

INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN LA REPRODUCCIÓN DE *PHOTORHABDUS LUMINESCENS*

Yirina Valdés Vázquez,¹ Antonio A. Lobaina Audevert,¹ María E. Márquez Gutiérrez¹ y Maylen Gómez Pacheco²

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

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

RESUMEN

La reproducción in vivo de los nemátodos entomopatógenos es altamente costosa y laboriosa, por lo que se hace necesario la elaboración de métodos de reproducción masiva in vitro más económicos. Debido a ello resulta indispensable asegurar el desarrollo de su bacteria simbiote, ya que garantiza la reproducción del nemátodo. El crecimiento de *Photorhabdus luminescens* se evaluó en quince variantes de medios de cultivo, elaborados a partir de infusiones de vísceras de cerdo, pollo y res, las cuales se combinaron independientemente con almidón, polvo de arroz y melaza. Para detectar la fase del cultivo bacteriano en los medios estudiados se determinó la presencia de bioluminiscencia, así como la coloración de las colonias en agar Mc Conkey y agar NBTA. Los mayores valores de unidades formadoras de colonias se obtuvieron en los tres medios elaborados con hígado de cerdo y el medio que contenía hígado de pollo-almidón. Las pruebas bioquímicas y las características morfológicas analizadas indicaron la presencia de la forma primaria de *P. luminescens*.

Palabras clave: *Photorhabdus luminescens*, medios de cultivo, reproducción

ABSTRACT

The reproduction in vivo of entomopathogenic nematodes becomes expensive and laborious. Due to this shortcomings, it's necessary to implement more economical mass production methods. However, one critical step to achieve this goal is to assure the development of the specific symbiotic bacterium associated to the nematode to be massively produced. The growth of *P. luminescens* was assessed in 15 different culture agar media prepared from pork broth, chicken broth and beef broth supplemented with corn starch, rice powder and sugarcane molasses independently. The colours of the colony in Mc Conkey Agar and NBTA agar as well as the bioluminescence were determined in order to detect the bacterial culture phase. Media prepared from pork liver and the one prepared from chicken liver and corn starch exhibited the greater number of colony forming units. Biochemical tests and morphological characteristics revealed the presence of the primary phase of *P. luminescens*.

Key words: *Photorhabdus luminescens*, culture media, reproduction

INTRODUCCIÓN

Los géneros bacterianos *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* se presentan en asociación mutualista con nemátodos entomopatógenos (NE) de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* respectivamente. Estas bacterias tienen una participación crucial en el crecimiento y la reproducción de esos nemátodos, pues contribuyen de manera esencial en la muerte del insecto hospedero y proporcionan una parte importante de la alimentación mediante la transformación del sustrato [Forst *et al.*, 2002] y el aporte de su propia biomasa.

Esta interacción simbiótica no solamente resulta beneficiosa por el suministro de los nutrientes necesarios por parte de la bacteria, sino que a su vez evita la

contaminación causada por otros microorganismos mediante la producción de barreras antimicrobianas como moléculas de antibióticos, bactericidas y fagos [Boemare *et al.*, 1997; Thaler *et al.*, 1997].

Actualmente existe una gran demanda mundial de NE para su empleo como control biológico de un variado número de insectos que son dañinos a cultivos agrícolas [Arteaga *et al.*, 1996]. Por otra parte, Bedding (1984) señaló los problemas que se presentan en su reproducción *in vivo* con respecto a los altos costos de producción. Todo esto hace necesario la implementación de métodos de reproducción *in vitro* que ofrezcan mayores ventajas económicas. Un elemento importante que se

debe garantizar es el crecimiento y desarrollo de la bacteria simbiote con vistas a obtener altos rendimientos en la producción de los nemátodos. Por lo anteriormente expuesto, este trabajo tuvo como objetivo determinar la influencia de diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento de *Photorhabdus luminescens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El aislamiento de *Photorhabdus luminescens* se realizó mediante la extracción con aguja hipodérmica de la hemolinfa de larvas de *Galleria mellonella* infestadas previamente con juveniles infectivos de la cepa *Heterorhabditis indica* P₂M, perteneciente a la colección del INISAV. La cepa de *P. luminescens* se incubó en tubos de agar nutriente (AN) a 28°C durante 48 horas.

Se elaboraron 15 medios de cultivo. Para ello se prepararon infusiones de hígado de cerdo (1), hígado de res (2), hígado de pollo (3), riñón de cerdo (4) y picadillo de pollo (5) (300 g de víscera/L de agua destilada), las cuales se combinaron independientemente con melaza (A), almidón (B) y polvo de arroz (C) (10 g/L). Tales medios se esterilizaron a 121°C por 20 minutos, y a 7 se ajustó el pH. Seguidamente se realizaron diluciones seriadas a partir de la suspensión del crecimiento de la bacteria y se sembraron tres placas por cada medio. La dosis de inóculo utilizada fue 100 µL/placa, se incubó a 28°C durante 72 horas y se empleó AN como referencia.

Las características culturales de las colonias se describieron y se compararon con las obtenidas en AN. Se contó además la cantidad de colonias por cada medio de cultivo. Los datos fueron procesados mediante un análisis de varianza simple, y las medias se analizaron por la dódima de comparación múltiple de Newman-Keuls con 5% de probabilidad de error.

Para determinar la fase de la bacteria, se observó en un cuarto oscuro la presencia o no de bioluminiscencia [Boemare *et al.*, 1993], y de cada uno de los medios de cultivo estudiados se tomó una colonia, que se sembró en agar Mc Conkey y agar NBTA [Boemare *et al.*, 1997].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las colonias desarrolladas en los 15 medios de cultivo presentaron una morfología diferente a la descrita por Márquez *et al.* (1997) en agar nutriente. Estas diferencias se evidenciaron fundamentalmente en el color, forma, superficie y consistencia de las colonias. De esta misma forma, a partir de las 72 horas se observaron nuevos cambios en su elevación, superficie y consistencia (Tabla 1).

En la pigmentación hubo variabilidad, con predominio del color carmelita y variantes desde marrón hasta rosado. La variabilidad de coloración en el género *Photorhabdus* ha sido señalada por autores como Boemare (2002), al plantear que esta característica se manifiesta fundamentalmente en medios de cultivo enriquecidos, como los utilizados en este trabajo.

Tabla 1. Caracterización morfológica de *P. luminescens* en diferentes medios de cultivo

Características	Agar nutriente	Medios estudiados (24-48 horas)	Medios estudiados (72 horas)
Color	Amarillo intenso	Variado	Variado
Forma	Ligeramente redondeada hasta irregular	Circular hasta ligeramente irregular	Circular hasta ligeramente irregular
Tamaño	3-4 mm de diámetro	3-4 mm de diámetro	3-4 mm de diámetro
Bordes	Entre ondulados y ligeramente irregulares	Ligeramente ondulados	Ligeramente ondulados
Superficie	Lisa	Rugosa	Menos rugosa
Opacidad	Opacas	Solamente en el centro	Solamente en el centro
Consistencia	Mucosa	Costrosa	Mucosa
Elevación	Elevada	Elevada	Prominente

El crecimiento bacteriano difirió entre las 15 combinaciones de medios de cultivo, y se obtuvo la mayor cantidad de colonias de *P. luminescens* en las tres variantes con hígado de cerdo y la variante hígado de pollo-almidón. En estos casos el número de colonias

obtenidas por encima del valor del testigo fue aproximadamente 150 unidades formadoras de colonias (Fig. 1). Debido a que el hígado de cerdo presenta un gran contenido de ácidos grasos insaturados, y según Daborn *et al.* (2001), *Photorhabdus* produce diferentes tipos de

proteasas y lipasas en medios de cultivos artificiales, se puede considerar que el medio elaborado con esta víscera permitió un mayor crecimiento bacteriano, probablemente por su contenido de nutrientes y/o por su facilidad de asimilación.

Por otra parte, varios autores como Lunau *et al.* (1993), Gerritsen y Smits (1993) se han referido a la estrecha

relación que existe entre las especies del género *Heterorhabditis* y sus simbios, además de la función fundamental que tiene la bacteria en la transformación del medio y el aporte de su propia biomasa para la alimentación del nemátodo. Esto conlleva a plantear que esos medios de cultivos pudieran proporcionar mayores rendimientos que el resto en la reproducción *in vitro* de *H. indica* P₂M.

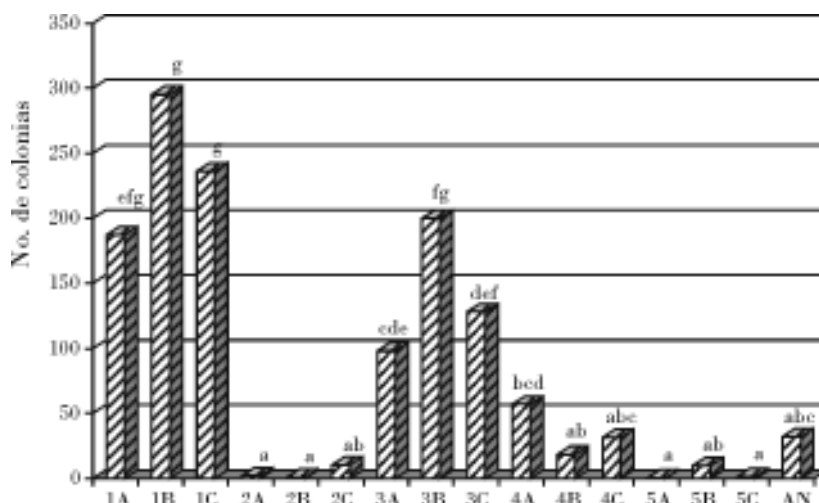


Figura 1. Número de colonias formadas por *P. luminescens* en las variantes de medio de cultivo ensayados. (Letras iguales no difieren; $p < 0,05$).

Sin embargo, se observó que en los medios elaborados con hígado de res y picadillo de pollo el rendimiento fue muy bajo, incluso comparados con el testigo, que no es un medio enriquecido. A partir de este resultado se puede inferir que la mayor influencia sobre el crecimiento de *P. luminescens* está determinada por la fuente de proteína utilizada y no por la fuente de carbono.

La presencia de bioluminiscencia se pudo observar en todos los medios de cultivo empleados; no obstante este parámetro analizado individualmente no es indicativo de que la bacteria se encuentre en fase primaria, pues se han reportado casos en los cuales los cultivos bacterianos se han hallado en fase secundaria, y una de las características que ha mantenido luego del cambio de fase es la emisión de luz [Boemare *et al.*, 1997].

Por otra parte, se observó la coloración roja de las colonias en agar Mc Conkey y azul en agar NBTA, lo que reveló definitivamente que la bacteria se encontraba en fase primaria en todos los medios de cultivo empleados, pues según el planteamiento de Boemare (2002), la

fase secundaria de este género bacteriano se caracteriza fundamentalmente por la pérdida de la absorción de rojo neutro en agar Mac Conkey y azul de bromotimol en NBTA.

Es de suma importancia conocer que estos medios no indujeron la fase secundaria de la bacteria, pues por sus características fisiológicas se conoce que la fase 1 es la ideal para lograr la reproducción de los nemátodos sobre medios artificiales. A ello se debe que muchos investigadores trabajen para obtener un medio en el cual se logre estabilizar esta fase.

CONCLUSIONES

- Las colonias de *P. luminescens* crecidas en los medios de cultivo enriquecidos con vísceras variaron su coloración, superficie, forma y consistencia.
- Los medios de cultivo con hígado de cerdo y la variante con hígado de pollo-almidón permitieron el mejor desarrollo de *P. luminescens*.
- Todos los medios de cultivo estudiados favorecieron la presencia de la fase primaria de la bacteria.

REFERENCIAS

- Arteaga, E.; M. Montes; E. Fernández; B. Chang; V. Calzadilla; O. Vázquez; O. Vázquez; G. Plumas; V. García: «Organization of the Work with Entomopathogenic Nematodes in Cuba». Third International Nematology Congress, Grosier, Guadalupe Antilles, French West Indies, 181, 1996.
- Bedding, R. A.: «Large Scale Production, Storage and Transport of the Insect-Parasitic Nematode *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp.», *Ann. Appl. Biol.* 104:117-120, 1984.
- Boemare, N. E.; R. J. Akhurst; R. G. Maurant: «DNA Relatedness Between *Xenorhabdus* ssp. (Enterobacteriaceae) Symbiotic Bacteria of Entomopathogenic Nematodes and a Proposal to Transfer *Xenorhabdus luminescens* to a New Genus, *Photorhabdus* gen. Nov. Int.», *J. Helminthol. Soc. Wash.* 1993, pp. 249-255.
- Boemare, N. E.; A. Givaudan; M. Brehélin; C. Laumond: «Symbiosis and Pathogenicity of Nematode-Bacterium Complexes», *Symbiosis* 22:21-45, 1997.
- Boemare, N. E.; J. O. Thaler; A. Lanois: «Simple Bacteriological Test for Phenotypic Characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Phase Variants», *Symbiosis* 22:167-175, 1997.
- Boemare, N. E.: «Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*», *Entomopathogenic Nematology*, CABI Publishing, New York, 2002, pp. 35-56.
- Daborn, P. J.; N. Waterfield, M. A. Blight; R. H. French-Constant: «Measuring Virulence Factor Expression by the Pathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens* in Culture and During Insect Infection», *Journal of Bacteriology* 183:5834-5839, 2001.
- Forst, S.; D. Clarke: «Bacteria-Nematode Symbiosis», *Entomopathogenic Nematology*, CABI Publishing, New York, 2002, pp. 57-77.
- Gerritsen, L. J. M.; P. H. Smits: «Variation in Pathogenicity of Recombinations of *Heterorhabditis* and *Xenorhabdus luminescens* Strain», *Fundam. Appl. Nematol.* 16:367-373, 1993.
- Lunau, S.; S. Stoessel; A. J. Schmidt-Peisker; R. U. Ehlers: «Establishment of Monoxenic Inocula for Scaling Up for *in Vitro* Culture of Entomopathogenic Nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp.», *Nematologica* 39:385-399, 1993.
- Márquez, M. E.; O. Fernández-Larrea; E. Arteaga: «Indicadores para determinar la fase primaria de *Photorhabdus luminescens*», *Rev. Protección Vegetal* 12 (2):85-88, 1997.
- Thaler, J. O.; M. H. Boyer-Giglio; N. E. Boemare: «New Antimicrobial Barriers Produced by *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. to Secure the Monoxenic Development of Entomopathogenic Nematodes», *Symbiosis* 22:205-215, 1997.