.000	120
Airlift de loop externo no convencional (**)	500	97.500	195

(*) Neves et al. 2001.

(**) Chavarría-Hernández and De la Torre, 2001.

(***) Nemátodos totales en cada placa Petri. La Desv. Est. es la generada en los conteos.

El valor más alto de factor de reproducción (RF=103) fue obtenido cuando se utilizó el reactor para cultivar los nemátodos (experimento 1). Este valor es comparable a los resultados reportados para nemátodos entomopatógenos cultivados en un reactor airlift de loop interno (RF=120) (Neves *et al.* 2001), pero bastante menor al reportado para el cultivo de este tipo de nemátodos en un reactor airlift de loop externo no convencional de similares características (RF=195) (Chavarría-Hernández and De la torre, 2001.). No obstante, es importante considerar en esta comparación que las especies de nemátodos son muy diferentes, ya que difieren en su modo de reproducción, siendo los entomopatógenos

hermafroditas y al mismo tiempo ovipositores, y además de permitir lograr 2 generaciones en un ciclo de cultivo de la misma duración (30 d), lo que se traduce en un ciclo reproductivo más corto o acelerado.

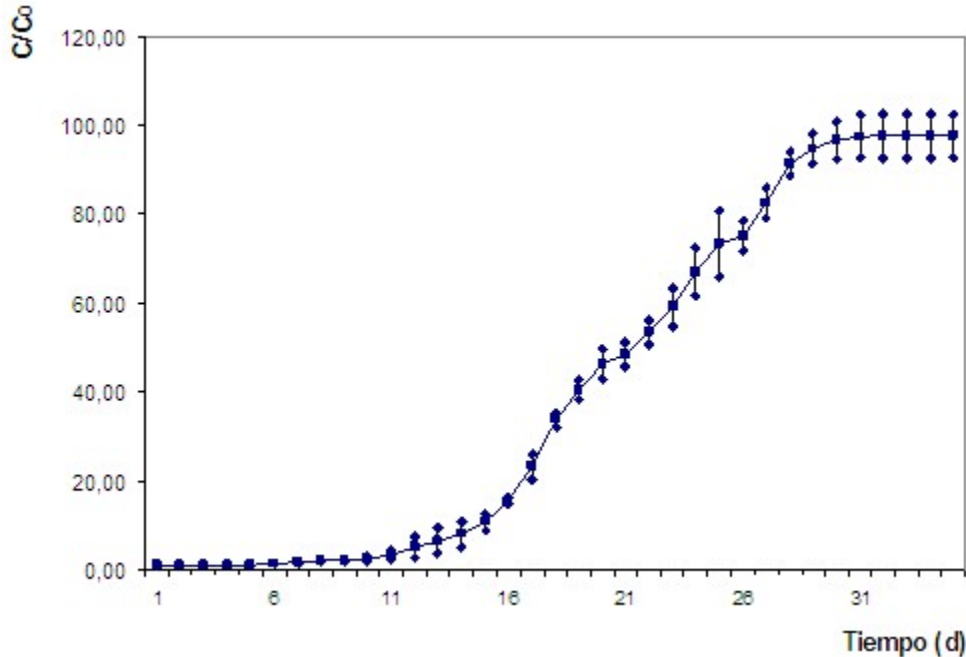


Figura 8.24. Comparación de la curva promedio y el modelo de Gompertz. Línea Roja; corresponde a la curva del modelo de Gompertz. Línea azul; corresponde a la curva promedio extraída de las 3 curvas experimentales. Cada punto con su desviación estándar.

8.8. Estudio de los nemátodos cultivados en suelo contaminado con metales pesados

Para realizar una evaluación preliminar de si existe efecto y de que tipo puede ser este efecto sobre las plantas acumuladoras de metales, por parte de los nemátodos, se diseñó un experimento para evaluar el efecto de la presencia de nemátodos en la rizósfera de las plantas acumuladoras. Se concentraron los nemátodos hasta un título de 600 Nem/mL y se resuspendieron en tampón M9. Luego se aplicaron en una relación de 1.000.000 Nem/m² de suelo (cuadro de 10 x 10 cm, 100.000 Nem).

8.8.1. Cultivo de las plantas acumuladoras de metales pesados

Durante el mes de diciembre de 2005 se inició un cultivo de plantas acumuladoras de metales (Dedal de oro, *Eschscholtzia californica*, (Figura 8.25.)). Las plantas se cultivaron en suelos contaminados de la zona de Puchuncaví, hasta el mes de marzo del 2006, mes en el cual se aplicaron los nemátodos en unos de los riegos regulares del cultivo. El cultivo se continuó manteniendo (en presencia de los nemátodos) hasta el mes de junio de 2006 (3 meses).



Figura 8.25. Dedal de oro, *Eschscholtzia californica*. Imagen de las macetas de cultivo con las cuales se realizaron pruebas de sobrevivencia de los nemátodos y de bioremediación.

8.8.2. Estudio de la influencia de los nemátodos en la capacidad acumuladora de las plantas

Se diseñó un ensayo consistente en el cultivo de las plantas acumuladoras (dedal de oro) en suelo contaminado de la zona de Puchuncaví. La Tabla 8.26., muestra algunos valores característicos de los metales encontrados en esta zona. Estos datos han sido cortésmente facilitados por la Dra. (c) May Lin Almendras, alumna Tesista del Programa de Doctorado en Biotecnología PUCV-UTFSM, Tesis “Estabilización de metales pesados en suelos contaminados utilizando bacterias sulfato reductoras”. Las plantas fueron cultivadas durante 6 meses en total. Los tres primeros meses sin la presencia de los nemátodos, bajo un régimen de riego cada 2 días, o según la necesidad, evitando siempre la abundancia de agua.

Tabla 8.26. Concentración de metales pesados en suelos de la zona de Puchuncaví.*

Muestra	Profundidad	Humedad	Concentración de metales pesados (mg/Kg) **				
	cm	%	Cu	Pb	Zn	Fe	As
T-1	0 a 10	0,20	167	25	60	3.900	19
T-2	0 a 10	0,15	245	39	66	2.610	26
T-1	30 a 40	0,19	53	2	51	5.300	3
T-2	30 a 40	0,12	23	5	52	2.830	<2

* Datos por cortesía de Dr. (c) May Lin Almendras. Tesista Programa de Doctorado en Biotecnología PUCV y UTFSM. Tesis “Estabilización de metales pesados en suelos contaminados utilizando bacterias sulfato reductoras”.

** Análisis realizados por el Laboratorio ALS Chemex, mediante Espectroscopia de Emisión en Plasma Acoplado Inductivamente (ICP- AES). Límite de detección: 0.01 mg/L.

Al inicio del cuarto mes se aplicaron los nemátodos y se mantuvo el cultivo bajo las mismas condiciones hasta completar los 6 meses. La Tabla 8.27., muestra la masa obtenida desde las plantas cosechadas desde los maceteros que contenían solo plantas y solo plantas y nemátodos (ningún otro tratamiento). En ambos casos se cosecharon 20 plantas de cada macetero y se cortaron cuidadosamente las raíces.

Tabla 8.27. Características físicas de las plantas usadas en ensayo de remediación

Dedal de oro	Parte Vegetal	Peso de la muestra (g)
Con Nemátodos	Raíces	0,6
	Follaje	13,7
Sin Nemátodos	Raíces	0,9

	Follaje	21
--	---------	----

Si comparamos la cantidad de masa radicular y de follaje de las 20 plantas tratadas con nemátodos, es posible apreciar que es menor que las plantas no tratadas, pero al comparar la razón follaje/raíz, es posible apreciar que esta razón es ligeramente mayor (follaje/raíz=22,8 versus 23,3) en las plantas cultivadas en presencia de nemátodos, lo que podría indicar que las raíces aunque sean menores en cantidad nutren mejor a las plantas. No obstante, esta es solo una apreciación preliminar y debe ser confirmada con más experimentación.

Por otra parte, al analizar la presencia de metales en las plantas cosechadas (Análisis realizados Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad de Valparaíso) (Tabla 8.28.), es posible apreciar que solo existe mayor cantidad de Hierro (Fe) y Manganeso (Mn) en las plantas cultivadas en presencia de nemátodos, lo que no indica mejoría en la capacidad de acumulación, dado que todas las demás plantas presentan niveles de metales similares en las raíces y el follaje, independientemente de la presencia de nemátodos en el macetero. No obstante, es claramente apreciable que las plantas poseen una excelente capacidad de acumular metales en sus tejidos, ya que los niveles de Cobre (Cu) y Plomo (Pb) son comparables a los encontrados en las muestras de suelo, mientras que las cantidades de Zinc (Zn) triplican las presentes en el suelo, y en el caso del Hierro (Fe) las plantas lo acumulan preferentemente en sus raíces.

Tabla 8.28. Concentración de metales pesados en plantas usadas en ensayo de remediación

Dedal de oro	Parte Vegetal	Concentración de metales pesados (mg/Kg) *				
		Cu	Pb	Zn	Fe	Mn
Con Nemátodos	Raíces	25,8	5,14	145	5.833	8,61
	Follaje	13,7	2,32	199	943	3,65

Sin Nemátodos	Raíces	50,1	10,8	173	5.537	5,67
	Follaje	14,2	9,94	200	486	4,02

* Análisis realizados por el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad de Valparaíso. Utilizando un Espectrofotometro de Absorción Atómica, Perkin Elmer, Analyst 300. Metodología de Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama, usando Aire-Acetileno. Límite de detección: 0,01 ug/g

Estos datos muestran la necesidad de evaluar adecuadamente la influencia de la presencia de los nemátodos en la capacidad de acumulación de metales por parte de las plantas. Un aspecto crítico de estos ensayos resulta ser lo prolongado que deben ser para poder apreciar cambios en la acumulación de metales, ya que una vez terminado este ensayo preliminar y discutidos los datos con especialistas en medio ambiente y técnicas agronómicas se estimo necesario realizar ensayos con una duración mayor a un año.

Es importante mencionar en este punto que el principal aspecto que se requería evaluar es la capacidad de sobrevivencia de los nemátodos una vez cultivados en medio líquido. Esta inquietud nació debido a que los nemátodos indudablemente han sufrido una adaptación al provenir de un sustrato sólido (suelo) a un medio líquido, ser cultivados en este medio libre de contaminantes, y luego sufrir un repentino retorno al sustrato sólido con presencia de agentes contaminantes. En consecuencia, el principal objetivo del experimento de fitoremediación fue evaluar la capacidad de sobrevivencia de los nemátodos al ser puestos en el suelo contaminado con metales pesados. Esto toma especial importancia cuando se considera que existen reportes en el área de estudio que indican concentraciones mucho mas elevadas de metales pesados que las expuestas en la Tabla 8.26., por ejemplo; se han reportado en los primeros 20 cm del suelo concentraciones de Cu que van desde los 45,4 a 3.718 mg/Kg, mientras que para Zn 124,8 a 174,4 mg/Kg, para Pb 21,3 a 353 mg/Kg, para Cd 0,05 a 1,5 mg/Kg, y para el Fe 47.531,3 a 50.261 mg/Kg (Ginocchio *et al.* 2004).

8.8.3. Estudio de la sobrevivencia de los nemátodos en suelo contaminado con metales pesados

De los 100.000 nemátodos aplicados en cada macetero del ensayo de remediación, al pasar los 3 meses de ensayo en presencia de los nemátodos, estos fueron recuperados del suelo. Esta recuperación fue realizada procesando por tamizado la totalidad de la tierra contenida en el macetero. La Tabla 8.29., muestra los nemátodos aplicados en cada macetero y los recuperados después de 3 meses.

Tabla 8.29. Porcentaje de nemátodos que sobreviven luego de 3 meses de ensayo.

Ensayo	Macetero	100.000 Nemátodos aplicados por macetero
		Nemátodos recuperados vivos
Con Nemátodos	1	48.000 \pm 12
	2	52.000 \pm 11
	3	62.000 \pm 11
Promedio		54.000
Porcentaje sobrevivencia		54 %

La evaluación de la cantidad de nemátodos sobrevivientes permitió determinar que el 54 % de los nemátodos pueden soportar la adversidad de las condiciones que el retorno al medio sólido contaminado representa, al menos hasta el tercer mes de permanencia en este medio ambiente. Sin duda esto representa un buen logro dado que las condiciones son muy diferentes a las cuales las múltiples generaciones de nemátodos han sido sometidas en el reactor durante los cultivos sucesivos, por lo cual existe una prolongada adaptación a condiciones favorables u óptimas. Esto muestra una muy buena capacidad de respuesta y adaptabilidad de los nemátodos a condiciones de vida extremas, siendo un factor favorable para su aplicación en técnicas de remediación de sitios impactados. Esto muestra que la

versatilidad descrita para los nemátodos de adaptarse a condiciones extremas no solo le permiten soportar cambios estacionales y sequías (McSorley 2003, Yeates 1998), sino también la presencia de contaminantes nocivos como los metales pesados. Al respecto, ya se ha mencionado la capacidad descrita en nemátodos de sintetizar sustancias quelantes de metales similares a las fitoquelatinas fabricadas por las plantas (Barsyte *et al.* 2001). Estas características de los nemátodos han hecho posible su utilización como indicadores del estado fértil de los suelo (Neher 2001), por lo que resultaría extraño utilizarlos como indicadores de contaminación y nivel de impacto de un suelo determinado.

No obstante, de estas observaciones surgen algunas dudas, como por ejemplo; cómo saber si este porcentaje de sobrevivencia corresponde o no, a una nueva generación de nemátodos que ya ha iniciado un ciclo de vida, o varios ciclos, en el suelo, y realmente la mortandad al aplicarlos al suelo es mucho mayor que el 56% estimado *a priori*.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El aislamiento del nemátodo estudiado fue posible sólo después de efectuada la cuarta campaña de muestreo de los suelos. Esta campaña fue ejecutada durante el mes de Agosto (Invierno), después de avanzada la época de lluvias en la región central del país. La humedad del suelo de Puchuncaví en esta época del año alcanza el 15 a 23% (Ginocchio *et al.* 2004), por lo que es un indicador de la sensibilidad a la sequía que los nemátodos de la zona de estudio presentan. Esto constituye un indicador de la necesidad de riego constante cuando se pretenda instaurar un sistema de remediación biológica integral (RBI) que utilice la tríada Planta-Bacteria-Nemátodo, que anteriormente se planteó. Si se une esta observación con el porcentaje de sobrevivencia de los nemátodos al ser aplicados sobre suelos contaminados con metales pesados (54%), después de cultivarlos en medio líquido, es posible recomendar estudios de su ciclo de vida y ciclo reproductivo en matrices sólidas. De esta manera sería posible dilucidar si los nemátodos mueren en mayor porcentaje al ser aplicados al suelo y si comienzan o no a desarrollarse sobre este sustrato. Además de conocer la cinética de su desarrollo en suelo. Otros estudios recomendables son; realizar cultivos de los nemátodos en presencia de metales pesados, analizar su capacidad de tolerancia a metales pesados, analizar la posibilidad de adaptación de los nemátodos a metales pesados antes de ser aplicados al suelo, y estudiar cambios de su ciclo reproductivo en presencia de estos contaminantes.

Respecto de las observaciones y experimentos realizados para estudiar el ciclo de vida y ciclo reproductivo de *Cuticularia sp.* fue posible determinar que requieren reproducción sexual, por lo que el contacto entre machos y hembras es necesario en cualquier cultivo desarrollado. El ciclo de vida observado consiste en un período de copula/fecundación y maduración de los huevos de 8 d, plazo en que ocurre la oviposición. Los huevos presentan un período de incubación de 4 a 6 d para luego eclosionar. Los individuos juveniles tardan 16 a 20 d en ser adultos. Con estas consideraciones, se plantea que el tiempo necesario de incubación de un cultivo de *Cuticularia sp.* debe contemplar a lo menos 30 d.

La temperatura óptima de incubación y de desarrollo de los nemátodos esta comprendida en el rango de los 15 a 25 °C, por lo que los cultivos fueron realizados a temperatura ambiente. Por su parte, la demanda de oxígeno es del orden de 10^{-6} g O₂*Nem⁻¹*h⁻¹. Cuando se proyecta el k_La requerido del sistema de cultivo en el reactor airlift (1,72 h⁻¹), y se compara con los valores de k_La obtenidos en el reactor con medio de cultivo nuevo (11,98 a 34,37 h⁻¹) y agotado (4,15 a 7,03 h⁻¹), es posible concluir que las necesidades de oxigenación del cultivo en desarrollo son suplidas sin limitaciones. En este sentido, la posibilidad de trabajar a temperatura ambiente y la buena capacidad de transferencia de oxígeno lograda en el reactor especialmente diseñado para el cultivo de *Cuticularia sp.* permiten proyectar de manera favorable desde un punto de vista económico y práctico el escalamiento del cultivo en un reactor airlift de loop externo no convencional.

La capacidad reproductiva de los nemátodos parece ser mayor cuando son cultivados en palcas Petri (medio sólido/agar), que cuando son cultivados en medio líquido. La necesidad de contacto sexual entre machos y hembras puede explicar esto. No obstante, la recuperación de los nemátodos desde el agar resulta ser un proceso complejo y de rendimiento fluctuante que no permite su proyección o escalamiento. Bajo este punto de vista el sistema de cultivo desarrollado en el reactor airlift permite obtener concentraciones elevadas de nemátodos en suspensión (33.000 Nem/mL) que fácilmente pueden ser traspasados a envases para transportarlos a terreno y aplicarlos directamente a un sitio en remediación. Si agregamos a esto la posibilidad de lavar los nemátodos con agua destilada y su gran capacidad de sobrevivencia en este medio (más de 6 meses) sin presentar importantes bajas de viabilidad, es posible decir que este sistema permite obtener grandes cantidades de nemátodos fácilmente almacenables y también aplicables en trabajos realizados en terreno.

Los experimentos realizados en el reactor airlift de loop externo no convencional permiten concluir que ha sido posible desarrollar un reactor eficiente para el cultivo de los nemátodos de vida libre aislados desde la zona de Punchuncaví. El reactor permite satisfacer las demandas de transferencia de oxígeno de los nemátodos, así como también demuestra ser compatible con el sistema de reproducción sexual de *Cuticularia sp.* Cepa chilena.

Respecto a los experimentos realizados para determinar el medio de cultivo apropiado para propagar *Cuticularia sp.* fue posible dilucidar que este tipo de nemátodo, a diferencia de los entomopatógenos, que se alimentan de todo el interior del insecto que infectan, el cual es literalmente licuado por la bacteria simbiote que portan, debe ser comparativamente más simple. Esto es; con contenido de carbohidratos, azúcares, péptidos, vitaminas y lípidos. El mejor medio fue el M9C complementado con aceite vegetal. Este medio es una modificación del tampón M9 descrito por Brenner en 1974, al ser complementado con extractos vegetales de harinas de maíz, trigo, arroz y cebada, fuentes de carbohidratos, vitaminas y azúcares. Por otra parte, al comparar los conteos finales obtenidos con M9C y los de los cultivos cuya alimentación era con bacterias, encontramos que son comparables cuando la concentración de estas es del orden de 10^7 Bact/mL. No obstante, los resultados son comparables a los obtenidos con el medio M9C por lo que se optó por utilizar el medio sin la presencia de bacterias. Estos hechos dejan abierta la posibilidad de realizar estudios acabados de la interacción de *Cuticularia sp.* con las bacterias, por lo que es recomendable a futuro realizar estudios acabados sobre la apropiada dieta bacteriana de *Cuticularia sp.*

Respecto de la aplicación de los nemátodos en ensayos de fitorremediación, se deja planteada la necesidad de realizar estudios de mayor duración, posiblemente de más de un año, para determinar la influencia de los nemátodos en la capacidad de acumular metales por parte de las plantas, así como también su efecto benéfico sobre la rizósfera y crecimiento vegetativo.

10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Con los resultados de las investigaciones desarrolladas en la presente tesis doctoral ha sido posible participar de eventos científicos y generar publicaciones, las cuales se resumen a continuación:

Presentaciones a Congresos y Seminarios

Seminario "Ingeniería Forestal y Minería. Soluciones del ámbito forestal a problemas ambientales de la minería". Jueves 30 de septiembre y Viernes 2 de Octubre de 2004.

Presentación: *"Remediación de suelos contaminados por actividades mineras"*.

Segundo Workshop. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso - Escuela de Ingeniería Bioquímica. Octubre de 2004. Presentación: *"Remediación de Suelos Contaminados con Metales Pesados"*.

XVI Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AIDIS – Chile. II Simposio Latinoamericano de Lodos y Biosólidos. Viña Del Mar, 24-26 de Octubre de 2005.

Presentación: *"Caracterización de un nemátodo aislado de suelos contaminados con metales pesados"*.

Laboratorio de Biotecnología. Centro de Investigación Alimentaria y Desarrollo (CIAD). Hermosillo. México. Julio de 2005. Presentación: *"Producción en Masa de Nemátodos Bacterívoros de Vida Libre Aislados de Suelos Contaminados con Metales Pesados, para su Utilización en una Metodología de Remediación Biológica Integral"*.

Publicaciones

DEFINICIÓN: *Cuticularia sp.* PS-2006 from chile 18s ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION: DQ385848

AUTORES: Araneda Herrera, P., Stock, S. and Chamy-Maggy, R.

TITULO: Morphological and Molecular Characterization of *Cuticularia sp.* from Chile

ESTADO: Publicado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=88659683>)

First record of *Cuticularia sp.* (nematoda: rhabditidae) from heavy metals contaminated soils in Chile.

Patricio Araneda^{1*}, S. Patricia Stock², Mayra de la Torre³ and Rolando Chamy¹

¹ Facultad de Ingeniería Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Av. General Cruz 34, Valparaíso, Chile.

² Department of Entomology, University of Arizona. 1140 E. South Campus Dr, Tucson, AZ, 85721, USA.

³ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, México.

ENVIADO A: *Journal of Nematology*, Octubre de 2007.

ESTADO: en evaluación.

Isolation, and in vitro axenic culture of a *Cuticularia sp.* (nematoda: rhabditidae) strain that survives in soils contaminated with heavy metals.

Patricio Araneda^{1*}, Patricia Stock², Mayra de la Torre³ and Rolando Chamy¹

¹ Facultad de Ingeniería Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Av. General Cruz 34, Valparaíso, Chile.

² Department of Entomology, University of Arizona. 1140 E. South Campus Dr, Tucson, AZ, 85721, USA.

³ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, México.

ENVIADO A: *Bioremediation Journal*, Octubre de 2007.

ESTADO: en evaluación.

Mass production of heavy metal tolerant nematode (*Cuticularia sp.*) in a non conventional external loop airlift reactor.

Patricio Araneda^{1*} and Rolando Chamý¹

¹ Facultad de Ingeniería Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Av. General Cruz 34, Valparaíso, Chile.

ENVIADO A: *Process Biochemistry*, Octubre de 2007.

ESTADO: en evaluación.

11. NOMENCLATURA

LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES	
SÍMBOLO	SIGNIFICADO
SIGLAS	
BLASTN	Basic Local Alignment Search Tool
D	Diámetro.
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ENAMI	Empresa Nacional de la Minería.
FONDEF	Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico Fondef.
H	Altura.
PCR	Reacción de Polimerización en Cadena.
PUCV	Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
RF	Factor de Reproducción.
RPM	Revoluciones por minuto.
TA	Tubo ascendente.
TAF	Formalina trietanolamina.

TD	Tubo Descendente.
TTC	Cloruro de trifeniltetrazolio.
OD	Oxígeno disuelto.
UTFSM	Universidad Técnica Federico Santa María.
UT	Unión transversal.
UV	Luz ultra violeta.
ZD	Zona de desaceleración.
18S rDNA	Secuencia del gen codificador de la subunidad ribosomal 18S.

UNIDADES	
mm	Milímetro.
cm	Centímetro.
m	Metro.
km	Kilómetro.
μL	Microlitro.
mL	Mililitro.
L	Litro.
ng	Nanogramo.
μg	Microgramo.

g	Gramos.
kg	Kilogramos.
d	Día(s).
h	Hora(s).
min	Minuto(s).
seg	Segundo(s).
ppm	Parte por millón (equivalente a mg/kg).
μM	Micromolar ($\mu\text{mol/L}$).
mM	Milimolar (mmol/L).
M	Molar (mol/L).
g/L	Gramos por litro.
% p/v	Porcentaje peso volumen.
Nem/mL	Nemátodos por mililitro.
Nem/m ²	Nemátodos por metro cuadrado.
L/min	Litros por minuto.
cm/seg	Centímetros por segundo.
Bact/mL	Bacterias por mililitro.
vvm	Volumen flujométrico de aireación (L/min).
g O ₂ Nem ⁻¹ h ⁻¹	Gramos de oxígeno consumidos por nemátodo por hora.

$\text{g O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Gramos de oxígeno por litro por hora.
kW/m^3	Kilowatts por metro cúbico.
W/m^3	Watts por metro cúbico.
pb	Pares de bases.
$^{\circ}\text{C}$	Temperatura en grados Celsius.

ECUACIONES	
k_{La}	Coefficiente de transferencia de oxígeno (h^{-1}).
C^*	Concentración de saturación de oxígeno (mg/L).
P_G	Potencia de entrada del gas (W).
V_L	Volumen del líquido (L).
ρ_L	Densidad del líquido (kg/m^3).
g	Aceleración de gravedad (m/seg^2).
U_G	Velocidad superficial del gas (m/seg).
U_{Gr}	Velocidad superficial del gas (m/seg).
A_d	Área de la sección transversal de la columna descendente (m^2).
A_r	Área de la sección transversal de la columna ascendente (m^2).
Q_L	Flujo molar del gas (mol/seg).
R	Constante de los gases ($\text{J/K}^{\circ}\text{Mol}$).

T	Temperatura absoluta (K).
h_L	Altura estática del gas libre de líquido (m).
A	Área de la sección transversal de la columna (m ²).
ln	Logaritmo natural.
P_h	Presión en la zona superior del reactor (Pa).
C	Concentración de nemátodos al tiempo t (Nem/mL).
C_o	Concentración inicial de nemátodos (Nem/mL).
C/C_o	Valor adimensional.
$(C/C_o)_{\max}$	Factor de multiplicación (adimensional).
e	Exponencial.
μ_{\max}	Velocidad de crecimiento máximo.
λ	Fase lag (tiempo).
t	Tiempo.
Re	Número de Reynolds. Adimensional.
Sh	Número de Sherwood. Adimensional.
dC_L / dt	Velocidad de consume de oxígeno (mg/h).
r_o	Velocidad de consumo de oxígeno (mg/h).
R^2	Coefficiente de regresión.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abu Hatab M. and Gaugler R. (1999). Lipids of in vivo and in vitro cultured *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biological Control*. 15: 113 – 118.
- Akhurst RJ. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*. 121: 303-309.
- Alkemade R, Wielemaker A, Hemminga MA. 1992. Stimulation of decomposition of *Apartina anglica* leaves by the bacterivorous marine nematode *Diplolaimelloides brucei* (Monhysteridae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 159: 267 - 278.
- Altschul SF, Thomas LM, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.
- Anderson RV. and Coleman DC. 1982. Nematode temperature responses: a niche dimension in populations of bacterial-feeding nematodes. *Journal of Nematology*. 14: 69 - 76.
- Anderson RV, Trofymow JA, Coleman DC, Reid CPP. 1992. Phosphorous mineralization by a soil pseudomonad in spent oil shale as affected by a rhabditid nematode. *Soil Biology and Biochemistry*. 14: 365 - 371.
- Andrassy I. 1983. A taxonomic review of the suborder Rhabditina (Nematoda: Secernentia). Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (ORSTOM), Paris. Page: 142 – 146.
- Anguissola Scotti I, Silva S, Botteschi G. 1999. Effect of fly ash on the availability of Zn, Cu, Ni and Cd to chicory. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 72: 159 – 163.
- Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1989. *Short protocols in molecular biology*. New York. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 387 pp.
- Bardgett RD, Speir TW, Ross DJ, Yeates GW, Kettles HA. 1994. Impact of pasture contaminati on by copper, chromium, ans arsenic timber preservative on soil microbial properties and nematodes. *Biology and Fertility of Soils*. 18: 71 – 79.

- Barsyte D, Lovejoy D, Lithgow G. 2001. Longevity and heavy metal resistance in daf-2 and age-1 long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 15: 627 - 634.
- Baker A. and Walter P. 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, Ed AJ Shaw, pp: 155 – 177, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Baldwin JG, Frisse LM, Vida JT, Eddelman CD, Thomas WK. 1997. An evolutionary framework for the study of developmental evolution in a set of nematodes related to *C. elegans*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 8: 249-259.
- Bird AF. and Ryder MH. 1993. Feeding of the nematode *Acrobeloides nanus* on bacteria. *Journal of Nematology*. 25: 493 - 499.
- Baumann A. 1985. Das Verhalten von zinksätzen gegen pflanzen und im boden. *Landwirtsch. Vers.-Statn*. 31: 1 – 53.
- Beath OA, Eppsom HF, Gilbert CS. 1937. Selenium distribution in and seasonal variation of vegetation type occurring on seleniferous soils. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 26: 394 – 405.
- Bock, E., Koops, H.-P., Möller, U. C., Rudert, M. 1990. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris* sp. nov. *Archivies of Microbiology*. 153: 105-110.
- Bongers T. 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* .83: 14 – 21
- Bongers T. and Ferris H. 1999. Nematode community structure as a biomonitor in environmental monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*. 14: 224–228.
- Booolootian RA. 1993. "Fundamentos de Zoología". Limusa Noriega Editores, México.
- Bouwman LA. and Zwart KB. 1994. The ecology of bacterivorous protozoans and nematodes in arable soil. *Agriculture, Ecosystems and Enviroment*. 51: 145-160.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77. pp: 71 – 94.
- Bricker TJ, Pichtel J, Brown H, Simmons M. 2001. Phytoextraction of Pb and Cd from a superfund soil: effects of amendments and croppings. *Journal of Environmental Science and Health*. 36. N° 9: 1597 - 1610.

- Brooks RR. 1977. Copper and cobalt uptake by *Haumaniastrum* species. *Plant Soil*. 48: 541 – 544.
- Buecher EJ. and Popiel I. 1989. Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. *Journal of Nematology*. 21: 500-504.
- Byers FG. 1935. Selenium occurrence in certain soils in the United States, with a discussion of the related topics. *United States Department of Agricultural Research Bulletin*. 482: 1-47.
- Bird AF. and Ryder MH. 1993. Feeding of the nematode *Acrobeloides nanus* on bacteria. *Journal of Nematology*. 25: 493 - 499.
- Bunz K, Trautmannsheimer M, Schramel P, Reifenhauer W. 2001. Availability of arsenic, copper, lead, thallium, and zinc to various vegetables grown in slag-contaminated soils. *Journal of Environmental Quality*. 30: 934 – 939.
- Cadish G. and Giller K.E. 1997. Driven by Nature-Plant Litter Quality and Decomposition. CAB International, Wallingford, 409 pp.
- Carvallo, L. 1999. Nitrificación y remoción de material orgánica en un reactor híbrido de biofilm y biomasa suspendida. *Tesis de Título de Ingeniero Bioquímico PUCV*. Escuela de Ingeniería Bioquímica PUCV. 142 pp.
- Chaney RL, Li YM, Angle JS, Baker AJM, Reeves RD, Brown SL, Homer FA, Malik M, Chin M. 2000. Improving metal hyperaccumulators wild plants to develop commercial phytoextraction systems: Approaches and progress. In: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Eds N. Terry, G.S. Bañuelos, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Chavarría-Hernández N. and De la Torre M. 2001. Population growth kinetics of the nematodes, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. *Biotechnology Letters*. 23: 311 - 315.
- Chisti Y. 1998. Pneumatically agitated bioreactors in industrial and environmental bioprocessing: Hydrodynamics, hydraulics, and transport phenomena. *Applied Mech Rev*. 51. N° 1: 33 – 112.
- Christie JR. 1970. "Nemátodos de los vegetales. Su ecología y control". Ed. Limusa, México.

- Choi KH, Chisti Y, Moo-Young M. 1996. Comparative evaluation of hydrodynamic and gas-liquid mass transfer characteristics in bubble column and airlift slurry reactors. *The Chemical Engineering Journal*. 62: 1223 – 229.
- Ciche T. and Ensign J. 2003. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out?. *Applied and Environmental Microbiology*. 69. N° 4: 1890 – 1897.
- Clemens S, Schroeder J, Degenkolb T. 2001. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *European Journal of Biochemistry*. 268: 3640 – 3643.
- Courtney WD, Polley D, Miller VL. 1955. TAF, an improved fixative in nematode techniques. *Plant Disease Reporter*. 39: 570-571.
- Coûteaux MM, Mousseau M, Celerier ML, Bottner P. 1991. Increased atmospheric CO₂ and litter quality: decomposition of sweet chestnut leaf litter with animal food webs of different complexities. *Oikos*. 61: 54 - 64.
- Cohen C, Fox T, Garvin D, Kochian L. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plants. *Plant Physiology*. 116: 1063 – 1072.
- Conder J, Lanno R, Basta N. 2001. Assessment of metal availability in smelter soil using earthworms and chemical extractions. *Journal of Environmental Quality*. 30: 1231 – 1237.
- Contreras A, Chisti Y, Molina E. 1998. A reassessment of relationship between riser and downcomer gas holdups in airlift reactors. *Chemical Engineering Science*. 53. N° 24: 4151 – 4154.
- Cunningham SD, Berti WR, Huang JW. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*. 13: 393 - 396.
- De la Torre M. 2003. Challenges for mass production of nematodes in submerged culture. *Biotechnology Advances*. 21: 407 – 416.
- Ehlers R-U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied in Microbiology and Biotechnology*. 56: 623 – 633.
- Ehlers R-U, Stössel S, and Wyss U. (1990). The influence of phase variants of *Xenorhabdus spp.* and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Revista de Nematología*. 13. N° 4: 417 – 424.
- Ettema CH. 1998. Soil nematode diversity species coexistence and ecosystem function. *Journal of Nematology*. 30: 159-169.

- Ettema C. and Bongers T. 1993. Characterization of nematode colonization and succession in disturbed soil using the Maturity Index. *Biology and Fertility of Soils*. 16: 79 - 85.
- Eweiss J, Ergas S, Chang D, Schroeder E. 1999. *Principios de biorrecuperación (Bioremediation)*. 1ª ed. en español. 287 pp. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. Madrid. España.
- Freckman DW. 1988. Bacterivorous Nematodes and Organic Matter Decomposition. *Agricultural Ecosystems and Environment*. 24: 195 - 218.
- Forst S, and Clarke D. 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis. Cp. 3. In: *Entomopathogenic Nematology*. CAB International. Ed. R. Gaugler.
- Friedman MJ, Langston SE, Pollitt S. 1989. Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. International Patent Application, WO 89/04602.
- Georgis R, Kaya H, Gaugler R. 1991. Effect of *steinernematid* and *heterorhabditid* nematodes on nontarget arthropods. *Environmental Entomology*. 20: 815-22.
- Gil G, Choo H, Gaugler R. 2002. Enhancement of entomopathogenic nematode production in in-vitro liquid culture of heterorhabditis bacteriophora by fed-batch culture with glucose supplementation. *Applied in Microbiology and Biotechnology*. 58: 751 – 755.
- Ginocchio R. 1999. Copper tolerance testing on plant species growing near a copper smelter in central Chile. En: Wenzel WW, DC Adriano, B Alloway, HE Doner, C Keller, NW Lepp, M Mench, R Naidu & GM Pierzynski (eds) Proceedings of the Fifth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements: 1156-1157. International Society for Trace Element Research, Viena, Austria.
- Ginocchio R. 2000. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncaví valley, Chile. *Chemosphere*. 41: 15-23.
- Ginocchio R, Rodríguez PH, Badilla-Ohlbaum R, Allen H, Lagos G. 2002. Effect of soil copper content and pH on copper uptake of selected vegetables grown under controlled conditions. *Environmental Toxicology & Chemistry*. 21: 117-125.
- Ginocchio R, Carvallo G, Toro I, Bustamante E, Silva Y, Sepulveda N. 2004. Micro-spatial variation of soil metal pollution and plant recruitment near a copper smelter in Central Chile. *Environmental Pollution*. 127: 3.

- González S. 1994. Estado de la contaminación de los suelos en Chile. En: Espinoza G, P Pisani, L Contreras & P Camus (eds) Perfil ambiental de Chile: 199-234. Comisión Nacional del Medio Ambiente, Santiago, Chile. 569 pp.
- Gleba D, Borisjuk N, Borisjuk L, Kneer R, Poulev A, Skarzhiskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba Y, Raskin I. 1999. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. USA. 96: 5973 – 5977.
- Gòdia F. and Sòla C. 1995. Fluidized-Bed Bioreactors. *Biotechnology Progress*. 11: 479 – 497.
- Guerinot ML and Salt D. 2001. Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiology*. 125: 164 – 167.
- Gyedu-Ababio TK, Furstenberg J, Blair D, Vanreusel A. 1999. Nematodes as indicators of pollution: a case study from the Swartkops River system, South Africa. *Hidrobiologia* 397: 155 - 169.
- Griffiths BS, Ritz K, Wheatly RE. 1994. Nematodes as indicators of enhanced microbiological activity in a Scottish organic farming system. *Soil Use and Management* 10: 20 - 24.
- Ha S-B, Smith A, Howden R, Dietrich W, Bugg S, O'Connell M, Goldsbrough P, Cobbett Ch. 1999. Phytochelatase synthase genes from Arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell*. 11: 1153 - 1163.
- Hickman CP, Roberts LS, Hickman FM. 1986. "Zoología. Principios integrales", Interamericana, Madrid.
- Holtan-Hartwig L, Bechmann M, Risnes Hoyas T, Linjordet R, Reier Bakken L. 2002. Heavy metals tolerance if soil denitrifying communities; N₂O dynamics. *Soil Biology & Biochemistry*. 34: 1181 – 1190.
- Ibewiro B, Sanginga N, Vanlauwe B, Merckx R. 2000. Influence of phytoparasitic nematodes on symbiotic N₂ fixation in tropical herbaceous legume cover crops. *Biology and Fertility of Soils*. 31: 254 – 260.
- Igual JM, Valverde A, Cervantes E, Velásquez E. (2001). Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*. 21: 561-568

- Ingham RE, Trofymow JA, Ingham ER, Coleman DC. 1985. Interactions of bacteria, fungi and their nematodes grazers on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs*. 55: 119 - 140.
- Jaffre T, Brooks RR, Lee J, Reeves RD. 1976. *Sebertia acuminata*: a nickel – accumulating plant from new Caledonia. *Sciences*. 193: 579 – 580.
- Jaworska M. and Tomaski P. 1999. Metal-metal interactions in biological systems. Part VI, effect of some metal ions on mortality, pathogenicity and reproductivity of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* entomopathogenic nematodes under laboratory conditions. *Water, Air and Soils Pollution*. 110: 181 – 194.
- Juni, E. 1972. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: Genetic evidence for a ubiquitous genus. *Journal of Bacteriology*. 112: 917-931
- Kennard M, and Janekeh M. 1991. Two- and three-phase mixing in a concentric draft tube gas-lift fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*. 38: 1261 - 1270.
- Kiikkila O, Perkiomaki J, Barnette M, Demore J, Pennanen T, Tulisalo E, Fritze H. 2001. In situ bioremediation through mulching of soil polluted by a copper-nickel smelter. *Journal of Environmental Quality*. 30: 1134 – 1143.
- Kinraide T. and Sweeney B. 2003. Proton alleviation of growth inhibition by toxic metals (Al, La, Cu) in rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry*. 35: 199 - 205.
- LaCoste C, Robinson B, Brooks R. 2001. Uptake of thallium by vegetables: its significance for human health, phytoremediation, and phytomining. *Journal of Plant Nutrition*. 24. N° 8: 1205 - 1215.
- Lakzian A, Murphy P, Turner A, Beynon JL, Giller K. 2002. *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* populations in soils with increasing heavy metals contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biology & Biochemistry*. 34: 519 – 529.
- Lebert K, Stanka R, Röck H. 1998. A first step towards computer controlled cultivation of nematodes-growth modelling of the symbiotic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Proceedings, IEEE Conference on Control Applications*, Trieste, Italy. pp: 373 – 377.
- Lombi E, Zhao F, Dunham S, McGrath SP. 2001. Phytoremediation of heavy metal – contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phyextraction. *Journal of Environmental Quality*. 30: 1919 – 1926.

- Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang W, Cai Y, Kennelley ED. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. A hardy, versatile, fast-growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. *Nature*. 409. brief communications.
- Malik, K. A. 1988. A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 8: 259-271.
- Márquez M, Roberts A, Carbonell R, Sáez G, Roberts G. 1999. Hydrodynamics of gas-lift reactors with a fast, liquid phase reaction. *Chemical Engineering Science*. 54: 2263 – 2271.
- Marshall AJ, and Williams WD. 1980. "Zoología Invertebrados". Ed. Reverté, Barcelona.
- Mench M, Vangronsveld J, Clijsters H, Lepp N, Edwards R. 2000. In situ metal immobilization and phytostabilization of contaminated soils. Cp. 18. pp: 324–355. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publishers. Ed. N.Terry and G.S. Bañuelos.
- McCoy C, Stuart R, Duncan L, Nguyen K. 2002. Field efficacy of two commercial preparations of entomopathogenic nematodes against larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in alfisol type soil. *Florida Entomologist*. 85. N° 4: 537 – 544.
- McGowen S, Basta N, Brown G. 2001. Use of diammonium phosphate to reduce heavy metals solubility and transport in smelter-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*. 30: 493 – 500.
- McSorley R. 2003. Adaptations of nematodes to environmental extremes. *Florida Entomologist*. 86. N° 2: 138 - 142.
- Miller WP, and McFee WW. 1983. Distribution of Cadmium, Zinc, Copper, and Lead in Soils of Industrial Northwestern Indiana. *Journal of Environmental Quality*. 12. N°1: 29 - 33.
- Molina E, Chisti Y, Moo-Young M. 1997. Characterization of shear rates in airlift bioreactors for animal cell culture. *Journal of Biotechnology*. 54: 195–210.
- Morin A, Hummel W, Kula MR. 1986. Production of hydantoinase from *Pseudomonas fluorescens* strain DSM 84. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 25: 91-96.
- Munilla León T. 1992 "Prácticas de zoología general. I. Invertebrados no artrópodos". Ed. Oikos Tau, Barcelona.

- Mylonakis E, Ausubel F, Perfect J, Heitman J, Calderwood S. 2002. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. 99: 15675 - 15680.
- Neher D. 2001 . Role of nematodes in soil health and their use as indicators. March 2001. Symposium 39th Annual Meeting of the Society of Nematologists. Quebec Canada. *Journal of Nematology*. 33. N° 4: 161 – 168.
- Neher D, and Powers T. 2003. Nematodes. In: Hillel, D., Rosenzweig, C., Powelson, D., Scow, K., Singer, M. and Sparks, D. (editors) *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Academic Press, New York.
- Neves JM, Teixeira JA, Simões N, Mota M. 2001. Effect of Air Flow Rate on Yields of *Steinernema carpocapsae* in liquid culture in an external-loop airlift bioreactor. *Biotechnology & Bioengineering*. 72. N° 3: 369-373.
- Nicolella C(a), van Loosdrecht M, Heijnen S. 2000. Particle-based biofilm reactor technology. *Trends in Biotechnology*. 18. N° 7: 312 – 320.
- Nicolella C, van Loosdrecht M, Heijnen S. 2000. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology*. 80: 1-30.
- Nuur S, Lawrence J, Zhu H, Swerhone G, Welsh M, Welacky T, Topp E. 2003. Bacteria associated with cyst of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69. N° 1: 607 – 615.
- Ochoa-Loza F, Asrtiola J, Maier R. 2001. Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Environmental Quality*. 30: 479 – 485.
- Palleroni, N. J. 1980. Isolation and properties of a new hydrogen bacterium related to *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of General Microbiology*. 117: 155-161.
- Pate E, Faye N, Thioulouse J, Villenave C, Bongers T, Cadet P., Debouzie D. 2000. Successional trends in the characteristics of soil nematode communities in cropped and fallow lands in Senegal (Sonkorong). *Applied Soil Ecology*. 14: 5 – 15.
- Patil KD. 1975. Cochran's Q Test: exact distribution. *Journal of the American Statistical Association*. 70: 186-189.

- Pawłowska T, Chaney R, Chin M, Charvat I. 2000. Effects of metals phytoextraction practices on the indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal-contaminated landfill. *Applied and Environmental Microbiology*. 66. N° 6: 2526 – 2530.
- Pederson G, Brink G, Fairbrother T. 2002. Nutrient uptake. *Agronomical Journal*. 94: 895 – 904.
- Pence N, Larsen P, Ebbs S, Letham D, Lasat M, Garvin D, Eide D, Kochian L. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academic of Sciences*. 97. N° 9: 4956 – 4960.
- Perisesarma de Man JG. 1895. Bericht über die von herrn Schiffscapitän Storm zu Atjeh, an den westlichen Küsten von Malakka, Borneo und Celebes sowie in der Java-See gesammelten Decapoden und Stomatopoden (Part 2). *Zoologische Jahrbuecher Systematik*. 9: 75-218 figs 16-39 [208].
- Phillips DH, Watson DB, Roh Y, Gu B. 2003. Mineralogical Characteristics and Transformations during Long-Term Operation of a Zerovalent Iron Reactive Barrier. [*Journal of Environmental Quality*](#). 32: 2033–2045.
- Plaza G, Otero Cabada M, Torres N, Velásquez M, Corbalán E, Rodriguez T. 2001. Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*. Vol. 5. ISSN 0329-5184 Impreso en Argentina.
- Pringsheim EG. 1950. The bacterial genus *Lineola*. *Journal of General Microbiology*. 4: 198-209.
- Qureshi F, Badar U, Ahmed N. 2001. Biosorption of copper by a bacterial biofilm on a flexible polyvinyl chloride conduit. *Applied and Environmental Microbiology*. 67. N° 9: 4349 – 4352.
- Ranjard L, Brothier E, Nazaret S. 2000. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprintings for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Applied and Enviromental Microbiology*. 66. N° 12: 5334 – 5339.
- Raven J. and Edwards D. 2001. Roots; evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of Experimental Botany*. 52: 381 – 401.

- Reddy k, Chinthamreddy S, Al-Hamdan A. 2001. Synergistic effects of multiple metal contaminants on electrokinetic remediation of soils. *Remediation Journals*. 11. N° 3: 85 - 109.
- Reeves RD and Brooks RR. 1983. European species of *Thlaspi* L (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. *Journal of Geochemical Exploration*. 18: 275 - 283.
- Remane A, Storch V, Welsch U. 1980. "Zoología sistemática. Clasificación del reino animal". Ed. Omega, Barcelona.
- Ricci M, Fifi A, Ragni A, Schlechtriem C, Focken U. 2003. Development of a low-cost technology for mass production of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live food for first feeding fish larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60. N° 5: 556 - 559.
- Ristaino JB and Thomas W. 1997. Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole: can we fill the gaps?. *Plant Disease*. 81: 964-977.
- Ruppert EE and Barnes RD. 1996. "Zoología de los invertebrados", McGraw-Hill Interamericana, México.
- Sáez A, Márquez M, Roberts G, Carbonell R. 1998. Hydrodynamic model for gas-lift reactors. *American Institute of Chemical Engineers Journal*. 44. N° 6: 1413 – 1423.
- Sánchez PA. 2002. Soil Fertility and Hunger in Africa. *Science*. 295: 2019 – 2020.
- Sandaa RA, Torsvik V, Enger O. 2001. Influence of long- term heavy metals contamination on microbial communities in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 33: 287 – 295.
- Salt ED, Blaylock M, Kumar N, Dushenkov V, Ensley B, Chet I, Raskin I. 1995. Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Biotechnology*. 13: 468 - 473.
- Scherer MM, Richter S, Valentine RL, Alvarez P.J. 2000. Chemistry and microbiology of permeable reactive barriers for in situ groundwater cleanup. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 30: 363–411.
- Schroth M. N. and Hancock J. G. 1982. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science*. 216: 1376-1381.
- Seinhorst JW. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*. 4: 67-69.

- Shapiro-Llan D and Gaugler R. 2002. Production technology for entomopathogenic nemátodos and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28. N° 3: 137 - 146.
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. (ed) 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 30: 225-420.
- Smart GC. 1995. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Supplement to the Journal of Nematology*. 27: 529 – 534.
- Smith L, Means J, Bruce A. 1995. Remedial Options for Metals Contaminated Site. 1° Edition. 217 pp. U.S.A. Printed in U.S.A.
- Stein DC, Kopec LK, Yasbin RE, Young FE. 1984. Characterization of *Bacillus subtilis* DSM 704 and its production of 1-deoxynojirimycin. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 : 280-284.
- Strauch O and Ehlers R-U. 1998. Food signal production of *Photorhabdus luminiscens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. In liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50. N° 3: 369 - 374.
- Stock SP, Griffin CT, Chaenari R. 2004. Morphological and molecular characterization of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationship with other closely related taxa. *Nematology*. 6: 401-412.
- Sulston JE and Brenner S. 1973. The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77: 95–104.
- Surrey MR and Davies RJ. 1996. Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 67: 92-99.
- Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*. 24: 967-980.
- Thomas R, Lawlor K, Bailey M, Macaskie L. 1998. Biodegradation of Metal-EDTA complexes by an enriched microbial population. *Applied and Environmental Microbiology*. 64. N° 4: 1319 – 1322.

Timm A and Steinbüchel A. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 3360-3367.

Tonolla M, Demarta A, Peduzzi S, Hahn D, Peduzzi R. 2000. In Situ Analysis of Sulfate-Reducing Bacteria Related to *Desulfocapsa thiozymogenes* in the Chemocline of Meromictic Lake Cadagno (Switzerland). *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 820 – 824.

Tu C, Koenning S, Hu H. 2003. Root-Parasitic nematodes enhances soil microbial activities and nitrogen mineralization. *Microbial Ecology*. 46. N° 1: 134 - 144.

Trujillo-Roldán M, Moreno S, Espín G, Galindo E. 2003. Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60. N° 6: 733 -737.

Van der Lelie D, Corbisier P, Diels L, Gilis A, Lodewyckx C, Mergeay M, Taghavi S, Spelmans N, Vangronsveld J. 2000. The role of Bacteria in the phytoremediation of heavy metals. Cp. 15. pp: 265–278. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publishers. Ed. Norman Terry and Gary Bañuelos.

Van Voorhies W and Ward S. 1999. Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 96: 11399 – 11403.

Vatamaniuk OK, Bucher E, Ward J, Rea P. 2001. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. *The Journal of Biological Chemistry*. 276. N° 24: 20817 - 20820.

Vengáis T, Bin Kiene R., Sveikauskaitė A. 2001. Electrokinetic remediation of lead, zinc and cadmium contaminated soil. *Journal of Chemical technology & Biotechnology*. 76. N° 11:1165 - 1170.

Visnovsky G, Claus JD, Merchuk JC. 2003. Cultivation of insects cells in airlift reactors: influence of reactor configuration and superficial gas velocity. *Latin American Applied Research*. 33: 207 – 211.

Wang QR, Liu XM, Cui YS, Dong YT, Christie P. 2002. Responses of legume and non-legume crop species to heavy metals in soils with multiple metal contamination. *Journal of Environmental Science and Health*. 37. N° 4: 611 – 621.

Watanabe ME. 2001. Can bioremediation bounce back?. *Nature*. 19: 1111 - 1115.

- Wenzel W, Adriano D, Salt D, Smith R. 1999. Phytoremediation: A plant-Microbe-Based remediation System. Cap 18. pp: 456–508. In: *Bioremediation of contaminated soils*. American Society of Agronomy, Inc. Crop.
- Woodring JL and Kaya HK. (1988). Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: a Handbook of Biology and Techniques. Arkansas Agric. Exp. Stn., USA.
- Yeates GW. 1993. Influence of sabbatical fallow on oligochaete and nematodes in a hill country pasture. *Proceeding. 6th Australasian Grassland Invertebrates Ecologist Conference*: 142 – 146.
- Yeates GW. 1998. Chapter 10. In: *The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes*. CAB International.
- Yeates GW. 1999. Effects of plants on nematode community structure. *Annuals Review of Phytopathology*. 37: 127 – 149.
- Yeates GW and Bongers T. 1999. Nematode diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 74: 113 – 135.
- Yeates GW, Bongers T, De Goede RG, Freckman DW, Georgieva SS. 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera- an outline for soil ecologist. *Journal of Nematology*. 25. N° 3: 315 – 313.
- Yeates GW, Dando JL, Shepherd TG. 2002. Pressure plate studies to determine how moisture affects access of bacterial-feeding nematodes to food in soil. *European Journal of Soil Science*. 53: 355 – 365.
- Yeates GW, Sagggar S, Hedley C, Mercer Ch. 1999. Increase in C¹⁴-carbon translocation to the microbial biomass when five species of plant-parasitic nematodes infect roots of white clover. *Nematology*. 1. N° 3: 295 – 300.
- Yeates GW and Williams P. 2001. Influence of three invasive weeds and site factors on soil microfauna in New Zeland. *Pedobiologia*. 45: 367 – 383.
- Yin B, Valinsky L, Gao X, Ole Becker J, Borneman J. 2003. Bacterial rRNA genes associated with soil suppressiveness against the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69. N° 3: 1573 – 1580.
- Young J, Dunnill P, Pearce J. 1998. Physical properties of liquid nematode culture and the design of recovery operations. *Bioprocess Engineering*. 19: 121 – 127.

ANEXO 1

Copia de la información de la secuencia 18S rDNA enviada a GenBank ([DQ385848](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/DQ385848)).

```
LOCUS       DQ385848                1360 bp    DNA         linear     INV 01-JUN-2007
DEFINITION  Cuticularia sp. PS-2006 from Chile 18S ribosomal RNA gene, partial
sequence.
ACCESSION   DQ385848
VERSION     DQ385848.1  GI:88659683
KEYWORDS    .
SOURCE      Cuticularia sp. PS-2006
  ORGANISM  Cuticularia sp. PS-2006
            Eukaryota; Metazoa; Nematoda; Chromadorea; Rhabditida;
            Rhabditoidea; Rhabditidae; Rhabditinae; Cuticularia.
REFERENCE   1 (bases 1 to 1360)
  AUTHORS   Araneda-Herrera,P., Stock,S. and Chamy-Maggy,R.
  TITLE     Morphological and Molecular Characterization of Cuticularia sp.
            from Chile
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 1360)
  AUTHORS   Araneda-Herrera,P., Stock,P. and Chamy-Maggi,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (31-JAN-2006) Entomology, University of Arizona, Forbes
            410. 1140 E. South Campus Dr, Tucson, AZ 85721, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source             1..1360
                       /organism="Cuticularia sp. PS-2006"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /db_xref="taxon:372471"
                       /country="Chile"
     rRNA                <1..>1360
                       /product="18S ribosomal RNA"
ORIGIN
  1  tgttggtgac  tctgaataac  ttagctgac  gcatggctt  gtaccggcga  catatcttcc
 61  aagtatctgc  cttatcaact  ttgatggta  gtttatgtgc  ctaccatggt  tgcaacgggt
121  aacggaaaat  aagggtttga  ttccggagag  ggagcctgag  aaacggctac  cacatctaag
181  gaaggcagca  ggcgcgcaaa  ttaccactg  gaggtgctcc  aaggtagtga  ctaacaataa
241  cgagaccgtc  ttctatgagg  ccggttatcg  gaatgggtac  aatttaaacc  ctttaacgag
301  gatctatgag  agggcaagtc  tggtgccagc  agcccggtta  attocagctc  tcaagggtga
361  tatccctatt  gctgcggtta  aaaagctcgt  agttggatct  ccgcctcagg  acgtgggtccg
421  cctttaggty  tgtactgcga  tcctaggcag  ttaactgctgg  ttttcagccg  gtggccttaa
481  ctgggtgccc  gttgtggcta  gcgagtttac  cttgagtaaa  tcagattgct  caagaaaggc
541  gtttcgctg  aatggtttgt  catggaataa  tggaaatagga  cttcgggtct  gttttgttgg
601  ttttctgaac  tgaagtaatg  attaagagga  acagacgggg  gcattcgtat  cgtgcgtga
661  gaggtgaaat  tcntggaccg  cagngggacg  cccaanagcg  aaagcatttg  ccaagaatgt
721  cttcattaat  caagaacgaa  agtcagaggt  tcgaaggcga  ttagataccg  ccctagtctc
781  gaccgtaaac  tatgccatct  agcgatccgg  tggggttatt  cgctcgcgcg  gggagcttcc
841  cggaaacgaa  agtctttcgg  ttccgggggt  agtatggttg  caaagctgaa  acttaagaa
901  attgacggaa  gggcaccacc  aggagtggag  cctgcggcct  aatttgactc  aacacgggaa
961  aactcaccog  gcccgacac  cgttaggatt  gacagattga  aagctcttcc  togatctggt
1021  ggttggtggt  gcattggcgt  tcttagttgg  tggagcgatt  tgtctggttt  attccgataa
1081  cgagcgagac  tctaacctac  taaatagttt  cacgattttc  gggctgtgtg  aactcttag
1141  agggataagc  ggtgtttaac  cgcaagagat  tgagcgataa  caggtctgtg  atgcccttag
1201  atgtccgggg  ctgcaacgac  gctacactgg  aaggatcagc  tggtcgcca  ttgccgaaag
1261  gtaatggtaa  accgttgaaa  ccctccgtg  accgggatag  ggaattgtaa  ttattccct
1321  tgaacgagga  attcctagta  agtgtgagtc  atcagctcac
//
```