

Recibido el 11 de enero de 2023, aceptado el 22 de mayo de 2023.

Licencia Creative Commons Reconocimiento - NoComercial - CompartirIgual 4.0 Internacional (cc by-nc-sa 4.0).



ABUNDANCIA, CARACTERIZACIONES MOLECULARES Y PRODUCCIÓN MASIVA DE COMUNIDADES MICROBIANAS BENÉFICAS (NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS) DEL SUELO

ABUNDANCE, MOLECULAR CHARACTERIZATIONS
AND MASS PRODUCTION OF BENEFICIAL MICROBIAL
COMMUNITIES (ENTOMO-PATHOGENIC NEMATODES)
FROM THE SOIL

Gobinath Chandrakasan*
Juan Fernando García Trejo
Óscar Alatorre Jácome
Enrique Rico García

Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.

*gobinath.chandrakasan@uaq.mx

Resumen

Los nematodos entomopatógenos (NEP) se consideran una de las mejores alternativas para el control biológico de plagas de insectos. Entre sus principales características, los NEP muestran una alta eficiencia en el control activo de macroinvertebrados, poseen altas tasas de fecundidad y fertilidad, son inocuos en plantas y vertebrados, asimismo como su cultivo y manejo demandan costos asequibles. Con el fin de obtener cepas activas de NEP (utilizadas como biocontrol para proteger de los insectos fitopatógenos a las plantas), se recolectaron diversas muestras de suelo de cultivo agrícola y forestal, a su vez, fueron caracterizadas fisicoquímicamente. Posteriormente, se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* para el aislamiento de NEP, estos últimos fueron identificados en función de sus características morfológicas, y reproducidos a escala laboratorio mediante técnicas de agitación orbital. Como resultado, se detectó que en 10 % de las muestras hay presencia de NEP. Gracias a que se utilizaron métodos de biología molecular y análisis metagenómicos, se identificaron dos taxones de NEP: *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp., con una abundancia relativa del 8 y 2 %, respectivamente. Por último, se llevaron a cabo ensayos para el establecimiento de un cultivo axénico a mediana escala de los nep; se implementaron técnicas tradicionales, como el cultivo en matraz bola y el agitado orbital bajo condiciones de crecimiento controladas, con el fin de evitar mayores inversiones en insumos costosos. Como conclusión, el cultivo de los nep presenta una alternativa real y sostenible para el biocontrol de plagas que afectan diferentes cultivos agrícolas.

Palabras clave: bio-control, *Galleria mellonella*, nematodos benéficos, PCR, *Steinernema* spp.

Entomopathogenic Nematodes (EPN) are considered one of the best alternatives for the biological control of insect pests. Among their main characteristics, EPNS show high efficiency in the active control of macroinvertebrates, have high fecundity and fertility rates, are harmless to plants and vertebrates, and their cultivation and management present affordable costs. In order to obtain active strains of EPN used as biocontrol to protect plants from phytoparasitic nematodes, various samples were collected from agricultural and forestry cultivation. The soil samples were characterized phys-

iochemically, subsequently *Galleria mellonella* larvae were used for the isolation of EPN, the latter were identified based on their morphological characteristics, and reproduced on a laboratory scale using orbital shaking techniques. As a result, in 10% of the samples the presence of EPN was detected. Using methods of molecular biology and metagenomic analysis identified two EPN taxa: *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. and, with a relative abundance of 8 and 2%, respectively. Finally, tests were carried out for the establishment of a medium-scale axenic culture of EPNs, using traditional techniques without excessively expensive inputs, such as conical flask culture and orbitally shaken flasks under controlled growth conditions, in order to avoid further investment in infrastructure. In conclusion, the cultivation of these EPN presents a real and sustainable alternative for the bio-control of pests that affect different agricultural crops.

Keywords: biocontrol, *Galleria mellonella*, beneficial nematodes, PCR, *Steinernema* spp.

Introducción

El control biológico es una estrategia para el manejo de insectos, malezas y enfermedades que aprovecha las asociaciones biológicas de antagonismo natural entre estos organismos. De origen tanto polifilético como heterogéneo, el catálogo de especies registradas para los fines de control biológico comprende desde bacterias simples hasta vertebrados complejos [1]. Un grupo de microorganismos eucariontes protozoarios que ha sido ampliamente estudiado son los nematodos: gusanos redondos, alargados, no segmentados, incoloros, sin apéndices visibles, de vida libre y parasitaria. Los nematodos beneficiosos, al contrario que los fitopatológicos, atacan a las plagas de insectos de manera específica. La introducción de nematodos entomopatógenos como agentes de control biológico en la agricultura aporta varias ventajas:



1. Son seguros para el medio ambiente y los cultivos.
2. Tienen un enfoque preciso de acción, ya que solo parasitan a insectos y artrópodos perjudiciales, sin afectar a organismos beneficiosos, como abejas o enemigos naturales de las plagas.
3. Demuestran eficacia contra una amplia gama de plagas de insectos, incluyendo las larvas de escarabajos, gusanos del maíz, mosquitos y orugas de mariposas [2].

Los nematodos capaces de infectar y matar insectos se denominan *nematodos entomopatógenos* (NEP) [3], [4] y pertenecen a las familias *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*. Las condiciones ambientales pueden afectar su supervivencia, virulencia y potencial reproductivo; no obstante,

su distribución es prácticamente global, con registros de ocurrencia en todos los suelos del mundo, a excepción de la Antártida [5]. Los NEP sostienen una relación mutualista con bacterias simbióticas de los géneros *Xenorhabdus* spp. y *Photorhabdus* spp. Estas últimas son endosimbiontes localizados a lo largo del intestino de las larvas juveniles en estado infeccioso.

Los nematodos son invertebrados cuyo ciclo de vida consta de seis etapas; en la tercera es cuando los juveniles infecciosos (IJ, *infective juveniles*, la única etapa de vida libre de los NEP) emprenden su búsqueda de hospederos, a quienes terminan alcanzando por atracción química. Los IJ comportan las bacterias endosimbiontes a lo largo del tracto intestinal en el caso de la familia *Heterorhabditidae*, o en una vesícula especial en la familia *Steinernematidae* [6], [7]; invaden al insecto huésped a través de sus orificios naturales (cavidad bucal, ano y espiráculos) o en algunos casos a través de

la cutícula. Una vez dentro del insecto hospedero, las bacterias simbióticas se liberan y acaban por inducirle la muerte. Posteriormente, los simbiontes bacterianos establecen y mantienen las condiciones adecuadas para la reproducción del nematodo, proporcionando nutrientes y sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de una amplia gama de microorganismos dentro y fuera del cadáver [8]. Los NEP completan su desarrollo y habitan el cadáver del anfitrión de dos a tres generaciones. Al agotarse la comida, los IJ lo abandonan en busca de nuevos huéspedes.

El cultivo de nematodos entomopatógenos presenta una alternativa sostenible para el biocontrol de plagas que afectan diferentes cultivos agrícolas. Estos animales poseen una alta eficiencia en el control activo de macroinvertebrados y altas tasas de fecundidad y fertilidad, se consideran una de las mejores alternativas para el control biológico de insectos.

Gracias a estos procesos, ya hay varios productos comerciales basados en NEP disponibles para el control de plagas. Y se han realizado encuestas en varios países para optimizar las condiciones ecológicas locales para el aislamiento de nuevas cepas [9]. Los NEP también se consideran adecuados en hábitats donde los pesticidas agroquímicos carecen de la eficiencia requerida. Este es el caso de los hábitats crípticos. No obstante, dado que en estos microhábitats la tasa de mortalidad de IJ por factores extrínsecos es mínima, se espera seguir recabando evidencia sobre su potencial. El fundamento para esta perspectiva es que existen reportes favorables del desempeño en la supervivencia y la persistencia de los NEP [10].

La producción comercial de NEP consta de tres enfoques básicos: producción *in vivo*, fermentación sólida *in vitro* y fermentación líquida *in vitro* [11]. Se considera que esta última aporta mayor rentabilidad económica; por tanto, constituye el grueso de la industria. Sin embargo, el método requiere personal altamente capacitado y costos elevados de puesta en marcha. Se pueden adoptar varios métodos para mejorar el cultivo *in vitro*, incluida la optimización de los medios y las características de fermentación [12]. Por otra parte, el cultivo *in vivo* a nivel comercial explota grandes cantidades de insectos: los especímenes se inoculan con NEP y de los huéspedes infectados se obtiene la cosecha a granel; generalmente se basa en el sistema de trampa blanca, el estándar para el cultivo a escala de laboratorio. Aunque no son la única, las larvas de *Galleria mellonella* constituyen la especie más común para la producción masiva *in vivo*.

El objetivo de este artículo es corroborar la potencialidad de aislamiento y caracterización de cepas selectas de nematodos entomopatógenos (NEP) como agentes de control biológico en la producción sostenible de alimentos. Se espera explotar la virulencia y efectividad del recurso a mediana y gran escala.



Materiales y métodos

Aislamiento de NEP

Las muestras de suelo se recolectaron y procesaron durante una semana mediante el método de cebo para insectos (trampa *Galleria*). Una muestra de suelo representativa de 250 g se colocó en una caja de plástico, para posteriormente inocularse con cinco larvas de estadio tardío de *Galleria mellonella*. Las cajas se almacenaron a 25 °C con un margen de ± 2 °C. Después de cinco días, las larvas muertas fueron recolectadas y transferidas a una trampa blanca [13] para confirmar y recolectar los IJ.

La trampa blanca consiste en un recipiente de plástico con una placa de Petri invertida de 5 cm de diámetro colocada en el fondo. Se dispuso un papel filtro Whatman 4 encima de la placa de modo que sus bordes entablaran contacto con el agua. Posteriormente, se humedeció el papel filtro con agua hasta saturarlo, luego se le colocaron larvas muertas. Después de 5 a 11 días, los IJ emergieron del cadáver y se asentaron en el agua. Todas las muestras se cebaron tres veces con larvas para obtener el máximo número de nematodos beneficiosos.

Extracción de ADN e identificación molecular de NEP

La caracterización molecular se llevó a cabo mediante el análisis de secuencias de ADN ribosómico. En genes nucleares, se emplearon las regiones del espaciador del transcrito interno (ITS) de *Steinernematidae* spp. y *Heterorhabditis* [14]. La extracción de ADN genómico se efectuó moliendo de 1 a 4×10^4 unidades de IJ en un mortero bajo nitrógeno líquido hasta que se formó un polvo blanco fino. Se recogió el polvo y se añadió 1 ml de tampón de extracción (Tris-Cl 10 mM, SDS al 1 %, NaCl 0.4 M, EDTA 5 mM, pH 8). Luego se incubaron 50 μ l de soluciones de proteína κ (0.01 g/ml) y posteriormente se mezclaron durante 30 min a 37 °C y posteriormente durante 60 min a 65 °M.

Seguidamente, la solución se extrajo por duplicado con volúmenes idénticos de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) (v:v:v) y finalmente con cloroformo-álcool isoamílico (24:1) (v/v). El ADN se precipitó de la fase acuosa final añadiendo 2 volúmenes de etanol al 96 % (v/v) y 0.1 volúmenes de acetato de amonio 3 M y colocando la mezcla a 70 °C durante 30 min. El

ADN precipitado se sedimentó en una microcentrífuga y se secó al vacío a temperatura ambiente. El sedimento se suspendió en 50 μ l de tampón TE (Tris-HCl 0.01 M, EDTA 0.001 M, pH -7.5) y se almacenó a 4 °C. La concentración de ácido nucleico se midió en un espectrofotómetro UV-Vis a 260 nm.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para la amplificación de los espaciadores internos transcritos (ITS) del ADN ribosómico se propició con la ayuda de un termociclador y los conjuntos de cebadores referidos por el cebador directo 18S (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') y el inverso (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'). La condición de ciclo incluida fue: 1 ciclo de 94 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C en 30 segundos, 55 °C transcurridos 45 s y 72 °C en el curso de 60 segundos y una extensión final de 72 °C durante 1.3 minutos. Los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta con un sistema de imágenes transiluminador. La búsqueda BLAST indicó una similitud superior al 98 % entre las secuencias de productos de PCR de la muestra recuperada. La secuencia del árbol filogenético fue construida por Untitled ClustalW (Slow/Precisa, IUB).

Aislamiento de bacterias simbióticas (*Xenorhabdus* spp.)

En este procedimiento, las bacterias simbióticas se aislaron de especies de IJ individuales recién cosechadas. Las NEP se cultivaron en larvas de estadio tardío de *G. mellonella* según [15] a 25 °C y se almacenaron a 20 °C durante una semana antes de su uso. Las bacterias simbióticas aisladas de *Steinernema* spp. se extrajeron de una piscina de IJ recién emergidas que se desinfectaron sumergiéndolas en una solución de hipocloruro de sodio al 10 % durante 10 min y luego se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Los IJ esterilizados en la superficie se destruyeron mediante agitación vorticial y el asa llena de suspensión se sembró en placas de agar NBTA (agar nutritivo 0.004 y 2, 3, 5-cloruro de trifeniltetrazolio y azul de bromotimol al 0.025 %) siguiendo el procedimiento de [16]. Se seleccionaron colonias individuales y subcultivaron en NBTA nuevo y este proceso se repitió hasta adquirir colonias puras de simbiontes bacterianos para cada especie de nematodo.

La extracción de ADN se realizó con bacterias simbiotes en el cultivo de dos días de edad a 27 ± 2 °C según [17]. Las colonias bacterianas permanecieron suspendidas en 100 μ l de agua bidestilada y se desgastaron



manteniéndolas a 99 °C durante 15 minutos, seguido de centrifugación a 13 000 rpm y el sobrenadante se utilizó para la reacción de PCR. La subunidad pequeña (16 s) de ARNr se amplificó con los siguientes cebadores y condiciones de PCR:

- Cebador directo: (16 s 20) 5'-AGA GTTTGATCCTGG CTC-3'
- Imprimación inversa: (16 s 1390) 5'-GAC GGG CGG TGT GTA CAA-3'
- Condiciones de ciclo: incluida 1 ciclo de 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 50 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 15 min.

Los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz ultravioleta con un sistema de imágenes transiluminador.

Producción masiva in vitro de NEP usando agitador orbital

Se eligió solo una *Xenorhabdus* spp. en función de su virulencia y patogenicidad, que se sembró en placas NBTA y se incubó durante 48 h a 30 °C. Luego, un asa de una colonia aislada de la bacteria en fase I, se transfirió a 50 ml de medio STB [18] y se incubó durante 36 h a 30 °C y 150 rpm. Posteriormente, se inocularon 150 ml de medio de producción (PM) [19] con caldo de cultivo *Xenorhabdus* spp., STB al 5 % (v/v) y se incubaron durante 60 h a temperatura ambiente 30 °C y 150 rpm. Siguió la composición del medio STB:

- 3 % (p/v) de caldo de tripticasa de soja
- 0.5 % (p/v) de extracto de levadura
- pH-7

Este medio se utilizó para producir *Xenorhabdus* spp., para inocular el medio de producción de NEP y su composición PM fue:

- 2.3 % (p/v) de extracto de levadura
- 1.25 % (p/v) de yema de huevo deshidratada
- 0.5 % (p/v) de cloruro de sodio
- 4 % (v/v) de aceite de canola

Se empleó este método para cocultivar la NEP y su bacteria simbiótica. Los métodos de fermentación se pueden seguir con matraces especiales de tamaño, forma y agitación diseñados con ligeras modificaciones por [20]. Para determinar las concentraciones de nematodos se diluyeron de 10 a 1000 veces con agua estéril. Se usaron triplicados de muestras de 0.1 ml para el recuento microscópico de nematodos totales utilizando microscopía de campo de luz con un aumento de 40x con el recuento resultante multiplicado por el factor de dilución respectivo. El experimento fue realizado por duplicado y cada bioensayo se repitió cuatro veces. Los resultados de las pruebas por duplicado fueron combinadas para el análisis final, realizado con el software SigmaPlot® 12 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, EE. UU.).

Resultados y discusión

Aislamiento y extracción de NEP del suelo

En el presente estudio se describe la abundancia y caracterización molecular, incluyendo la producción en masa de NEP potencial, que se localizó en una zona cultivada y otra no cultivada de Amazcala, Querétaro (Tabla 1). Se recolectaron un total de 100 muestras de suelo de diferentes áreas agrícolas (Figura 1 (a)). En condiciones de laboratorio, las muestras recolectadas se procesaron en una semana utilizando el método de cebo de insectos (trampa *Galleria*, Figura 1 (b y e)). Se colocó una muestra representativa de 250 g en una caja de plástico y se inoculó con cinco estadios tardíos de larvas de *G. mellonella* (Figura 1 (c)). Las cajas se almacenaron a 25 ± 2 °C. Después de cinco días, las larvas muertas fueron recolectadas y transferidas a una trampa blanca para confirmar y recolectar (Figura 1 (d)) juveniles infectantes (IJ). Para la multiplicación en masa de los nematodos (Figura 1 (f)), los IJ aislados se liberaron en un vaso de precipitados de 25 ml y luego se dejaron reposar durante unos treinta minutos. Se descartó el sobrenadante que contenía los residuos y los nematodos se asentaron en el fondo del vaso de precipitados. Con frecuencia, se añadió agua destilada, de tres a cuatro veces, a los IJ que contenían el vaso de precipitados, hasta que la suspensión apareciera transparente. Después, los IJ se almacenaron a una concentración de aproximadamente $1-4 \times 10^3$ IJ/ml en agua destilada con formalina al 0.1 % en



TABLA 1.

Ocurrencia y distribución de NEP y sus características del suelo de diferentes zonas de muestreo de suelo.

un matraz de cultivo tisular, se almacenaron a 19.5 ± 0.5 °C en incubadora DBO, para evitar la falta de oxígeno y la mortalidad de IJ. Los nematodos extraídos se analizaron en el microscopio óptico (Figura 1). La observación arrojó especies de *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. en el suelo. Los nematodos se cultivaron rutinariamente en larvas de *G. mellonella* [21].

SITIO DE MUESTREO	CULTIVOS AGRÍCOLAS/ TIERRA	NEP RECUPERADOS		TIPO DE SUELO	TEMPERATURA DEL SUELO (°C)	CONTENIDO ORGÁNICO (%)	PH	CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (MS/CM)	TOTAL (%) DE STEINERNEMA SPP.	TOTAL (%) DE HETERORHABDITIS SPP.	TOTAL (%) DE NEP RECUPERADOS
		STEINERNEMA SPP.	HETERORHABDITIS SPP.								
Zona I (cultivos agrícolas)	Tomate	++	-	Arcilla	31	4.8	7.13	0.83			
	Pepino	++	-	Arcilla	28	3.9	7.24	1.19			
	Maíz	++	-	Arena	29	4.2	6.90	0.82	8 %	2 %	10 %
Zona II (tierra sin cultivar)	Pastos	+	-	Limo	28	3.3	6.90	0.86			
	Árboles	+	-	Limo	31	3.5	7.01	1.23			
	Plantas perennes	-	++	Limo	29	3.7	7.13	0.83			



FIGURA 1.

Procesamiento de muestras de suelo y Extracción de NEP.

(a) muestra de suelo recolectada del campo agrícola; (b) la larva de la polilla de la cera mayor (*G. mellonella*) (Pyralidae, Lepidoptera) se utilizó como insecto modelo para el aislamiento de NEP; (c) el cebo en Galería de muestras de suelo con larvas sanas en una caja de plástico bien cerrada con orificio de oxígeno, después de 5 a 7 días de cebo muestra larvas muertas si su suelo contiene NEP; (d) cadáver de *G. mellonella* infectados con *Steinernema* spp en tres diferentes medios de cultivo. (e) método de reventado de blancos para extracción de IJ de NEP; (f) aparición de IJ en larvas de *G. mellonella*; (g) vista microscópica de NEP. cuyo diámetro aerodinámico es 2.5 μ m.

Identificación molecular y análisis filogenético

Para autenticar los genes nucleares aislados recuperados, se llevó a cabo un análisis *in silico* de las secuencias obtenidas con los datos de la región espaciadora del transcrito interno (ITS). Los aislamientos mostraron el patrón de desarrollo típico de *Steinernema* spp. y *Heterorhabditis* spp. Las investigaciones taxonómicas revelaron que, de los 10 aislamientos, GC-06, GC-15, GC-26, KTM-08, GC-38, GC-41, KTM-32 y GC-48 pertenecen a *Steinernema* spp. GC-64, GC-89 conciernen a *Heterorhabditis* spp. (Tabla 2). Se eligió solo un NEP (KTM-08) para un estudio molecular adicional basado en la virulencia y la patogenicidad. El resultado de la amplificación de las ITS produjeron una secuencia de nucleótidos de 600 pares de bases (pb) que forman parte del 18 s parcial (ITS 1, ITS 2, Figura 2 (a)). La secuencia obtenida del aislado NEP tenía un 99 % de similitud con la de *Steinernema* spp. de aislamientos estrechamente relacionados; en cambio, la similitud con las secuencias de otros *Steinernema* spp. relacionados se puede observar en la Figura 2. Por otro lado, también existen reportes de la especie *S. siamkayai* del continente asiático [22], [23]. En este caso, esta especie se encontró dentro de campos de cultivo y prados en zonas cálidas. No obstante, también hay reportes de ocurrencias de aislamiento de *S. siamkayai* alrededor del mundo, en todo tipo de hábitats y condiciones climáticas.

TABLA 2.

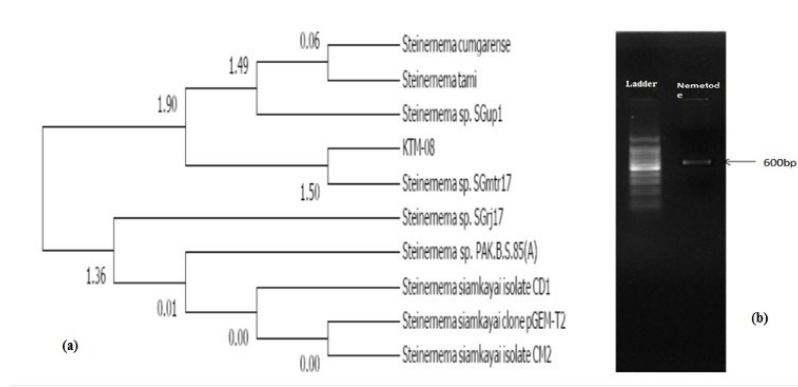
Atributos de infectividad en IJ de NEP en larvas de *G. mellonella*.

RECUPERADO AISLAR CÓDIGO DE MUESTRA	APARICIÓN LARVAS CADAVÉRICAS DE GALLERIA INFECTADAS	(%) DE TASA DE INFECTIVIDAD (HORAS)		TIEMPO PROMEDIO DE DURACIÓN DE LA INFECCIÓN (HORAS)	PRODUCCIÓN Y DESARROLLO DE NEP EN CADÁVER (DÍAS)	TIEMPO DE DURACIÓN DE LA EMERGENCIA IJ (DÍAS)
		STEINERNEMA SPP.	HETERORHABDITIS SPP.			
GC-06	Negro	45	-	24 - 48	4 - 5	6
GC-15	Negro	35	-	72 - 96	6 - 7	6
GC-26	Negro	40	-	24 - 48	5 - 6	7
KTM-08	Negro	50	-	24 - 48	4 - 5	8
GC-38	Negro	45	-	24 - 48	4 - 5	6
GC-41	Marrón	35	-	48 - 72	5 - 6	7
KTM-32	Marrón	40	-	48 - 72	6 - 7	7
GC-48	Marrón	30	-	48 - 96	6 - 7	6
GC-64	Marrón grisáceo	-	45	48 - 96	5 - 6	7
GC-89	Rojo	-	40	24 - 48	4 - 5	6



FIGURA 2.

Resultados del an3lisis gen3tico de NEP de *Steinernema*.



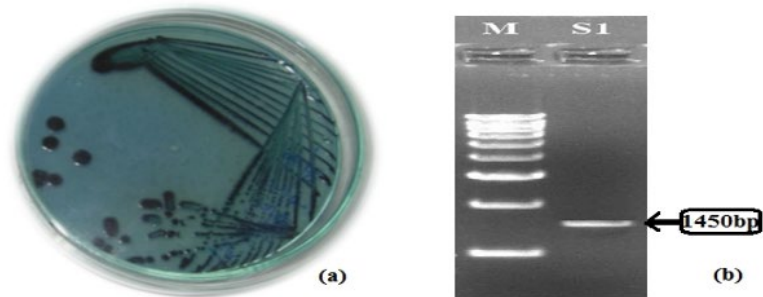
(a) 3rbol filogen3tico de *Steinernema siamkayai* (KTM-08); (b) im3genes de PCR para especies de *Steinernema* spp. de tierras agr3colas utilizando cebadores espec3ficos de especies ITS m3s marcador de ADN.

Aislamiento e identificaci3n de bacterias simbi3ticas

Para el nivel primario se observ3 la identificaci3n de colonias bacterianas simbi3ticas en base a la absorci3n de colorantes de azul de bromotimol y trifenil tetrazolio de placas NBTA (Figura 3 (a)). En las observaciones basadas en la morfolog3a de la colonia azul-verde, las tres cepas aisladas pertenec3an al g3nero *Xenorhabdus* spp. aislados de IJ de *Steinernema* spp. Para una mayor autenticaci3n, se identificaron bacterias simbi3ticas aisladas a nivel molecular a trav3s de la secuenciaci3n del gen codificante al 16 S ARNr. El simbiote se amplific3 mediante el uso de cebadores de PCR que representan regiones del ARNr 16 S conservadas en bacterias. Las cepas produjeron una 3nica banda de aproximadamente 1450 pb (Figura 3 (b)).

FIGURA 3.

Muestra el crecimiento de bacterias simbi3ticas en la placa petri y caracterizaci3n molecular.



(a) Colonias de color azul que muestran *Xenorhabdus stockiae*; (b) im3genes de fragmentos amplificados por PCR de ARNr 16s en *X. stockiae*.

Se recuperaron NEP de diferentes especies (10 %) y su prevalencia ha sido reportada con antelación bajo diferentes condiciones ambientales. Parámetros como el clima, altitud, vegetación y diversidad de hábitats son factores diferenciales en las caracterizaciones de sus nichos ecológicos. Por eso, tener evidencia de ocurrencia de una riqueza de diez especies de NEP del suelo agrícola, es un indicador importante de su asociación con insectos plaga. Todas las muestras positivas se recuperaron de suelos arcillosos. Con las fuentes consultadas, se puede encontrar la coincidencia en que la movilidad y supervivencia de NEP se ve favorecida en suelos con alto contenido de arena [24], [25]. Con los resultados de este estudio se demuestra la riqueza, diversidad y abundancia de las poblaciones de NEP en diferentes ambientes (arables y forestales). Se observa que cada especie tiene un patrón de distribución característico, y con ayuda de la cladograma a nivel de ADN nuclear, se perciben polimorfismos que efectivamente confirman las adaptaciones y la diferencia de poblaciones según las condiciones ambientales de estos organismos. Por otro lado, la presencia de *Steinernematidae* en la mayoría de las áreas estudiadas indica el papel potencial de estos nematodos en la regulación natural de las poblaciones de insectos. Y, de hecho, se tiene una ratio de 4:1 S:H en ocurrencia de especies en las muestras estudiadas.

Cultivo masivo *in vitro* de NEP

Hasta ahora, se han abordado las propiedades de poblaciones de NEP en sus ambientes nativos. No obstante, para saber si estas poblaciones son viables para ser cultivadas fuera de su ambiente natural, se requirió llevar a cabo cultivos exógenos e *in vitro* con semilla obtenida de las poblaciones silvestres. Dentro de los procesos de producción en masa de NEP es fundamental conocer las condiciones óptimas para realizar de manera exitosa el cultivo líquido *in vitro* de la mayor cantidad de organismos. Las variables que se consideraron en este estudio, para el cultivo masivo de NEP, son mencionadas en la Tabla 3. Entre ellos, los objetivos fundamentales son el tiempo de cultivo, la temperatura y el pH. De manera subjetiva y secundaria, se tiene el volumen del medio y del matraz y las revoluciones por minuto (RPM) que se emplean para mantener en resuspensión el cultivo. En suma, se intenta hacer una mezcla homogénea



con una agitación constante. Para este objeto, las técnicas referidas en la investigación fueron empleadas por [26] y [27]. Los presentes estudios exploran la producción de cultivos líquidos de *S. siamyakai*. En la Tabla 3 se mencionan las condiciones empleadas para el cultivo masivo de NEP.

El cultivo comenzó con esterilización de las larvas NEP con IJ suspendidos en una solución líquida de hiamina al 0.125 % por 20 minutos. Posteriormente, el concentrado de la muestra de IJ fue lavado con abundante agua esterilizada. A continuación, se procedió a inocular los IJ en cajas de petri con el fin de establecer los primeros stocks de cultivo axénico las bacterias *Xenorhabdus spp.* Para esto, se utilizó el medio de cultivo STB:

1. La primera etapa consistió en inocular 50 ml de medio contenidos en matraces con volumen de 250 ml por 36 horas.
2. En la segunda se compensó el medio ya consumido con otros 120 ml de medio, por 48 horas adicionales.
3. Después que el crecimiento bacteriano alcanzó la densidad poblacional de 4×10^3 IJ/ml, se logró llegar a la fase estacionaria.

Finalmente, para alcanzar la fase de cultivo masivo, se transfiere el cultivo a un biorreactor de matraz de agitación. Esta fase corresponde a 10 muestras, cada biorreactor con 10 ml de medios de producción con IJ desinfectados (Tabla 3).

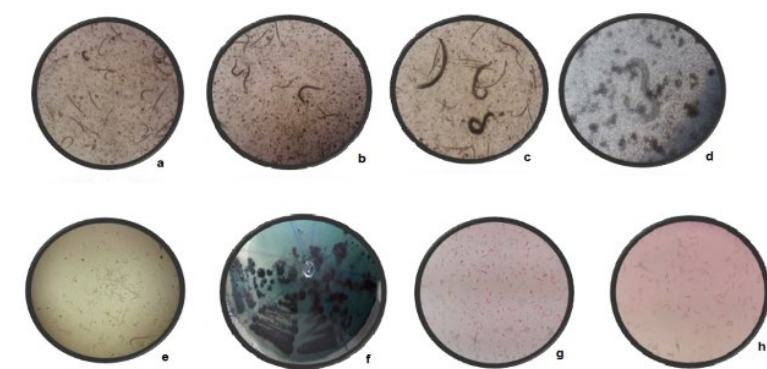
TABLA 3.

VARIABLES DE CRECIMIENTO EMPLEADAS EN BACTERIAS SIMBIÓTICAS (*Xenorhabdus spp.*) USANDO MEDIOS LÍQUIDOS DE PRODUCCIÓN DE *Steinernema spp.* CONTROLADOS POR MEDIDAS FÍSICAS Y MECÁNICAS.

MEDIO	DÍAS/HORAS	pH	TEMPERATURA	RPM (REVOLUCIONES POR MINUTO)	VOLUMEN DE MEDIOS (ML)	VOLUMEN DEL MATRAZ (ML)
Medio STB	36 horas	7.2	30	130	50	250
Medio de producción	48 horas	8.0	30	130	120	500
Biorreactor de matraz de agitación diseñado	8 días	8.2	25	130	10	120

FIGURA 4.

Microfotografías de luz de las etapas de desarrollo de *Steinernema* sp. Durante la incubación en medio de producción.



(a) IJ 2; (b) IJ 4; (c) hembras jóvenes/hermafroditas; (d) adulto; (e) oviposición y J1; (f) fase primaria y secundaria del crecimiento bacteriano; (g) colonias bacterianas en los medios de producción; (h) colonias bacterianas en medios STB.

La cría de bacterias simbióticas tiene por objetivo aprovecharlas para potenciar tanto la virulencia como la productividad de IJ en cultivos líquidos *in vitro* de NEP (Figura 4) [28]. Sin embargo, durante la producción de NEP, los IJ se recuperaron y se desarrollaron rápidamente en diferentes etapas:

- Figura 4 (a) el día 1, muestra el IJ2.
- Figura 4 (b) el día 3, muestra J4.
- Figura 4 (c) el día 5, muestra las hembras jóvenes/hermafroditas.
- Figura 4 (d) el día 6, muestra al adulto.
- Figura 4 (e) el día 8, muestra a los adultos productores de huevos.

En la Figura 4 (paneles g y h), se percibe un desarrollo sobresaliente observado en el proceso de población de nematodo que ocurrió alrededor del día 5. Tanto el medio STB como el PM favorecieron el crecimiento de *Xenorhabdus* spp., que creció en placas NBTA inoculadas con muestras de caldo de cultivo. En cambio, en el panel 4f se muestran las fases primarias y secundarias que se dieron durante el cultivo.

En el caso de la curva de crecimiento de la densidad del cultivo, los valores se pueden observar en la Figura 5. En este caso, se explicita el lugar gráfico de las densidades de nematodos en función del tiempo y el modo de fermentación utilizado para la producción en masa. Durante los primeros 3 días de procesos, la densidad de nematodos no cambió, el resultado se mantuvo en 4×10^3 IJ/ml. Las concentraciones máximas de nematodos después de ocho días, seguido de los pro-

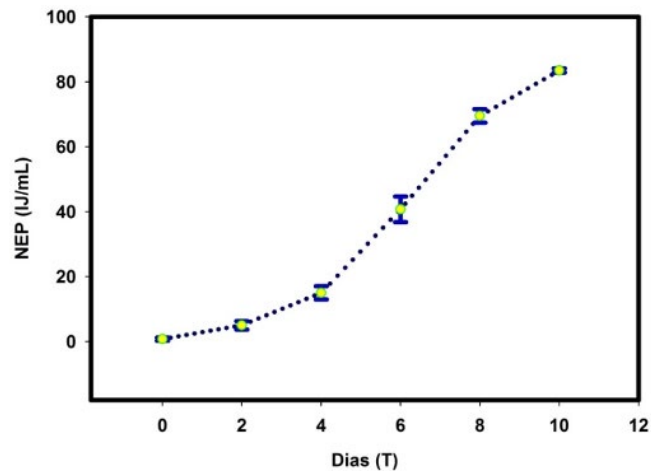


FIGURA 5.

Aumento de las densidades de *Steinernema* spp. en relación con el tiempo y el proceso de producción. Al final del período de producción: la densidad inicial de NEP es de 4×10^3 IJs/ml y la concentración final de NEP final es de 85×10^3 IJ/ml, con el 95 % de ellos en la etapa infectiva juvenil (IJ).

cesos de inoculación, fueron 85×10^3 IJ/ml. Este resultado confirma lo reportado anteriormente en la literatura, y también coincide el registro ocular correspondiente a una adecuada recuperación de NEP y al creciente número de hembras reproductivas [29], [30].

Por tanto, se ha registrado un crecimiento de 11 veces su densidad sobre la población original, en tan solo 10 días.



Conclusión

En el presente trabajo se realizó la caracterización de NEP silvestres y su domesticación. Se describe la metodología para llevar a cabo este proceso en otros niveles variados de poblaciones no comerciales de NEP. Su ejecución plantea un modelo probado de cultivo de poblaciones de organismos entomopatógenos que son inocuos al ambiente y que no representan un riesgo antes, durante y después del cultivo de alimentos. Así mismo, se describen aspectos relevantes de las poblaciones silvestres y parámetros útiles de producción de NEP a nivel de laboratorio. Al probarse la metodología, se abre un nuevo panorama para futuras investigaciones de sinecología comparativa, así como la nueva documentación de casos de éxito (de este modelo) que prescinde de compuestos dañinos al ambiente. Cabe destacar que, dada su simpleza, la técnica puede implementarse en pequeños laboratorios en diversos ambientes, con lo cual no se depende directamente de proveedores ni de abastos. Las líneas de investigación que abre el presente estudio para evaluar en profundidad los alcances de estos métodos anteriormente descritos

son bastante amplias, desde fenómenos sinecológicos hasta agroecológicos, pasando por todos los niveles de complejidad de las interacciones ecológicas para propiciar cultivos más sostenibles y rendimientos más productivos.



Referencias

- [1] G. Chandrakasan, M. T. Ayala, J. F. G. Trejo, G. Marcus, M. Maruthupandy, C. C. Kanisha, M. Murugan, F. A. AL-mekhlafi y M. A. Wadaan, "Bio controlled efficacy of *Bacillus thuringiensis* cry protein protection against tomato fruit borer *Helicoverpa armigera* in a laboratory environment", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, vol. 119, pp. 101827, 2022.
- [2] A. Thanwisai, P. Muangpat, W. Meesil, P. Janthu, A. Dumida, C. Subkrasae, J. Ardpairin, S. Tandhavanant, T. P. Yoshino y A. Vitta, "Entomopathogenic Nematodes and Their Symbiotic Bacteria from the National Parks of Thailand and Larvicidal Property of Symbiotic Bacteria against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*", *Biology*, vol. 11, no. 11, pp. 1658, 2022.
- [3] M. E. Aalaoui, F. Mokri, A. A. Dababat, R. Lahlali y M. Sbaghi, "Moroccan entomopathogenic nematodes as potential biocontrol agents against *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae)", *Scientific Reports*, vol. 12, no. 7590, pp. 1-7, 2022.
- [4] G. Chandrakasan, P. Seetharaman, S. Gnanasekar, M. Kadarkarai y S. Sivaperumal, "Xenorhabdus stockiae KT835471-mediated feasible biosynthesis of metal nanoparticles for their antibacterial and cytotoxic activities", *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, vol. 45, no. 8, pp. 1675-1684, 2017.
- [5] J. Ramakrishnan, L. Salame, A. Nasser, I. Glazer y D. Ment, "Survival and efficacy of entomopathogenic nematodes on exposed surfaces", *Scientific Reports*, vol. 12, no. 1, p. 4629, 2022.
- [6] G. O. Poinar y G. M. Thomas, "Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (*Achromobacteriaceae: Eubacteriales*) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp. *Steinernematidae*)", *Parasitology*, vol. 56, no. 2, pp. 385-390, Mayo 1966.
- [7] A. F. Bird y R. J. Akhurst, "The name of the intestinal vesicle in Nematodes of the family *Steinernematidae*", *International Journal for Parasitology*, vol. 13, no. 6, pp. 599-606, Dic. 1983.

- [8] S. Forst y K. Neelson, "Molecular Biology of the Symbiotic-Pathogenic Bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp.", *Microbiology Reviews*, vol. 60, no. 1, pp. 21-43, 1996.
- [9] M. D. Kaya, G. Okçu, M. Atak, Y. Çikili y Ö. Kolsarici "Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.)", *European Journal of Agronomy*, vol. 24, no. 4, pp. 291-295, 2006.
- [10] Z. Mráček, S. Bečvář, P. Kindlmann y J. Jersáková, "Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic", *Biological Control*, vol. 34, no. 1, pp. 27-37, 2005.
- [11] D. I. Shapiro-Ilan y W. A. Gardner, "Improved control of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae) through multi-stage pre-emergence applications of *Steinernema carpocapsae*", *Journal of Entomological Science*, vol. 47, no. 1, pp. 27-34, Ene. 2012.
- [12] L. G. Leite, D. I. Shapiro-Ilan, S. Hazir y M. A. Jackson, "Effect of inoculum age and physical parameters on *in vitro* culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*", *Journal of Helminthology*, vol. 91, no. 6, pp. 686-695, 2016.
- [13] G. F. White, "A method for obtaining infective nematode larvae from cultures", *Science*, vol. 66, no. 1709, pp. 302-303, 1927.
- [14] S. P. Stock, J. F. Campbell y S. A. Nadler, "Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters", *Journal of Parasitology*, vol. 87, no. 4, pp. 877-889, 2001.
- [15] S. R. Dutky, J. V. Thompson y G. E. Cantwell, "A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode," *Journal of Insect Physiology*, vol. 6, no. 4, pp. 417- 422, 1964.
- [16] R. J. Akhurst, "Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*", *Journal of General Microbiology*, vol. 121, pp. 303-309, 1980.
- [17] P. Tailliez, S. Pages, N. Gini-bre y N. E. Boemare, "New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including



the description of ten novel species", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, no. 12, pp. 2805-2818, 2006.

- [18] E. J. Buecher y I. Popiel, "Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont", *Journal of Nematology*, vol. 21, no. 4, pp. 500-504, 1989.
- [19] N. Chavarría-Hernández y M. de la Torre, "Population growth kinetics of the nematode, *Steinernema feltiae*, in submerged monoxenic culture," *Biotechnology Letters*, vol. 23, no. 4, pp. 311-315, 2001.
- [20] S. J. Pérez-Campos, A. I. Rodríguez-Hernández, M. R. López-Cuellar, A. Zepeda-Bastida y N. Chavarría-Hernández, "In vitro liquid culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense*, in orbitally shaken flasks", *Biocontrol Science and Technology*, vol. 28, no. 9, pp. 901-911, 2018.
- [21] D. I. Shapiro-Ilan, E. E. Lewis, R. W. Behle y M. R. McGuire, "Formulation of entomopathogenic nematode-infected cadavers", *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 78, no. 1, pp. 17-23, 2001.
- [22] H. B. Khatri-Chhetri, L. Waeyenberge, H. K. Manandhar y M. Moens, "Natural occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in Nepal", *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 103, no. 1, pp. 74-78, 2010.
- [23] K. Lalitha, K. Nithya, B. G. Bharathi, S. Venkatesan y M. S. Shivakumar, "Long-term storage does not affect the infectivity of entomopathogenic nematodes on insect hosts", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 107, no. 7, pp. 419-431, 2022.
- [24] S. Hazir, N. Keskin, S. P. Stock, H. K. Kaya y S. Özcan, "Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (*Rhabditida: Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) in Turkey", *Biodiversity and Conservation*, vol. 12, no. 2, pp. 375-386, 2003.
- [25] N. E. Kary, G. Niknam, C. T. Griffin, S. A. Mohammadi y M. Moghaddam, "A survey of entomopathogenic nematodes of the families *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae* (*Nematoda: Rhabditida*) in the north-west of Iran," *Nematology*, vol. 11,

- no. 1, pp. 107-116, 2009.
- [26] M. D. Dunn, P. D. Belur y A. P. Malan, "A review of the in vitro liquid mass culture of entomopathogenic nematodes," *Biocontrol Science and Technology*, vol. 31, no. 1, pp. 1-21, 2021.
- [27] C. I. Cortés Martínez y N. Chavarría Hernández, "Production of entomopathogenic nematodes in submerged monoxenic culture: a review", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 117, no. 12, pp. 3968-3985, 2020.
- [28] N. E. Boemare y R. J. Akhurst, "The Genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*" in *The Prokaryotes: Vol. 6, Proteobacteria: Gamma subclass*, New York: Springer-Verlag, pp. 451- 494, 2002.
- [29] D. Upadhyay, R. Kooliyottil, S. Mandjiny, F. L. Inman y L. D. Holmes, "Mass production of the beneficial nematode *Steinernema carpocapsae* utilizing a fed-batch culturing process", *International Journal of Phytopathology*, vol. 2, no. 1, pp. 52-58, Abr. 2013.
- [30] A. Hirao y R. U. Ehlers, "Influence of inoculum density on population dynamics and dauer juvenile yields in liquid culture of biocontrol nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda: Rhabditida)," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 85, no. 3, pp. 507-515, 2010.

