

ASLAMIENTO DE BACTERIAS SIMBIÓTICAS PRESENTES EN NEMATODOS FITOPATOGENOS DE UN CULTIVO DE TABACO, EN GIRÓN SANTANDER

Ana Milena González¹; Leinnis Vanessa Ortiz²; Jessica Lizeth Parra³; Zully Patricia Rodriguez⁴; Carlos Acevedo M.Sc⁵

Correspondencia: 1:Milenags06@gmail.com; 2:Ortiz6112@gmail.com; 3:Jessicaparram@gmail.com; 4: zullycoope@gmail.com; 5. cacevedoi@udes.edu.co

1,2,3,4 Estudiantes Programa de Microbiología Industrial. 5. Profesor curso de Ecología Microbiana.

RESUMEN

Los nematodos son un amplio grupo de invertebrados, los cuales desde el punto de vista agrícola, reside en que estos comprenden un gran número de especies perjudiciales para los cultivos. Para estudiar los nematodos se debe establecer su morfología, reproducción, nutrición, ambiente óptimos de crecimiento y la interacción simbiótica que realizan con algunas bacterias, ya que poco se conoce del beneficio o las propiedades que esta asociación brinda al nematodo, razón por la cual en este estudio tuvo como objeto conocer la importancia de la interacción entre nematodos y bacterias, para esto se llevó a cabo el método de Baermann mediante el cual se capturaron nematodos fitopatógenos del tabaco donde posteriormente se realizó un aislamiento de las bacterias presentes en los nematodos, encontrando que estas bacterias corresponden a una tinción Gram negativa y forma bacilar, posteriormente mediante pruebas bioquímicas se logró inferir que tales bacterias pertenecen a la familia Enterobacteriaceae.

Palabras Clave: Nematodos, embudo de Baermann, bacterias, tabaco, simbiosis,

ABSTRACT

Nematodes are a large group of invertebrates, which, from the agricultural point of view, comprise a large number of species harmful to crops. To study the nematodes you must establish their morphology, reproduction, nutrition, optimal growth environment and the symbiotic interaction with some bacterias, this because the benefits or the properties That this association gives to the nematodo is little-known, this is why this study has as an objective to know the importance of the interaction between the nematodes and the bacterias. For this we conducted the Baerman method whereby we capture nematods phytopathogen from the snuff, then we did an isolation bacterias that were in the nematodes, findind that those bacterias were a negative Gram staining with a bacillary form. After this, by biochemical tests, we can infer that those bacterias belong to a enterobacteriaceae family.

Keywords: Nematodes, Baermann funnel, bacteria, snuff, simbiosis.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos son animales microscópicos invertebrados, pertenecientes al Phylum animal Nematoda. Se encuentran en una amplia gama de hábitats, especialmente en el suelo y el agua. La mayoría son saprofitos pero algunos son parásitos de animales o de plantas. Los nematodos parásitos de las plantas se clasifican en los órdenes Dorylaimida y Tylenchida, existen nematodos fitopatógenos formadores de agallas en la raíz, denominados endoparásitos sedentarios, cuya importancia agrícola, reside en que comprenden un gran número de especies perjudiciales para los cultivos. Los nematodos

fitopatógenos, son una plaga de importancia económica en el mundo, especialmente en países tropicales y subtropicales (Llanos Manuel, 1982). Unos de los cultivos afectados en Colombia es el del tabaco el cual representan ingresos, generando empleo para los agricultores (Munera, 2003), sin embargo la introducción de nuevas variedades de tabaco o la ampliación del cultivo lleva consigo un desequilibrio ecológico que ocasiona la proliferación de nuevas razas de este patógeno.

Para estudiar los nematodos se debe establecer su morfología, reproducción, nutrición, ambiente óptimo de crecimiento y la

interacción simbiótica que realizan con algunas bacterias; ya que poco se conoce sobre la utilidad o las propiedades que esta asociación brinda al nematodo, para llegar a establecer tales beneficios se deben conocer los métodos de captura, la forma de extraer las bacterias y medios de cultivo para su aislamiento y posterior identificación.

Por otra parte uno de los géneros más distribuidos en los cultivos de tabaco es el nematodo agallador de raíces *Meloidogyne* spp, este reduce el crecimiento de las plantas (Munera, 2003), existiendo más de 80 especies distribuidas en el mundo, donde la especie a la cual se le atribuye el mayor daño económico es *Meloidogyne incognita* (Eisemback, 1997). Para infectar la planta, el nematodo emplea una estructura especializada llamada estilete, la cual al insertarse en las células vegetales de las raíces genera secreciones enzimáticas que licúan su interior, posteriormente absorben el material pre digerido y llevan a cabo una digestión completa gracias a la presencia de esófagos.

Las bacterias relacionadas con el nematodo *Meloidogyne* spp son *Pseudomonas*, *Actinobacteria* y enterobacterias (Adam M, 2012), también se ha indicado que los microorganismos benéficos asociados y aislados de agallas de nematodos pertenecen a las especies de *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* y *Paecilomyces farinosus* (Gallegos Gabriel, et al. 2007)

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de la muestra

Se realizó un muestreo aleatorio (Fig. 2) en un cultivo de tabaco de la finca Bellavista ubicada en el municipio de girón Santander (Fig. 1), cuya área es de 1 Hm² (Fig. 2). Se seleccionaron 10 árboles al azar y se realizó una colecta de 1 Kg de suelo a una distancia de 15 cm del tallo y a una profundidad de 20 cm, posteriormente se mezclaron las submuestras y se obtuvo una muestra madre (Fig. 3), de la cual se extrajo 1 Kg.



Figura 1. Cultivo de tabaco. Fuente autores.

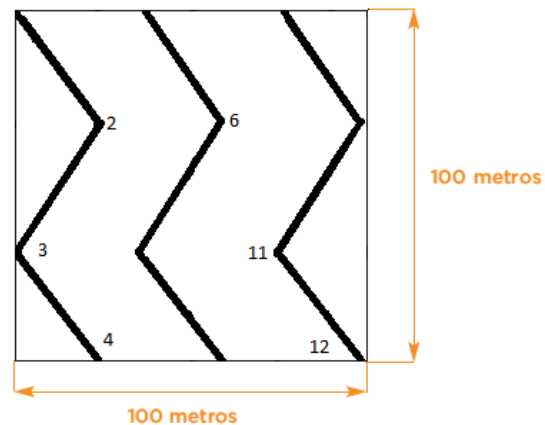


Figura 2. Toma de muestra en zigzag – aleatoria simple de la finca Bellavista. Fuente autores.

Captura o Extracción de nematodos

Se realizó la captura de los nematodos siguiendo el protocolo del embudo de Baermann (1961), el cual consiste en la preparación de una emulsión compuesta de 10 gramos de suelo y 50mL de agua destilada, mezclándose por inmersión hasta desintegrar el suelo, posteriormente se realizó un tamizado de esta emulsión y se tomaron cuatro embudos tapados en su extremo con gasa y se ubicó sobre el papel filtro, adicional a esto se llenaron con agua destilada. Seguidamente se introdujo en la parte superior 100 g de suelo tamizado en cada embudo (Fig. 4) y se dejó reposar por un lapso de tiempo entre 12 a 24 horas, ya que los nematodos se caracterizan por migrar hacia regiones húmedas. Finalmente, se recogieron unas gotas y fueron observadas al microscopio para la confirmación de la presencia de nematodos en la muestra.



Figura 3. Preparación de la muestra mediante el método embudo de Baermann. Fuente autores.

Aislamiento de bacterias

Se tomaron 1000 μ L de la muestra de agua recolectada mediante el método de Baermann y se depositó en agar nutritivo incubando a temperatura ambiente en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, posterior a ello, se observó el crecimiento de colonias bacterianas; macroscópicamente diferentes de las que se seleccionaron ocho colonias cuya tinción y forma corresponden a bacilos Gram negativos.

Posteriormente, las colonias seleccionadas se repicaron en agar MacConkey en condiciones de anaerobiosis a temperatura ambiente.

Pruebas bioquímicas

Las colonias aisladas se sembraron en Agar XLD, Agar Bismuto sulfito y Agar Hektoen, también se realizó prueba catalasa y oxidasa a cada una de ellas.

RESULTADOS

Captura o Extracción de nematodos

Se confirmó la presencia de nematodos en la muestra madre proveniente de un cultivo de tabaco, mediante la observación directa al microscopio (Fig. 4), se logró observar el nematodo en su estado juvenil (Fig. 4, a),

también se observó un nematodo adulto con simetría bilateral y cuerpo alargado fusiforme (Fig. 4, b, c) además empleado safranina como colorante (Byrd *et al*, 1983).

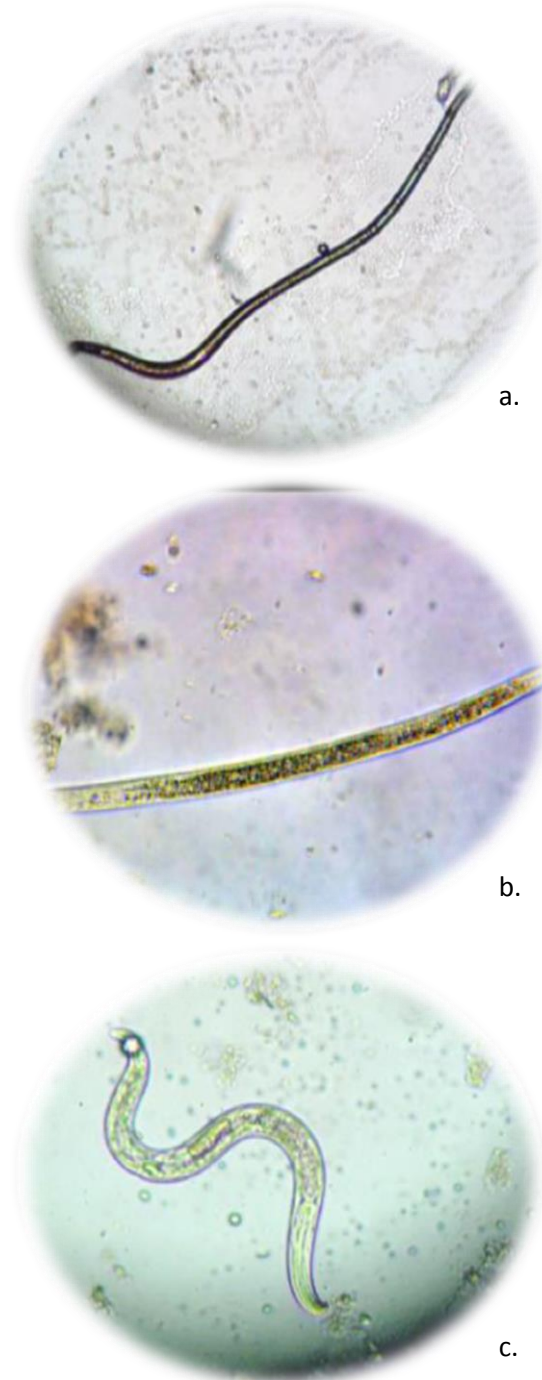


Figura 4. Vista microscópica de nematodos en microscopio óptico 40X, a) nematodo juvenil, b) nematodo adulto con cuerpo alargado alargado c) nematodo adulto con cuerpo alargado fusiforme . Fuente autores.

Además se identificó algunas partes del nematodo como su cubierta, boca, labios, cloaca y estilete (Fig. 5), estas estructuras indican que el nematodo es fitopatógeno y comparando con los principales géneros de nematodos que afectan el cultivo de tabaco como *Meloidogyne* sp, *Tylenchus* sp y *Tylenchorhynchus* sp se infirió que el nematodo capturado posiblemente pertenece al género *Meloidogyne* sp (Fig. 6), Las especies de este género atacan un amplio espectro de plantas y constituyen el grupo de nematodos de mayor importancia económica mundial (Zuckerman,1985).

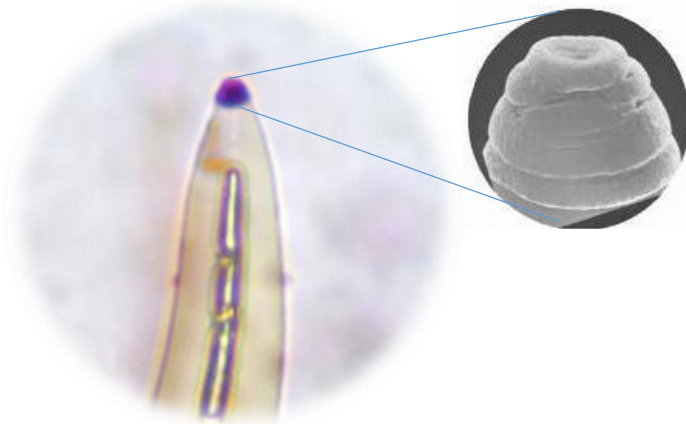


Figura 5. Vista microscópica de nematodos en microscopio óptico 40X, se logra observar la parte trasera del nematodo llegando a identificar su cloaca.

Aislamiento de bacterias

Se observó el crecimiento de colonias bacterianas morfológicamente diferentes (Fig. 7 - Tabla 1) cuya tinción y forma correspondía a bacilos y cocobacilos Gram positivos y negativos, cultivadas en condiciones de anoxigenia, los resultados obtenidos a partir del cultivo en condiciones de oxigenia fueron omitidos puesto que no representaron una variable significativa, por lo que a partir de acá se trabajó con cultivos llevados a condiciones de anaerobiosis.

Se observó el crecimiento de cuatro colonias de las ocho colonias repicadas en agar MacCokey (Fig. 8), Se lograron obtener colonias puras de tinción Gram negativa y forma bacilar, esto gracias a que este medio tiene inhibidores (sales biliares y cristal violeta) los cuales no permiten crecimiento de la microbiota Gram positiva, ya que este medio de cultivo es utilizado para el

aislamiento de *Salmonella*, *Shigellas* y bacterias coliformes (Merk, 2002).

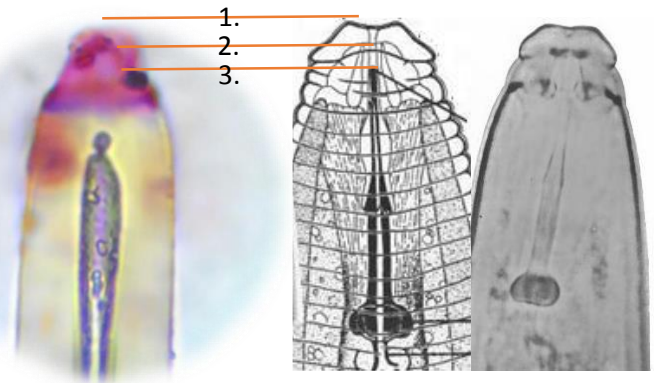


Figura 6. Comparación morfológica con macho *Meloidogyne incognita* Fuente. Der. Autores; Izq. (Eisenback et al., 1981). 1) Cubierta alta y ancha, con disco labial cóncavo. 2) Labios medios separados, 3) Punta del estilete.

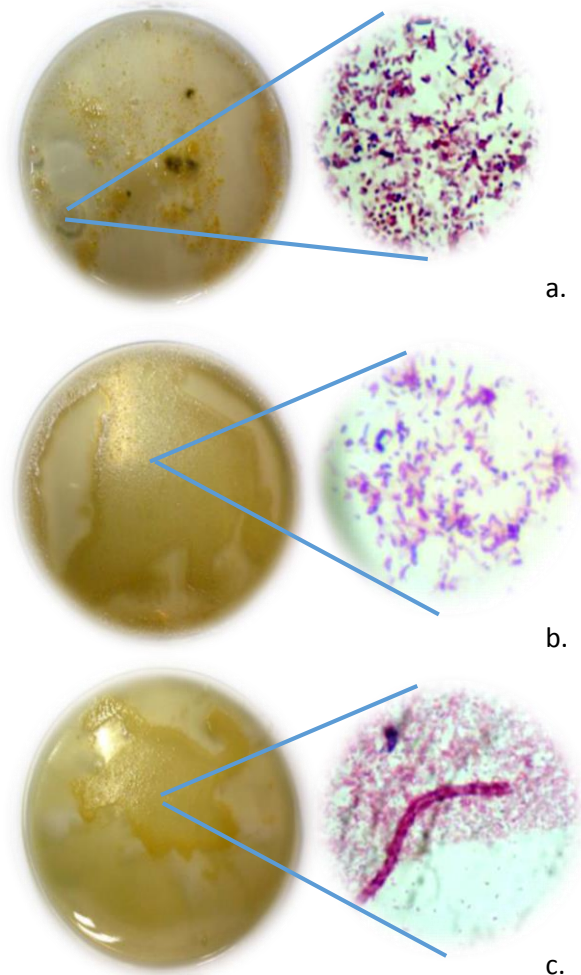


Figura 7. a,b,c. Vista superior de colonias bacterianas cultivadas en agar nutritivo también se observa la vista al microscopio óptico 40X, de las colonias.

Tres de las cuatro colonias aisladas (Fig. 8, a, b, c) presentaban una coloración rosada, por lo cual se deduce que estas colonias tienen la capacidad de degradar la lactosa, características presentes en bacterias del género *Klebsiella* sp; una de las colonias presentes en el medio era incolora (Fig 8, d) característica presente en bacterias del género *Salmonella*, *Shigella* o *Proteus*.

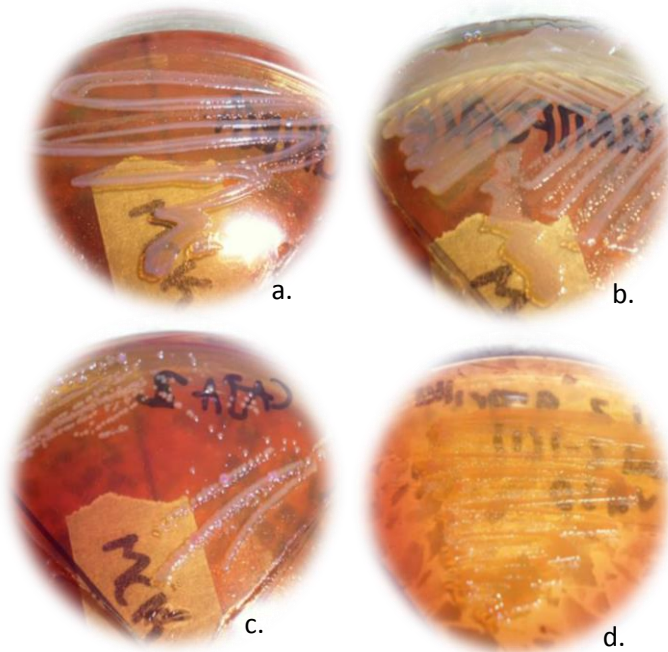


Figura 8. Colonias bacterianas en agar MacConkey. a,b,c,d. Colonias de aspecto mucoso.

Pruebas bioquímicas

Catalasa

Mediante esta prueba se logró observar efervescencia la cual corresponde al desprendimiento de oxígeno libre debido a su capacidad enzimática de descomponer el peróxido de hidrógeno, es decir se revela que las colonias tienen esta enzima, y a su vez indica que puede presentar una respiración aerobia o anaerobia facultativa, pues la literatura indica que la enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos.

Oxidasa

Teniendo en cuenta que los microorganismos que se buscan son enterobacterias, y esta prueba se realiza para diferenciar este grupo bacteriano pues no poseen citocromo oxidasa a excepción de la familia *Plesiomonas* que es

oxidasa positivo (Romero Raúl, *et al.* 2002). Como se observa en la Figura 9 las colonias números 1, 2 y 4 presentaron una coloración púrpura, es decir que estos microorganismos producen la enzima oxidasa la cual al oxidar el sustrato presente en los discos se observa dicha coloración, Además la colonia 3 demostró la ausencia de dicha enzima pues no produjo dicha coloración.

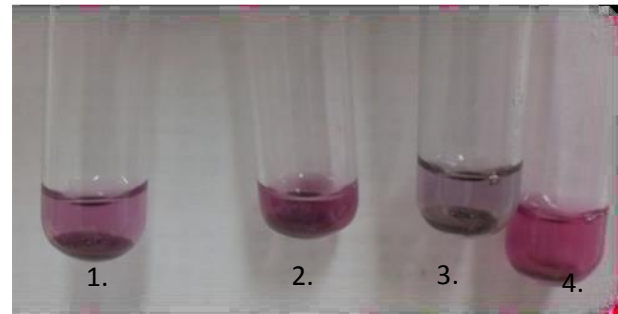


Figura 9. Prueba de oxidasa para los 4 aislamientos. Obsérvese que en tubo 3 la reacción no es intensa indicando presumiblemente que el microorganismo no cuenta con el sistema citocromooxidasa.

Agar Bismuto sulfito

La fermentación de la glucosa produce la reducción del sulfito con formación de sulfuro de hierro y colonias negras, tal como se evidencia en la colonia 2 y 4, los repiques de las cajas 1 y 2 no crecieron lo cual ocurre al contenido de bismuto y verde brillante que son inhibidores de toda la microbiota Gram positiva y de la mayoría de las bacterias Gram negativas. (Fig. 10).

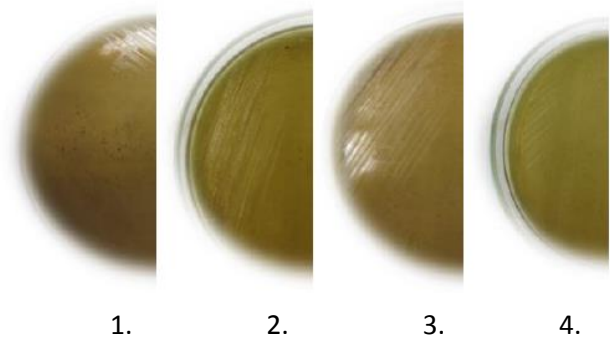


Figura 10. Se observa la incapacidad de los microorganismos para reducir sulfatos.

Agar Hektoen

Como se observa en la Figura 11 las colonias número 1 y 2 presentan colonias verdes según la literatura estos microorganismos son no fermentadores de lactosa.

En cambio la colonia número 3 presentó colonias anaranjadas es decir es un microorganismo fermentador de lactosa pues al acidificar el medio, se torna este color. La colonia 4 no presentó crecimiento.

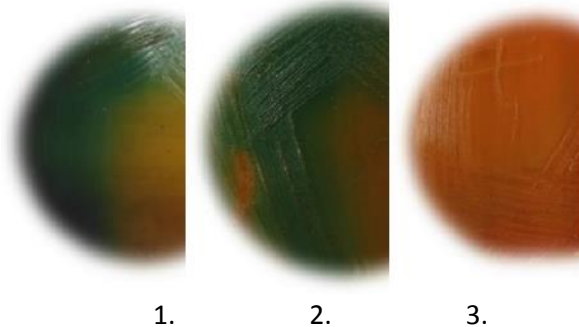


Figura 11. Aislamientos en agar hektoen. 1,2: Colonias azul verdosas indican la presencia de *Proteus* sp. 3: Colonias color salmón indica la presencia de *Escherichia coli*.

Agar XLD

En la figura 12 la caja número 4 formó colonias amarillas brillantes habitualmente rodeadas de zonas nebulosas de precipitación de sales biliares tal, lo cual ocurre en la mayoría de los microorganismos entéricos como *E. coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter* fermentan la lactosa o más de un carbohidrato para producir ácido y son lisina negativa.

Algunas especies como *Salmonella* puede presentar colonias rosa sin centro negro como se observa en las colonias de las cajas 2 y 3 (Fig.12), esto se debe a que descarboxilan la lisina, aumentando el pH del medio.

La caja número 1 (Fig.12) presentó colonias transparentes y parecen rojas por el color del medio, Organismos de lisina-positivos, no fermentadores.

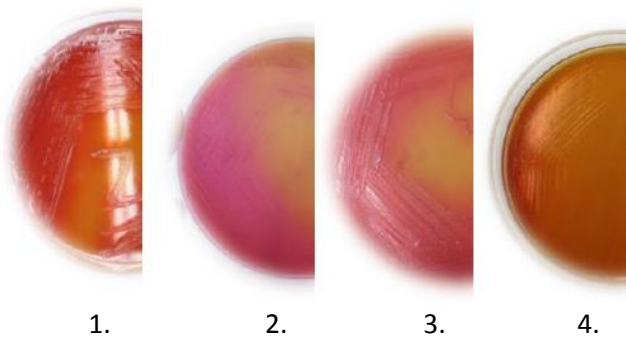


Figura 12. Aislamientos en agar xld. 1,2,3,4: muestran reacción que indica que pertenecen a patógenos entéricos.

CONCLUSIONES

- Se logró capturar nematodos mediante el protocolo del embudo de Baermann, y observar estructuras, de las cuales se logró una identificación.
- Comparando los protocolos de captura de nematodos, (embudo de Baermann y plato de Oostenbrink) el que obtuvo un mejor desempeño fue el embudo de Baerman ya que este demostró ser más eficaz atrayendo un gran número de nematodos y en poco tiempo.
- No se logró aislar las bacterias que están internamente en los nematodos porque en la bibliografía consultada no se reporta tal interacción, sin embargo las bacterias aisladas, tienen reportes en los cuales están asociadas al ambiente aledaño, al hábitat de los nematodos.

BIBLIOGRAFIA

- Adam, M., Hallmann, J., Heuer; H. 2012 /Microbial communities associated with juveniles of *Meloidogyne* spp. in soil/ Julius Kühn-Institut, Epidemiology and Pathogen Diagnostics, Braunschweig/ Young Scientists Meeting.
- Chaverri Guerero Rodrigo/ El cultivo del Tabaco/ Euned.
- Gallegos Gabriel, Cepeda Melchor, Hernández Francisco 2007 / Microorganismos Benéficos Asociados a *Meloidogyne* incognita (Kofoid y White) Chitwood en Guayabo (*Psidium guajava* L.) de Calvillo, guascalientes, México/Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Parasitología Agrícola, Buenavista, Saltillo, Coahuila/ Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA/ México.
- Gilchrist, L., Fuentes Dávila, G.,Martinez-Cano, C/ Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada/ Segundo edición/ capítulo 6/México/ Pp 48 – 52.
- Llanos Manuel, 1981 / Los nematodos del tabaco / Ministerio de agricultura, pesca y alimentación/ Instituto tecnológico del tabaco/ Sevilla, España.
- M. B. Harrison 1987 / Fitonematología manual de laboratorio / publicado por agrónomo tropical de investigación y enseñanza, Turrialba, costa rica.
- Nahabedian Daniel E. 2013/ Nematodos fitopatógenos/ Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas/decimosexta edición/ Buenos aires argentina.

- Sánchez Miguel /Nematodos fitopatógenos en cultivos protegidos/ Fitoprotección laboratorio y asesoría técnica.
- T. SALMERÓN y T. CABELLO 1989/ Incidencia de Meloidogyne incognita en cultivos de tabaco de la Vega de Granada (SE. de España)/ Departamento de Protección Vegetal. Centro de Investigación y Desarrollo Agrario de Granada. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía.
- Morerira Fátima, Jeroen Huising y Bignell David 2012/ Manual de biología de suelos tropicales/ Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo/ México/ PP 290.

Resumen de resultados

Colonia	Catalasa	Oxidasa	Bismuto sulfito	Hektoen	XLD
1	+	+	No creció	No fermenta lactosa	No fermenta descarboxila lisina
2	+	+	Fermenta glucosa y reducción a sulfitos	No fermenta lactosa	Descarboxila la lisina
3	+	-	No creció	Fermenta lactosa	Descarboxila la lisina
4	+	+	Fermenta glucosa-reducción del sulfito	No creció	Fermenta lactosa- lisina negativa

Tabla 1. Resumen de las pruebas bioquímicas Fuente autores