



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias

Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

“Aislamiento y producción masiva de simbiontes bacterianos de nematodos nativos del estado de Hidalgo con potencial para el control de plagas agrícolas”

Trabajo de investigación

Que para obtener el título de:

Ingeniero Agroindustrial

Presenta:

Alejandro Martínez Rodríguez

Dirección: Dr. Norberto Chavarría Hernández, ICAp, UAEH
Co-dirección: Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, ICAp, UAEH

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Octubre 2008

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección de los profesores: Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández y Dr. Norberto Chavarría Hernández. El trabajo forma parte de las actividades de los proyectos: Fondos Mixtos-CONACyT-Gobierno del Estado de Hidalgo-2006, Clave 48556, ***Catálogo de nematodos entomopatógenos nativos del Estado de Hidalgo, con potencial para ser empleados en el biocontrol de plagas y así contribuir a la disponibilidad de alimentos inocuos***; y PIFI-PROMEPA de Cuerpos Académicos 2006, ***Consolidación del Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria***.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme concluir esta etapa en mi vida.

A mi Familia por el apoyo y comprensión que siempre me han brindado gracias.

Catedráticos que influyeron en mi formación profesional.

Amigos y compañeros con quienes conviví esta etapa de mi vida.

A la Dra. Carmen Wachter y su grupo de trabajo por su apoyo gracias.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, hermanos y tíos, especialmente a mi hermano Vicente Pascual Martínez Rodríguez † gracias por su apoyo incondicional.

Solamente una vida, vivida para los otros, vale la pena ser vivida.

Albert Einstein

Son Hombres

Son Hombres los que aran su propio surco.

Toda creación es fruto de la libre iniciativa y llega a su término sostenida por el sentimiento de independencia.

La libre iniciativa permite adelantarse a los demás.

El que se resigna a recorrer caminos consuetudinarios envejece prematuramente y se torna esclavo de la costumbre.

El que osa no leer un nuevo libro, encenderse por un nuevo anhelo, acometer una nueva empresa, ha renunciado a vivir.

Sólo cosechan simpatía los que siembran su propio entusiasmo. La belleza de vivir hay que descubrirla pronto o no se descubre nunca.

Para el perfeccionamiento humano son inútiles los tímidos que viven rumiando tranquilamente, sin arriesgarse a tentar nuevas experiencias; son los innovadores los únicos eficaces, descubriendo un rastro o encendiendo una chispa.

Podrá ser más cómodo no equivocarse nunca que errar muchas veces; pero sirven mejor a la humanidad los hombres que, en su inquietud de renovarse, por acertar una vez aceptan los inconvenientes de equivocarse mil.

José Ingenieros

En la naturaleza el papel de lo infinitamente pequeño es infinitamente grande.

Louis Pasteur

Índice general	I
Índice de cuadros	III
Índice de Figuras	IV
Nomenclatura	V
Abreviaturas	
Letras del alfabeto griego	
Unidades	
Resumen	VIII

Índice General

Capítulo I Revisión de literatura

1.1 Agricultura.....	1
1.1.1 Agricultura orgánica.....	1
1.2 Uso de plaguicidas e implicaciones	2
1.2.1 Uso de pesticidas a nivel mundial	4
1.2.2 Uso de pesticidas en México.....	5
1.3 Control Biológico	5
1.3.1 Estrategias de control biológico	7
1.4 Manejo Integral de plagas	8
1.5 Nematodos entomopatógenos	9
1.5.1 Ciclo de vida de nematodos entomopatógenos	10
1.6 Métodos de producción de nematodos entomopatógenos	11
1.6.1 Producción “In vitro”: cultivo sólido y cultivo sumergido.....	11
1.7 Generalidades de simbioses bacterianas de NEP.....	13
1.8 Colección y aislamiento de cepas de nematodos y simbioses bacterianas	15

1.9 Aislamiento e identificación de simbioses bacterianos	15
1.9.1 Caracterización bioquímica	16
1.9.1.1 Métodos de identificación bioquímicos.....	16
1.9.2 Caracterización genotípica	20
1.9.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
1.9.2.2 Electroforesis en gel	22
1.9.2.3 Secuenciación	22
1.9.2.3.1 Método químico de secuenciación del ADN	23
1.9.2.3.2 Método enzimático de secuenciación del ADN.....	23
1.10 Justificación	27
1.11 Objetivo general	28
1.11.1 Objetivos particulares.....	28
1.12 Hipótesis.....	28

Capítulo II Materiales y Métodos

2.1 Especímenes	29
2.2 Medios de cultivo	29
2.3 Aislamiento de simbioses bacterianos	29
2.3.1 Aislamiento a partir de hemolinfa	30
2.3.2 Fractura de Infecciones juveniles	30
2.3.3 Gota pendiente	31
2.4 Preparación de viales de conservación.....	32
2.5 Caracterización de simbioses bacterianos aislados	32

2.5.1 Morfología y movilidad.....	32
2.6 Caracterización bioquímica	33
2.7 Caracterización genotípica	34
2.7.1 Extracción ADN	34
2.7.2 Electroforesis en gel de agarosa	35
2.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa	36
2.7.3.1 Purificación de productos de PCR	37
2.7.4 Secuenciación	37
Capítulo III Resultados y discusiones	
3.1 Resultados.....	38
3.2 Características microbiológicas generales de simbioses bacterianas aislados	42
3.3 Caracterización bioquímica de <i>Xenorhabdus</i> sp.....	45
3.4 Caracterización genética de <i>Xenorhabdus</i> sp.....	48
Conclusiones IV	
Conclusiones	50
Recomendaciones V	
Recomendaciones para trabajos futuros.....	51
Anexo VI	
Reactivos para extracción del ADN.....	52
VII Referencias	
Bibliografía.....	54

Índice de cuadros

Cuadro 1.1 Estimación del uso de pesticidas en el mundo y Estados Unidos de América del 2000 al 2001 (Kiely <i>et al.</i> , 2004).....	4
--	---

Cuadro 1.2 Selección de casos y eventos notables de control biológico en México (García-García, 2006).....	8
Cuadro 1.3 Algunas compañías productoras de nematodos entomopatógenos así como las especies producidas y su uso en el campo (Kaya <i>et al.</i> , 2006)	10
Cuadro 1.4 Análisis comparativo de tres sistemas de producción de nematodos entomopatógenos (Fernández <i>et al.</i> , 1994)	12
Cuadro 1.5 Especies de bacterias entomopatógenas y su NEP simbiote (López-Cuellar 2005)	14
Cuadro 1.6 Trabajos recientes sobre aislamiento e identificación de bacterias simbióticas de nematodos entomopatógenos	25
Cuadro 2.1 Material y reactivos para la aplicación de API's	31
Cuadro 3.1 Algunas características generales de cepas <i>Xenorhabdus</i> spp.	44
Cuadro 3.2 Algunas características morfológicas coloniales de crecimiento de <i>Xenorhabdus</i> spp. en medio sólido NBTA	45
Cuadro 3.3 Diferencias fenotípicas de <i>Xenorhabdus</i> sp. aislado de NEP del estado de Hidalgo comparándolo con otros especímenes del mismo género.....	47

Índice de Figuras

Figura 1.1 Ciclo de vida de nematodos entomopatógenos del género <i>Steinernema</i> (López-Cuellar 2005).....	10
Figura 1.2 Morfología de <i>X. nematophila</i> en fase I desarrollada en cultivo sólido a) Células de <i>X. nematophila</i> con flagelas. b) Célula de <i>X. Nematophila</i> no se distingue ningún flagelo (Givaudan <i>et al.</i> , 1995)	13
Figura 1.3 Representación esquemática del probable ciclo de vida del complejo nematodo entomopatógeno/bacteria simbiótica. Fase de variación (conversión de la fase I a Fase II) en <i>Xenorhabdus</i> y <i>Photorhabdus</i> especies aparentemente ocurren dentro del huésped durante la reproducción de nematodo después de la muerte del huésped (Owuama, 2001)	14
Figura 2.1 Extracción de hemolinfa de una larva de <i>Galleria mellonella</i>	31
Figura 3.1 Larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas con nematodos entomopatógenos aislados en	

el estado de Hidalgo, después de 48 h de infección. a) color rojizo característico del complejo *Heterorhabditis* spp/*Photorhabdus* spp.; b) color blanquecino-cremoso característico de infecciones debidas al complejo *Steinernema* spp./*Xenorhabdus* spp. . 38

- Figura 3.2 Cultivos en placas de NBTA de algunos simbioses bacterianos de nematodos entomopatógenos aislados en el estado de Hidalgo, después de 48 h de incubación a 30 °C por el color desarrollado se podría sugerir que se trata de individuos de *Xenorhabdus* spp. en fase I 38
- Figura 3.3 Ubicación de células de simbioses bacterianos en el intestino de sus respectivos nematodos huésped. A) Células de *X. nematophila* localizadas en la vesícula del intestino de fases IJ de *Steinernema carpocapse*, B) Células de *Photorhabdus luminesces* localizadas en el intestino medio de IJ de *Heterorhabditis bacteriophora* (Ciche *et al.*, 2006) 39
- Figura 3.4 Cultivo sólido en medio NBTA de dos simbioses bacterianos de NEP aislados en el estado de Hidalgo. Se muestran distintos colores del crecimiento dependiendo del fenotipo manifestado por las bacterias: a) crecimiento azul, bacteria en fase I; b) crecimiento rojo, bacteria en fase II 40
- Figura 3.5 Cultivo In Vitro sólido de nematodos entomopatógenos aislados en el estado de Hidalgo creciendo en biomasa de su respectivo simbiote bacteriano previamente aislado y precultivado. Se observa el crecimiento abundante de nematodos (masa blanquecina) después de 10 d de haber inoculado fases de IJ de NEP 41
- Figura 3.6 Fotografías de transmisión electrónica de células de *Photorhabdus luminesces* : (A y D) muestran células con dos distintas estructuras de inclusiones proteínicas separadas por centrifugación: inclusiones tipo 1 (B y C), e inclusiones tipo 2 (E y F) (Bowen y Ensing, 2001)..... 42
- Figura 3.7 Cultivos líquidos en STB de dos simbioses bacterianos aislados de nematodos entomopatógenos del estado de Hidalgo. Bacterias en fase I después de 12 h de incubación a 30 °C. A) *Xenorhabdus* spp., B) *Photorhabdus* spp. (magnificación, 1000 x) 43
- Figura 3.8 Colonia de *Xenorhabdus* sp. Fase I aislada de nematodo entomopatógeno colectado en el estado de Hidalgo. Cultivo en placa de NBTA incubada a 30 °C por 48 h (Magnificación 40 x) 44
- Figura 3.9 Geles de agarosa al 1 % obtenidos de la electroforesis de material genético de dos simbioses bacterianos aislados de nematodos entomopatógenos colectados en el estado de Hidalgo a) Gel realizado para comprobar la integridad y cantidad de ADN extraído. b) Gel realizado con productos de amplificación obtenidos mediante PCR. 48
- Figura 3.10 Secuencia en formato fasta de *Xenorhabdus* sp. aislada de nematodos entomopatógenos colectados en el estado de Hidalgo 49

Nomenclatura

Abreviaturas

AB Azul de bromotimol

TTC	Cloruro de trifenil tetrazolio
IOFAM	Federación Internacional de movimientos de agricultura orgánica
FAO	Food and Agriculture Organization of The United Nations
EUA	Estados Unidos de América
USD	Dólares EUA
pH	Potencial de iones hidrogeno
MIP	Manejo integral de plagas
NEP	Nematodo(s) entomopatógono
IJ	Infectivo(s) Juvenil
Fase I	Fase primaria
Fase II	Fase secundaria
DNA	Acido desoxirribonucléico
NBTA	Agar nutritivo con Cloruro de trifenil tetrazolio y azul de bromotimol
STB	Caldo de soya tripticaseina
p/v	Unidades de peso por unidades de volumen
v/v	Unidades de volumen por unidades de volúmenes
API's	Sistemas para la identificación bioquímica de microorganismos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dNTP	nucleótidos
pb	pares de bases

Símbolos griegos

λ

Longitud de onda

Unidades

°C	Grados Celsius
%	Porcentaje (por cada cien)
rpm	revoluciones por minuto
Ha	hectáreas
Ton	tonelada
ng	nanogramo
μL	microlitro
mL	mililitro

L	litro
kg	kilogramo
h	hora
mm	milímetro
mM	milimolar
pmol	picomolar
mg	miligramo
V	volt
kd	kilodalton

Resumen

Se asilaron 25 simbiontes bacterianos de nematodos entomopatógenos silvestres del estado de Hidalgo, de los cuales el 65 % pertenecen al género *Photorhabdus* y el restante 35 % a *Xenorhabdus*.

Se caracterizó un espécimen de *Xenorhabdus* sp. mediante distintos estudios morfológicos, bioquímicos y genéticos determinándose que pertenece a la especie *Xenorhabdus nematophila* Breton. Los resultados relevantes son los siguientes:

- Características morfológicas: bacilos Gram negativos de 1.2 a 9 μm con movilidad. Cuando crece en medio agar nutritivo con azul de bromotimol (AB) y cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (medio NBTA), la fase I bacteriana absorbe AB dando lugar a colonias azules redondas y regulares (diámetro, 0.56 mm); mientras que la fase II bacteriana no absorbe AB y oxida TTC generando colonias rojas irregulares.
- Características bioquímicas: el espécimen dio positivas las siguientes reacciones: producción de ácido a partir de ribosa y de acetoína; uso como fuente de carbono del inositol, L-arabinosa, n-acetil-glucosamina, glicerol, galactosa y fructosa. Así mismo, dio negativas entre otras, las siguientes reacciones: hidrólisis de esculina y producción de ácido a partir de inositol.
- Características genéticas: la secuencia del segmento amplificado del gen 16s rADN coincidió en un 99 % con *Xenorhabdus nematophila* Breton.

Capítulo I

Revisión de literatura

1.1 Agricultura

La agricultura es el arte de cultivar la tierra, es una actividad fundamental para el desarrollo autosuficiente y la generación de riqueza de las naciones. El manejo de los suelos y el cultivo de vegetales tienen la finalidad de proveer alimentos al hombre y materia prima a la industria. Las actividades económicas del sector agrícola se fundamentan en la explotación del suelo o en los recursos que éste origina de forma natural o por acción del hombre (Saltini, 1989).

Agricultura y medio ambiente

La agricultura tiene un gran impacto en el medio ambiente, en los últimos años, algunos aspectos de la agricultura intensiva a nivel industrial han sido cada vez más polémicos. La creciente influencia de las grandes compañías productoras de semillas, productos químicos y las procesadoras de comida, preocupan cada vez más tanto a los agricultores como al público en general (Irouleguy, 1962).

Agricultura Moderna Intensiva

La Agricultura moderna intensiva se basa en el monocultivo intensivo, es insostenible ecológicamente, sanitariamente peligroso y financieramente costoso. Este modelo, promovido por la industria petroquímica, se basa en la lucha contra la naturaleza: rompe el equilibrio de los ecosistemas, puede reducir la diversidad genética natural, necesita cantidades enormes y crecientes de sustancias químicas, acelera la erosión del suelo y la pérdida de sus minerales, contamina las aguas subterráneas y los ríos, extermina innumerables especies de organismos vivos del suelo vitales para el equilibrio y la salud de las cosechas, etc. (García-García 2006).

Algunos problemas que ha generado la agricultura intensiva son:

- Contaminación por nitrógeno, fósforo y magnesio en ríos, lagos y aguas subterráneas, debido al uso de distintos productos químicos como insecticidas, fungicidas y fertilizantes, entre otros.
- Erosión del suelo.
- Agotamiento de minerales del suelo, debido principalmente a monocultivos.

Muchos de estos problemas van agotando y desertizando el suelo, obligando a abandonar unos terrenos para arar otros nuevos que, a su vez, se agotan, creando un círculo vicioso que va destruyendo el entorno. Un ejemplo es la deforestación progresiva (Irouleguy, 1962).

1.1.1 Agricultura orgánica

Se denomina agricultura orgánica a todo aquel sistema agrícola que promueve la producción sana y segura de alimentos y fibras textiles desde el punto de vista ambiental, social y económico, respetando las exigencias y capacidades naturales de las plantas, animales y el entorno, buscando optimizar la calidad de la agricultura y el medio ambiente. La agricultura orgánica implica la reducción considerable de abonos químicos, plaguicidas y otros productos sintéticos (IFOAM, 2005).

En México la agricultura orgánica está en franca expansión, en los últimos ocho años pasó de 25,000 Ha cultivadas de orgánicos a poco más de 200,000 Ha. México se encuentra posicionado en primer lugar, en producción de café orgánico. Los productos orgánicos mexicanos cuentan con aceptación en Alemania, Inglaterra, Italia, Holanda y España, entre otros (Gómez-Tovar y Gómez-Cruz 2005). El dinámico y atractivo mercado de los alimentos orgánicos está estimulando fuertemente la reconversión de la agricultura convencional a la agricultura orgánica (IFOAM 2005). No obstante la agricultura orgánica se enfrenta a diversos problemas, entre los cuales, podemos destacar las plagas, las cuales afectan directamente la productividad y calidad de los cultivos generando importantes pérdidas económicas.

Una plaga es el resultado de un desequilibrio ecológico de magnitud suficiente para favorecer el desarrollo y reproducción de una sola especie biológica, cuando ésta se encuentra fuera del alcance de su depredador natural logra reproducirse a altos niveles sobre ese nicho y propicia severos problemas. La plaga se puede formar por alguna colonia de insectos, ácaros, hongos, malezas, roedores, moluscos y/o nematodos llegando a perjudicar y disminuir los rendimientos agropecuarios y/o afectar en otros rubros como son la salud humana, la del ganado o de alguna especie forestal y puede amenazar incluso a frutas, granos y/o semillas almacenadas (Sanjuan-Galindo 2006).

1.2 Uso de plaguicidas e implicaciones

Por cientos de años, la agricultura contribuyó de manera considerable a la diversidad de especies y de hábitat, dando origen a muchos de los ecosistemas de hoy. Sin embargo, durante el último siglo, la agricultura moderna intensiva, como consecuencia del uso de altos insumos de plaguicidas y fertilizantes sintéticos, ha tenido un impacto nocivo sobre la diversidad de los recursos genéticos de las variedades de cultivos y de razas de animales, sobre las especies silvestres de la flora y de la fauna, afectando la diversidad de los ecosistemas. La persistencia en el suelo de esos residuos

altera de manera sustancial el balance ecológico de la flora y fauna; los plaguicidas y fertilizantes al acumularse en el suelo tienden a degradarlo o removerlo y amenazan su fertilidad. Por otra parte, la acumulación de compuestos químicos provenientes de los plaguicidas en los tejidos de los organismos está asociada con disfunciones y deterioro del sistema inmunológico, deficiencias en el proceso reproductivo, anomalías en el desarrollo de las células y la formación de tumores cancerosos. También se ha demostrado que la utilización de los compuestos químicos contenidos en los plaguicidas ocasiona efectos perjudiciales en la vida acuática, especialmente en las especies más importantes dentro de la cadena alimentaría, como son los peces, las aves y los mamíferos marinos (FAO, 2004).

Los plaguicidas o pesticidas son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de plagas en su sentido más amplio. Existen varias clasificaciones de los plaguicidas dependiendo del blanco de ataque; por ejemplo, herbicidas, insecticidas, fungicidas, rodenticidas, etc., de acuerdo a la plaga que se pretenda controlar. Otra clasificación se basa en las propiedades químicas de los plaguicidas (i.e., organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides) (Barrera, 2002).

Los compuestos tóxicos (sustancias que pueden ocasionar efectos adversos en la salud humana y en los organismos vivos), la persistencia (sustancias químicas que no se degradan fácilmente en el medio ambiente) y la bioacumulación (concentración en los tejidos de los seres vivos), son características que definen a las sustancias químicas contenidas en los plaguicidas. El problema de las sustancias y productos que presentan dichas características, es que se incorporan como insumos para procesos de producción, que al pasar al mercado como productos de consumo final y desecharse de manera inapropiada, se convierten en residuos considerablemente peligrosos y contaminantes, esparciéndose en la atmósfera, cuerpos de agua, suelos y en todos los ecosistemas (FAO, 2004).

El exceso de dependencia en los plaguicidas, particularmente en países desarrollados con sistemas de cultivo intensivo, ha dado lugar a problemas importantes, entre ellos el desarrollo de variedades de plagas resistentes a los productos químicos utilizados para su control, la destrucción de los enemigos naturales de las plagas, la expansión de las poblaciones de especies que antes no se consideraban plagas, la presencia de residuos indeseables y otros efectos ambientales perjudiciales (López-Cuellar, 2005). Actualmente existen 22 plaguicidas clasificados como perjudiciales para la salud y el medio ambiente, de los cuales 60 % aún son utilizados en México y 42 % son elaborados en el país. Al mismo tiempo, de 90 plaguicidas que han sido cancelados o restringidos en los Estados Unidos de América (EUA), 30 se usan todavía en México, lo que demuestra la falta de control y

aplicación de criterios toxicológicos y ambientales en la reglamentación nacional respectiva (López-Cuellar 2005). Por lo anterior, es necesario detener la contaminación por el uso de plaguicidas a través de alternativas como la agricultura orgánica y la lucha biológica y natural contra las plagas. La aplicación de plaguicidas en los suelos provoca literalmente un envenenamiento del mismo, esta aplicación de químicos afecta adversamente la capacidad de microorganismos y otros organismos del suelo encargados de reintegrar los elementos a los diferentes ciclos biológicos lo cual acorta de manera tajante la circulación y reciclamiento de diferentes sustancias benéficas para el ecosistema.

1.2.1 Uso de pesticidas a nivel mundial

En los años 2000 y 2001, el consumo de pesticidas usados en el mundo excedió los 32,769 millones de dólares (USD). Los herbicidas fueron los de mayor uso, seguido por pesticidas, insecticidas y fungicidas. En EUA el total de pesticidas usados en 2000 y 2001 fue equivalente a 11,165 millones de USD, una cifra similar a la correspondiente para el resto del mundo, mostrando una proporción más elevada en el uso de herbicidas y otros pesticidas. Los valores estimados de gasto en pesticidas usados en el mundo y EUA son mostrados en el Cuadro 1.1 (Kiely *et al.*, 2004).

Cuadro 1.1 Estimación del uso de pesticidas en el mundo y Estados Unidos de América del 2000 al 2001.

Tipo	Mercado en el mundo		Mercado en EUA		EUA porcentaje del Mercado global
	Millones USD	Porcentaje	Millones USD	Porcentaje	Porcentaje
Año 2000					
Herbicidas	14,319	44	6,365	57	44
Insecticidas	9,102	28	3,129	28	34
Fungicidas	6,384	19	860	8	13
Otros	2,964	9	811	7	27
Total	32,769	100	11,165	100	34
Año 2001					
Herbicidas	14,118	44	6,410	58	45
Insecticidas	8,763	28	3,124	28	36
Fungicidas	6,027	19	835	8	14
Otros	2,848	9	721	7	25
Total	31,756	100	11,090	100	35

EUA = Estados Unidos de América, USD = dólares EUA

1.2.2 Uso de pesticidas en México

Mundialmente se busca la disminución del uso de pesticidas químicos. En México no se ha regulado de forma apropiada esta actividad. En el año 2005, las regiones con mayor uso de plaguicidas eran: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México, Puebla y Oaxaca. Se calcula que en ellas se aplica el 80 % del total de pesticidas usados en el país, lo que comprueba que el uso de plaguicidas tiene una fuerte concentración en algunas regiones y en algunos cultivos. Aunque esto varía según el cultivo, en términos generales los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas, seguidos de insecticidas y fungicidas. En las zonas noroeste y centro (Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Baja California, Guanajuato y Jalisco) se consumen cantidades importantes de plaguicidas de todo tipo para producir granos y una gran variedad de hortalizas de exportación, entre ellas, tomate, cucurbitáceas y chile. Por su parte, en las zonas cañeras se aplican grandes cantidades de herbicidas e insecticidas, las zonas de plátano consumen principalmente fungicidas y en la zona de Villa Guerrero, en el Estado de México, se utilizan cantidades importantes de diversos plaguicidas para la producción de flores, mientras que para el maíz se aplican sobre todo herbicidas. No hay datos claros sobre la cantidad de plaguicidas que se usa actualmente en el país, pero hace unos 6 años se decía que se consumían alrededor de 50,000 ton anuales de ingredientes activos. El valor actual del mercado se calcula que está entre 400 y 600 millones de USD, si bien es posible que este valor subestime la realidad (Albert, 2005).

1.3 Control Biológico

El control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malas hierbas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otros organismos. Hay que tener en cuenta que su uso ha tenido significados diferentes a lo largo del tiempo; así, los fitopatólogos han tendido a usar el término para denotar métodos de control que incluyen rotación de cultivos y alteraciones del pH del suelo, entre otros. Otros investigadores diferencian un control biológico clásico de control biológico moderno donde se incluyen las técnicas de control por interferencia. Sin embargo, la definición más aceptada en la actualidad es la que han utilizado tradicionalmente los entomólogos. El control biológico tiene importancia económica para el control de muchas plagas de insectos especialmente en la agricultura (Rodríguez-Bosque y Arredondo-Bernal, 2007)

El concepto de control biológico hay que diferenciarlo del control natural, que es el control que sucede en las poblaciones de organismos sin intervención del hombre e incluye además de enemigos naturales la acción de los factores abióticos del medio. Por ello hay que entender el control biológico como un método artificial de control que presenta limitaciones especialmente en cuanto al

conocimiento de los organismos afectados, lo que trae consigo una serie de desventajas e inconvenientes en su aplicación, sobre todo si se relaciona con los métodos químicos de control (Barrera, 2002).

Entre los inconvenientes más importantes se encuentran:

1. Normalmente su aplicación requiere de un planteamiento y manejo más complejo, mayor seguimiento de la aplicación, menos rápido y drástico que el control químico.
2. El éxito de su aplicación requiere mayores conocimientos de la biología de los organismos implicados (tanto del agente causante del daño como de sus enemigos naturales).
3. La mayoría de los enemigos naturales suelen actuar sobre una o unas pocas especies, es decir son altamente selectivos. Esto puede resultar una ventaja (como se comentará a continuación) pero en ocasiones supone una desventaja al incrementar la complejidad y los costos derivados de la necesidad de utilizar distintos programas de control.

Ventajas del control biológico

A pesar de ello, también presenta una serie de ventajas que hace que este tipo de control se convierta en uno de los más importantes para la protección fitosanitaria. Cuando funciona posee muchas ventajas, entre las que se puede citar:

1. Poco o ningún efecto nocivo colateral de los enemigos naturales hacia otros organismos, incluso el hombre.
2. La resistencia de las plagas al control biológico es muy rara.
3. El control es relativamente a largo término, y algunas veces permanente.
4. El tratamiento con insecticidas es eliminado por completo o de manera sustancial.
5. La relación costo/beneficio es muy favorable.
6. Evita plagas secundarias.
7. No existen problemas de intoxicaciones.

8. Se le puede usar dentro del Manejo Integral de Plagas (MIP)

(Barrera, 2002).

1.3.1 Estrategias de control biológico

El control biológico puede llevarse a cabo a través de una acción intencionada, directa, por parte del hombre o bien a través de acciones indirectas mediante el manejo de las interacciones existentes en el agroecosistema. Sin embargo en la actualidad se discute la inconveniencia ecológica de introducir especies en lugares donde antes no existían. Por ello, la aplicación de especies externas al ecosistema, sólo debe hacerse para el control de organismos nocivos foráneos habiendo realizado previamente estudios ecológicos con objeto de evitar desplazamientos de los enemigos naturales autóctonos. Se diferencian dos tipos fundamentales de control biológico: inoculación, con finalidad preventiva, e inundación, con finalidad curativa. Otro tipo de aplicación es la conservación la cual es la menos empleada.

Inoculación: la inoculación es una estrategia utilizada cuando es posible una cierta permanencia del enemigo natural en el cultivo pero que es incapaz de vivir sobre él de forma permanente. Las liberaciones inoculativas se hacen al establecimiento del cultivo para colonizar el área durante el tiempo de permanencia del cultivo (o estación climatológica) y de esta forma prevenir los incrementos de la población del agente perjudicial.

Inundación: la estrategia de inundación consiste en liberaciones de un número muy elevado de enemigos naturales nativos o introducidos, generalmente patógenos, para la reducción de la población del agente dañino a corto plazo cuando la población alcanza niveles de daño económico.

Conservación: la estrategia de conservación de enemigos naturales es la menos estudiada y la más compleja de las estrategias de control biológico, fundamentalmente debido a que, a diferencia de las anteriores, su aplicación se lleva a cabo a través del manejo de las interacciones del agro ecosistema para potenciar la eficacia de los enemigos naturales autóctonos y de esta forma prevenir el ataque a niveles de daño económico de los agentes perjudiciales de las plantas cultivadas. Para poder llevarla a cabo es fundamental la existencia de enemigos naturales que controlen la población que produce el daño, pudiendo actuar sobre los elementos del medio tanto modificando los factores que interfieren con las especies benéficas como realizando un manejo de los requerimientos ecológicos que necesitan las especies benéficas en su ambiente (Rodríguez-Bosque y Arredondo-Bernal, 2007).

En el Cuadro 1.2 se muestra una selección de acontecimientos notables en México, de aplicación de control biológico para el Manejo Integral de Plagas (García-García, 2006).

Cuadro 1.2 Selección de casos y eventos notables de control biológico en México			
Año	Acontecimiento histórico	Enemigo natural	Especie plaga
1993	Inicio del control biológico del lirio acuático con curculiónidos en Sinaloa	<i>Noechetina bruchi</i> , <i>N. eichhorniae</i>	<i>Eichhornia crassipes</i>
1993	Inicia la búsqueda de hongos entomopatógenos contra la langosta	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. Acridum	<i>Schistocerca piceifrons</i>
1994	Se inicia en Veracruz la búsqueda de enemigos naturales nativos del minador de los cítricos	Predominantes: <i>Cirrospilus</i> spp.	<i>Phyllocnistis citrella</i>
1996-1997	Se realiza la evaluación de liberaciones masivas de parasitoides contra moscas de la fruta en Chiapas	<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	<i>Anastrepha</i> spp.
1998	Se inaugura el laboratorio de producción masiva de parasitoides contra el picudo del algodón en Río Bravo	<i>Catolaccus grandis</i>	<i>Anthonomus grandis</i>
2000	Se liberan parasitoides de la cochinilla rosada en Baja California Norte	<i>Maconellicoccus hirsutus</i>	<i>Anagyrus Kamali Gyranusoidea indica</i>
2000	Se libera la catarinita japonesa contra el pulgón café en la península de Yucatán	<i>Harmonia axyridis</i>	<i>Toxoptera citricida</i>
2000	Se introduce y libera en Chiapas el parasitoide de adultos de la broca del café	<i>Phymastichus coffea</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>

1.4 Manejo integral de plagas

El Manejo Integrado de Plagas (MIP), se basa en actividades fitosanitarias recomendadas por la FAO, combina una variedad de métodos de control, comprendida la conservación de los enemigos naturales, la rotación de cultivos, los cultivos mixtos y el uso de variedades resistentes a las plagas (García-García 2006). Para el MIP, la biotecnología es una herramienta útil y prometedora, siendo algunas de sus propuestas inocuas y que disminuyen el uso de insecticidas químicos, las siguientes:

1. Desarrollo de modificaciones genéticas en variedades agrícolas capaces de autoprotgerse

mediante la producción de sustancias tóxicas para plagas.

2. Empleo de organismos vivos como depredadores naturales de plagas.

3. Proteínas obtenidas a partir de algunos virus y que están siendo utilizadas para la inhibición de gusanos plaga del tabaco y del algodón entre algunos otros.

4. La bacteria *Bacillus thuringiensis* se ha usado por más de 50 años en el control de plagas en diversos cultivos y en zonas turísticas para combatir insectos como mosquitos. Su aplicación no produce efectos nocivos al ambiente o la salud humana.

5. Los hongos entomopatógenos poseen cierto grado de especificidad, lo que les permite disminuir una población de insectos plaga sin dañar otras especies o insectos benéficos y producen enzimas y toxinas que disminuyen las defensas de sus huéspedes.

6. Los nematodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* son enemigos naturales de diferentes insectos. Se utilizan porque se ha logrado probar su eficacia como agentes de control biológico en el combate de una amplia variedad de insectos-plaga como son: escarabajos rizófagos, gusanos barrenadores y diversos grillos a nivel de campo, que atacan una amplia variedad de productos agrícolas como maíz, fresas, almendras, cultivos de invernadero, caña de azúcar y papas, entre otros (Sanjuan-Galindo, 2006)

1.5 Nematodos entomopatógenos

Desde la década de los 1970 se ha desarrollado un gran interés en la investigación y comercialización de nematodos entomopatógenos (i.e. steinernemátidos y heterorhabdítidos) y su asociación simbiótica con bacterias (*Xenorhabdus* para *Steinernema* y *Photorhabdus* para *Heterorhabditis*), debido a que se pueden aplicar para el control de plagas ya que afectan a una cantidad amplia de insectos plaga. Actualmente, las especies de nematodos más comercializadas para fines de control biológico son *Steinernema carpocapse*, *S. feltiae*, *S. glaseri*, *S. kraussei*, *S. riobrave* cabinillas, *S. scapterisci*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. indica*, *H. medigis* y *H. marelatus* (Kaya et al., 2006; Cuadro 1.3)

Cuadro 1.3 Algunas compañías productoras de nematodos entomopatógenos así como las especies producidas y su uso en campo

Compañía	Especie de NEP	Sitio de Internet	Uso
Andermatt Biocontrol Grossdietwil	Sc, Sf, Hm	www.biocontrol.ch	Invernadero/Jardines
Asa Jung laboratory, Oakland, California, USA	Sc, Sf	www.asajunglab.com	Varios
Biologic Willow Hill, Pennsylvania, USA	Sc, Sf	www.biologicco.com	Varios
Bionema, Umea, Sweden Becker Underwood Ames USA	Sc, Sf, Sg, Sk, Ss, Hm	www.bionema.se / www.beckerunderwood.com	Jardinería, invernadero, cultivo de hongos
Certis Columbia Maryland, USA	Sc, Sf, Sr	www.certisusa.com	Invernadero, cultivo hongos, jardinería, viveros
e-Nema GmbH Raisdorf Germany	Sc, H sp.	www.goodbug-shop.com	Cítricos, césped, etc.
Biocontrol integral, Greendale, Indiana USA	Hb, Hi, Hmar	www.koppert.nl	Invernaderos, césped
M y R Durango, Bayfield Colorado USA	Sc, Sf, Hb	www.goodburg.com	Varios
Owinplant, Owinska K/poznanian Polonia	Sf	www.owinplant.com.pl	Invernadero, cultivo de hongos

Antes del 2003 Canadá producía NEP, pero recientemente no muestra actividad al año 2004. Sc, *Steinernema carpocapse*; Sf, *S. feltiae*; Sg, *S. glaseri*; Sk, *S. krausseir*; Sr, *S. riobrave*; Ss, *S. scapterisci*; Hb, *Heterorhabditis bacteriophora*; Hi, *H. indica*; Hm, *H. megidis*; Hmar, *H. marelatus*; H sp, *Heterorhabditis* especies.

1.5.1 Ciclo de vida de nematodos entomopatógenos

Los NEP tienen un ciclo de vida simple que incluyen el huevo, cuatro estadios juveniles y los adultos (Figura 1.1). El estadio juvenil infectivo puede localizar al huésped y entrar por sus aberturas naturales, para luego atravesar las paredes internas y pasar al hemocele, donde libera a la bacteria, que se multiplica repetidamente, generando las condiciones adecuadas para el desarrollo de los nematodos. Los nematodos ingieren las células bacterianas y los tejidos hidrolizados del huésped, para desarrollarse hasta adultos. Dentro del huésped pueden producirse dos o tres generaciones y luego, cuando se han agotado los nutrientes, emergen los juveniles infectivos (IJ) en busca de nuevos huéspedes. La especificidad de la asociación opera en dos niveles: a) la provisión de aceites esenciales por la bacteria, b) la retención de la bacteria dentro del intestino. El tiempo del ciclo de vida (de la infección a la salida de los juveniles) es de 7 a 10 días en *Steinernema* y de 12 a 15 días para *Heterorhabditis* (Fernández *et al.*, 1994).

1.6 Métodos de producción de nematodos entomopatógenos

Los métodos "In vivo" son más apropiados para mantenimiento de cepas y producción de IJ para ensayos de laboratorio y de campo a pequeña escala. Para las producciones a gran escala, los métodos "In vitro" son los más prácticos. Los steinernemátidos tienen mejores cualidades para almacenamiento. La producción "In vivo" de grandes cantidades de heterorhabdítidos en un intervalo de tiempo corto para evitar largos periodos de almacenamiento, puede ser un proceso difícil. Para este tipo de producción se utiliza frecuentemente *Galleria mellonella* por ser de fácil adquisición, con probabilidades de ser criadas con pocos recursos y ser un huésped muy susceptible. La producción promedio de IJ por larva de insecto es entre 30,000 y 50,000 siguiendo los métodos tradicionales (Fernández *et al.*, 1994).

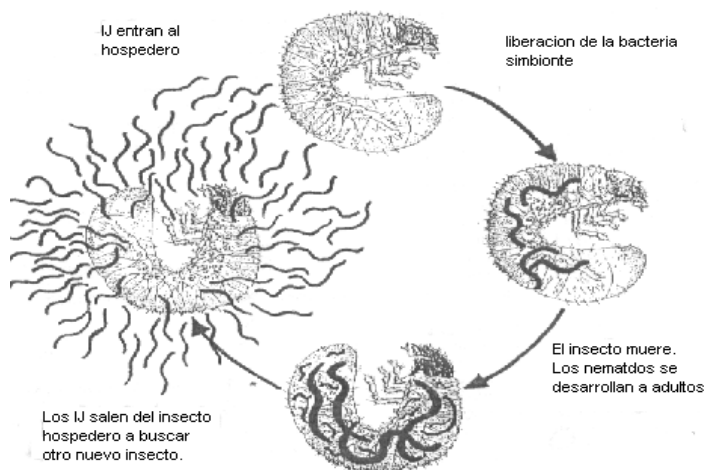


Figura 1.1 Ciclo de vida de nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* (López-Cuellar, 2005)

1.6.1 Producción "In vitro": cultivo sólido y cultivo sumergido

La producción en cultivo sólido surgió como una necesidad de hacer más económica y productiva la obtención de los nematodos. Los factores importantes son la necesidad de que el cultivo sea monoxénico (que los nematodos y su bacteria asociada sean los únicos agentes bióticos), el uso de la forma primaria de la bacteria, una superficie grande para que los nematodos puedan crecer, una fuente de esterol para los nematodos y una base alimentaria para las bacterias. El método más famoso es el de Bedding, reportado en 1986, que utiliza un homogenizado de vísceras de aves en placas de poliuretano como soporte en frascos grandes de vidrio o bolsas que pueden ser procesadas en autoclave. Otro método "In vitro" es el cultivo sumergido, el cual es la principal

tecnología de producción comercial a gran escala. Tiene muchos aspectos positivos, aunque por ser objeto de patentes de las firmas comerciales, la información está restringida. Así tenemos que son de escalamiento fácil, confiabilidad, empleo de materiales estables y uniformes; con los steinernemátidos está más adelantada su producción y se pueden obtener corrientemente, incluso en fermentadores de hasta 80 mil L. Como resultado del proceso tecnológico y los distintos procesos involucrados en la aplicación, el costo de los tratamientos por nematodos oscila entre 50 USD y 400 USD por hectárea de superficie tratada (Fernández *et al.*, 1994). El Cuadro 1.4 presenta un análisis comparativo entre los tres sistemas de producción mencionados, lo cual permite observar las ventajas y desventajas de cada uno en relación con los propósitos y recursos disponibles en base a lo expuesto por Fernández *et al.* (1994).

Cuadro 1.4 Análisis comparativo de tres sistemas de producción de nematodos entomopatógenos

Indicador	Cultivo In vitro		
	Cultivo In vivo	Cultivo sólido	Cultivo sumergido
Rendimiento aproximado	4x10 ⁵ IJ/insecto	6.7x10 ⁸ IJ/kg	1x10 ⁸ IJ/L
Duración del proceso (días)	8-15	12-14	16-24
Costo en capital	Bajo/medio	Bajo/medio	Alto
Costo labor	Alto	Alto	Bajo
Costo del material base	Alto	Bajo	Bajo
Control durante propagación de la bacteria	Pobre	Pobre	Bueno
Escalamiento	Difícil	Difícil	Bueno
Control de materiales base y posibilidades de suministro	Pobre	Medio	Bueno
Uniformidad de materiales	Pobre	Pobre	Bueno

Por otra parte, cualquiera que sea el método *In vitro* usado, siempre se involucran dos etapas:

Etapas 1. Bacteria simbiote es inoculada en el medio de producción y esta fermentación toma de 1 a 3 días (López-Cuellar, 2005). Un factor determinante para lograr altas productividades de nematodos virulentos en cultivos *In vitro*, es lo que se refiere a la bacteria simbiótica. Ésta plantea

retos debido a sus aspectos puramente biológicos, siendo lo más conveniente mantener a la bacteria en la llamada fase primaria durante los procesos de producción, lo cual no necesariamente es sencillo. Algunos autores sugieren que la etapa bacteriana de la fermentación determina el éxito de la producción *In vitro* de NEP (Wang *et al.*, 2007).

Etapa 2. Los nematodos son inoculados (pudiendo ser IJ exclusivamente o un cultivo maduro con distintos estadios de desarrollo de los NEP) (Chavarría-Hernández y de la Torre, 2001). Este es el inicio del cultivo monoxénico propiamente dicho y puede durar de 15 hasta 50 días.

1.7 Generalidades de simbioses bacterianas de NEP

Los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* están formados por bacterias simbioses específicas que viven asociadas con los nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, respectivamente. Las bacterias mutualistas *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, son alojadas dentro del tracto digestivo de fases IJ de los nematodos. Son enterobacterias de forma bacilar, Gram negativas y anaerobias facultativas, que no tienen estadios resistentes ni se encuentran libres en la naturaleza (solamente se encuentran en los nematodos o insectos huéspedes). Tienen una forma primaria (i.e., fase I) y otra secundaria (i.e., fase II), siendo la primera más virulenta debido a sus características fisiológicas y morfológicas. Una vez dentro del insecto, la bacteria lo mata por septicemia en un periodo de 24 a 48 h (Fernández *et al.*, 1994). La Figura 1.2 muestra al simbiote bacteriano *X. nematophila* en microscopía electrónica donde se puede observar los flagelos los cuales son más comunes en la fase I de este simbiote, relacionándose con mayor movilidad en comparación con la fase II bacteriana (Givaudan *et al.*, 1995).

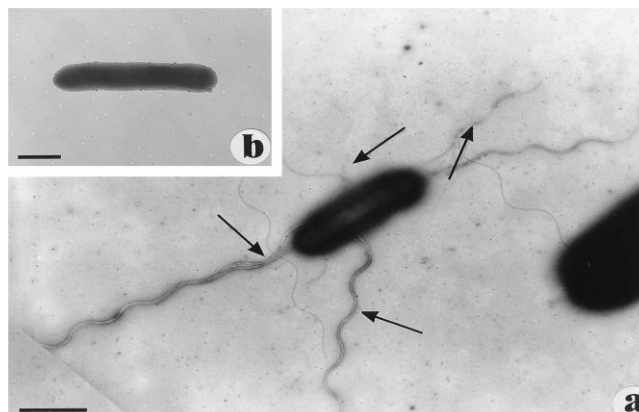


Figura 1.2. Morfología de *X. nematophila* en fase I desarrollada en cultivo solidó. a) Células de *X. nematophila* con flagelos. B) Célula de *X. nematophila* no se distingue ningún flagelo. Tomado de Givaudan *et al.* (1995).

Los factores que determinan la interacción simbiótica entre los nematodos y las bacterias aún no

están bien identificados. La fase I bacteriana es menos estable en cambio la fase II es más estable en cultivos prolongados. El dimorfismo que presenta la bacteria es puramente fenotípico y no está relacionado con cambios a nivel ADN (Ciche *et al.*, 2006). En la Figura 1.3 se esquematiza el ciclo de vida y relación simbiótica de los NEP y sus respectivas bacterias simbióticas.

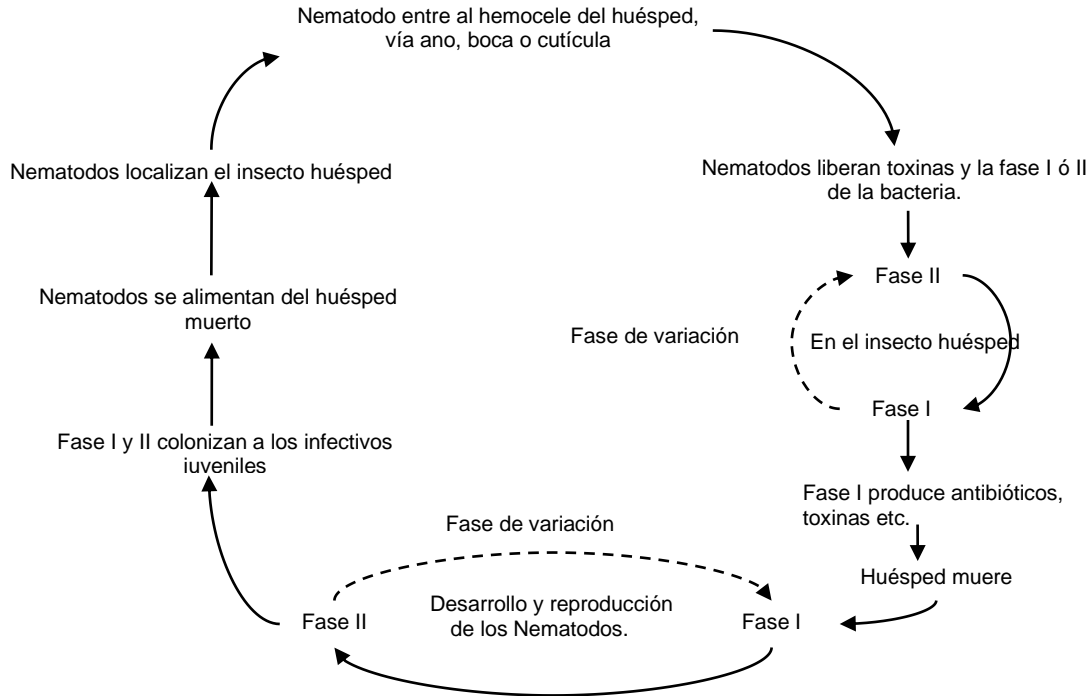


Figura 1.3 Representación esquemática del probable ciclo de vida del complejo nematodo entomopatógeno/bacteria simbiótica. Fase de variación (conversión de la fase I a fase II) en *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* aparentemente ocurre dentro del huésped durante la reproducción del nematodo (Owuama, 2001).

El Cuadro 1.5 muestra algunos ejemplos de relaciones simbióticas específicas entre bacterias y sus respectivos NEP.

Cuadro 1.5. Especies de bacterias entomopatógenas y su NEP simbiote (López-Cuellar, 2005)

Especie bacteriana	Nematodo
<i>X. beddingii</i>	<i>Steinernema</i> sp.
<i>X. bovienii</i>	<i>S. feltiae</i>
	<i>S. intermedia</i>
	<i>S. krausseir</i>
	<i>S. affinis</i>
<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>
<i>X. poinarii</i>	<i>S. glaseri</i>
<i>Xenorhabdus</i> spp.	<i>S. kushidai</i>
	<i>S. longicardum</i>
	<i>S. neocurtillis</i>
	<i>S. rara</i>
	<i>S. ritteri</i>
	<i>S. scapterisci</i>
	<i>S. serratum</i>
<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>

Photorhabdus spp.

H. megidis

H. indica

H. brevicaudis

H. zealandica

Por otra parte, en un afán de conservar o alterar lo menos posible la biodiversidad existente en los distintos ecosistemas, la práctica del biocontrol de insectos plaga mediante el uso de NEP actualmente tiende a usar preferentemente especies de nematodos nativos de las zonas geográficas donde son aplicados para el biocontrol, en lugar de usar especies exóticas de NEP aislados de nichos ecológicos diferentes, que por otra parte aún continúa siendo la práctica más ampliamente usada en muchos Agrosistemas. Más aún, se ha reportado que el uso de especies nativas de NEP en prácticas de biocontrol de insectos es frecuentemente más eficaz que el correspondiente a especies exóticas, cuando los especímenes han sido aplicados en igualdad de circunstancias.

Por las razones anteriores, varios grupos de investigación se han dado a la tarea en los últimos años de aislar especies de NEP de las regiones donde eventualmente podrán ser usados en estrategias de Manejo Integral de Plagas, reportándose en varios casos la presencia de nuevas especies de nematodos o de variedades distintas mejor adaptadas al entorno donde éstas serán usadas. En este sentido, también es de gran importancia identificar los simbioses bacterianos ya que, como se ha mencionado anteriormente, el cultivo puro de la bacteria simbiótica es fundamental en la producción masiva de NEP (Abu-Hatab *et al.*, 1998; Jeffke *et al.*, 2000; López-Cuellar, 2005).

1.8 Colección y aislamiento de cepas de nematodos y simbioses bacterianos

La colecta y aislamiento de nematodos nativos es importante para su utilización local en estrategias de MIP, para no alterar los ecosistemas y a la vez cumplir la legislación establecida. Se conocen dos formas fundamentales de colecta: en el suelo, a través de técnicas de flotación, decantación o extracción húmeda (poco empleado), y mediante la colecta por medio de huéspedes infestados naturalmente o con insectos-trampa, siendo este último el método más usado. El método de trapeo utiliza insectos altamente susceptibles, como *Galleria mellonella*, a fin de concentrar los nematodos del ambiente natural, aprovechando la capacidad de búsqueda que tienen estos para hallar al huésped (Fernández *et al.*, 1994). Después del proceso de aislamiento, se procede a la obtención, purificación e identificación de sus respectivos simbioses bacterianos para poder ser empleada en distintos experimentos, enfocados a la producción de bioinsecticidas a base de NEP.

1.9 Aislamiento e identificación simbioses bacterianas

El aislamiento de los simbioses bacterianas se debe realizar en su fase I, ya que como anteriormente se mencionó, esta fase es la más empleada en los procesos de producción de bioinsecticidas a base de NEP. La identificación de una bacteria implica su asignación a un taxón según una clasificación dada. Consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones disponibles. Las características a determinar y su número depende principalmente del tipo de bacteria y del fin que se persigue en la identificación.

1.9.1 Caracterización Bioquímica

La identificación de un simbiote bacteriano aislado puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y diferentes criterios en la evaluación de similitudes. Los ensayos bioquímicos tradicionalmente utilizados, denominados pruebas bioquímicas convencionales, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no. Son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano. Existen diferentes sistemas que facilitan la realización de tales ensayos, porque proponen el mejor conjunto de pruebas bioquímicas para la identificación de un grupo bacteriano, porque simplifican la interpretación de un resultado utilizando un valor numérico, además proveen los reactivos listos para su uso o porque son totalmente automatizables.

1.9.1.2 Métodos bioquímicos de identificación

API 20 NE

El API 20 NE es un sistema para la identificación de bacilos gram-negativos no enterobacterias. El sistema está estandarizado y combina 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. El kit consta de una galería con 20 microtubos conteniendo medios y/o sustratos en forma deshidratada.

Los microtubos convencionales, se inoculan con una suspensión bacteriana de la cepa a analizar en solución salina. Tras un periodo de incubación de 24 a 48 h a 30 °C se pueden observar virajes

de color en el medio, bien directamente o tras adición de reactivos. Las pruebas de asimilación se inoculan con un medio mínimo, observándose crecimiento bacteriano si la cepa a analizar es susceptible de utilizar el sustrato correspondiente. La lectura de la reacción API se realiza sumando las pruebas positivas por tríos; luego, se obtiene un número clave para la bacteria en cuestión, que puede ser buscado posteriormente en una tabla de códigos. Algunas pruebas convencionales incluidas en este kit son:

NO₃: reducción de NO₃; producción de N₂. Se añaden los reactivos NIT 1 (0.8g ácido sulfanílico + 100 mL ácido acético 5N) y NIT 2 (0.6 g N-N-dimetil-1-naftilamina + 100 mL ácido acético 5N). Tras 5 min, un color rojo indica reacción positiva. Una reacción negativa (ausencia de color) puede deberse a la producción de nitrógeno; para comprobarlo se añaden 2-3 mg de Zn (metal). Si tras otros 5 min no se aprecia cambio de color la reacción es positiva; si vira al rojo la reacción es negativa.

TRP: degradación de triptófano hasta indol. Añadir una gota del reactivo INDOL (5 p-dimetil aminobenzaldehído + 75 mL alcohol isoamílico + 25 mL HCl 37%). La aparición de un color rosa es indicativa de resultado positivo.

GLU: fermentación de glucosa. Cubrir la ventana del microtubo tras su inoculación con aceite de parafina para proporcionar un ambiente anaerobio. El medio es azul-verdoso; un viraje al amarillo supone reacción positiva.

ADH: producción de arginina dihidrolasa. Cubrir la ventana del microtubo tras su inoculación con aceite de parafina para proporcionar un ambiente anaerobio. El medio es amarillo; un viraje hacia el naranja-rosa-rojo indica reacción positiva.

URE: hidrólisis de urea (producción de ureasa). Cubrir la ventana del microtubo tras su inoculación con aceite de parafina para proporcionar un ambiente anaerobio. El medio es amarillo; un viraje hacia el naranja-rosa-rojo indica prueba positiva.

ESC: hidrólisis de esculina (producción de β-glucosidasa). El medio es amarillo; el viraje hacia el gris-marrón-negro es indicativo de reacción positiva. De forma general la hidrólisis de la esculina libera glucosa, esculetina y esta última se detecta porque reacciona con el ión férrico del medio dando unos precipitados negros que lo oscurecen.

GEL: proteasas. El medio contiene gelatina y tinta china. Si la bacteria a analizar produce

proteasas capaces de hidrolizar el sustrato, la tinta china difunde, obteniéndose una prueba positiva. En caso contrario la reacción es negativa.

PNPG: β -galactosidasa. El medio contiene p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido. En caso de existir producción de β -galactosidasa el medio vira de incoloro a amarillo.

Pruebas de asimilación

El resto de las pruebas del API 20 NE son ensayos de asimilación de diversos sustratos. Los medios son transparentes; una reacción positiva conlleva la aparición de turbidez.

GLU: asimilación de glucosa; ARA: asimilación de arabinosa; MNE: asimilación de manosa; MAN: asimilación de manitol; NAG: asimilación de N-acetil-glucosamina; GNT: asimilación de gluconato; CAP: asimilación de caprato; ADI: asimilación de adipato; MLT: asimilación de malato; CIT: asimilación de citrato; PAC: asimilación de fenil-acetato.

OX: presencia de oxidasas. Esta prueba indica si un microorganismo es oxidasa-positivo o negativo. Para su realización se han de emplear discos de Diferenciación de Oxidasa (Difco).

Aplicar una gota de agua destilada estéril sobre el disco y a continuación colocar sobre el mismo una colonia de la cepa estudiada con un asa de platino. La aparición de un color rosa a castaño o a casi negro en un período de 20 min indica reacción positiva.

API 20 E

El sistema API 20 E es útil para la identificación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae así como de otros bacilos gram-negativos. La galería consta de 20 microtubos que contienen medios deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana; el metabolismo de los microorganismos produce cambios de color en el medio, ya sea directamente o tras adición de reactivos. La lectura de este API sigue las mismas pautas que las establecidas para el API20 NE. Tras 18-24 h a 35-37 °C debe hacerse la lectura de la galería según la tabla de lectura. Se anotan primero las reacciones espontáneas; si la glucosa resulta positiva y/o 3 o más microtubos son positivos se procede a añadir los reactivos correspondientes a los microtubos que los requieren. Algunas pruebas convencionales incluidas en este kit son:

ONPG: producción de β -galactosidasa. El sustrato utilizado es o-nitrofenil- β -D-galactósido. El

medio es incoloro; si la reacción es positiva vira al amarillo.

ADH: producción de arginina dihidrolasa. Como sustrato se utiliza arginina. Añadir una gota de reactivo TDA (3.4 g percloruro férrico + 100 mL agua destilada). El medio es amarillo; una reacción positiva lo hace virar hacia el marrón.

LDC: producción de lisina decarboxilasa. Se utiliza lisina como sustrato. El medio, de color amarillo vira al naranja cuando la prueba es positiva.

ODC: producción de ornitina decarboxilasa utilizando como sustrato ornitina. El medio es amarillo; una reacción positiva lo hace virar hacia el naranja-rojo.

CIT: utilización de citrato. Cuando la prueba resulta positiva el medio vira del amarillo al verde.

H₂S: producción de sulfuro de hidrogeno. Utilizando como sustrato tiosulfato de sodio. El medio es incoloro-grisáceo; cuando la prueba es positiva se forma un depósito negro.

URE: producción de ureasa. El sustrato es urea, y si la reacción es positiva el medio de color amarillo, vira al naranja-rojo.

TDA: producción de triptófano desaminasa utilizando como sustrato triptófano. El medio es amarillo; cuando la prueba es positiva se puede apreciar un viraje al marrón.

IND: degradación de triptófano hasta indol. Añadir una gota del reactivo INDOL (5 p-dimetil aminobenzaldehído + 75 mL alcohol isoamílico + 25 mL HCl 37%). La aparición de un color rosa es indicativa de resultado positivo.

VP: prueba de Voges Proskauer. Utilizando como sustrato piruvato sódico se analiza la producción de acetoína. Añadir una gota del reactivo VP1 (40 g KOH + 100 mL agua destilada) y una de VP2 (a-naftol + 100 mL etanol). El medio es incoloro; una reacción positiva viene indicada por un viraje al rojo-rosado.

La prueba de Voges-Proskauer permite determinar si la bacteria problema sigue la vía de la fermentación butanodiólica para la conversión del ácido pirúvico, produciendo mayoritariamente productos neutros como resultado del proceso de fermentación.

A continuación se exponen una serie de pruebas indicativas de fermentación-oxidación de varios sustratos. La fermentación se examina en la parte inferior de los tubos; la oxidación se examina en las cúpulas de los mismos. Los medios son de color azul verdoso; una reacción positiva viene dada por una coloración amarilla:

GLU: fermentación/oxidación de glucosa; MAN: fermentación/oxidación de manosa; INO: fermentación/oxidación de inositol; SOR: fermentación/oxidación de sorbitol; RHA: fermentación/oxidación de ramnosa; SAC: fermentación/oxidación de sacarosa; MEL: fermentación/oxidación de melibiosa; AMY: fermentación/oxidación de amigdalina; ARA: fermentación/oxidación de arabinosa.

Las pruebas de la oxidasa (OX), reducción de nitratos, producción de proteasas (GE) también se llevan a cabo en este ensayo bioquímico, con el mismo principio y procedimiento que en el API 20 NE.

API 50 CH

Sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos enfocados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. El API 50 CH se emplea en combinación con el API 50 CHB/E medium para la identificación de *Bacillus* y microorganismos próximos, de enterobacterias y Vibrionaceae. El API 50CH permite el estudio de la fermentación de sustrato y derivados (heterósidos, polialcoholes y ácidos urónicos). Durante el periodo de incubación, la fermentación puede generar un cambio de color en el tubo debido a producción de ácido en anaerobiosis.

1.9.2 Caracterización genotípica

La microbiología en los últimos años ha empleado a la biología molecular como una herramienta indispensable para la identificación y caracterización de microorganismos. Para estas tareas, también se tienen que considerar aspectos del ecosistema donde se desarrolle el microorganismo o microorganismos en estudio, ya que el crecimiento, la sobrevivencia y la actividad de cualquier especie, pueden estar determinados por la presencia de otras especies.

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación. Éstos han sido caracterizados tradicionalmente por su fenotipo, el conjunto de propiedades celulares observables, como su morfología, propiedades fisiológicas y por la estructura de sus componentes celulares. La necesidad de cultivar los microorganismos para

identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, ya que ahora se sabe que más del 90 % de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales. Es aquí donde las técnicas de biología molecular pueden tener gran pertinencia ya que a través de éstas, puede evidenciarse la presencia de ciertos organismos aunque éstos no necesariamente puedan ser cultivados mediante los métodos microbiológicos tradicionales. Consiste en aislar microorganismos y tipificarlos mediante técnicas basadas en el material genético DNA (Díaz-Ruiz y Wachter-Rodarte, 2003). Diversos grupos de trabajo (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003; Escalante *et al.*, 2004) se han enfocado al estudio de la diversidad bacteriana en sistemas ecológicos complejos, de manera que para llevar a cabo estas caracterizaciones, además de considerar los aspectos de la microbiología tradicional, se han complementado con el empleo de técnicas de biología molecular usando el material genético de los especímenes en estudio, para lo cual existen una diversidad de técnicas que se pueden emplear, como la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR), análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA), análisis de huellas digitales con base al análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) complementando esta técnica con una ribotipificación (Díaz-Ruiz y Wachter-Rodarte 2003).

Para la identificación y clasificación de simbioses bacterianas de NEP, además de técnicas microbiológicas tradicionales, algunos grupos de investigación se han auxiliado de la caracterización genética de estos simbioses (Fischer – le Saux *et al.*, 1999; Lengyel *et al.*, 2005; Somvanshi *et al.*, 2006; Tailliez *et al.*, 2006) empleando técnicas de biología molecular como una herramienta invaluable para realizar una adecuada caracterización de especímenes aislados.

1.9.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa de ADN (PCR)

Si las secuencias de nucleótidos en los extremos de una región de ADN en particular se conocen, el fragmento intermedio puede amplificarse directamente por la reacción en cadena de la polimerasa de ADN (PCR). La PCR depende de la capacidad para desnaturalizar alternativamente las moléculas de ADN de hebra doble y renaturalizar (hibridar) las hebras individuales complementarias en una forma controlada. Otro factor importante en la reacción de PCR, es la capacidad de sintetizar oligonucleótidos de al menos 18 a 20 nucleótidos de longitud con una secuencia definida. Tales nucleótidos sintéticos pueden producirse rápidamente con instrumentos automatizados basados en el esquema de reacción estándar mencionado (Luque-Cabrera y Herráez-Sánchez, 2005).

Un procedimiento de PCR típico comienza con la desnaturalización por calor de una muestra de

ADN para generar hebras simples. Luego, al ADN desnaturalizado se le añade en exceso, dos oligonucleótidos sintéticos complementarios a los extremos 3' del segmento de ADN de interés y la temperatura se disminuye hasta 50 a 60°C. Estos oligonucleótidos específicos, los cuales se encuentran en una concentración alta, se hibridarán con sus secuencias complementarias en la muestra de ADN mientras que las hebras largas de ADN de la muestra permanecerán aparte debido a su baja concentración. Los oligonucleótidos hibridados sirven luego como cebadores para la síntesis de la cadena de ADN en presencia de desoxinucleótidos (dNTP) y una ADN polimerasa resistente a la temperatura como la proveniente de *Thermus aquaticus* (microorganismo que vive en aguas termales). Esta enzima, denominada Taq polimerasa, puede permanecer activa aún después de ser calentada a 95°C y puede extender los cebadores a temperaturas de hasta 72 °C. Cuando se completa la síntesis, toda la mezcla se vuelve a calentar a 95 °C para desnaturalizar los dúplex de ADN recién formados. Después que se vuelve a bajar la temperatura tiene lugar otro ciclo de síntesis porque aún hay exceso de cebadores. Ciclos repetidos de desnaturalización (calentamiento) y síntesis (enfriamiento) amplifican rápidamente la secuencia de interés. En cada ciclo, se duplica la cantidad de copias de la secuencia entre los sitios del cebador, por ende la secuencia deseada se multiplica exponencialmente mientras que todas las otras secuencias en la muestra de ADN originalmente permanecen sin amplificar (Maurer, 2006).

1.9.2.2 Electroforesis en gel

Cerca de un pH neutro, las moléculas de ADN tienen una carga negativa y por ende se mueven hacia el electrodo positivo durante la electroforesis en gel. Debido a que la matriz del gel restringe la difusión aleatoria de las moléculas, las que tienen la misma longitud migran juntas como una banda cuyo ancho iguala al del carril donde se colocó la mezcla original de ADN al comienzo de la corrida electroforética. Las moléculas más pequeñas se mueven a través de la matriz del gel más rápidamente que las más grandes de manera que las moléculas de diferentes longitudes migran como bandas distintas. Las moléculas de ADN compuestas por hasta 2,000 nucleótidos suelen separarse electroforéticamente en geles de poliacrilamida y las moléculas de alrededor de 200 nucleótidos hasta más de 20 kb, en geles de agarosa. Un método común para visualizar bandas de ADN separadas en un gel es incubarlo en una solución que contenga bromuro de etidio, el cual actúa como colorante fluorescente. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN. Este efecto es debido al aumento de la hidrofobicidad al medio, y no a la rigidificación del anillo bencénico, no estando éste entre pares de bases del ADN. Como el bromuro de etidio se intercala en el ADN, esta sustancia tiene un poderoso efecto mutágeno y posiblemente puede ser

cancerígeno o teratígeno.

El bromuro de etidio tiene una referencia CAS 1239-45-8, y una fórmula $C_{21}H_{20}BrN_3$. Como la mayoría de los compuestos fluorescentes, es una sustancia aromática. La mayor parte de la molécula es una estructura tricíclica con grupos amino-benceno en cada lado de una molécula piridínica (seis átomos, conteniendo nitrógeno y un anillo aromático). Esta estructura dibenzopiridínica es conocida con el nombre de fenantridina (Luque-Cabrera y Herráez-Sánchez , 2005).

1.9.2.3 Secuenciación

Hasta los años 1970 era muy difícil y costoso secuenciar incluso fragmentos de sólo 5 ó 10 nucleótidos. Fueron los métodos químicos de Maxam y Gilbert de 1977, y enzimático de Sanger de 1980, los que abrieron el camino a dicho gran objetivo. Estos dos métodos pioneros de la secuenciación tienen en común algunos aspectos, como la utilización de fragmentos de ADN original escindidos con enzimas de restricción, el marcaje del ADN de forma radiactiva o química (compuestos fluorescentes), y el empleo de métodos electroforéticos para separar los fragmentos generados. La muestra de ADN es amplificada por PCR para disponer de suficiente cantidad de material para su análisis. Igualmente es conveniente la purificación para eliminar ADN contaminante en la muestra y reactivos procedentes de la purificación o de otros procesos previos (como cebadores y nucleótidos restantes de la PCR) (Luque-Cabrera y Herráez-Sánchez, 2005).

1.9.2.3.1 Método químico de secuenciación del ADN

Este procedimiento, uno de los más usados pero actualmente desplazado por el método enzimático, se basa en la hidrólisis química y en un diseño original aplicable a secuencias de ADN de menos de 250 nucleótidos. Se conoce habitualmente como método de Maxam y Gilbert. Puede describirse en tres etapas; marcaje del ADN, hidrólisis química selectiva del ADN y análisis de los productos.

Marcaje de una hebra del ADN: se parte de un ADN de doble hebra, generalmente obtenido por restricción de uno mayor. En esta primera etapa consiste en el marcaje de uno de los extremos de cada hebra. Lo habitual es emplear polinucleótido quinasa y ATP radiactivo para marcar el extremo 5', aunque pueden también emplearse fluorocromos o marcar el extremo 3'. Después de ser marcado el ADN debe ser desnaturalizado.

Modificación de las bases y fragmentación del DNA: el propósito es conseguir fragmentos de ADN

de hebra sencilla, marcados, de longitud variable y que terminen en un nucleótido conocido. De esta forma, la longitud de cada fragmento indicará la posición de ese nucleótido. Ello se consigue con tratamientos químicos independientes que producen fragmentos.

Separación de los fragmentos y análisis: para analizar las 4 mezclas de fragmentos obtenidos, se separan todos ellos de acuerdo con su tamaño, empleando electroforesis. El tamaño de cada fragmento marcado indica directamente la posición en la secuencia del nucleótido correspondiente (Luque-Cabrera y Herráez-Sánchez, 2005).

1.9.2.3.2 Método enzimático de secuenciación del ADN

El método enzimático o de Sanger es la base de las variantes más utilizadas actualmente para la secuenciación a gran escala del ADN. En este método no se desnaturaliza el ADN, sino que se acude a la interrupción controlada de la síntesis de una hebra complementaria durante una replicación in Vitro. Esta síntesis catalizada por una ADN polimerasa, define el carácter enzimático del método. Igualmente, han ido surgiendo distintas variantes del método inicial en lo relativo al tipo y lugar de marcaje de los nucleótidos, especialmente al aparecer los fluorocromos como alternativa a los isótopos radioactivos. En general, el método involucra tres secciones: síntesis enzimática, análisis de los fragmentos y automatización (Luque-Cabrera y Herráez-Sánchez, 2005).

Por otra parte, el Cuadro 1.6 presenta un resumen de trabajos relacionados al aislamiento e identificación de simbiontes bacterianos de nematodos entomopatógenos mediante distintos métodos. En este sentido, no existen aún trabajos publicados sobre especímenes aislados en México por grupo alguno.

Cuadro 1.6. Trabajos recientes sobre aislamiento e identificación de bacterias simbióticas de nematodos entomopatógenos.

Especímenes	Propósito	Metodología	Resultados	Referencia
76 aislados bacterianos del género <i>Xenorhabdus</i> provenientes de distintas colecciones y algunos de ellos aislados por el grupo responsable del trabajo.	Caracterización genética, fenotípica e Identificación de nuevas especies de simbioses de steinernemátidos.	Técnicas moleculares (i.e., 16S rADN, RFLP y RAPD) y pruebas fenotípicas (i.e., API 20E, API 20NE, API 50CH y Biotype 100)	Proponen 10 nuevas especies de <i>Xenorhabdus</i> (i.e., <i>X. cabanillasii</i> sp. nov., <i>X. doucetiae</i> sp. nov., <i>X. griffiniae</i> sp. nov., <i>X. hominickii</i> sp. nov., <i>X. koppenhoeferi</i> sp. nov., <i>X. kozodoii</i> sp. nov., <i>X. mauleonii</i> sp. nov., <i>X. miraniensis</i> sp. nov., <i>X. romanii</i> sp. nov., y <i>X. stockiae</i> sp. nov.)	Tailliez <i>et al.</i> , 2006
<i>Xenorhabdus indica</i> sp. nov., asociada a <i>Steinernema thermophilum</i> Ganguly y Singh aislado en la India.	Identificación de simbionte bacteriano	Técnicas moleculares (i.e., 16S rADN) y pruebas fenotípicas (i.e., API 20NE, API 50CH, Biolog GN y actividad antimicrobiana)	Nueva especie <i>Xenorhabdus indica</i> sp. nov., simbionte del nematodo entomopatógeno <i>S. thermophilum</i> aislado en la India.	Somvanshi <i>et al.</i> , 2006

<p>Simbiontes bacterianos extraídos de los nematodos entomopatógenos <i>Steinernema scapterisci</i>, <i>S. bicornutum</i>, <i>S. serratum</i> y <i>S. rarum</i>, aislados en Uruguay, Serbia, sur de China y Argentina, respectivamente.</p>	<p>Caracterización genética y fenotípica. Identificación de nuevas especies de simbiontes de steinernemátidos.</p>	<p>Técnicas moleculares (i.e., 16S rADN) y pruebas fenotípicas (i.e., API 20E, API 50CH, Biolog GN y actividad antimicrobiana)</p>	<p>Identificación: <i>Xenorhabdus budapestensis</i> sp. nov., aislada de <i>Steinernema bicornutum</i>; <i>X. ehlersii</i> sp. nov., aislada de <i>S. serratum</i>; <i>X. innexi</i> sp. nov., aislada de <i>S. scapterisci</i>; y <i>X. szentirmaii</i> sp. nov., aislada de <i>S. rarum</i>.</p>	<p>Lengyel <i>et al.</i>, 2005</p>
<p>Simbiontes bacterianos extraídos de los nematodos entomopatógenos <i>Steinernema oregonense</i> y <i>Heterorhabditis marelatus</i>, aislados en EUA.</p>	<p>Caracterización genética de los simbiontes bacterianos aislados.</p>	<p>Técnicas moleculares (i.e., 16S rADN)</p>	<p><i>Xenorhabdus</i> parece estar muy relacionada con <i>X. bovienii</i>; mientras que la especie aislada de <i>Photorhabdus</i> parece muy distinta de aquellas reportadas hasta la fecha de esta publicación.</p>	<p>Liu <i>et al.</i> 2001</p>
<p>Simbionte bacteriano de <i>Steinernema cubanum</i></p>	<p>Identificación del simbionte bacteriano del nematodo <i>Steinernema cubanum</i></p>	<p>Extracción de ADN y amplificación del gen 16s rADN</p>	<p>Se identificó la bacteria simbionte como <i>Xenorhabdus poinare</i>. Aislada del nematodo <i>S. cubanum</i></p>	<p>Fischer-Le Saux <i>et al.</i> 1999</p>

1.10 Justificación

Para evitar pérdidas económicas importantes ocasionadas por plagas en cultivos agrícolas se han usado importantes cantidades de diferentes pesticidas químicos, los cuales en muchas ocasiones se han asociado con problemas ambientales y de salud. Debido a lo anterior, es urgente la búsqueda de métodos de control de plagas más eficientes y menos perjudiciales para el medio ambiente y salud del género humano. Dentro de las opciones que se tienen, el uso de nematodos entomopatógenos (NEP) con actividad bioinsecticida se presenta prometedor debido a las propiedades que estos organismos tienen de buscar activamente a sus insectos presa y por la variedad de especies de insectos plaga que pueden ayudar a controlar. Además, en un afán de conservar o alterar lo menos posible la biodiversidad existente en los distintos ecosistemas, la práctica del biocontrol de insectos plaga mediante el uso de NEP actualmente tiende a usar preferentemente especies de nematodos nativos de las zonas geográficas donde son aplicados para el biocontrol, en lugar de usar especies exóticas de NEP aislados de nichos ecológicos diferentes, que por otra parte aún continúa siendo la práctica más ampliamente usada en muchos Agrosistemas. Más aún, se ha reportado que el uso de especies nativas de NEP en prácticas de biocontrol de insectos es frecuentemente más eficaz que el correspondiente a especies exóticas, cuando los especímenes han sido aplicados en igualdad de circunstancias. Por las razones anteriores, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de aislar especies de NEP y sus bacterias simbióticas en las regiones donde eventualmente podrán ser usados en estrategias de manejo integrado de plagas reportándose en varios casos la presencia de nuevas especies o de variedades distintas mejor adaptadas al entorno donde éstas serán usadas. En este sentido, los aspectos concernientes a los simbioses bacterianos son fundamentales ya que para la producción masiva de estos bioinsecticidas, es indispensable contar con abastos puros de la bacteria, lo cual determina el éxito o no de la producción industrial.

Con base en lo anterior, el propósito del presente proyecto de investigación es desarrollar estudios de aislamiento e identificación de especies bacteriales simbióticas de nematodos entomopatógenos nativos del Estado de Hidalgo, con la finalidad de contribuir en los siguientes aspectos:

1. Mejorar las tecnologías agroindustriales de nuestro país para la producción de bioinsecticidas.
2. Promover un mayor desarrollo de la agricultura orgánica mediante el uso de “tecnologías limpias” lo cual puede coadyuvar al desarrollo sustentable del estado de Hidalgo. Actualmente existe una tendencia económica importante enfocada al consumo de productos orgánicos.
3. Contribuir al aislamiento y caracterización de los simbioses bacterianos de NEP para incrementar el conocimiento de la diversidad biológica existente en el estado de Hidalgo.

1.11 Objetivo general

Aislar e identificar mediante técnicas morfométricas, bioquímicas y biomoleculares a simbioses bacterianas de nematodos entomopatógenos aislados en el estado de Hidalgo, para contribuir a una agricultura sustentable.

1.11.1 Objetivos particulares

- Aislar simbioses bacterianas de nematodos entomopatógenos por medio de distintas técnicas microbiológicas de aislamiento.
- Identificar los simbioses bacterianas aislados mediante ensayos bioquímicos, pruebas fenotípicas y amplificación del gen 16s rADN y subsiguiente secuenciación de productos de PCR.

1.12 Hipótesis

Existen simbiosis de nematodo-entomopatógeno/bacteria silvestres en el estado de Hidalgo que pueden ser aislados, cuyos simbioses bacterianas pueden ser aislados e identificados mediante técnicas convencionales y de biología molecular.

Capítulo II

Materiales y Métodos

2.1 Especímenes

Nematodos entomopatógenos aislados en el estado de Hidalgo de la zona centro-norte, de los cuales se extrajeron, purificaron, conservaron e identificaron sus respectivos simbiontes bacterianos por los métodos aquí descritos.

2.2 Medios de cultivo

NBTA (Akhurst, 1980).

Ingrediente	Concentración (% p/v)
Agar nutritivo	2.3
Azul de bromotimol	0.025
Cloruro de trifenil tetrazolio (TTC)	0.004

Se prepara el agar nutritivo junto con el azul de bromotimol y se ajusta el pH a 8-8.5. Después de esterilizar se adiciona el TTC al medio, cuando la temperatura sea aproximadamente 40 °C.

NOTA.

El TTC está preparado al 0.4% p/v y esterilizado por filtración. Se utiliza 1 mL por cada 100 mL de medio a preparar.

Medio de producción bacteriano (STB)

Ingrediente	Concentración (% p/v)
Caldo de soya tripticaseína	3
Extracto de levadura	0.5

2.3 Aislamiento de simbiontes bacterianos

Para aislar un microorganismo de la naturaleza, se debe conocer previamente los requerimientos nutricionales y las condiciones ambientales óptimas para su crecimiento.

Se emplearon tres métodos con base en las características de los abastos de NEP.

2.3.1 Aislamiento a partir de hemolinfa

- ❖ Se trabajo en todo momento en la campana de flujo laminar
- ❖ Se tomo una larva de *Galleria mellonella* previamente infectada con nematodos entomopatógenos (máximo 24 h después de su muerte).
- ❖ La larva fue colocada dentro una solución de hipoclorito de sodio al 0.1 % v/v o alcohol al 75 % v/v durante 5 min.
- ❖ Posteriormente, la larva se coloco en agua destilada estéril para enjuagarla.
- ❖ Una vez enjuagada la larva, se coloco sobre una caja Petri para permitir que seque y facilitar su manipulación.
- ❖ La larva fue abierta con un bisturí estéril y se tomo una muestra de hemolinfa con el asa bacteriológica para ser estriada en agar NBTA. Se debe cuidar no dañar el tracto digestivo de la larva para evitar contaminaciones.

2.3.2 Fractura de Infeccivos Juveniles (IJ)

- ❖ Se trabajo en la campana de flujo laminar.
- ❖ De una suspensión de IJ, se tomo una gota (40 µL) y se atraparon uno a uno, alrededor de 10 IJ que se pasaron a otra gota de solución de cloro al 3 % v/v.
- ❖ Los IJ se dejaron por 10 min y se atraparon nuevamente para enjuagarlos, colocándolos en otra gota de agua destilada estéril.
- ❖ Los IJ se atraparon nuevamente y se colocaron en una gota de STB (4 µL) en caja Petri estéril, en la cual se partieron a la mitad con el asa bacteriológica; posteriormente se añaden alrededor de 8 mL más de medio STB, sellándose la caja con parafilm.
- ❖ Se incubo la caja a 30°C de 24 a 48 h se monitoreo a simple vista la turbidez del medio (un aumento de ésta indica probable crecimiento bacteriano).

- ❖ Después de la incubación y desarrollo de turbidez, se tomaron alícuotas de caldo STB y se estriaron en cajas de NBTA, las cuales luego se incubaron a 30°C.
- ❖ Se monitoreo el cultivo en placa NBTA para determinar el crecimiento y la fase del simbionte bacteriano, en base a la coloración que desarrollen las colonias.

2.3.3 Gota pendiente

- ❖ Se trabajo en la campana de flujo laminar.
- ❖ Se realizo una pequeña incisión a una larva de *G. mellonella* y se presiono con los dedos índice y pulgar para sacar una gota de hemolinfa (Figura 2.1).



Figura 2.1 Extracción de hemolinfa de una larva de *Galleria mellonella*

- ❖ Esta gota se coloco sobre un cubreobjetos estéril.
- ❖ Se atraparon y sanitizaron 10 IJ como se describió anteriormente, los cuales se colocaron en la gota de hemolinfa.
- ❖ Este cubreobjetos se coloco en posición invertida en el hueco de un portaobjetos excavado estéril y las orillas se sellándose con vaselina esterilizada.
- ❖ El portaobjetos y cubreobjetos se colocaron dentro de una caja Petri con papel filtro húmedo esterilizado, para mantener una humedad relativa favorable.
- ❖ Se incubaron a 30°C por 48 h en incubadora de convección.
- ❖ Luego, alícuotas del cultivo anterior fueron estriadas en placas de NBTA, e incubadas a

30°C por 24 a 48 h para determinar el crecimiento y la fase del simbiote bacteriano.

2.4 Preparación de viales de conservación

Se selecciona una colonia bacteria aislada en cultivo en placa de medio diferencial (NBTA) y en fase I. Posteriormente, con esta colonia se realiza un cultivo axénico en STB (30 mL de medio en matraz Erlenmeyer de 250 mL) a 30 °C por 24 h y agitación orbital de 150 rpm. Al final de la incubación, el caldo debe tener un pH de 8 a 8.5 y una alta concentración de biomasa bacteriana sin microorganismos contaminantes. Luego se agrega glicerol estéril para obtener una concentración de 25% v/v, se homogeneiza la mezcla y se vierte en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL. Después se refrigera de 4 a 8°C por 1 h, para luego congelar de 0 a - 4°C por 1.5 h y finalmente se pasan al ultra congelador a - 80°C para mantener el abasto de bacteria hasta su empleo.

Reactivación de viales

Para reactivar las bacterias, los viales de conservación se descongelan a temperatura ambiente para posteriormente inocular un volumen de medio de cultivo STB que se incuba por 24 h a 30 °C con agitación orbital constante de 150 rpm. Después de la reactivación de un vial de conservación en medio STB, para comprobar la fase en la que se encuentran los simbiotes bacterianos se estrictan cajas de NBTA con muestras de caldo STB. Las cajas se incuban a 30°C por 24 h y se observan las características de las colonias desarrolladas que deben corresponder a la fase I bacteriana. Todos los cultivos se realizan de forma aséptica y en la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones cruzadas.

2.5 Caracterización de los simbiotes bacterianos aislados

Las características generales de los simbiotes bacterianos así como de sus respectivos crecimientos en medio sólido se evaluaron de forma tradicional. Los aspectos que se evaluaron fueron forma, tamaño y movilidad.

2.5.1 Morfología y movilidad

La morfología celular se observó en el microscopio óptico empleando muestras de cultivos líquidos. Para ello se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 30 ml de medio STB, el cual se incubo por 24 h a 30°C con agitación orbital a 150 rpm.

Para determinar la movilidad de los simbiotes bacterianos de NEP se realizó la observación

directa de muestras de cultivos líquidos frescos bajo el microscopio óptico.

Las características de las colonias fueron evaluadas al microscopio de campo claro (Eclipse 80i, Nikon, Japan) a partir de cultivos en placa de NBTA después de haber sido incubados por 48 h a 30°C, considerando los aspectos evaluados por Suárez-Sánchez (1997).

La longitud y ancho de células de los simbioses bacterianos aislados así como de sus colonias, fueron evaluados con microscopio de campo claro y con cámara digital (Motic® 480, China), usando el software comercial Motic Images Plus 2.0 para el manejo de imágenes, previamente calibrado.

2.6 Caracterización bioquímica

Se emplearon tres sistemas bioquímicos de identificación API's (bioMérieux, Francia), en el Cuadro 2.1 se muestran los reactivos complementarios a estos sistemas.

Cuadro 2.1 Material y reactivos para la aplicación de los API's.

Reactivos	Marca
NaCl al 0.85 %	bioMérieux
James	"
TDA	"
VP 1 + VP 2	"
NIT 1 + NIT 2	"
Oxidasa	"
Zinc	"
API 50CHB/E médium	"
Aceite de parafina	
Agua destilada estéril	

API 20 NE

El API 20 NE es un sistema para la identificación de bacilos gram-negativos no enterobacterias. El sistema está estandarizado y combina 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. El kit consta de una galería con 20 microtubos conteniendo medios y/o sustratos en forma deshidratada.

API 20 E

El sistema API 20 E es útil para la identificación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae así como de otros bacilos gram-negativos. La galería consta de 20 microtubos

que contienen medios deshidratados. Los tests se inoculan con una suspensión bacteriana; el metabolismo de los microorganismos produce cambios de color en el medio, ya sea directamente o tras adición de reactivos.

50CH

Sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos enfocados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos. El API 50 CH se emplea en combinación con el API 50CHB/E medium para la identificación de *Bacillus* y microorganismos próximos, de enterobacterias y Vibrionaceae. El API 50CH permite el estudio de la fermentación de sustrato y derivados (heterósidos, polialcoholes y ácidos urónicos). Durante el periodo de incubación, la fermentación puede generar un cambio de color en el tubo debido a producción de ácido en anaerobiosis.

2.7 Caracterización genotípica

2.7.1 Extracción de ADN

- Colocar 500 μL de buffer TES (10X) en microtubos de 1.5 mL estériles.
- Tomar biomasa bacteriana (cepa cultivada previamente en medio sólido) con asa estéril, de tal forma que la muestra sea del tamaño de un grano de arroz aproximadamente.
- Resuspender la biomasa en el buffer TES.
- Adicionar 20 μL de lizosima (10 mg/ μL). la enzima que haya sobrado en la alícuota debe desecharse.
- Agitar vigorosamente.
- Incubar en un baño a 37°C de 15 a 60 min. A partir de los primeros 15 min observar cada tubo y sacar del baño cuando aumente la viscosidad. No sobre pasar los 60 min.
- Adicionar 8 μL de pronasa (20 mg/ μL)
- Adicionar 8 μL de RNA'asa (10 mg/ μL)
- Agitar vigorosamente en vortex por 5 s.
- Incubar en un baño a 65°C durante exactamente 1 h.
- Adicionar 120 μL de SDS (10%) y agitar.
- Regresar los tubos al baño a 65°C por 25 min.
- Sacar los tubos del baño y esperar a que se enfríen.
- Adicionar 600 μL de la mezcla fenol-cloroformo tomando solo la parte de abajo. Nota: el fenol es tóxico trabajar en la campana y evitar el contacto.
- Agitar vigorosamente (a mano o en el vortex) hasta formar una emulsión blanca centrifugar por 10 min en microcentrífuga (Hermle Z-160M) a 5,000 rpm y temperatura ambiente. Al centrifugar

se forman dos fases y en la interfase por lo general se encuentran impurezas blancas.

- Extraer la fase superficial con cuidado de no extraer las impurezas de la interfase y colocarla en otro microtubo estéril.
- Agregar un volumen igual de etanol absoluto frío (4°C), aproximadamente 1 mL lo que equivale al doble del volumen extraído de la fase superior.
- Agitar muy suavemente (invirtiendo el tubo) y observar la formación de una gelatina.
- Centrifugar 14,000 rpm por 10 min y temperatura ambiente.
- Observar si se formo pellet (muy pequeño generalmente) y tirar el etanol con cuidado de no llevarse el pellet.
- Dejar los tubos boca abajo con el objeto de evaporar todo el etanol (dejar preferentemente por 12 h)
- Al siguiente día, resuspender el ADN agregando de 25 a 35 μ L de agua estéril, en base a la cantidad de ADN obtenido de la extracción y dejar hidratar. Para hidratar se puede incubar a 55°C durante 1 h o bien dejar durante el día en congelación y utilizar al día siguiente.

Nota: No agitar vigorosamente el ADN con el agua porque se puede fraccionar. También se puede emplear buffer TE 1x para hidratar el ADN.

Es importante que la preparación y manipulación de los reactivos se realice con guantes de nitrilo, con la finalidad de reducir el riesgo de contaminaciones cruzadas.

2.7.2 Electroforesis en gel de agarosa

La realización de la electroforesis en gel de agarosa tiene como finalidad comprobar la cantidad y calidad del ADN extraído así como de los productos de PCR.

Procedimiento para el gel de agarosa

- Determinar el volumen adecuado de gel que se elaborara en base al número de muestras.
- Realizar un solución 1% p/v agarosa en buffer TBE 1x
- Calentar en horno de microondas la solución de agarosa, teniendo en cuenta de no excederse en el calentamiento. El tiempo de calentamiento esta en función del volumen y concentración de agarosa.
- Enfriar la solución y verter en el molde correspondiente. Colocar los peines correspondientes y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- La carga de los pozos del gel se puede realizar en seco o húmedo en base a la habilidad del usuario. Se recomienda que en el primer pozo colocar el testigo y en el resto las muestras

correspondientes llevando un adecuado control.

Se recomienda colocar 2 μ L de colorante y 3 μ L de muestra por pozo, colocándolo con cuidado de no derramarlo fuera del pozo correspondiente para cada muestra.

- Si el gel se cargó en seco, se coloca en la cámara de electroforesis y se cubre totalmente con buffer TBE 1x.
- El gel de agarosa se puede correr a distintos voltajes en base a la muestra. Es recomendable que cuando se corre ADN emplear voltajes menores a 100 V por 60 o 40 min. Para correr productos de PCR, se recomiendan voltajes en un rango de 80 a 50 V por 45-30 min. Es importante que se apliquen las condiciones adecuadas para correr los geles tanto para ADN como para productos para PCR, ya que es un factor importante para la obtención adecuada de bandas. Otro factor importante es la calidad de la muestra que se corre.
- La tinción del gel se lleva a cabo con una solución de bromuro de etidio [50mg/mL] durante 20 o 30 min en base a la calidad de la solución empleada. Es muy importante manejar adecuadamente el gel de agarosa al momento de la tinción ya que el bromuro de etidio es altamente cancerígeno. Se recomienda tener un lugar exclusivo para almacenar y manejar esta solución además que el usuario debe siempre proteger sus manos con guantes de nitrilo.
- Colocar el gel en la cámara de luz ultravioleta y observar las bandas correspondientes a cada pozo y tomar una foto.
- Desechar el gel en el lugar destinado para este tipo de residuos.

Nota es importante manipular con la debida precaución el gel y el bromuro de etidio para evitar contaminaciones cruzadas y los guantes que se empleen deben de desecharse después de la tinción en el lugar destinado para estos residuos.

2.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa

2.7.3

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en base al protocolo para amplificar por PCR el fragmento V₁ de gen 16S rADN.

Características de los cebadores empleados para la PCR y secuenciación.

Primer	Secuencia 5'-3'	Posición	Orientación
pA (amplificador)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAC	9-28	Reversa
3 (amplificador)	GTTGCGCTVGTGCGGGACT	1109 -1090	<i>Up-down</i>
Gamma (secuenciar)	ACTCCTGCCTCCCGTAGGAGA	358 – 339	<i>Up-down</i>

Protocolo para amplificar por PCR el fragmento V₁ del gen 16S rDNA.

Componentes	Volumen	Concentración para reacción
Buffer	10 µL	1x
MgCl ₂	5 µL	50 mM
dNTP's	2 µL	10 mM
Primer 3	1 µL	20 pmol/µL
Primer PA	1 µL	20 pmol/µL
Templado	10 µL	10 ng/µL
<i>Taq</i> polimerasa	2 µL	1 U/µL
Agua destilada estéril	68 µL	
Volumen final	100 µL	

Condiciones de PCR termociclador para amplificar la región V1 del gen 16S rDNA.

Número de ciclos	Temperatura (° C)	Tiempo (min)
1	94	3
34	94	1
-	65	1.3
-	72	2
2	72	15

2.7.3.1 Purificación productos de PCR

Se empleo Qiagen PCR clean – up kit específico para este procedimiento.

- Tubo eppendorf estéril para colocar el producto de PCR con un volumen de 1.5 mL.
- Agregar 500 µL de buffer PB, agitar el producto de PCR suavemente hasta homogenizar adecuadamente.
- Transferir el mezclado al tubo columna y centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.
- Descartar sobrenadante.
- Agregar 750 µL de buffer PE y centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.
- Descartar sobrenadante.
- Volver a centrifugar a las mismas condiciones.
- Transferir columna (parte superior del tubo – columna) a un eppendorf de 1.5 mL (sin tapa). Adicionar 4.5 µL de buffer EB o 30 µL para productos no muy buenos.
- Reposar por 1 min y centrifugar 13,000 rpm por 1 min.
- Remover la parte superior del tubo y tapan el eppendorf. Almacenar a -20°C.

2.7.4 Secuenciación

La secuenciación de los productos de PCR, fue lleva a cabo en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México, para lo cual se empleo un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer de Perkin-Elmer Applied Biosystems que permite secuenciar ADN de diferentes tipos utilizando técnicas de electrofóresis capilar. El equipo está acoplado a una computadora Macintosh en la que se colectan y analizan los datos. Los datos se entregan como electroferograma.

Capítulo III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La Figura 3.1 presenta el aspecto exhibido por larvas de *Galleria mellonella* muertas por la acción de distintos nematodos entomopatógenos aislados en el estado de Hidalgo. Las larvas “rojizas” sugieren la acción biológica del complejo *Heterorhabditis* spp./*Photorhabdus* spp. mientras que las “blanquecino-cremosas”, de *Steinernema* spp./*Xenorhabdus* spp.

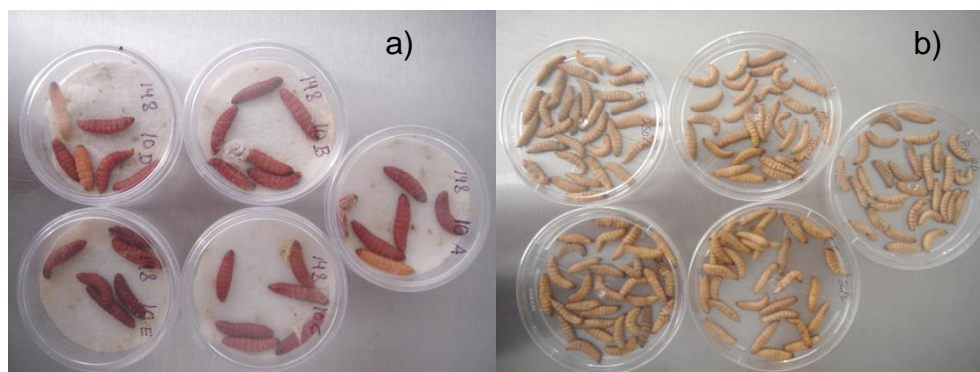


Figura 3.1 Larvas de *Galleria mellonella* infectadas con nematodos entomopatógenos aislados en el estado de Hidalgo, después de 48 h de infección. a) color rojizo característico del complejo *Heterorhabditis* spp./*Photorhabdus* spp.; b) color blanquecino-cremoso característico de infecciones debidas al complejo *Steinernema* spp./*Xenorhabdus* spp.

En la Figura 3.2 se presenta el crecimiento en medio diferencial sólido (NBTA) de algunos aislados bacterianos simbiotes de NEP.

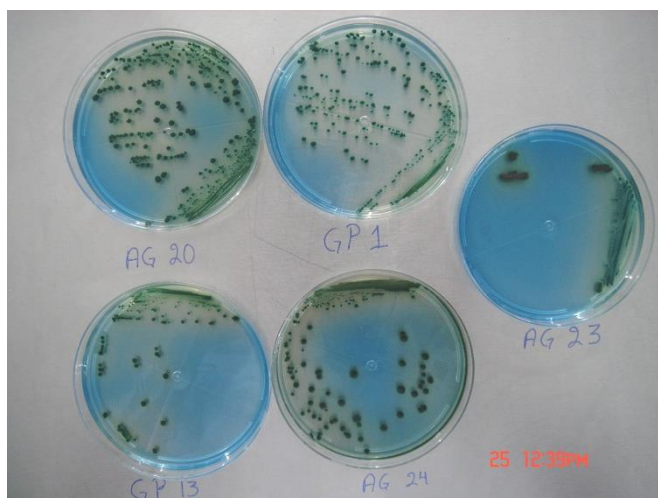


Figura 3.2 Cultivos en placas de NBTA de algunos simbioses bacterianos de nematodos entomopatógenos aislados en el estado de Hidalgo, después de 48 h de incubación a 30°C. Por el color desarrollado se podría sugerir que se trata de individuos de *Xenorhabdus* spp. en fase I. Las claves AG20, GP1, AG23, GP13 y AG24 indican distintas regiones geográficas donde fueron aislados los complejos NEP/simbionte bacteriano.

Al momento de redactar el presente documento se habían aislaron 25 simbioses bacterianos, de los cuales, aparentemente el 65% son *Photorhabdus* spp. y el restante 35% son *Xenorhabdus* spp., de acuerdo con los criterios sugeridos por Fernández *et al.* (1994) (tomando como base la coloración que presentan las larvas de *G. mellonella* muertas por infestación de NEP). Las diferencias entre los géneros bacterianos *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* son notables, siendo una de ellas su localización dentro de los IJ (Ciche *et al.*, 2006): *Photorhabdus* se ubica en el intestino en una proporción aproximada de alrededor de 130 células de simbiote bacteriano por cada IJ heterorhabdítico. En cambio *Xenorhabdus* se ubica en una vesícula especializada del intestino exhibiendo una proporción variable ya que oscila en un rango de 30 a 200 células de simbiote bacteriano por cada IJ steinernemático (Flores-Lara *et al.*, 2007). La Figura 3.3 muestra la ubicación de los simbioses bacterianos dentro de los IJ de NEP steinernemáticos y heterorhabdíticos.

La caracterización es de relevancia ya que este el primer reporte de aislamiento de simbioses bacterianos de NEP en el estado de Hidalgo y probablemente a nivel nacional. Por otra parte, con relación al aislamiento de NEP, Salas-Luévano (2002) reportó 40 especímenes colectados en la región central y sur del estado de Zacatecas, pero el autor mencionado no se ocupó del estudio ni aislamiento de los simbioses bacterianos involucrados. Por otra parte, Molina-Ochoa *et al.* (2003) aislaron varios NEP (5 steinernemáticos y 2 heterorhabdíticos) en regiones de Colima, Michoacán y Jalisco; no obstante, tampoco estos autores se ocuparon de hacer caracterización sistemática alguna de los simbioses bacterianos involucrados.



Figura 3.3 Ubicación de células de simbioses bacterianos en el intestino de sus respectivos nematodos huéspedes. A) Células de *Xenorhabdus nematophila* localizadas en la vesícula del intestino de fases IJ de *Steinerema carpocapse*; B) células de *Photorhabdus luminesces* localizadas en el intestino medio de un IJ de *Heterorhabditis bacteriophora* (tomado de Ciche et al. 2006)

La Figura 3.4 muestra el crecimiento en medio diferencial NBTA de dos simbioses bacterianos de NEP, los cuales exhibieron distinta coloración dependiendo de su estado fenotípico, aunque en fase I presentan por lo general un color azul, algunos simbioses en esta misma fase presenta una coloración azul-verdosa e incluso amarillo-verdosa (Forst y Kenneth, 1996). En el caso de *Xenorhabdus* spp, la coloración de los simbioses en fase I está relacionada con la capacidad de absorción del colorante azul de bromotimol; en cambio la fase II presenta una coloración rojiza debido a la oxidación del cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) el cual cambia de incoloro a rojo indicando el cambio de fase (Akhurst, 1980). La fase II puede surgir espontáneamente según Ciche et al. (2006), debido a que las bacterias se someten a condiciones de estrés como baja oxigenación, temperaturas elevadas y disminución de nutrientes (principalmente minerales), por mencionar algunas. Anteriormente, Owuama (2001) sugirió que el dimorfismo es determinado por las condiciones ambientales, sin involucrar variaciones a nivel de DNA.

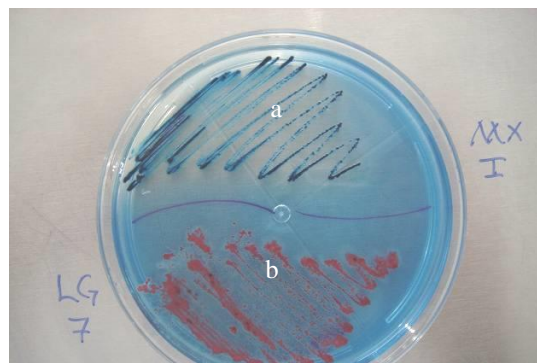


Figura 3.4 Cultivo sólido en medio NBTA de dos simbioses bacterianos de NEP aislados en el estado de Hidalgo. Se muestran distintos colores del crecimiento dependiendo del fenotipo manifestado por las bacterias: a) crecimiento azul, bacteria en Fase I; b) crecimiento rojo, bacteria en Fase II.

Los dos géneros de bacterias simbiotes de NEP pueden metabolizar varios tipos de colorantes, principalmente cuando se encuentran en fase II. *Photorhabdus* spp. pueden sintetizar más pigmentos que las especies de *Xenorhabdus*; e.g., *X. nemathopila* aparentemente no sintetiza pigmentos, mientras que *Photorhabdus luminesces* sintetiza distintas antraquinonas (Li *et al.*, 1995). La síntesis de estos pigmentos también se relaciona con las características del medio de cultivo, la edad del mismo y las condiciones de operación.

Durante el presente trabajo, los aislados de *Xenorhabdus* spp. en fase I siempre presentaron una coloración azul al ser crecidos en NBTA. En contraste, los aislados de *Photorhabdus* spp. exhibieron diversas coloraciones que fueron desde amarillo-verdoso hasta púrpura, lo cual ha sido también observado por otros grupos (Hurlbert *et al.*, 1989; Gerritsen *et al.*, 1992), quienes mencionan, que la variable que más influye en la variación fenotípica bacteriana es el tiempo de incubación, de manera que en cultivos viejos predomina la fase II. En otros trabajos, (Somvanshi *et al.*, 2005 y Tailliez *et al.*, 2006) no consideraron el color como un parámetro para determinar la fase del simbiote bacteriano; en los estudios de taxonomía de estos microorganismos sólo realizaron reacciones bioquímicas y análisis genético. Por otra parte, en la empresa alemana E-NEMA productora de NEP bioinsecticidas, para determinar la fase de *P. luminescens* que a su vez tiene relación con el momento adecuado para inocular IJ, realizan mediciones de la luminiscencia producida por la bacteria (comunicación personal, G Maciel Vergara).

Una vez que se lograron aislados bacterianos con características fenotípicas de la fase I, se seleccionaron colonias para la preparación de abastos bacterianos que fueron evaluados en su capacidad para soportar el desarrollo de sus respectivos NEP simbiotes. De los 25 complejos NEP/bacteria aislados, 24 abastos bacterianos promovieron un buen desarrollo poblacional de sus respectivos NEP (Figura 3.5). De acuerdo con Byron *et al.* (2006) la especificidad del complejo NEP/bacteria es evidenciada por la recuperación de los IJ al encontrar biomasa bacteriana simbiótica así como otros nutrientes necesarios para su desarrollo y reproducción, aunado a la retención de la bacteria en el tracto intestinal de los IJ inducidos al final de un cultivo. Aunque, los NEP pueden emplear otra bacteria que no sea su correspondiente simbiote, pudiendo desarrollarse e incluso almacenarlo en su tracto digestivo, pero la entomopatogenicidad del complejo se reduce de forma considerable (Flores-Lara *et al.*, 2007).



Figura 3.5 Cultivo in vitro sólido de nematodos entomopatógenos aislados en el estado de Hidalgo creciendo en biomasa de su respectivo simbiote bacteriano previamente aislado y precultivado. Se observa el crecimiento abundante de nematodos (masa blanquecina) después de 10 d de haber inoculado fases IJ de NEP.

Para la producción masiva de bioinsecticidas a base de NEP, contar con simbioses bacterianas en fase I es de gran importancia está asociado con el logro de mayores productividades de NEP. Por otra parte, la fase I es almacenada por los IJ y está relacionada con la infección aguda durante la actividad entomopatógena del complejo nematodo/bacteria.

Se sabe que tanto *Xenorhabdus* spp. como *Photorhabdus* spp. producen cristales de proteína (Figura 3.6) inclusiones largas rectangulares (26 KDa de proteína) y pequeñas piramidales (22 KDa de proteína), los cuales pueden constituir el 40% de toda la proteína celular de los simbioses (Bowen y Ensign, 2001). Estos cristales incorporan polipéptidos con un alto contenido de aminoácidos esenciales (Ciche *et al.*, 2006), los cuales probablemente son los principales causantes de la muerte de las larvas de insectos huésped (Owuama, 2001).

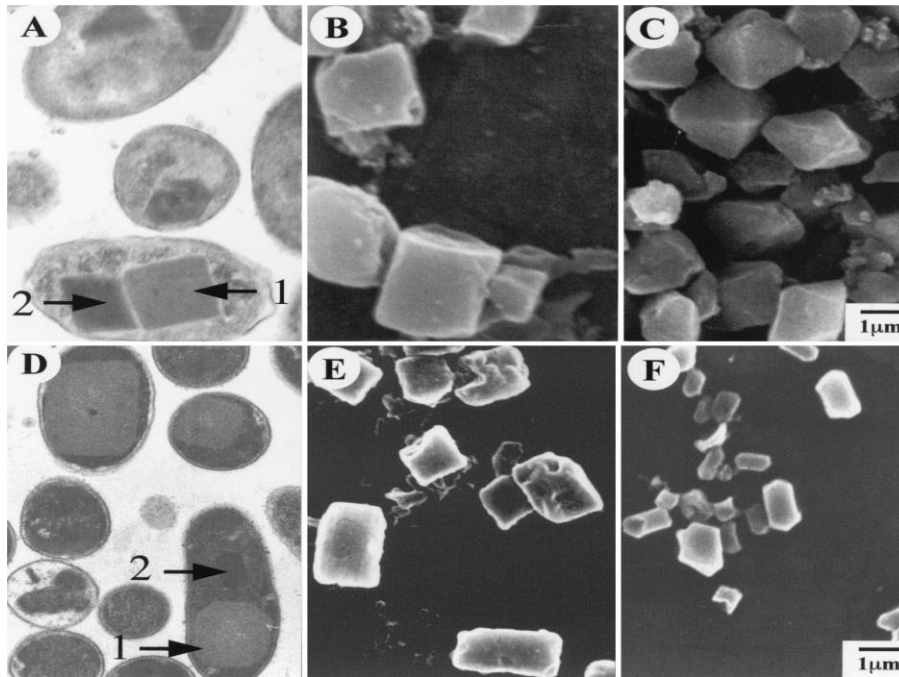


Figura 3.6 Fotografías de transmisión electrónica de células de *Photorhabdus luminescens*: (A y D) muestran las células con dos distintas estructuras de inclusiones proteínicas. Fotografías de barrido electrónico de inclusiones proteínicas separadas por centrifugación: inclusiones tipo 1 (B y C), e inclusiones tipo 2 (E y F) (tomado de Bowen y Ensign, 2001)

Como se mencionó anteriormente, actualmente se cuenta con 24 simbioses bacterianas aislados de NEP del estado de Hidalgo; no obstante, en la parte restante de esta sección sólo nos ocuparemos de un espécimen, ya que la caracterización completa de todos los aislados demanda un gran esfuerzo que queda fuera de los alcances del presente trabajo de licenciatura.

3.2 Características microbiológicas generales de simbioses bacterianas aislados

Los procariontes presentan variaciones morfológicas y existen términos apropiados para describirlas. En el presente trabajo se consideró la forma y movilidad de simbioses bacterianas aislados de NEP colectados en el estado de Hidalgo. En la Figura 3.7 se observa el aspecto de dos simbioses bacterianas en fase I. Los especímenes aislados presentaron forma de bacilos irregulares con una longitud de 1.2 a 9 μm (Figura 3.7 A); longitud de 1 a 6 μm (Figura 3.7 B), con una anchura menos variable (Figura 3.7 A, ancho promedio, 1.1 μm ; Figura 3.7 B, ancho promedio, 0.6 μm). En la literatura algunos autores han reportado dimensiones tanto para *Xenorhabdus* spp. (Akhurst, 1982: *Xenorhabdus* sp., longitud de 1.6 a 12.1 μm , por ancho de 0.8 a 1.6 μm) como para *Photorhabdus* spp. (Hurlbert *et al.*, 1989: *Xenorhabdus luminescens*, longitud de 1.1 a 1.3 μm , por ancho de 0.4 a 0.7 μm) Las mediciones de los simbioses bacterianas aislados en el presente

trabajo tienen similitud con los reportados por los autores mencionados. Por otra parte, en este estudio no se evidencio la presencia de flagelos o cilios en los especímenes aislados debido a las limitaciones de las técnicas microscópicas usadas, fue evidente que las bacterias aisladas eran móviles debido a los desplazamientos que éstas exhibían en preparaciones en fresco al observarse al microscopio. En este sentido, es bien sabida la movilidad de bacterias de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* (Owuama, 2001; Ciche *et al.*, 2006). Los individuos del género *Xenorhabdus* spp. presentan movilidad en la fase I, la cual es originada por flagelos (Owuama, 2001). Byron *et al.* (2006) determinaron que *Xenorhabdus* spp. en fase I, sintetiza flagelos los cuales ayudan a un proceso eficaz de colonización de los NEP, así como en la liberación de los simbioses bacterianos por los NEP cuando alcanzan la hemolinfa del insecto huésped. En cambio, en fase II no producen flagelos reduciendo de forma considerable su eficiencia en estos procesos los cuales se relacionan directamente con la patogenicidad del complejo nematodo/bacteria (Forst *et al.*, 1997)

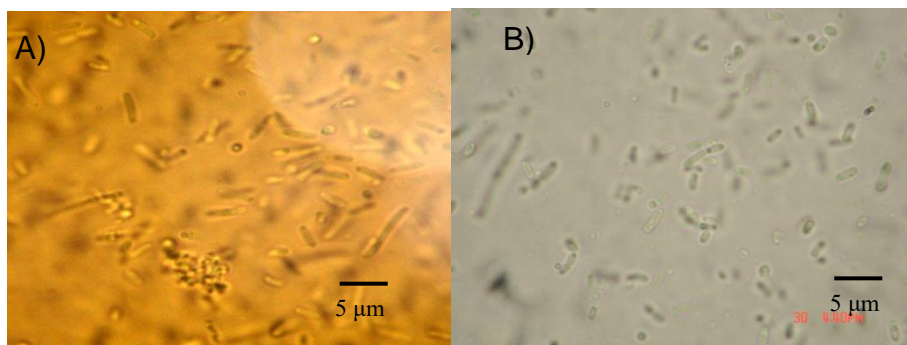


Figura 3.7 Cultivos líquidos en STB de dos simbioses bacterianos aislados de nematodos entomopatógenos del estado de Hidalgo. Bacterias en fase I después de 12 h de incubación a 30°C. A) *Xenorhabdus* spp., B) *Photorhabdus* spp (magnificación, 1000 x)

En el Cuadro 3.1 se presenta la comparación del simbiote *Xenorhabdus* sp. aislado de NEP colectado en el estado de Hidalgo, así como de la cepa *X. nematophila* aislada a partir de *S. carpocapsae* All con la que el grupo de investigación ha trabajado por 10 años, con otros especímenes del mismo género reportados.

Cuadro 3.1 Algunas características generales de cepas de *Xenorhabdus* spp.

	Morfología**	Movilidad	Gram	Referencia
<i>Xenorhabdus</i> sp.	Bacilos	+*	-	
<i>X. nemathopila</i>	“	+*	-	Presente trabajo
<i>X. poinarii</i>	“	+°	-	
<i>X. bedding</i>	“	+°	-	Byron <i>et al.</i> 2006
<i>X. japonicus</i>	“	+°	-	
<i>X. bovienii</i>	“	+°	-	

Xenorhabdus sp. simbiote de nematodo entomopatógono del estado de Hidalgo, *X. nemathopila* simbiote de *S. carpocapse* All. *X. poinarii* simbiote de *S. glaseri*, *X. bedding* simbiote de *Steinernema* sp., *X. japonicus* simbiote de *S. kushidai*, *X. bovienii* simbiote de *S. feltiae*.

*movilidad en preparaciones en fresco.

°Evidencia de estructuras motiles mediante microscopia.

**Los tamaños de las células son variables.

Los distintos miembros de *Xenorhabdus* presentados en el cuadro anterior exhiben características generales similares ya que todos son bacilos móviles Gram negativos, lo cual también está de acuerdo con Woodring y Kaya (1988). Por otra parte, la Figura 3.8 muestra una colonia de *Xenorhabdus* sp. aislada, creciendo en NBTA. El crecimiento colonial de *Xenorhabdus* sp. aislado de NEP en el estado de Hidalgo, en NBTA, fue similar a lo reportados por otros autores (Cuadro 3.2) presentándose las principales diferencias en el diámetro de las colonias obtenidas. No obstante, este parámetro es muy dependiente del tiempo de incubación y seguramente del medio de cultivo (Gerritsen *et al.*, 1992) por lo que es posible que esta sea una de las causas de variación observadas, más que por tratarse de distintas especies, en general; sobre todo cuando los resultados de algunos autores incluidos en el Cuadro 3.2 no reportan los tiempos de incubación. En estudios similares, Gerritsen *et al.* (1992) realizaron una caracterización de 4 variedades de *Xenorhabdus luminesces* (\equiv *Photorhabdus luminesces*) donde uno de los parámetros que evaluaron fue el diámetro de las colonias, determinando que el tiempo de incubación influyó notablemente con este parámetro. Por otra parte, Forst *et al.* (1997) determinaron que aparentemente las bacterias del género *Photorhabdus* tienen la capacidad de presentar un mayor rango de pigmentos cuando crecen en medios sólidos, así como formas y tamaños no bien definidos en sus colonias.

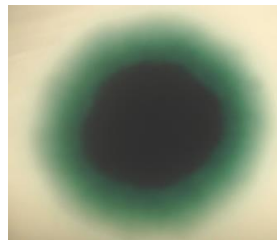


Figura 3.8. Colonia de *Xenorhabdus* sp.-fase I, aislada de nematodo entomopatógono colectado en el estado de Hidalgo. Cultivo en placa de NBTA, incubada a 30° C por 48 h. (Magnificación, 40 x)

Cuadro 3.2 Algunas características morfológicas coloniales del crecimiento de *Xenorhabdus* spp. en medio sólido NBTA.

Simbionte bacteriano	Forma	Diámetro (mm)	Aspecto	Elevación	Color	Tiempo de incubación (h)	Referencia
* <i>Xenorhabdus</i> sp.	Redonda	0.56	Creoso	Cóncava	Azul	24	Presente trabajo
** <i>X. nematophila</i>	Redonda	0.88	Creoso	Cóncava	Azul	24	
*** <i>Xenorhabdus</i> sp.	Redonda	2-3	Creoso	Cóncava	Azul	Nr	Pérez-Bocourt <i>et al.</i> , 2006
**** <i>X. nematophila</i>	Redonda	1-1.5	Creoso	Cóncava	Azul	Nr	Suárez-Sánchez, 1997
° <i>Xenorhabdus</i> sp.	Redonda	1.5 – 2	Creoso	Cóncava	Azul	24	Akhurst, 1982

*Simbionte bacteriano de nematodo entomopatógeno colectado en el estado de Hidalgo

**Simbionte bacteriano de *S. carpocapse* All. mantenido en el laboratorio de Biotecnología del ICAp

***Simbionte bacteriano de *S. cubanum*

****Simbionte bacteriano de *S. feltiae*.

°Simbionte bacteriano de *S. krausseii*.

Nr = no reportado

3.3 Caracterización bioquímica de *Xenorhabdus* sp.

La caracterización bioquímica aporta información complementaria y muy valiosa para la clasificación del simbionte bacteriano aislado. Forst *et al.* (1997) estudiando los géneros de simbioses bacterianas de NEP, determinaron que las principales diferencias fenotípicas entre ambos géneros son que *Photorhabdus* presenta bioluminiscencia y es catalasa positivo, mientras que *Xenorhabdus* es negativo en ambos aspectos. Estos son factores de diferenciación comunes entre ambos géneros (Ciche *et al.*, 2006). El Cuadro 3.3 muestra los resultados obtenidos en el presente estudio sobre pruebas bioquímicas en dos especímenes del género *Xenorhabdus* (i.e., *Xenorhabdus* sp. y *X. nematophila* –simbionte de *Steinernema carpocapsae* All-) usando distintos kits de ensayos bioquímicos (i.e., API: 20 NE, 20 E y 50 CH). Al comparar los resultados de las reacciones, se observa que el aislado de *Xenorhabdus* sp. no fue similar en su totalidad con los resultados publicados sobre especies relacionadas. Particularmente, en cuanto a la hidrólisis de esculina, *Xenorhabdus* sp. aislado en el presente trabajo fue negativo para esta reacción, lo cual contrasta con lo reportado por otros autores trabajando con especies relacionadas (Fischer-le Saux *et al.*, 1999; Lengyel *et al.*, 2005; Somvanshi *et al.*, 2006; y Tailliez *et al.*, 2006) quienes

invariablemente detectaron reacción positiva en esculina para individuos del género *Xenorhabdus*.

La producción de ácido a partir de inositol fue negativa para los especímenes empleados en este trabajo, así como para los demás especímenes reportados en el Cuadro 3.3, a excepción de *X. nemathopila* reportada por Somvanshi *et al.* (2006). En contraste, el uso de inositol como fuente de carbono fue positivo para todos los casos de *X. nemathopila*, incluyendo a *Xenorhabdus* sp. aislado en este trabajo. Caso contrario se presentó para las otras especies mostradas en el Cuadro 3.3, excepto *X. japonica* la cual también presentó reacción positiva según Tailliez *et al.* (2006), lo cual por cierto contrasta con los resultados obtenidos por otros grupos para esta especie donde se halló reacción negativa al uso de inositol como fuente de carbono (Cuadro 3.3). Por otra parte, todas las variedades de *X. nemathopila* estudiadas usaron a la D-fructosa como fuente de carbono. Además, para esta especie siempre fue negativa la producción de ácido a partir de gluconato.

Analizando los perfiles bioquímicos del Cuadro 3.3, los resultados son diversos, incluso a pesar de que se compararon resultados obtenidos con las mismas especies. Esto probablemente tenga que ver con las condiciones en las cuales se realizaron los API como las variaciones de temperatura, uso de otros medios, así como las características fenotípicas propias de cada espécimen las cuales están en función del entorno ecológico de donde fueron sustraídas, ya que, dos variedades de la misma especie pueden estar adaptadas a ecosistemas muy distintos lo cual afecta a las características fenotípicas particulares en cada caso (e. g., de las cinco variedades de *X. nematophila* incluidas en el Cuadro 3.3., sólo en el presente trabajo esta especie fue positiva para la hidrólisis de esculina)

El simbiote bacteriano *Xenorhabdus* sp. aislado en el presente estudio, exhibe características aparentemente similares a *X. nemathopila*, aunque faltan más evidencias experimentales para definir la especie del aislado. Por otra parte, lo que sí es claro del Cuadro 3.3, es la amplia biodiversidad que se puede encontrar en miembros del género *Xenorhabdus*.

Cuadro 3.3 Diferencias fenotípicas de *Xenorhabdus* sp. aislado de NEP del estado de Hidalgo, con otros especímenes del mismo género reportados por otros grupos. Clave de especímenes: 1 = simbiote bacteriano aislado en el presente trabajo. 2*, 3, 7, 11 y 15 = *X. nemathopila*. 4, 10, 14 y 18 = *X. poinarii*. 5, 9, 13 y 17 = *X. japonica*. 6, 8, 12 y 16 = *X. bovienii*.

Simbiote bacteriano

	1	2*	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Presente trabajo		Fischer – Le Saux <i>et al.</i> , 1999				Somvanshi <i>et al.</i> , 2006				Tailliez <i>et al.</i> , 2006				Lengyel <i>et al.</i> , 2005			
Pigmentación	+	+	+	+	+	+	Nr	Nr	Nr	Nr	-	+	-	+	Nr	Nr	Nr	Nr
Lecitinasas	Pnr	Pnr	+	d	+	+	Nr	Nr	Nr	Nr	+	+	-	-	Nr	Nr	Nr	Nr
Hidrólisis de esculina	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
L- Triptófano	-	+	-	-	-	D	-	-	-	-	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
Citrato trisodico	-	-	+	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Citocromo – oxidasa	-	-	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
Producción de ácido a partir de:																		
Inositol	-	-	-	-	-	D	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribosa	+	-	+	-	-	+	-	-	d	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
Gluconato	-	-	-	-	-	D	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Málico (oxidación)	-	+	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
Acetoina	+	+	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
Utilización como fuente de carbono, de:																		
L-Histidina	Pnr	Pnr	-	d	-	D	Nr	Nr	Nr	Nr	-	-	-	-	Nr	Nr	Nr	Nr
Inositol	+	+	+	-	-	D	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Ribosa	-	-	D	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	d	-
L-tirosina	Pnr	Pnr	-	-	-	D	Nr	Nr	Nr	Nr	-	-	-	-	Nr	Nr	Nr	Nr
L-arabinosa	+	-	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
N-acetil-glucosamina	+	+	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
Glicerol	+	+	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
D-galactosa	+	+	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr	Nr
D-fructuosa	+	+	Nr	Nr	Nr	Nr	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-

* Simbiote bacteriano de *S. carpocapse* All mantenido en el laboratorio de Biotecnología del ICAP.

+ = reacción positiva, - = reacción negativa, d = reacción deficiente.

Nr = no reportado, pnr = prueba no realizada

3.4 Caracterización genética de *Xenorhabdus* sp.

Para la identificación y clasificación de simbioses bacterianos de NEP, algunos grupos de investigación se han auxiliado de la caracterización genética de estos simbioses (Fischer-le Saux *et al.*, 1999; Legyel *et al.*, 2005; Somvanshi *et al.*, 2006; Tailliez *et al.*, 2006) empleando técnicas de biología molecular como una herramienta invaluable para realizar una adecuada caracterización de especímenes aislados. Con base a los antecedentes se realizó una caracterización genética del simbiote bacteriano *Xenorhabdus* sp. mediante el análisis de los productos de amplificación del gen 16s rADN.

La Figura 3.9 presenta resultados de electroforesis en geles de agarosa al 1 % para evaluar la cantidad e integridad del ADN extraído del simbiote bacteriano (Figura 3.9a) (i.e., la banda intensa y uniforme) así como de los productos de PCR obtenidos (Figura 3.9b) durante la amplificación. En la Figura 3.9a se observa que en dos pozos del gel no hay prácticamente banda alguna. Como esto sucede con cierta frecuencia, para comprobar si se obtuvo ADN se realizaron mediciones de absorbancia ($\lambda=260-280$ nm) para determinar cuantitativamente la cantidad de ADN (96.25 ng/ μ l y 105.6 ng/ μ l en los pozos que no se aprecia a simple vista). Por otra parte, como se puede observar en la Figura 3.9b hubo una buena amplificación del segmento estudiado de ADN del simbiote bacteriano, con un tamaño de alrededor de 950 a 1030 pares de bases (pb), tomando en cuenta la distancia que recorrió la muestra de productos de PCR en el gel de agarosa lo cual coincidió con el recorrido del marcador molecular Lambda ADN (100 pb ADN ladder, Gibco BRL) (i.e., rango de 900 a 1000 pb).

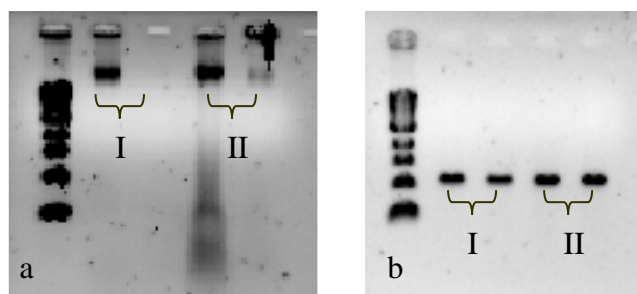


Figura 3.9 Geles de agarosa al 1% obtenidos de la electroforesis de material genético de dos simbioses bacterianos aislados de nematodos entomopatógenos colectados en el estado de Hidalgo. a) Gel realizado para comprobar la integridad y cantidad del ADN extraído. b) Gel realizado con productos de amplificación obtenidos mediante PCR. Muestra de los carriles resaltados: I, *Xenorhabdus* sp. aislado; II, otro simbiote bacteriano aislado.

Una vez que se considero que se tenían productos de amplificación en cantidad y calidad convenientes, de acuerdo con la experiencia de la Dra. C Wachter Rodarte de la Facultad de Química, UNAM, el material genético se envió a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular, UNAM, obteniéndose lo siguiente (Figura 3.10):

```
TCTTAGGGGCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCA
GCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGGGCCATTACCCCGCCTACTAGCTAATCC
CATCTGGGTTTCATCCGATGGCGTGAGGCCCGAAGTCCCCCACTTTACTC
CCAAGAGGTCATGCGGTATTAGCCACCGTTTCCAGTGGTTATCCCCCTCC
ATCGGGCAGATCCCCAGACATTAATCACCCTCCGCGCACTCGTCAGCAAA
ACAGCAAGCTGTTTCCTGTTACCGTCCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCC
GCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCAAATCTAGGGGAATATTGCACAA
TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG
GTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGTAAGTCTGAACAGGGCTT
ACGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGTATTACTGGGCGTAAA
GCGCACGCAGGCGGCCAATTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGTAACTCT
GGGAACGGATCCAAGACTGGGTGGGTAGAGACTCTTAAGGGGGGTAGAAT
```

Figura 3.10 Secuencia en formato fasta de *Xenorhadus* sp. aislada de nematodos entomopatógenos colectados en el estado de Hidalgo.

La secuencia obtenida para *Xenorhabdus* sp. aislado fue comparada con la base de datos del banco genómico del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en búsqueda de homología con los especímenes incluidos en la base de datos del mencionado centro, obteniéndose como resultado un 99% de similitud del aislado bacteriano con la especie *Xenorhabdus nematophila* Breton. Se considero que la homología encontrada es suficiente para establecer positiva la identificación de *X. nematophila* Breton como el simbionte bacteriano aislado de un nematodo entomopatógeno aislado en el estado de Hidalgo, identificado como steinernemátido por las evidencias recabadas hasta el momento (Pérez-Santos, en proceso). Este resultado complementa de forma importante los resultados presentados en las secciones anteriores, mismos que ya sugerían que el simbionte bacteriano aislado pertenece al género *Xenorhabdus*.

IV Conclusiones

- Aparentemente existe una amplia diversidad en el estado de Hidalgo de complejos nematodo-entomopatógeno/bacteria-simbionte con potencial uso en el biocontrol de insectos-plaga.
- Al momento de redactar el presente documento, se han aislado 25 simbioses bacterianas de nematodos entomopatógenos colectados en el Estado, de los cuales el 65% muy probablemente sean *Photorhabdus* spp. y el resto, *Xenorhabdus* spp.
- Las características morfológicas microscópicas y coloniales evaluadas en los aislados estudiados de *Xenorhabdus* sp. coinciden con las reportadas por otros autores para individuos de este grupo.
- El perfil bioquímico exhibido por el aislado de *Xenorhabdus* sp., en general fue distinto de los reportados por otros autores para miembros de este género.
- La secuencia del segmento amplificado del gen 16s rADN de *Xenorhabdus* sp. aislada coincidió en un 99% con *Xenorhabdus nematophila* Breton.
- Con base a los resultados obtenidos, se consideró que el simbiote bacteriano aislado pertenece a la especie *X. nematophila* Breton.

V Recomendaciones para trabajos posteriores

- Complementar la caracterización de *Xenorhabdus nematophila* Breton con estudios de microscopía de transmisión electrónica para determinar la presencia de cristales proteínicos e evidenciar los flagelos característicos de este espécimen.
- Realizar la caracterización cinética de *Xenorhabdus nematophila* Breton en cultivo sumergido.
- Continuar con la caracterización de los simbioses bacterianos de nematodos entomopatógenos ya aislados para determinar su género y especie.
- Realizar bioensayos de complejo aislado *Steinernema* sp./*X. nematophila* Breton para determinar su potencial biocontrolador.

VI Anexo

Reactivos para extracción del DNA.

Pronasa 20 mg/μL la pronasa es una mezcla de serin-proteasas y proteasas ácidas aisladas de *Streptomyces griseus*

Pretratamiento: la pronasa – autodigerida se preparo disolviendo la enzima en polvo en Tris HCl 10 mM (pH 7.5), NaCl 10 mM para tener una concentración de 20 mg/μL de enzima. Una vez disuelta la enzima, incubar a 37°C por 1 h. Posteriormente se almaceno en alícuotas pequeñas de 25 a 30 μL.

Tris-HCl 10 mM

Se puede preparar a partir de una solución más concentrada. Ejemplo: agregar 1 mL de solución Tris-HCl 1M y 99 mL de agua destilada.

Tris – HCl 1M

Disolver 121.1 g de Tris base en 800 mL de agua y posteriormente ajustar el pH a 7.5 añadiendo aproximadamente 65 mL de HCl concentrado. Esperar a que la solución este a temperatura ambiente antes de hacer los ajustes de pH. Finalmente, aforar a 1 L con agua destilada y esterilizar.

RNA'asa 20 mg/μL

Ribonucleasa A de páncreas de bovino EC 3.127.5 Sigma-Aldrich: cristalizada, purificada por cromatografía 500 mg.

Pesar la cantidad de enzima requerida de acuerdo al volumen a preparar y aforar con agua desionizada estéril. Por ejemplo 0.2 g de enzima para preparar 10 mL. Una vez preparada almacenarla a -20°C en alícuotas pequeñas de 150 a 200 μL. La preparación de la enzima debe hacerse en frío manteniendo el matraz y la enzima siempre en hielo. El matraz y espátula empleados deben estar perfectamente enjuagados con agua estéril.

Lisozima 20 mg/μL EC. 3.2.1.17 Sigma cristalizada, dializada y liofilizada. Pesar la cantidad de acuerdo al volumen a preparar y aforar con agua desionizada estéril. Por ejemplo: 0.2 g de enzima para preparar 10 mL. Una vez preparada la enzima guardar a -20°C en alícuotas pequeñas de 150 a 200 μL. Una vez usada una alícuota, se deberá desechar el resto porque

es una enzima muy sensible a cambios de temperatura.

Todo el proceso debe realizarse en frío. Mantener el matraz y la enzima en hielo. El matraz y espátula deben estar perfectamente enjuagados con agua estéril.

Buffer TES 10x

Se prepararon 100ml de buffer TES 10x, mezclando 0.605g de Tris(0.05M Sigma trizma base), 1 ml de EDTA (sal disódica cristal) 0.5M pH 8 y 0.2922g de NaCl y aforar con agua destilada. La solución EDTA 0.5M pH 8 se preparó disolviendo 18.62g de sal disodica de EDTA en agua destilada, ajustando el pH a 8 con NaOH y se aforó a 100ml.

Solución de Sal disódica cristal.

Se prepararon 100 mL mezclando 18.62 g y disolver en unos 70 a 80 mL de agua. Ajustar el pH a 8 con NaOH y luego aforar a 100 mL con agua destilada.

SDS 10%

Para 1 L, pesar 100 g de SDS en 900 mL de agua destilada. Calentar a 68°C para ayudar a disolver. Ajustar el pH a 7.2 con HCl concentrado. Aforar el volumen a 1 L con agua y guardar.

Nota: pesar el SDS usando un cubre bocas para evitar el contacto con él ya que las partículas del reactivo son muy ligeras y se dispersan fácilmente.

No es necesario esterilizar la solución SDS.

Etanol absoluto

La concentración de etanol puede variar en base a la pureza de las cepas a las cuales se extrajo el DNA. Se pueden manejar concentraciones de 70 a 100 %.

VII Referencias.

- Abu-Habat M, Stuart R, Gaugler R. 1998. Antibiotic resistance and protease production by *Photorhabdus Luminescens* and *Xenorhabdus poinari* bacteria symbiotic with entomopathogenic nematodos: Variation among species and strains. **Soil Biology Biochemistry** 30: 1955-1961.
- Akhurst RJ. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp. Bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes Neaoplectana and Heterorhabditis. **Journal General Microbiology** 121: 303-309.
- Akhurst RJ. 1982. A. *Xenorhabdus* sp. (Eubacteriales: Enterobacteriaceae) symbiotically associated with *Steinernema Kraussei*(Nematoda: Steinernematidad). **Revue Nématology** 5: 277-280.
- Albert AL. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. 7° Congreso de actualización en toxicología clínica. Servicios de Salud de Nayarit y Comisión federal de protección contra riesgos sanitarios.
- Barrera FJ. 2002. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En R.Báez y J.J. Juvera. (editores). Memorias del XIII Curso Nacional de control biológico. México
- Bowen DJ, Ensing JC. 2001. Isolation and Characterization of Intracellular Protein Inclusions Produced by the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology** 67: 4834-4841.
- Byron JA, Fodor A, Koppenhöfer SH, Stackebrandt E, Stock P, Klein GM. 2006. Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens. **Biological Control** 37: 32–49
- Chavarría-Hernández N., de la Torre M. 2001. Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture. **Biotechnology Letters** 23: 311-315.
- Ciche TA, Darby C, Ehlers RU, Forst S, Goodrich-Blair H. 2006. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. **Biological Control** 38: 22- 46.
- Díaz-Ruiz G, Guyot J P, Ruiz-Teran F, Morlon-Guyot J, Wachter C. 2003. Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amylolytic but Fast-Growing Lactic Acid Bacteria: a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage. **Applied and Environmental Microbiology** 69: 4367–4374.

Díaz-Ruiz G, Wacher-Rodarte C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. **Revista Latinoamericana de Microbiología** 45: 30 – 40.

Escalante A, Rodríguez ME, Martínez A, López-Munguía A, Bolívar F, Gosset G. 2004. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology Letters** 235: 273–279.

FAO - Food and Agriculture Organization of The United Nations. 2004. Agricultura y Biodiversidad. [http: www.fao.org](http://www.fao.org).

Fernández E, Arteaga E, Pérez M. 1994. Utilización de los nematodos entomopatógenos en el control de plagas agrícolas. Laboratorio de Hematología. La Habana Cuba.

Fischer-Le Saux MS, Arteaga-Hernández E, Mráček Z, Boemare NE. 1999. The bacterial symbiont *Xenorhabdus poinarii* (Enterobacteriaceae) is harbored by two phylogenetic related host nematodes: the entomopathogenic species *Steinernema cubanum* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). **Microbiology Ecology** 29: 149-157.

Flores-Lara Y, Renneckar D, Forst S, Goodrich-Blair H, Stock P. 2007. Influence of nematode age and culture conditions on morphological and physiological parameters in the bacterial vesicle of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 95: 110–118.

Forst S, Kenneth N. 1996. Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. **Microbiological Reviews** 60: 21-43.

Forts S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: Bugs That Kill Bugs. **Microbiological Reviews** 51:47-72.

García-García A. 2006. Formulación de bioinsecticidas a base de nematodos entomopatógenos. Tesis de Licenciatura. ICAP-UAEH.

Gerritsen LJ, Raay G, Smits PH. 1992. Characterization of form Variants of *Xenorhabdus luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology** 58: 1975-1979.

Givaudan A, Baghdiguián S, Lanois A, Boemare N. 1995. Swarming and Swimming Changes Concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophila*. **Applied and Environmental Microbiology** 61: 1408 – 1413.

Gómez-Tovar L, Gómez-Cruz MA. 2005. La agricultura orgánica en México: Un ejemplo de incorporación y resistencia a la globalización. Programa de Integración de la agricultura. CIESTAAM de la Universidad Autónoma de Chapingo México.

Hurlbert RE, Xu J, Small CL. 1989. Colonial and Cellular Polymorphism in *Xenorhabdus luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology** 55: 1136-1143.

IFOAM - Federación Internacional de movimientos de agricultura orgánica. 2005. The World of organic Agricultural Statistics and Emerging Trends. Willer H, Ussefi M (editores). Alemania.

Irouleguy V. 1962. Agricultura. *De agrarische geschiedenis van West-Europa*. <http://www.es.wikipedia.org/wiki/Agricultura>. Último acceso: 5 de octubre 2008.

Jeffke T, Jende D, Mätje C, Ehlers RU, Berthe-Corti L. 2000. Growth of *Photorhabdus luminescens* in batch and glucose fed-batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology** 54: 326-330.

Kaya H, Aguilera MM, Alumai A, Choo YH, de la Torre M, Fodor A, Ganguly S, Hazir S, Lakatos T, Pye A, Wilson M, Yamanaka S, Yang H, Ehlers RU. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. **Biological Control** 38: 134-155.

Kiely T, Donaldson D, Grube A. 2004. Pesticides Industry Sales and Usage 2000 and 2001 Market Estimates. Biological and Economic Analysis Division Office of Pesticide Programs Office of prevención, Pesticides, and Toxic Substances U.S. Environmental Protection Agency Washington.

Lengyel K, Lang E, Fodor A, Szállas E, Schumann P, Stackebrandt E. 2005. Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov., *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology** 28: 115-112.

LI J, Chen G, Wu H, Webster JM. 1995. Identification of two Pigments and a Hydroxystilbene Antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. **Applied and Environmental Microbiology** 61: 4329-4333.

Liu J, Berry E B, Blouin M S. 2001. Identificación de Symbiotic Bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the Entomopathogenic Nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* Based on 16S rDNA Sequence. **Journal of Invertebrate pathology**.

77: 87-91.

López-Cuellar MR. 2005. Producción de la Bacteria *Xenorhabdus* spp. en cultivo sumergido usando un medio de cultivo a base de aguamiel de maguey pulquero. Tesis de Licenciatura ICAP-UAEH.

Luque-Cabrera J, Herráez-Sánchez A. 2005. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Ed. Elsevier. Madrid España. pp: 187-188, 231-235.

Maurer J (editor). 2006. PCR Methods in Foods. Ed Springer Science. Universidad Georgia. Estados Unidos de América. pp. 1-15

Molina-Ochoa J, Lezama-Gutierrez R, Gonzalez-Ramirez M, Lopez-Edwards M, Rodríguez-Vega MA, Arceo-Palacios F. 2003. Pathogens and parasitic nematodes associated with populations of fall armyworm (Lepidoptera: *noctuidae*) Larvae in México. **Florida Entomologist** 86: 244-253.

Owuama CI. 2001. Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodos. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 17: 505 – 515.

Pérez-Bocourt Y, Márquez-Gutiérrez M, Gómez M. 2006. Caracterización de la fase primaria de las bacterias simbioses de los nematodos entomopatógenos *Steinernema Cubanum*, *Heterorhabditis indica* y *H. bacteriophora*. **Revista Fitosanidad** 10: 193-195.

Rodríguez-Bosque LA, Arredondo-Bernal HC (editores). 2007. Teoría y aplicación del control biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico. México. 303 pg.

Salas-Luévano MA. 2002. Existencia de nematodos entomopatógenos (*steinernematidae* y *heterorhabditidae*) en agrosistemas del cañon de Juchipila Zacatecas, México. Tesis Doctoral. UACol.

Saltini A. 1989. Storia Delle Scienze Agrarie. Ed Edagricole. Vol 4, Bolonia. 10 pg.

Sanjuan-Galindo R. 2006. Producción del nematodo entomopatógeno *Steinernema carpocapse* en cultivo monoxénico sumergido en biorreactor Air lift con recirculación interna. Tesis de Maestría. ICAP - UAEH.

Somvanshi V, Lang E, Ganguly S, Swiderski J, Saxena KA, Stackebrandt E. 2006 A novel species of *Xenorhabdus*, familia Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus indica* sp. nov., symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum*,

Ganguly and Singh. **Systematic and Applied Microbiology** 29: 519-525.

Suárez-Sánchez J. 1997 Caracterización cinética de un cultivo monoxénico en medio sumergido del nematodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* (Rhabditida: *Steinernematidae*). Tesis de Licenciatura. TESE.

Tailliez P, Pagés S, Nadège G, Boemare N. 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including description of ten novel species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56: 2805 – 2818.

Wang Y, Bilgrami AL, Shapiro-Ilan D, Gaugler R. 2007. Stability of entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens*, during in vitro culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 34: 73-81.

Woodring J, Kaya H. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A Handbook of Biology and Techniques. EUA. Arkansas Agric. Exp Stn.