

# CARACTERIZACIÓN DE LA FASE PRIMARIA DE LAS BACTERIAS SIMBIONTES DE LOS NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS *STEINERNEMA CUBANUM*, *HETERORHABDITIS INDICA* Y *H. BACTERIOPHORA*

Yamilka Pérez Bocourt,<sup>1</sup> María E. Márquez Gutiérrez<sup>1</sup> y Maylen Gómez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical. Ave 7a. no. 3005 e/ 30 y 32, Playa, Ciudad de La Habana

## RESUMEN

Los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* están formados por bacterias simbiotes específicas que viven asociadas con los nematodos entomopatógenos *Steinernema* y *Heterorhabditis*, respectivamente. En estas bacterias ocurre un fenómeno de disociación de fases *in vitro*, que es fundamental en el modo de acción de los nematodos y en el establecimiento de condiciones óptimas para su reproducción. A partir de larvas muertas de *Galleria mellonella* L. infestadas con las cepas de nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis indica* cepa P2M, *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88 y *Steinernema cubanum*, se aislaron las bacterias simbiotes *Photorhabdus luminescens* (P-01), (P-02) y *Xenorhabdus* sp. (X-01). Las formas primarias de los aislados se caracterizaron por la absorción de los pigmentos en los medios agar Mc. Conkey y agar NBTA, la producción de lipasa, lecitinasa, proteasa, y la presencia de flagelo. Todos los aislados mostraron actividad antibiótica frente a *Micrococcus luteus*.

Palabras clave: *Photorhabdus luminescens*, *Xenorhabdus*, bacterias simbiotes, fase primaria

## ABSTRACT

Genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* comprise symbiotic bacteria that live associated with entomopathogenic nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis*, respectively. Phase dissociation process occurs in these bacteria when growth *in vitro*. This becomes very critical due to nematodes mode of action creating better conditions for their reproduction. Since death larva of *Galleria mellonella* L. infected to entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* strain P2M, *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88 and *Steinernema cubanum*, symbiotic bacteria *Photorhabdus luminescens* (P-01), (P-02) and *Xenorhabdus* sp. (X-01) were isolated. Adsorption dyes in Mc. Conkey agar and NBTA agar, lipase, protease activity and flagella presence were characteristics of isolates primary phase. Every isolates showed antibiotic activity opposite to *Micrococcus luteus*.

Key words: *Photorhabdus luminescens*, *Xenorhabdus*, primary phase, symbiotic bacteria

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* viven en simbiosis con los nematodos entomopatógenos *Steinernema* y *Heterorhabditis* [Akhurst *et al.*, 1996]. Inicialmente existía un solo género, *Xenorhabdus*, que agrupaba a todos los simbiotes de nematodos entomopatógenos [Thomas y Poinar, 1979]. Boemare *et al.* (1993), después de realizar estudios fisiológicos bioquímicos y genéticos, determinaron que la especie *Xenorhabdus luminescens* pasara a formar el nuevo género *Photorhabdus*, cuyo nombre se debe a que estas bacterias son bioluminiscentes. Su intensidad varía con los diferentes aislados [Rayney *et al.*, 1995].

Existe un fenómeno de disociación de fases en el desarrollo de poblaciones de bacterias asociadas a los nematodos

entomopatógenos [Akhurst, 1980]. Esta acción es espontánea. El cambio reversible es muy difícil de obtener, especialmente cuando se establecen crías sobre medios nutritivos *in vitro* [Boyer-Giglio y Boemare, 1991]. La variación de fase es una propiedad común a ambos géneros [Boemare y Akhurst, 1988; Neelson *et al.*, 1990].

La fase primaria tiene características totalmente diferentes a la secundaria, por lo que resulta de gran importancia realizar una adecuada diferenciación entre ellas, pues solo la primera se utiliza para la reproducción masiva de los nematodos entomopatógenos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la forma primaria de los aislados bacterianos asociados a los nematodos *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se aislaron las bacterias simbiotes a partir de larvas muertas de *Galleria mellonella* L. infestadas con las cepas de nematodos entomopatógenos *Heterorhabditis indica* cepa P2M, *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88 y *Steinernema cubanum*, pertenecientes a la colección de nematodos entomopatógenos del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal.

Para la determinación de las características de la forma primaria se utilizaron las pruebas bioquímicas de motilidad, actividad proteasa, lipasa y lecitinasa, producción de antibióticos excretables y la detección de la bioluminiscencia sugeridas por Arkhust (1980) y Boemare *et al.* (1997). Se realizaron siembras por estrías en agar Mc. Conkey para observar la capacidad de absorción del rojo neutro. Para constatar la absorción del bromotimol azul y la reducción del cloruro de trifenil-tetrazolium de esta fase se utilizó el medio NBTA, de acuerdo con lo propuesto por Boemare *et al.* (1997).

La prueba de motilidad se realizó en agar semisólido y se utilizó agar número 1(OXOID) al 0,6% para determinar la presencia de flagelos. Se realizó la siembra de la bacteria en forma de punción.

La actividad proteasa se hizo en medio agar nutriente, suplementado con gelatina (0,4%), y como revelador se empleó solución Frazier [Frazier, 1926]. La actividad lipasa se detectó en Tween 80, y la lecitinasa se observó en agar nutriente suplementado con yema de huevo al 10%.

La producción de antibióticos excretables por las bacterias al medio se comprobó con *Micrococcus luteus* como organismo indicador, según proponen Boemare *et al.* (1997). La detección de la bioluminiscencia en el caso de *Photorhabdus* se observó en un cuarto oscuro después de adaptar la vista 10 min en estas condiciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un aislado de *Xenorhabdus* sp. X-01 y dos de *Photorhabdus luminescens* P-01 simbiote de *Heterorhabditis indica* y P-02 simbiote de *Heterorhabditis bacteriophora*. Se plantea que las bacterias simbiotes de las cepas de referencia internacional *H. indica* (P2M) y *H. bacteriophora* (HP-88) pertenecen a la especie *Photorhabdus luminescens*, que a su vez se agrupan en diferentes subespecies [Boemare, 2002].

Las colonias de P-01 presentaron formas circulares con bordes ligeramente ondulados y traslúcidos, de forma ligeramente redondeada hasta irregular, de superficie lisa, elevadas, de consistencia mucosa, de color amarillo intenso, brillantes y con diámetro de 3-4 mm (*Fig. 1(a)*).

En el aislado P-02 se observaron colonias con formas redondeadas, superficies lisas, de consistencias mucosas, planas, cuyo diámetro estuvo alrededor de 2 mm (*Fig. 1(b)*) y de color blanco grisáceo.

El aislamiento X-01 exhibió otras características, al tener bordes enteros, ligeramente ondulados, elevados y de consistencia mucosa, coloración beis con el centro más oscuro, que midieron de 2-3 mm de diámetro (*Fig. 1(c)*).

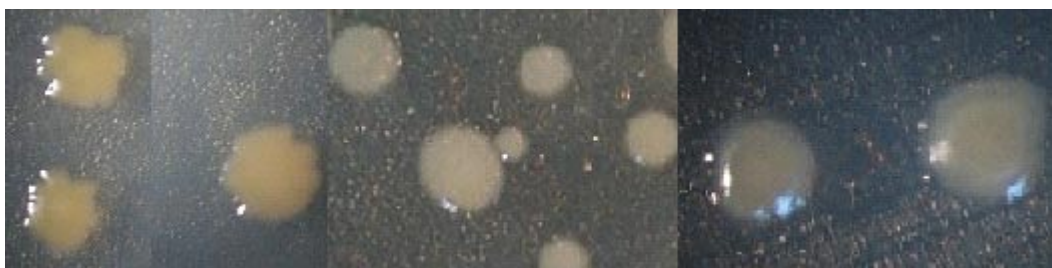


Figura 1. Morfología de las colonias en agar nutriente P-01 (a), P-02 (b), X-01 (c).

Las formas primarias de los tres aislados presentaron colonias de coloración rojiza, lo que indicó la absorción del colorante rojo neutro en agar Mc. Conkey. En el medio NBTA también se obtuvo una respuesta positiva donde las colonias de los aislados tomaron una coloración azul, lo que indica la presencia de la fase primaria de las bacterias según los criterios de Boemare y Akhurst (1988) y Boemare *et al.* (1993).

Todos los aislados mostraron presencia de flagelo, actividad proteasa, lipasa y antibiótica. Esta última se evidenció por la presencia de un halo que inhibió el crecimiento de *M. luteus*, que fue el microorganismo indicador propuesto por Boemare *et al.* (1997).

La actividad lecitinasa fue positiva para todos los aislados. En este sentido Thaler *et al.* (1998) estudiaron la

especificidad de diferentes sustratos para evaluar la actividad lecitinasa, y solamente en la forma primaria de *Xenorhabdus nematophilus* y *Xenorhabdus bovienii* se produjo una mayor actividad, cuando la bacteria creció en medio sólido con lecitina al 0,01%. Este mismo autor planteó que la producción de lecitinasa es dependiente de la fase de crecimiento. Los mayores niveles de síntesis se obtuvieron al inicio de la forma estacionaria.

## CONCLUSIONES

- Las formas primarias de los aislados X-01, P-01 y P-02 se caracterizaron por la absorción de los pigmentos en los medios agar Mc. Conkey y agar NBTA, la producción de lipasa, lecitinasa, proteasa, y la presencia de flagelo.
- Todos los aislados mostraron actividad antibiótica sobre *Micrococcus luteus*.

## REFERENCIAS

- Akhurst, R. J.: «Morphological and Functional Dimorphism in *Xenorhabdus* spp., Bacteria Symbiotical Associated with the Insect Pathogenic Nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*», *Journal of General Microbiology* 121:303-309, 1980.
- Akhurst, R. J.; R. G. Mourant; L. Baud; N. Boemare: «Phenotypic and DNA Relatedness Study Between Nematode Symbiont and Clinical Strain of the Genus *Photorhabdus* (Enterobacteriaceae)», *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:1034-1041, 1996.
- Boemare, N. E.; R. J. Akhurst: «Biochemical and Physiological Characterization of Colony form Variants in *Xenorhabdus* spp (Enterobacteriaceae)», *International Journal of Systematic Bacteriology* 134:751-761, 1988.
- Boemare, N. E.; R. J. Akhurst; R. G. Mourant: «DNA Relatedness Between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes and a Proposal to Transfer *Xenorhabdus luminescens* to a New Genus, *Photorhabdus* Gen», *Nov. Int. J. Helminthol. Soc. Wash*, 1993, pp. 249-255.
- Boemare, N. E.; J. O. Thaler; A. Lanois: «Simple Bacteriological Test for Phenotypic Characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Phase Variants», *Symbiosis* 22:167-175, 1997.
- Boemare, N. E.: «Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*», *Entomopathogenic Nematology*, CABI Publishing, 2002, pp. 35-56.
- Boyer-Giglio, M-H.; N. E. Boemare: «La variation de phases chez les *Xenorhabdus* spp.», *Rencontres Caraïbes en Lutte Biologique*, Rencontres Caraïbes de Lutte Biologique, nov. 1990, Pointe-à-Pitre INRA-ACTA, Paris, 1991, pp. 133-144.
- Frazier, W. C.: «A Method for the Detection of Changes in Gelatine due to Bacteria», *Journal of Infectious Diseases* 39:302, 1926.
- Nealson, K. H.; T. M. Sckmidth; B. Bleakley: «Physiology and Biochemistry of *Xenorhabdus*», *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, CRC, Press, Boca Raton, Florida, 1990, pp. 271-284.
- Thaler, J. O.; B. Duvic; A. Givaudan; N. E. Boemare: «Isolation and Entomopathogenic Properties of the *Xenorhabdus nematophilus* F1 Lecithinase», *Applied and Environmental Microbiology* 64:2367-2372, 1998.
- Tomas, G. M.; G. O. Poinar: «*Xenorhabdus* gen. nov. a Genus of Entomopathogenic Bacteria of the Family Enterobacteriaceae», *International Journal of Systematic Bacteriology* 29:352-401, 1979.
- Rayney, F.; R. U. Ehlers; E. Stackebrandt: «Inability of the Polyphasic Approach to Systematics to Determine the Relatedness of the Genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*», *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:379-281, 1995.