



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

BÚSQUEDA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *SERRATIA* SPP.
(ENTEROBACTERIACEAE) ENTOMOPATÓGENO DE LARVAS DE
MELOLONTHIDAE (COLEOPTERA) EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA
"EL CIELO", TAMAULIPAS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

MARCO AURELIO CALDERÓN MEDINA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO JAVIER VILLALOBOS HERNÁNDEZ
ASESORA EN MICROBIOLOGÍA: M. EN C. ROSA MARÍA RAMÍREZ GAMA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

1998

TESIS CON
FACULTAD DE

263874

26
201





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Búsqueda, Aislamiento e Identificación de Serratia spp (Enterobacteriaceae) entomopatógeno de larvas de Melolonthidae (Coleoptera) en la Reserva de la biosfera "El Cielo", Tamaulipas.

realizado por Marco Aurelio Calderón Medina

con número de cuenta 7605175-5 , pasante de la carrera de Biología

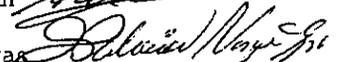
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Francisco Javier Villalobos Hernández 

Propietario M. en C. Rosa María Ramírez Gama 

Propietario M. en C. Alfredo Echegaray Alemán 

Suplente Dr. José Guadalupe Palacios Vargas 

Suplente Dra. Norma Eugenia García Calderón 

Consejo Departamental de Biología

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

Edna M. Suarez D.

DEPARTAMENTO
DE BIOL.

Abreviaturas utilizadas en el presente estudio

AADO	Agar Adonitol
ADNasa	Agar para la prueba de la desoxirribonucleasa
AHK	Agar Hierro de Klieger
AITA	Agar Itaconato
ALB	Agar Luria Bertani
ASBI	Agricultura Sustentable de Bajos Insumos
ATC	Agar Talio-Capriolato
Cc	centímetros cúbicos
CBP	Control Biológico de Plagas.
CP	Cepas problema
Cz	<i>Costelytra zealandica</i> (White) (Coleoptera: Scarabaeidae)
EA	Enfermedad ambarina
GN	Gelosa Nutritiva o Agar Nutritivo
h	horas
ha	Hectáreas
ID ₅₀	(Infectious Dose) Índice de la evaluación de la dosis requerida para causar una infección demostrable en el 50% de los organismos expuestos
LT ₅₀	(Lethal Time) Tiempo Letal medio es un índice del tiempo en que el 50% de los organismos en tratamiento están muertos por causa de este.
mg	miligramos
mM	micro Molar
µm	micrómetro
° C	grados centígrados
PB	Pruebas Bioquímicas
<i>Ph.</i>	<i>Phyllophaga</i> spp.
pH	potencial hidrógeno
<i>Pm</i>	<i>Phyllophaga</i> (Anodontata) <i>misteca</i> (Bates) (Coleoptera: Melolonthidae)
<i>Pt</i>	<i>Phyllophaga</i> (Phytalus) <i>trichodes</i> (Bates) (Coleoptera: Melolonthidae)
RBEC	Reserva de la Biosfera "El Cielo"
SSIE	Solución Salina Isotónica Estéril
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

DEDICO ESTE TRABAJO:

A LA MEMORIA DE MI PADRE

DR. LUIS CALDERÓN BARRIOS

**PRESENCIA CONSTANTE EN MI PENSAMIENTO
FUENTE DE MI INSPIRACIÓN Y AMOR
EJEMPLO DE HONESTIDAD E INQUIETUD INTELECTUAL.**

**A mi madre.
A mis hermanos.
A mis cuñados.
A mis amigos.**

...dormí sueños de piedra que no sueña
y al cabo de los años como piedras
oí cantar mi sangre encarcelada,
con un rumor de luz el mar cantaba,
una a una cedían las murallas,
todas las puertas se desmoronaban
y el sol entraba a saco por mi frente,
despegaba mis párpados cerrados,
desprendía mi ser de su envoltura,
me arrancaba de mi ser de su envoltura,
me arrancaba de mí, me separaba
de mí bruto dormir siglos de piedra
y su magia de espejos revivía
un sauce de cristal, un chocho de agua,
un alto surtidor que el viento arquea,
un árbol bien plantado mas danzante,
un caminar de río que se curva,
avanza, retrocede, da un rodeo
y llega siempre:

*Octavio Paz, Piedra de Sol
México, 1957*

Agradecimientos.

Deseo hacer un profundo reconocimiento a todos aquellos que contribuyeron a hacer posible la elaboración del presente trabajo.

Al Instituto de Ecología A. C. (Xalapa, Veracruz) en general y en particular a los departamentos de Biosistemática de Insectos, Biología de suelos y Laboratorio de Plantas Vasculares por el apoyo logístico para el mantenimiento de las larvas y la realización de los primeros bioensayos.

A la Dra. María Eugenia Nuñez-Valdéz por la valiosa aportación de 4 cepas aisladas de larvas enfermas y probadas en bioensayo en el presente trabajo, por su contribución en el diseño de la metodología experimental de los bioensayos, y muy especialmente por su amistad de mucho tiempo.

Al laboratorio de Microbiología Experimental del departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM cuyos colaboradores (M. en C. Guadalupe Tsuzuki, QFB Elda Peniche Quintanilla, Biol. Carmen Urzúa, QFB Laura Isabel Cedillo, Biol. Hilda María del Carmen Ruiz y Biol. Rosalba Esquivel) han sido una fuerza constante de aliento y quienes aportaron valiosas ideas que enriquecieron la investigación, y cuya amistad me ha beneficiado en el aspecto humano. Reconozco así mismo el valioso trabajo de los siguientes alumnos de la Facultad de Química: Lizzette Cortés, Tonatzin Zapata, Fabiola Arredondo, Yazbeth Ortiz, Marielena Tenorio, Tayde V. Rojas y Valentín Gómez. Quienes en cumplimiento de su servicio social trabajaron duras jornadas en el laboratorio en apoyo a esta tesis. Es de reconocer el trabajo de los laboratoristas Sr. Tomás Hernández, Sr. Roberto Zaldívar y Sr. Crisostomo Lugo quienes aportaron los pequeños detalles que dan tantos años de labor en apoyo a la investigación.

A la población del ejido "20 de Abril", Joya de Salas, reserva de la biosfera "El Cielo" por recibirme y darme a conocer la riqueza que encierra su corazón.

A la Facultad de Química por su prolífica actividad científica y muy especialmente a los jefes de los laboratorios de Medios de Cultivo (QFB. Adriana Mejía) y Laboratorio de Cepario (Biol. Luciano Hernández) quienes aportaron, sin restricción alguna, los reactivos, material de soporte y cepas microbiológicas de referencia para la realización de las bioquímicas de las cepas aisladas en el presente estudio.

Al jurado revisor constituido por la M. en C. Rosa María Ramírez-Gama, M. en C. Alfredo Echegaray Alemán, Dr. José Guadalupe Palacios Vargas y a la Dra. Norma Eugenia García Calderón quienes hicieron enriquecedoras observaciones a los manuscritos de la tesis. Reconocimiento aparte ofrezco a la Maestra Rosa María quien dio cauce a todo el ímpetu desbocado de mi energía y por las muchas horas de extrema paciencia al sentarse a revisar no sólo la metodología para el laboratorio de microbiología y los numerosos manuscritos, sino también a ser un apoyo en momentos de extrema desilusión.

Y finalmente un profundo reconocimiento al Dr. Francisco Javier Villalobos Hernández, director de la presente tesis, quien me ha rescatado de muy difíciles situaciones personales. Sería muy extenso resumir el amor filial que nos une, Valga este trabajo como un homenaje a nuestra añeja amistad.

Búsqueda, aislamiento e identificación de <i>Serratia</i> spp. (Enterobacteriaceae) entomopatógeno de larvas de Melolonthidae (Coleoptera) en la Reserva de la Biosfera "El Cielo", Tamaulipas.	1
I. Introducción.	1
II. Antecedentes.	4
A. Importancia de las larvas de Melolonthidae en la agricultura.	4
B. Necesidad de una agricultura sustentable de bajos insumos (ASBI).	5
C. Control Biológico de Plagas.	5
D. El papel de los entomopatógenos.	6
E. Control Biológico por <i>Serratia</i> spp.	7
F. Descripción de la zona de estudio.	9
III. Objetivos.	11
A. Objetivo general.	11
B. Objetivos particulares.	11
IV. Materiales y Métodos.	12
A. Zona de Muestreo.	12
B. Obtención y Manejo de larvas de <i>Phyllophaga</i> spp.	12
B.1. Colecta de larvas de <i>Phyllophaga</i> spp. en zonas de cultivos de maíz.	12
B.2. Identificación de larvas de <i>Ph. trichodes</i> (Pt.)	12
B.3. Manejo y mantenimiento de las larvas en el laboratorio para el bioensayo.	13
B.4. Selección de larvas utilizadas en el bioensayo.	14
B.5. Selección de larvas para efectuar el aislamiento de bacterias.	14
C. Aislamiento e identificación preliminar de cepas bacterianas, posibles agentes causales de la enfermedad.	14
C.1. Técnica de aislamiento.	14
C.2. Conservación de las cepas.	16
C.3. Identificación preliminar de <i>Serratia</i> spp.	16

D. Bioensayo de infección.....	17
D.2. Bioensayos.....	18
D.3. Observación de la evolución de las larvas.....	20
E. Recuperación de bacterias a partir del hospedero infectado.....	20
E.1. Aislamiento de bacterias a partir de larvas que enfermaron en el bioensayo.....	20
E.2. Pruebas de Identificación.....	21
E.3. Pruebas de Identificación de <i>Serratia</i> spp.....	22
F. Organigrama de trabajo.....	26
V. Resultados y Discusión.....	27
A. Muestreo.....	27
B. Observaciones cualitativas de la enfermedad en Ph.....	27
C. Densidad de larvas.....	29
C.1. Justificación del uso de <i>Serratia</i> como agente de control biológico.....	32
D. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas candidatas.....	32
E. Bioensayos.....	35
E.1. Color ámbar.....	36
E.2. Supervivencia y morbi-mortalidad.....	40
E.3. Alimentación de las larvas en bioensayo.....	43
E.4. Peso de las larvas en bioensayo de infección.....	47
F. Recuperación de bacterias a partir del hospedero infectado.....	48
G. Identificación de las cepas aisladas.....	52
VI. Conclusiones.....	59
VII. Bibliografía.....	60

**Búsqueda, aislamiento e identificación de *Serratia* spp.
(Enterobacteriaceae) entomopatógeno de larvas de
Melolonthidae (Coleoptera) en la Reserva de la Biosfera
“El Cielo”, Tamaulipas.**

I. Introducción.

Las gallinas ciegas (larvas de Coleoptera Melolonthidae) causan estragos en los rendimientos de diversos cultivos al dañar su sistema radicular (Morón, 1984). El control de estas plagas en los campos mexicanos permitiría obtener rendimientos anuales de maíz equivalentes al promedio mundial de esta gramínea (Villalobos, 1992). Para su control se han intentado numerosos métodos, sin embargo algunos de ellos han ocasionado consecuencias indeseables para el medio ambiente (Villalobos, 1992). En este sentido el control biológico es una alternativa que encaja dentro de los principios de la agricultura sustentable (Villalobos, 1995).

Las bacterias del género *Serratia*, causantes de la enfermedad ambarina, han sido utilizadas en un programa exitoso de control biológico de larvas del escarabajo *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeidae) (Cz) en la agricultura de pastizales de Nueva Zelanda (Jackson *et al.*, 1992). Dicha enfermedad ha sido reportada en otros Melolonthidae como: *Rhizotrogus* (= *Amphimallon*) *majalis* (Razoumowsky) (Klein y

Jackson, 1992); en el escarabajo japonés *Popillia japonica* en Ohio; *Melolontha melolontha* y *M. hippocastini* en Europa (Tanada y Kaya, 1992 en Villalobos, 1997 a)

La enfermedad ambarina es causada por *S. entomophila* y *S. proteomaculans* bacterias que inhiben la alimentación de las larvas infectadas a través de la acción de una toxina (Jackson *et al.*, 1993; Nuñez-Valdéz, 1994). La muerte de larvas infectadas por *Serratia* tiene lugar de 1 a 3 meses después de que se inicia la enfermedad (Jackson *et al.*, 1992). Las perspectivas que ofrece el estudio en el ámbito molecular de los mecanismos de patogenicidad que se presentan en estas bacterias son enormes (Nuñez-Valdéz, 1993). Por otra parte las interacciones que se establecen entre la bacteria, las gallinas ciegas y la materia orgánica del suelo muestran que es posible insertar a este microorganismo dentro de un esquema de agricultura sustentable (Villalobos, 1997b).

Estudios previos sugieren que larvas de *Phyllophaga* (*Phytalus*) *trichodes* (Bates) (Coleoptera: Melolonthidae) (*Pt*) y *Ph.* (*Anodentata*) *misteca* (Bates) (Coleoptera: Melolonthidae) (*Pm*) son las principales responsables de pérdidas en el cultivo del maíz en la reserva de la biosfera "El Cielo", Tamaulipas; y que en numerosas ocasiones dichas larvas presentan síntomas de enfermedad ambarina (Villalobos, 1997 a)

El presente estudio tiene como objetivos comprobar la presencia de bacterias del género *Serratia* en estas larvas y demostrar que ésta es el agente causal de la enfermedad mediante la aplicación de los postulados de Koch.

En este trabajo se hizo un muestreo a ocho parcelas ubicadas en el área de cultivo de la Joya de Salas, reserva de la biosfera "El Cielo" (RBEC). Se determinó el número de larvas totales y enfermas por m², se obtuvieron cultivos bacterianos a partir de macerados de las larvas enfermas; para comprobar si los cultivos aislados eran los agentes causales de la enfermedad, estos fueron inoculados (por ingesta) a larvas sanas y se logró inducir la

enfermedad con algunas de las cepas bacterianas probadas. A partir de las larvas que desarrollaron la enfermedad ambarina (EA) durante el bioensayo se efectuó el aislamiento o recuperación de las bacterias. Finalmente para comprobar que las bacterias inoculadas correspondían a las recuperadas, se procedió a caracterizarlas mediante observación microscópica y aplicación de 44 pruebas bioquímicas, se sugiere que la enfermedad es causada por dos especies de *Serratia* y que una de estas (*S. liquefaciens*) por su patogenicidad tiene un mayor potencial como agente de biocontrol para larvas de *Pt.*

II. Antecedentes.

A. Importancia de las larvas de Melolonthidae en la agricultura.

En la gran mayoría de los cultivos de importancia económica, se ha reportado algún tipo de plaga, que abate los rendimientos. Los coleópteros Melolonthidae se consideran como plagas en cultivos de gramíneas, leguminosas, rosáceas y solanáceas (Morón, 1984). Un 40% de las 150 especies de plagas reportadas para el maíz son coleópteros rizófagos. Después de los lepidópteros, las larvas de Melolonthidae representan un 2° lugar en importancia como plaga del maíz (Ríos, 1986 en Villalobos, 1992).

El complejo de especies de Melolonthidae en México es muy diverso. Esta familia está representada por 520 especies cuyos estados larvales se presentan en el suelo y pertenecen a 13 géneros (Morón, 1984). Dicha diversidad ha sido explicada como resultado del solapamiento de las zonas biogeográficas Neártica y Neotropical (Villalobos, 1992). Muchas de las especies de esta familia son consideradas como rizófagas. El segundo y principalmente el tercer estadio larval son señalados como los más perjudiciales para las plantas, puesto que pueden provocar la muerte de la planta al cercenar sus raíces (Morón, 1988).

Las pérdidas en la agricultura ocasionadas por larvas de *Phyllophaga* varían de 0.4 a 1.1 ton ha⁻¹ año⁻¹ (Rodríguez-del-Bosque, 1988; López Olguín y Aragón, 1989). Los mayores estragos se presentan en 10 estados centrales de México, lo que representa aproximadamente el 50 % de la superficie dedicada al maíz (Villalobos, 1992). Se calcula que la extensión de zonas infestadas por larvas de melolontidos es de 4 x 10⁵ ha a 5 x 10⁵ ha (Romero, 1980).

B. Necesidad de una agricultura sustentable de bajos insumos (ASBI).

Aunque la crisis de producción de maíz es multifactorial, el control de plagas subterráneas, permitiría para algunos campos de cultivo mexicanos, alcanzar rendimientos anuales equivalentes al promedio mundial de esta gramínea (Villalobos, 1992).

El paradigma de la ASBI, contempla un control de plagas efectivo y una agricultura ecológicamente sana. De acuerdo con Pimentel *et al.* (1989) los principios de la ASBI en un agroecosistema son: 1) adaptarlo al ambiente de la región; 2) optimizar el uso de sus recursos físicos, químicos y biológicos; 3) diseñar estrategias que minimicen sus efectos negativos sobre el medio. Estos principios se engloban en 4 factores principales: 1. Nutrientes del suelo. 2. Agua. 3. Energía. 4. Plagas y su control.

C. Control Biológico de Plagas.

El Control Biológico de Plagas (CBP) es tan antiguo y efectivo como la historia de la agricultura (van Emden, 1989). El CBP consiste en utilizar a los enemigos naturales de los insectos - parásitos, depredadores y organismos patógenos- para atacarlos y estabilizar su población en niveles económicamente manejables. Sin embargo el CBP fue dejado de lado por la euforia provocada por los insecticidas químicos en los años 30's y 50's de este siglo. El uso de insecticidas químicos afectó negativamente al ambiente y los insectos desarrollaron resistencia. Estos no eran de acción específica para las plagas, matando también a insectos benéficos (Mallet, 1989). Así mismo, la mayoría de las plagas agrícolas que se introducen y establecen en nuevos hábitats, no traen consigo los múltiples enemigos naturales que los atacan y regulan sus poblaciones (National Academy of Sciences, 1989).

El CBP presenta tres ventajas específicas con respecto al control químico (National Academy of Sciences, *op. cit.*):

1. Una vez establecido el CBP es relativamente permanente. Los enemigos naturales de los que depende se perpetúan a sí mismos, y se ajustan a los cambios de población de las plagas que atacan.
2. El CBP es parcialmente seguro al reducir efectos secundarios tales como toxicidad o contaminación del ambiente.
3. Los costos para el desarrollo de un insecticida químico se estiman en USA\$ 25 Millones y para un bioinsecticida en USA\$1 Millón (Jackson *et al.* , 1992).

D. El papel de los entomopatógenos.

Para el CBP se han investigado microorganismos tales como: rickettsias, virus, hongos, bacterias y protozoarios. Con su acción han obtenido resultados alentadores para ciertos grupos de insectos. A pesar del uso promisorio de entomopatógenos como bioinsecticidas, se presentan algunos problemas como: dificultad de propagación *in vitro*; baja persistencia y/o lenta reproducción del microorganismo en condiciones de campo, estrecho rango de infección del hospedero; y temores de liberación al ambiente de un organismo al que se ha aplicado ingeniería genética (Nuñez-Valdéz, 1993).

Para la utilización de entomopatógenos en la agricultura mexicana se sugieren tres prerequisites (Villalobos, 1992):

1. Identificar el complejo de plagas naturales y sus patógenos, y acompañar ésta de estudios básicos de bioecología.
 2. Evaluar el efecto de patógenos nativos con relación a la diversidad vegetal del agroecosistema, así como de las prácticas agrícolas.
-

3. Introducir patógenos exóticos siempre y cuando las especies nativas hayan fallado en el control y los insectos plaga superen el umbral económico.

Entre las bacterias más citadas como entomopatógenas se encuentra *Bacillus thuringiensis*, bacteria formadora de esporas y de cristales proteicos que provocan lisis de los tejidos epiteliales del intestino causando su muerte posterior (Knowles en Nuñez-Valdéz, 1993). También se han reportado bacterias no formadoras de esporas como: *Micrococcus nigrofaciens* que ataca a *Phyllophaga*; *Pseudomonas* spp. que ataca a *Phyllophaga* y *Cz*; *Serratia marcescens* ataca a *Melolontha melolontha*, *Popillia japonica* y *Phyllophaga* spp. y *S. entomophila* que ataca a *Cz* (Klein y Jackson, 1992).

E. Control Biológico por *Serratia* spp.

De acuerdo con Grimont y Grimont (1981), el género *Serratia* sp. es un miembro de la familia Enterobacteriaceae que presenta las siguientes características: bacilos cortos de 0.5 - 0.8 μm de diámetro y de 0.9 - 2.0 μm de largo, con puntas redondeadas, móviles por medio de flagelos peritricos, anaerobios facultativos, patógenos facultativos, no forman esporas, desarrollo de la colonia frecuentemente opaco, algunas veces iridiscentes con colores blancos, rosas o rojos, crece a temperaturas entre 10 y 36°C, con pH de 5-9, resistentes a altas concentraciones de NaCl. Las especies de este género no requieren factores de crecimiento y se han reportado en ambientes como suelo, agua, insectos, superficies vegetales y como patógenos oportunistas del hombre (Krieg, 1984).

Serratia entomophila Grimont, *et al.*, 1981 es una de las bacterias que se reporta con gran potencial para ser utilizada como bioinsecticida (Grimont *et al.*, 1988). Esta es considerada como patógena facultativa, causante de la enfermedad ambarina en *Cz* (Grimont *op. cit.*). *S. entomophila* tiene una fase de vida libre en el suelo donde es ingerida

por las larvas, después la bacteria se adhiere al buche y la parte anterior del intestino (zona conocida como válvula cardiaca), donde da la apariencia de un tapón (Wilson, *et al.*, 1992). La larva desahoga su intestino, deja de alimentarse y toma una característica coloración ámbar. Aproximadamente de 1-3 meses después, las larvas mueren, cuando su hemocele ha sido invadido y se ha provocado una septicemia (Klein y Jackson, 1992).

La enfermedad ambarina, es causada por *S. entomophila* y *S. proteamaculans* (Grimont *et al.*, 1988). Esta enfermedad ha sido sólo reportada en Nueva Zelanda, sin embargo síntomas similares han sido observados en otros escarabajos, tales como: *Rhizotrogus (=Amphimallon) majalis* (Razoumowsky) (Klein y Jackson, 1992); escarabajo japonés *Popillia japonica* en Ohio; *Melolontha melolontha* y *M. hipocastini* en Europa (Tanada y Kaya, 1992 en Villalobos, 1997a).

Las ventajas del biocontrol por *S. entomophila* para el CBP son: (Nuñez-Valdéz, 1993; Villalobos, 1994):

1. Ha demostrado ser efectiva en la disminución de poblaciones de larvas que son plagas.
 2. Es fácil de cultivar *in vitro*, para una producción masiva.
 3. Ha demostrado alta selectividad de los insectos objeto de control, no se reportan casos de virulencia en otros organismos, incluyendo al hombre.
 4. Persistencia activa hasta por 5 años en suelos tratados con una aplicación inundativa.
 5. Disminución en costos de producción agrícola al sustituir a los insecticidas químicos.
 6. Su acción es considerada ecológicamente sana.
-

F. Descripción de la zona de estudio.

La reserva de la biosfera "El Cielo" (RBEC) se ubica al suroeste del estado de Tamaulipas, en las laderas de la Sierra Madre Oriental, conocida como Sierra Cucharas y Sierra Chiquita. Comprende gran parte del municipio de Gómez Farías y parte de los municipios de Jaumave y Llera. Está limitada por los paralelos 23° 13' y 23° 03' N, el meridiano 99° 18' W y la curva de nivel de 200 m snm al Este. Una vía de acceso a la RBEC es la carretera nacional Núm 85 Ciudad Mante-Cd. Victoria. En la población de El Encino se toma un camino de terracería que conduce al ejido "20 de Abril". Dentro de éste se ubica la Joya de Salas que está situada al Noroeste de la RBEC a una altitud entre 1,500 y 1,600 m snm, en lo que se conoce como zona de amortiguamiento (Contreras *et al.*, 1994). Los suelos que predominan en el ejido son Luvisol vértico con un horizonte "A" de textura arcillosa, color pardo oscuro, pH 5.0 y muy ricos en materia orgánica. Sus suelos se utilizan para el cultivo de maíz y frijol de temporal y pastizales. (Puig y Bracho, 1987). Las tierras de cultivo están rodeadas por bosques de Pino - Encino cercanos a una laguna permanente que abastece de agua para consumo animal durante épocas de sequía.

En la Joya de Salas se han reportado daños en cultivos de maíz causados por *Phyllophaga* spp. (Sánchez-Ramos *et al.*, 1992). De acuerdo con Villalobos (1997a) cuando se presentan signos obvios de daño, una buena proporción de larvas se localiza entre los 5-10 cm de profundidad afectando las interfases tallo-raíz, las plantas de maíz infestadas adquieren una coloración rojiza o amarillenta, detienen su crecimiento y sus hojas se enrollan sobre sí mismas y después mueren. Este mismo autor sugiere que en promedio, un 48% de los rendimientos de cultivo de maíz se pierden debido a la acción principal de una especie bianual (*Pt*). Sin embargo, el daño puede ser causado anualmente por *Pm* que presenta un ciclo de vida anual. En ambas especies de *Phyllophaga*, este autor detectó

larvas con síntomas similares a los de la enfermedad ambarina causada por *S. entomophila* en Cz en Nueva Zelanda (Jackson *et al.*, 1993).

III. Objetivos.

A. Objetivo general.

Buscar, aislar e identificar cepas de *Serratia* con actividad patogénica en larvas de *Phyllophaga* en la RBEC.

B. Objetivos particulares.

1. Confirmar la presencia de larvas de *Phyllophaga* con enfermedad amarillina (EA) en la Joya de Salas, Ejido "20 de Abril". Reserva de la Biosfera "El Cielo", Tamaulipas.
 2. Evaluar la frecuencia con que se presenta la EA en la zona de estudio.
 3. Demostrar que *Serratia* es el agente causal de la EA en larvas de *Ph. trichodes*, mediante la aplicación de los postulados de Koch. Para esto se realizaron las siguientes actividades:
 - ◆ Buscar larvas que muestren síntomas de EA en el campo.
 - ◆ Buscar el mismo tipo de bacterias en larvas con EA.
 - ◆ Aislar bacterias de larvas con EA y obtener su cultivo puro.
 - ◆ Inducir la EA en larvas sanas mediante la inoculación de los cultivos aislados.
 - ◆ Recuperar del hospedero enfermo la bacteria inoculada y corroborar que corresponde a la original.
 - ◆ Comparar las características bioquímicas de las bacterias candidatas inoculadas y recuperadas de larvas a las que se indujo la enfermedad.
 - ◆ Identificar taxonómicamente a las bacterias que resulten patógenas.
-

IV. Materiales y Métodos.

A. Zona de Muestreo.

El muestreo se realizó en parcelas ubicadas en el ejido "20 de Abril", Joya de Salas en las que se han reportado daños en el cultivo de maíz causados por *Phyllophaga* (Sanchez-Ramos *et al.*, 1992)

B. Obtención y Manejo de larvas de *Phyllophaga* spp.

B.1. Colecta de larvas de *Phyllophaga* spp. en zonas de cultivos de maíz.

Se emplearon dos técnicas de muestreo y en ambos casos se colectaron larvas de segundo y tercer estadio, así como adultos de ambas especies de *Ph.*

- 1 Colecta intensiva. Se seleccionaron sitios específicos con antecedentes de daño en el desarrollo del maíz. En éstos se eligieron de 3 a 5 sitios de muestreo donde se cavó hasta una profundidad aproximada de 20 cm. de profundidad.
- 2 Colecta extensiva. Se efectuó siguiendo el arado de un tractor o la yunta y se recolectaron las larvas que quedaron al descubierto. Esta técnica permitió el muestreo de una mayor superficie de campo de cultivo, lo cual incrementó su representatividad.

Los organismos aparentemente sanos se acomodaron individualmente en cajas de Petri de plástico conteniendo suelo del sitio de colecta, y se añadió un trozo de zanahoria para su alimentación. Las larvas que presentaron síntomas externos de enfermedad similares a la EA se colocaron en envases individuales y se transportaron en termos para evitar su descomposición y maltrato.

B.2. Identificación de larvas de *Ph. trichodes* (Pt.)

La identificación de las larvas de *Phyllophaga* obtenidas del campo se hizo mediante el reconocimiento de la propregmatia en la epifaringe (parte interna del labrum),

de larvas muertas. Dicho carácter es decisivo para la diferenciación entre larvas de *Pt* y *Pm* (Villalobos, 1997 a) Las larvas de *Pt* presentan progmatia mientras que está ausente en las larvas de *Pm*.

En larvas vivas, el reconocimiento de ambas especies se realizó por comparación del número de sedas presentes en el margen superior de la sutura fronto-clipeal. Las larvas de *Pt* tienen más de 20 sedas en tanto que las larvas de *Pm* presentan entre 12 y 16 sedas. Los estadios larvales se identificaron utilizando la medida de la anchura máxima de la cápsula cefálica como en Villalobos (1991).

B.3. Manejo y mantenimiento de las larvas en el laboratorio para el bioensayo.

Las larvas utilizadas para el bioensayo con terceros estadios de *Pt* fueron colectadas durante la primera semana de octubre de 1996. La colecta fue por el método directo extensivo (Sección B.1.).

El material vivo se colocó en recipientes de plástico de una capacidad de 20 cc., los que contenían suelo de la parcela muestreada. Posteriormente el material se depositó en el insectario a temperatura ambiente (24° C) y humedad relativa constante (25%), por un período de 2 semanas, durante las que se realizaron las siguientes actividades:

- 1 Adicionar y renovar trozos de zanahoria como fuente de alimento para las larvas.
 - 2 Hidratar el suelo a una humedad aproximada del 25%.
 - 3 Separación de larvas muertas.
 - 4 Observación de las larvas vivas y registro de:
 - Síntomas externos que indiquen que la larva tenía EA, tales como: cambio de color en el tórax y abdomen, anorexia, poca movilidad, encorvamiento y reducción del abdomen, flacidez del cuerpo con apariencia acuosa.
-

- Alimentación de las larvas, normal o deficiente con base en la cantidad de zanahoria residual.

B.4. Selección de larvas utilizadas en el bioensayo.

Después de haber conservado las larvas por un período de dos semanas en el insectario se realizó una selección de terceros estadios de *Pt*. Estas larvas no presentaban melanizaciones en su cuerpo y tenían completos sus apéndices. Tanto el color de su cuerpo como su reacción ante estímulos externos indicaban que estas larvas estaban sanas.

Las larvas seleccionadas fueron colocadas individualmente en compartimentos de hieleras de plástico (5.5 x 5.5 x 3.0 cm), con 14 oquedades. A cada larva se le proporcionó la cuarta parte de un cilindro de zanahoria de 6 mm de ancho. Cada tercer día se tomaron registros de la alimentación y se renovó la zanahoria para garantizar que las larvas estuvieran alimentándose activamente.

B.5. Selección de larvas para efectuar el aislamiento de bacterias.

Se seleccionaron los cadáveres de larvas colectadas en el campo que presentaron síntomas similares a la EA. Además de aquellas que desarrollaron la enfermedad durante el período de observación en el insectario. Estos cadáveres se colocaron en cajas de Petri estériles y se conservaron a 4° C hasta su procesamiento en el laboratorio de Microbiología. A fin de evitar contaminaciones la manipulación de organismos sanos y enfermos se efectuó con material diferente y desinfectado.

C. Aislamiento e identificación preliminar de cepas bacterianas, posibles agentes causales de la enfermedad.

C.1. Técnica de aislamiento.

El aislamiento de bacterias se realizó a partir de larvas enfermas y muertas

colectadas en el campo y de las que murieron en el insectario con síntomas de enfermedad parecida a la ambarina. Para el aislamiento de cepas de *Serratia* spp. se empleó la técnica de Helig (1992) y Jackson *et al.* (1993) que consiste en:

- 1 Conservar las larvas en cajas de Petri o tubos de vidrio estériles a 4° C, hasta su procesamiento microbiológico en el laboratorio.
- 2 Desinfectar y disectar las muestras. Para ello la superficie externa de la larva se limpió con alcohol al 70% y 8 baños con agua destilada estéril. Con un bisturí estéril se separó y descartó la cámara de fermentación de la larva.
- 3 Aislamiento de *Serratia* spp.
 - ◆ En una caja de Petri estéril se colocó la región tórax-abdomen de la larva con 10 ml de solución amortiguadora de fosfatos estéril, 100 mM a pH 7.2 la cual se maceró durante 20 seg.
 - ◆ La suspensión del macerado se agitó en un Vortex durante 1 minuto.
 - ◆ A partir de esta suspensión y con una asa estéril se sembró por agotamiento (estrías) en cajas de Petri que contengan los siguientes medios: Agar Talio-Capriolato (ATC) (Starr, 1976) y Agar Luria Bertani (ALB) (Nuñez-Valdéz, 1994). Cada medio con tres repeticiones, se incubó a 30° C por 4 y 1 día respectivamente. Posteriormente se seleccionaron colonias que presentaban las características de *Serratia* spp. que para estos medios correspondían a:
 - a Macroscópicas. Colonias circulares regulares aproximadamente de 3 mm de diámetro en ALB a las 24 h colonias circulares, márgenes lisos, convexas de color blanco-lechosas, de consistencia mucosa a los 6 días en ATC (Nuñez-Valdéz, 1994).
 - b Microscópicas. Bacilos cortos o cocobáculos Gram negativos.

c Purificación de las cepas. Stucki *et al.* (1984) consideran que cepas que no presenten diferencias en la morfología colonial después de tres transferencias en el mismo medio se consideran cultivos puros; por lo que las colonias seleccionadas se sembraron tres veces consecutivas en el mismo medio, se incubó en las condiciones antes indicadas, y en cada ocasión se verificó el desarrollo de las características macroscópicas y microscópicas.

Para asegurar la pureza de las cepas, éstas se incubaron en Gelosa Nutritiva (GN) y ALB, medios de cultivo que permiten el desarrollo de las cepas problemáticas, así como, de otras bacterias que pudieran haber permanecido inhibidas. El crecimiento obtenido se suspendió en Solución Salina Isotónica Estéril (SSIE) mezclada con Tween 80 al 0.15% (reactivo tenso-activo que facilita la separación de bacterias diferentes que pudieran permanecer aún unidas). La suspensión se inoculó nuevamente en GN y ALB, la alícuota se distribuyó con triángulo de vidrio y se incubó a 30° C durante 24 h.

C.2. Conservación de las cepas.

Las colonias que presentaron la morfología de *Serratia* spp. se sembraron por quintuplicado en tubos de cultivo con GN y ALB y se incubaron a 30° C por 24 h. Posteriormente se conservaron en refrigeración a 4° C como cepas problemáticas (CP). Las CP se replicaron también en tubos Eppendorff con medio ALB semi-sólido (Stabs) (Nuñez-Valdéz, 1994).

C.3. Identificación preliminar de *Serratia* spp.

Dado que los medios selectivos ALB y ATC recomendados para el aislamiento de *Serratia* spp. (Grimont y Grimont, 1981; O'Callaghan y Jackson, 1993) también permiten

el desarrollo de otras bacterias, se decidió someter a las CP a 12 pruebas bioquímicas que permitieran diferenciar a *Serratia* de otras Enterobacterias, así como de otros bacilos Gram negativos. Las pruebas fueron: Dnasa, Oxidasa, Reducción de Nitratos, Agar Hierro de Kligler (glucosa, lactosa y producción de H₂S), Fermentación de glucosa (con tubo Durham invertido), D-adonitol, L-arabinosa, lactosa, D-sorbitol, Voges-Proskauer, Rojo de Metilo, Oxido-Fermentación. En todos los casos las CP se activaron en GN, se sembraron en los medios indicados anteriormente y se incubaron a 30° C durante 24 h para su posterior lectura e interpretación.

Como control de las pruebas bioquímicas se hizo un corrimiento paralelo de las CP y de cepas de ocho cepas bacterianas conocidas, las que se emplearon como referencia de reacciones positivas y negativas de acuerdo a las recomendaciones de MacFaddin (1990). Dichas cepas control se obtuvieron del cepario de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM; y fueron las siguientes: *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Moraxella* spp., *Acinetobacter calcoaceticus* variedad *anitratus* y *Staphylococcus aureus*.

Los resultados (Cuadro 4) se compararon con la información de Farmer y Kelly (1991) y el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994).

D. Bioensayo de infección.

Se efectuaron 2 bioensayos, en el primero se utilizaron 190 larvas de tercer estadio de *Pt* seleccionadas como se indicó en el inciso B.4. y 12 cepas de *Serratia* spp. obtenidas como se indica en la sección C.1. Se utilizó el método de infección reportado en Nuñez-Valdéz (1994) que consiste en permitir a las larvas la ingestión de zanahoria inoculada previamente con las CP (Cuadro 1).

En el segundo bioensayo se emplearon 100 larvas de *Pt* y 6 cepas que mostraron un desarrollo similar a *Serratia* spp. en el medio ALB. De éstas, cuatro cepas fueron aisladas en el Instituto de Biotecnología, UNAM de Cuernavaca, de cadáveres de larvas de tercer estadio de *Pt* por Nuñez-Valdéz. M. E. En el segundo bioensayo se emplearon dos técnicas de impregnación de las zanahorias y el número de infecciones fue mayor al empleado en el primero (Cuadro 1)

Cuadro 1 Descripción del método de inoculación y patrón de infección por ingesta de zanahorias		
	Bioensayo 1	Bioensayo 2
INOCULACIÓN	1) CONTROL. Rodamiento en medio de cultivo estéril. 2) TRATAMIENTOS. Rodamiento de zanahorias en cultivos en placa de 24 h de cada una de las CP	1) CONTROL. Rodamiento en medio de cultivo estéril. 2) TRATAMIENTOS: a) Impregnación por sumersión de zanahoria en cultivos líquidos de las CP con crecimiento de 24 h y con poblaciones previamente ajustadas en nefelómetro. b) Impregnación por rodamiento en cultivo en placa de 24 h de las CP
PATRON DE INFECCIÓN	Una sola infección al inicio del ensayo.	a) Infección cada 4 días durante 2 semanas. b) A partir de la 5a. infección cada 3 días hasta completar 9 infecciones.

Para los dos bioensayos se emplearon hieleras de plástico como las descritas en la sección B.4, que fueron previamente desinfectados con una Solución de Cloralex al 10% durante 24 h antes de ser usados.

D.2. Bioensayos.

Antes del bioensayo cada larva se transfirió a una caja de Petri, se lavó 2 veces con 5 ml de agua destilada estéril favoreciendo la remoción del suelo con un pincel, se colocó

sobre un papel secante y una vez seca se pesó en balanza analítica; se colocó en un frasco limpio previamente numerado.

Con las larvas limpias y contenidas en los frascos numerados se procedió a aleatorizar la muestra haciendo grupos en bloques, de lo que resultaron 13 (Bioensayo 1) y 7 (Bioensayo 2) grupos de 14 larvas de tercer estadio de *Pt* del segundo año del ciclo de vida. Para cada tratamiento se empleó una misma hielera de plástico. En cada una de ellas se colocó una larva y un pedazo de zanahoria impregnada con las CP mediante los métodos de inoculación e infección mostrados en el Cuadro 1. Cada recipiente fue cubierto con una tapa de plástico para evitar el desplazamiento de las larvas a oquedades vecinas. Las hieleras se apilaron y en la tapa superior de estas se colocó una toalla de papel húmeda y se sujetaron con ligas. Grupos de 4 hieleras fueron introducidos en una bolsa de plástico negro. Se hicieron horadaciones en la bolsa de plástico para permitir la entrada del aire. Bajo estas condiciones las hieleras se incubaron a 25° C durante 30 días.

Se emplearon zanahorias, aproximadamente de 5 cm de diámetro y 10 cm de largo, éstas se lavaron y cortaron en trozos de 6 mm de largo. Con un horador previamente desinfectado con una Solución de Cloralex al 10%; se procedió a cortar cilindros de los trozos de zanahoria de un grosor promedio de 0.647 ± 0.021 cm por 0.4 cm de diámetro, cuidando de realizarlo en la zona carnosa de la zanahoria evitando la periferia y su centro. Para cada tratamiento se cortaron 30 cilindros, 10 se colocaron en una caja de Petri estéril que se selló con masking-tape y se conservaron en refrigeración, estos se emplearon como patrón de desecación y para comparar el porcentaje cualitativo de alimentación de las larvas.

En la Campana de Flujo Laminar se procedió a impregnar los otros 20 cilindros

mediante los métodos indicados en el Cuadro 1. Con pinzas estériles se colocó 1 cilindro de zanahoria impregnado con las CP en cada uno de los compartimentos de las hieleras.

El número bacteriano por cilindro de zanahoria se determinó por el método de dilución y cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC). Para ello se inocularon las diluciones de 10^{-6} hasta 10^{-12} en GN y se incubó 24 h a 30° C.

D.3. Observación de la evolución de las larvas.

Durante los 30 días del bioensayo, se hicieron revisiones del desarrollo de color ámbar, sobrevivencia, morbilidad, mortalidad, alimentación (porcentaje cualitativo comparado con un patrón) y peso (este último cada 5 días).

Además se realizó la transferencia de las larvas a hieleras limpias respetando el lugar asignado a cada larva en el bioensayo. Al mismo tiempo se renovaron los cilindros de zanahoria para cada una de las larvas.

E. Recuperación de bacterias a partir del hospedero infectado.

E.1. Aislamiento de bacterias a partir de larvas que enfermaron en el bioensayo.

Las larvas que murieron durante el bioensayo se conservaron en cajas de Petri estériles a 4 °C. A partir de estas se hizo el aislamiento en la forma indicada en la sección C.1. usando como medio de cultivo ALB, después de 24 h de incubación se seleccionaron aquellas colonias que presentaron las características de *Serratia* y se procedió a su purificación.

Para verificar que las bacterias inoculadas (Serie 1) corresponden a las cepas aisladas de larvas que desarrollaron EA durante el bioensayo (Serie 2), las cepas de las dos series se sometieron a 10 pruebas bioquímicas. Cuatro de ellas corresponden a las recomendadas por O'Callaghan y Jackson (1993) y Nuñez-Valdéz (1994), y las otras 6 a las

descritas en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994), las que permiten la diferenciación de *Serratia* spp. de otros bacilos Gram negativos.

E.2. Pruebas de Identificación.

Las cepas de las dos series se activaron en el medio de cultivo ALB, del desarrollo obtenido se seleccionaron al azar 25 colonias diferenciadas y aisladas, y se procedió a sembrar cada una de ellas en los siguientes medios de cultivo: Agar Talio-Capriolato (ATC), Agar para la Prueba de Desoxiribonucleasa (ADNasa), Agar Adonitol (AADO) y Agar Itaconato (AITA), mediante la siguiente técnica (Nuñez-Valdéz, 1994):

- 1 Las cajas con los cuatro medios se cuadrícularon con lápiz de cera por la parte externa.
- 2 Con el extremo de un palillo estéril, se picó el centro de una de las colonias desarrolladas en ALB, con el mismo inóculo, se punteo la superficie de uno de los cuadros en ATC, AITA, ADNasa y AADO. Iniciando en AITA para garantizar el desarrollo.
- 3 Todas las placas se incubaron a 30° C; las de ADNasa y AADO durante 24 h y las de AITA durante 72 h y las de ATC de 4 a 6 días.
- 4 En cada medio de cultivo, se observó el crecimiento y el desarrollo de reacciones positivas que son dadas por:
 - ◆ La aparición de un halo rosáceo en ADNasa que indica la síntesis de la enzima que degrada el ADN y su hidrólisis.
 - ◆ El vire del indicador de azul a amarillo en AADO, que indica la producción de ácido a partir del adonitol.
 - ◆ El crecimiento en AITA.

Los resultados (Cuadro 8) se compararon con el patrón de identificación descrito en

O'Callaghan y Jackson (1993) y Nuñez-Valdéz (1994).

E.3. Pruebas de Identificación de Serratia spp.

Siguiendo las recomendaciones del Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey, las cepas de las dos series se sembraron en placa de GN y se incubaron a 30° C durante 24 h, a partir de cada cultivo activo se verificó la pureza mediante la tinción Gram y observación microscópica. Después se tomó una asada del cultivo y se suspendió en 4.0 ml de SSIE esta suspensión se agitó en Vortex durante 30 seg. y con esta Suspensión Madre (SM) se inocularon los diferentes medios de cultivo. La temperatura y tiempo de incubación, así como las características a observar se indican en el Cuadro 2.

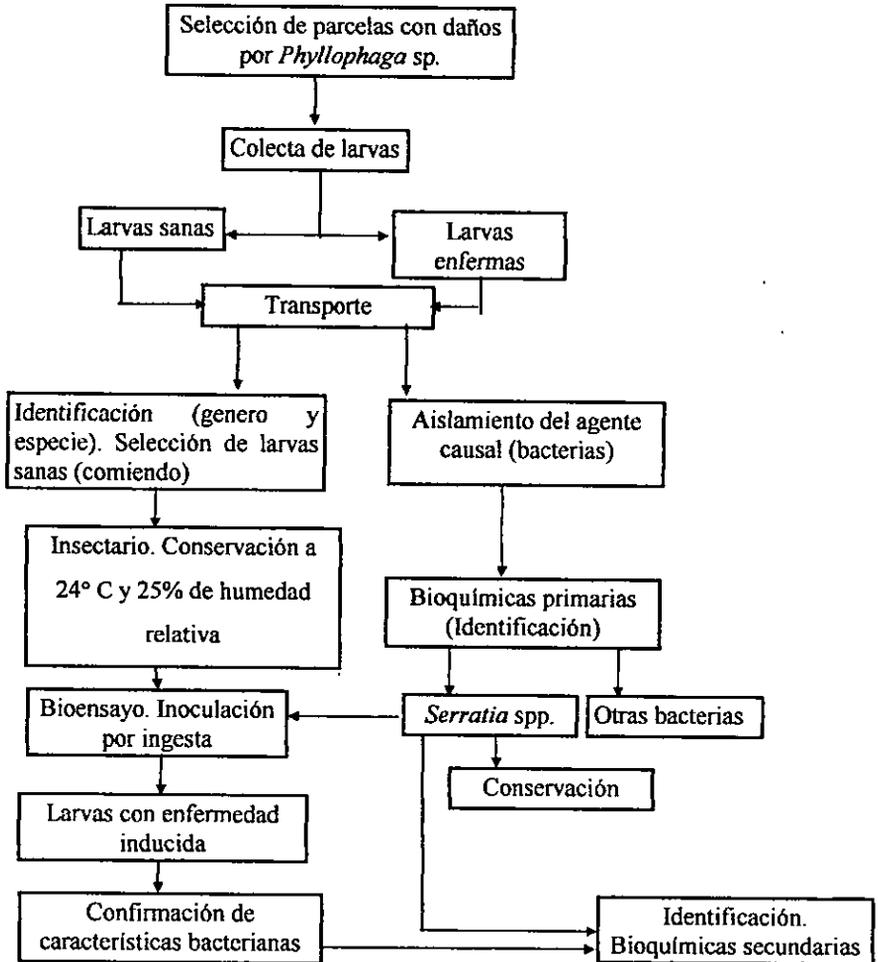
Cuadro 2. Lista de Pruebas Bioquímicas realizadas para la identificación de las cepas obtenidas de aislamientos y reaslamientos (bioensayos), de bacterias en *P. trichodes* de 3^{er} estadio con síntomas de enfermedad ambarina.¹

Condiciones para realizar las pruebas						
Pruebas Bioquímicas	Medio de cultivo	Técnica de inoculación	Incubación	Interpretación de resultados	Otros. Fuentes.	
Oxidasa	bastoncillos de identificación OXOID	impregnación de colonia aislada de 24 h		lectura a los 15 min.	correlación con pruebas estándar del 100%	Oxoid, 1995
Indol, producción [*] ; Ac. Sulfhídrico, producción [*] ; Movilidad.	SIM, semi-sólido	picadura	35° C de 18-24 h	la formación de Indol da lugar a una coloración rojo-purpura, después de agregar el reactivo. Presencia de H ₂ S por ennegrecimiento de la zona de crecimiento. Movilidad positiva por turbidez difusa del medio al rededor del canal de picadura.		Merck, 1982
Rojo de Metil /Voges-Proskauer [*]	Caldo RMVP, pH:6.9	asa con inóculo poco denso.	35° C, de 3-5 días para RM.	virre del indicador de pH		MacFaddin, 1990.
Citrato (de Simmons) [*]	Agar Citrato de Simmons inclinado	esfrías únicamente en "cola de pescado"	35° C de 24-48 h	lectura por virre de color del medio		Merck, 1982.
Urea, hidrólisis de [*]	Agar urea de Christensen, pH: 6.8	esfrías en "cola de pescado"	35° C de 6 a 24 h	lectura por virre de color del medio	dejar hasta 6 días para descartar reacción tardía	MacFaddin, 1990.
Lisina descarboxilasa [*]	Agar lisina-Hierro	punción en el centro del medio y en esfrías en la "cola de pescado"	35° C de 16 a 24 h	lectura por virre de color de pH del medio		Merck, 1982.
Ornitina descarboxilasa	Caldo de ensayo de Møller, pH:6	asada densa	35° C por 96 h	virre del indicador de pH	se utilizan dos tubos. A) sin aminoácido; b) con aminoácido.	MacFaddin, 1990.

¹ Continuación del Cuadro 2 en la página siguiente.

Hidrólisis de gelatina	Medio de gelatina nutritiva para punción, pH: 6.8	punción al centro del medio con aguja de inoculación	35° C. de 24 h a 14 días.	observar si hay crecimiento y licuefacción	Cubrir los tubos con parafina estéril colocar los tubos en prueba en refrigeración antes de su lectura.	MacFaddin, 1990.
Catalasa	Reacción de cepas de 24 h a Agua oxigenada (H ₂ O ₂) al 3.0 %, solución acuosa	agregar unas gotas de reactivos sobre colonias de 24 h	lectura inmediata	cepa catalasa positiva con la formación de burbujas		MacFaddin, 1990.
KCN, crecimiento en	Caldo KCN, pH: 7.6	asa poco densa	35° C, 48 h	prueba positiva por turbiedad del medio.		MacFaddin, 1990.
Malonato*, Tarttrato*, Acetato*, Hidrólisis de esculina	Equipo de PB para Enterobacterias Combo para Negativos No. 5 BAXTER	Inoculación de cepa de 24 h estandarizada en su densidad	35° C por 24 h	lectura de reacciones positivas-negativas según referencia del laboratorio		
Arginina descarboxilasa* y Esculina*	MCROSCAN.					
Hidratos de carbono: Glucosa* (con tubo Durham invertido), adonitol*, arabinosa*, celobiosa, dulcitol, glicerol, i-Inositol*, lactosa, maltosa, D-manitol, D-mannosa, melobiosa*, rafinosa*, L-ramnosa*, D-	Caldo básico de rojo fenol, pH: 7.4, concentración del azucar del 1%	asada densa	35° C de 18-24 h	vire del indicador de pH	Estilización a 116-118° C, 10 a 12 libras por 15 min.	MacFaddin, 1990.

F. Organigrama de trabajo.



V. Resultados y Discusión.

A. Muestreo.

Para la realización de este estudio, se tomaron muestras de 8 parcelas de la zona denominada "El Potrero", que corresponde a la principal área de cultivo de maíz de la RBEC (Cuadro 3).

El primer muestreo se efectuó al inicio de la temporada de lluvias (mayo de 1996) cuando los campesinos estaban preparando sus terrenos para el cultivo (barbecho). Para el segundo muestreo (Junio de 1996) se eligieron tres parcelas en las mismas condiciones de cultivo y una (Isidro Ruiz) en donde se había sembrado con tractor y se estaba realizando un primer barbecho para limpiar el terreno de maleza.

El material colectado en los dos muestreos estuvo representado en su mayoría por larvas de *Pt* (98% del material). En el primer muestreo se encontraron larvas de segundo estadio intermedio y avanzado y de tercer estadio inicial; así como pocos adultos de esta especie y de *Pm*. En el segundo muestreo se obtuvieron larvas de *Pt* de segundo estadio avanzado y tercero inicial así como adultos en cópula.

B. Observaciones cualitativas de la enfermedad en Ph.

En el campo no se encontraron larvas vivas con apariencia externa de la EA ya sea en estados intermedios o avanzados. Las larvas presuntamente muertas a consecuencia de la EA que fueron colectadas de las parcelas muestreadas presentaban las siguientes características:

- evidencias de diferentes tonalidades color ambarino en la región tórax-abdomen.
 - encogimiento del cuerpo y reducción de talla.
 - Decremento evidente de peso de la larva en comparación a larvas aparentemente
-

sanas.

- Cuerpo flácido con una apariencia acuosa o hialina.
- Las larvas con EA, en general, se descomponían rápidamente después de su muerte.

Además de las características descritas anteriormente, las larvas vivas asintomáticas colectadas en el campo que eventualmente adquirieron la EA en el insectario mostraban una anorexia marcada.

Villalobos (1997a) sugiere que ambas especies de *Phyllophaga* presentes en la Joya de Salas puedan estar afectadas por una EA similar a la reportada por Jackson *et al.* (1993) para Cz en Nueva Zelandia. Los síntomas externos de esta enfermedad fueron reconocidos por primera vez por Trought *et al.* (1982), en un estudio que derivó en la búsqueda del agente causal de la enfermedad. Estas evidencias externas de la EA son similares a las reportadas por Larragoiti *et al.* (1981) quienes en experimentos de cría en insectario de *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae) sugieren que la epizootia observada fue causada por *Serratia marcescens* en larvas de 2º y 3er estadios.

Características externas similares a la EA han sido observadas en larvas de otras especies de Melolonthidae como en *Rhizotrogus* (= *Amphimallon*) *majalis* (Razoumowsky) (Tashiro *et al.*, 1969. En: Klein y Jackson, 1992) un escarabajo europeo, cuyas larvas presentaron una "apariencia acuosa e inanición" cuando fueron mantenidas en condiciones de laboratorio y que causó una importante mortalidad de las mismas. Larvas de este escarabajo con síntomas similares fueron posteriormente encontradas en el campo por estos autores. Así mismo dichos síntomas se encontraron en larvas de *Popillia japonica* en los Estados Unidos de Norteamérica (Klein y Jackson, 1992) sugiriendo, también, la presencia de la EA. Además, *Melolontha melolontha* y *M. hippocastini* han

sido observadas con síntomas similares a la EA en Europa (Tanada y Kaya, 1993 en Villalobos, 1997b).

C. Densidad de larvas

Las abundancias del total de larvas de *Ph spp.* colectadas siguiendo a la yunta varían de 0.02 a 4.1 i/m^2 ⁽²⁾ (Cuadro 3). Con la excepción de la parcela de Magdaleno Berrones, en la que se reporta un daño leve, en todas las parcelas se registró una menor densidad de larvas en el primer muestreo (mayo de 1996). Esto puede estar relacionado con la terminación de la fase endógena del ciclo de vida de estos organismos.

La densidad de larvas encontradas en el presente estudio es ligeramente inferior a la estimada por Villalobos (1997a) para esta misma zona, quien reporta densidades de 7 a 8 i/m^2 en mayo y junio de 1996; estas diferencias pueden atribuirse a la técnica de muestreo empleada. El método de colecta utilizado por este autor permite una búsqueda eficiente de las larvas en el suelo, pero puede sobrestimar la densidad poblacional al tener que restringirse a un área pequeña. Por el contrario, el muestreo realizado en el presente estudio, carece de eficiencia para localizar a las larvas que se ocultan dentro de los agregados del suelo, pero tiene la ventaja de abarcar una superficie mayor. Los datos presentados por Villalobos (1997a) pueden ser una estimación más próxima del tamaño de las agregaciones que ocurren comúnmente en estos insectos (Rodríguez-del-Bosque, 1988; Villalobos, 1997a). Las estimaciones en el presente estudio sugieren que la densidad global considerando una mayor escala podría ser más baja.

El porcentaje de larvas con síntomas externos de EA fluctuó de 0 a 15.4% de la densidad para las parcelas muestreadas sugiriendo la yunta (Cuadro 3). Trought *et al.*

² i/m^2 individuos (larvas) por metro cuadrado

(1982) en Nueva Zelanda encontraron que el 86% de larvas de *Cz* presentaban la EA. El menor porcentaje obtenido en el presente estudio pudiera estar dada por:

- ◆ La EA es un factor de mortalidad denso-dependiente. En Nueva Zelanda la densidad larval puede alcanzar picos de hasta 806 i/m^2 (Trought *et al.*, 1982), lo que pudiera aumentar la probabilidad de contagio por ingesta de suelo contaminado, de reproducción de la bacteria patógena dentro de la larva y de contagio (podrían aumentar las interacciones agresivas intraespecíficas, y con ello, la probabilidad de contagio a través de las heridas como lo sugieren Klein y Jackson, 1992).
 - ◆ La diferencia de biomasa entre ambas especies. Trought *et al.* (1982) reportaron valores promedio de biomasa (peso fresco) de 108.0 ± 4.6 mg para larvas sanas de tercer estadio de *C. zealandica*, mientras que las larvas sanas de tercer estadio de *Pt* presentan una biomasa promedio de $1,107.0 \pm 24$ mg, lo cual representa una proporción aproximada de 1 : 10. Una consecuencia de esta diferencia de proporción en la biomasa de ambas especies, puede ser el que se necesite una mayor dosis de las toxinas secretadas por las bacterias patógenas, para que síntomas como la inhibición de la alimentación y el color ámbar se manifiesten, como lo señalan Nuñez-Valdéz y Mahanty (1996).
-

Cuadro 3. Densidad de larvas de *Phyllophaga* spp. en ocho parcelas de cultivo de maíz ubicadas en la Joya de Salas, reserva de la biosfera "El Cielo", Tamaulipas, México.¹

Fecha de Muestreo y Propietario de la parcela	Años de descanso	Area muestreada m ²	Densidad i/m ²	Porcentaje de larvas enfermas	Último registro de daño
Mayo, 1996					
Ricardo García	4	180	0.139	0	hace 2 años
Antonio García	Uso continuo	1300	0.019	0	hace 1 año
Victor Maldonado	10	520	0.315	5.5	sin daño previo
Antonio Cruz	Uso continuo	1716	0.078	1.5	hace 2 años
Junio, 1996					
José Rodaciano	2	240	0.433	15.4	hace 1 año
Magdaleno Berrones	Uso continuo	240	.05	0	hace 1 año *
Candelario Cruz	Uso continuo	200	4.095	2.1	hace 2 años
Isidro Cruz	Uso continuo	210	0.29	4.9	hace 2 años

* Daño leve.

¹ Datos obtenidos con el método de colecta extensiva por seguimiento de la yunta.

Es importante destacar el hecho de que la densidad de larvas de *Pt* disminuyó de 36 i/m^2 en septiembre de 1995 a 8.0 i/m^2 en octubre de 1996 (Villalobos, 1997a). Este decremento corresponde a una mortalidad de 77% de larvas de *Pt* del 1^{er} al 2^o año del ciclo de vida, lo que sugiere un proceso regulador de las poblaciones de estos insectos. Jackson (1984) sugiere que niveles de infección de EA >30%, pueden indicar el decline en la densidad poblacional para la siguiente estación del año. Dicha información podría ser usada en la decisión de aplicar insecticidas y puede ser un componente crucial en las investigaciones a largo plazo para las estrategias de control racional de gallinas ciegas (Jackson, *op cit.*).

C.1. Justificación del uso de Serratia como agente de control biológico.

Rodríguez-del-Bosque (1988) propone un umbral económico para *Ph. crinita* de 3 i/m^2 en cultivos de maíz. Villalobos (1997a) sugiere que en la Joya de Salas un buen indicador del daño es una densidad de 3 larvas de tercer estadio de *Ph* por planta de maíz, y con base en los cálculos de los mismos agricultores las pérdidas en el rendimiento del cultivo de maíz sean aproximadas al 50%. El adoptar una estrategia de control en la zona sería justificable si sus costos son inferiores a los de las pérdidas. Las evidencias anteriores de densidad de larvas, porcentajes de las mismas con síntomas de EA y evidencias de regulación natural de las poblaciones, podrían ser valiosas en una propuesta de control biológico de *Pt*. Sin embargo, para este fin, todavía debe evaluarse la viabilidad y costos de crecer la bacteria y aplicarla en el campo, así como, una estimación más minuciosa de las pérdidas.

D. Aislamiento e identificación de cepas bacterianas candidatas.

Del crecimiento bacteriano obtenido a partir de los macerados de diez larvas con

evidencias externas de EA, se seleccionaron 19 colonias que mostraron el desarrollo característico de *Serratia* spp. en los medios ATC y ALB. Estas presentaron una morfología al microscopio óptico de cocobacilos o bacilos cortos, Gram negativos.

Los resultados del Cuadro 4 muestran que de las 19 cepas bacterianas candidatas, doce cepas presentaron características similares a *Serratia* spp.; cuatro son similares a *Enterobacter* debido a su reacción nula en DNasa, formación de gas en la fermentación de carbohidratos y la incapacidad para fermentar la L-arabinosa. Mientras que otras tres cepas presentaron un tipo de metabolismo Oxidativo, y una reacción Oxidasa positiva por lo que se les identificó como *Pseudomonas* spp.

Cuadro 4. Identificación preliminar de 19 cepas aisladas en ATC, de larvas de tercer estado de *Ph. trichodes* con enfermedad ambarina.¹

Pruebas bioquímicas	Serratia Spp. ¹		Enterobacter spp. ¹		Proteus spp. ²		Yersinia spp. ²		Pseudomonas spp. ²	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
• Dnasa	+	-	-	-	V	-	-	-	V	-
• Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• Reducción de Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V
• Agar Hierro de Kilgier										
i. Glucosa	+	+	+	+	V	+	+	+	-	-
ii. Lactosa	+	+	+	+	V	+	+	+	-	-
iii. Prod. de H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• Glucosa, prod. de gas	+ ^b , G ^b	-	+ ^b	-	V	+	+	+	-	-
• D-adonitol	D	D	+	+	D	D	D	D	D	D
• L-arabinosa	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
• D-sorbitol	D	D	+	+	D	D	D	D	D	D
• Voges-Proskauer	+	+	+	+	-	-	-	-	-	NK
• Rojo de metilo	[-]	+	+	+	D	D	D	D	D	NK
• Oxido-Fermentación (Lugby Leifson)	F	F	F	F	F	F	F	F	F	O
Número de cepas con características similares a:	12	4	4	0	0	0	0	0	0	3

¹ obtenidas por maceración de larvas a las que se seccionó y removió la cámara de fermentación y se sembró el macerado en medios bacteriológicos, como se indica en métodos.

² fuentes bibliográficas de las cepas: Hoiit, *et al.*, 1994; Farmer y Kelly, 1991.

^a excepto *S. fonticola* y algunas cepas de *S. liquefaciens* y *S. rubidaea*

^b algunas especies no producen gas.

^c algunas especies producen gas.

^d débil

[-] = 11 a 25% cepas son positivas.

ATC, Agar Tállo-Capriolato

F, fermentativas.

O, oxidativas.

V, inestabilidad de la cepa, no equivalente a "d"

NK, no reportado

D, diferentes reacciones dadas por diferentes spp. de un genero.

Aún cuando el ATC es considerado como un medio altamente selectivo para el aislamiento de *Serratia* spp.; con la aplicación de 11 pruebas bioquímicas a las 19 colonias seleccionadas, se logró la identificación de otras bacterias diferentes a *Serratia*. Estos resultados que coinciden con los reportes de Starr *et al.* (1976) quienes indican que en este medio observaron el desarrollo de *Pseudomonas*. Asimismo, O'Callaghan y Jackson, (1993) en este medio registraron el desarrollo de *Serratia*, de otras Enterobacterias tales como *Enterobacter*, *Proteus*, y *Yersinia*; así como de bacterias Gram negativas de *Pseudomonas*.

En el presente estudio, se observó que la microbiota asociada a larvas de *Pt* con EA estuvo representada predominantemente por *Serratia* (62% de las cepas aisladas), seguido por el 21% de *Enterobacter* y el 16 % de *Pseudomonas*. Estos géneros bacterianos, también fueron encontrados en el intestino medio de larvas de tercer estadio de *Cz* con enfermedad ambarina, en donde además se reporta la presencia de *Yersinia enterocolytica* y *Flavobacterium* spp. (Stucki *et al.*, 1984). Este mismo autor encontró que al menos una cepa patogénica fue aislada del 40% de las larvas mostrando síntomas de la EA, mientras que cepas patogénicas fueron aisladas del 8% de larvas aparentemente sanas.

E. Bioensayos.

Se efectuaron dos bioensayos de infección por ingesta. En el primero las 12 cepas bacterianas probadas indujeron cambios en el color de la región tórax-abdomen de las larvas, pérdida de peso y mortalidad con diferencias estadísticamente no significativas (datos no mostrados).

Al aplicar el fundamento de Ridsdill-Smith y Roberts (1976), respecto a las tasa de crecimiento relativo se observó una tendencia de decremento en producción de biomasa no

significativa respecto al control (datos no mostrados). Dicha información no fue suficiente para demostrar si las cepas bacterianas probadas eran o no patógenas, por lo que se decidió efectuar un 2º bioensayo con cambios en el patrón de infección (Cuadro 1). Los resultados de dicho bioensayo se muestran en los cuadros 5 a 7.

La zanahoria utilizada en los bioensayos tenía un volumen promedio de 0.8 mm^3 . Su peso fresco promedio fue de $0.102 \pm 0.005 \text{ g}$. Una vez sometida a desecación por 24 h a 80°C tuvo un peso seco promedio de $0.012 \pm 0.002 \text{ g}$, con una pérdida promedio de agua de 11.3%.

La zanahoria fresca que se puso como alimento a las larvas en el bioensayo, contenían 2.81×10^{12} bacterias/trozo (2.75×10^{13} bacterias g^{-1}) cuando se impregnaron por sumersión y 6.04×10^{14} bacterias/trozo (5.92×10^{15} bacterias g^{-1}) cuando se impregnaron por rodamiento.

Jackson (1988) impregnó por rodamiento en 20 mg de peso fresco de zanahoria con una cantidad de 1×10^6 bacterias para bioensayos de infección de Cz por *S. entomophila*. La cantidad de zanahoria administrada así como el inóculo en este estudio es superior a lo reportado en la literatura. Para poder establecer la ID_{50} ³ es necesario inocular zanahorias con diferentes concentraciones de bacteria. La ID_{50} para larvas de Cz en sistemas de bioensayos con suelo fue calculado como de 9×10^5 bacterias g^{-1} , con un período de incubación de 2 semanas (Jackson *et al.*, 1983. en O'Callaghan, 1989).

E.1. Color ámbar.

En el cuadro 5 se indican los porcentajes de larvas que desarrollaron el color ámbar (A) así como otros síntomas de la EA tales como pérdida de peso o inhibición de la

³ ID_{50} (Infectious Dose) es la evaluación de la dosis requerida para causar una infección demostrable en 50% de los organismos expuestos (Davis *et al.*, 1973).

alimentación (A+OS). Es conveniente hacer notar que algunas larvas desarrollaron todos los síntomas de la EA, en tanto que otras sólo desarrollaron el color. Nuñez-Valdéz y Mahanty (1996) sugieren que el desarrollo de la EA en Cz es un proceso multifactorial en el cual los diferentes síntomas pueden presentarse de manera independiente y en función del nivel de actividad de la toxina.

Los primeros indicios de color ámbar se manifestaron a partir de los 10 días para los tratamientos L3 y FQ12S. A los 15 días del bioensayo los grupos tratados con las CP presentaron un promedio de 12.5% de larvas con color ámbar. Es a los 20 días cuando hubo un incremento significativo ($P < 0.01$ y $P < 0.05$) respecto al control, se observó que en los tratamientos L3 y LT, el 64% y el 29 % respectivamente de las larvas presentaron color ámbar y otros síntomas en tanto que con FQ12S el 29 % de las larvas sólo presentaron color ámbar (Gráfica 1).

Después de 30 días los tratamientos L3 (78%), LT (64%), FQ12S (36%) y MAC (28%) tuvieron incrementos significativos en el número de larvas con color ámbar respecto al control. Al aplicar la prueba de χ^2 entre los tratamientos para las dos categorías del Cuadro 5 se observa que los tratamientos LT, L3 y MAC no presentan diferencias significativas entre ellos, y que FQ12S no es significativamente diferente, en estas características a MAC (Gráfica 1).

El desarrollo de color ámbar registrado a partir de los 10 días difiere de lo observado en Cz donde la aparición de este síntoma en larvas de tercer estadio se presenta entre los 2 y 5 días posteriores al inicio del bioensayo (Jackson *et al.*, 1993). Esto puede ser explicado por la diferencia de biomasa entre estas dos especies. La diferencia en biomasa sugiere la necesidad de utilizar una mayor dosis de toxinas para infectar larvas de *Ph* como lo sugieren Nuñez-Valdéz y Mahanty (1996) para *C. zealandica*.

Cuadro 5 Porcentaje de larvas *Ph. trichodes* de 3^{er} estadio con color ámbar que no desarrollaron otros síntomas de la enfermedad (A) y % de larvas con color ambarino que además presentaron otros síntomas¹ de la enfermedad (A+OS) a intervalos de 5 días durante el bioensayo.

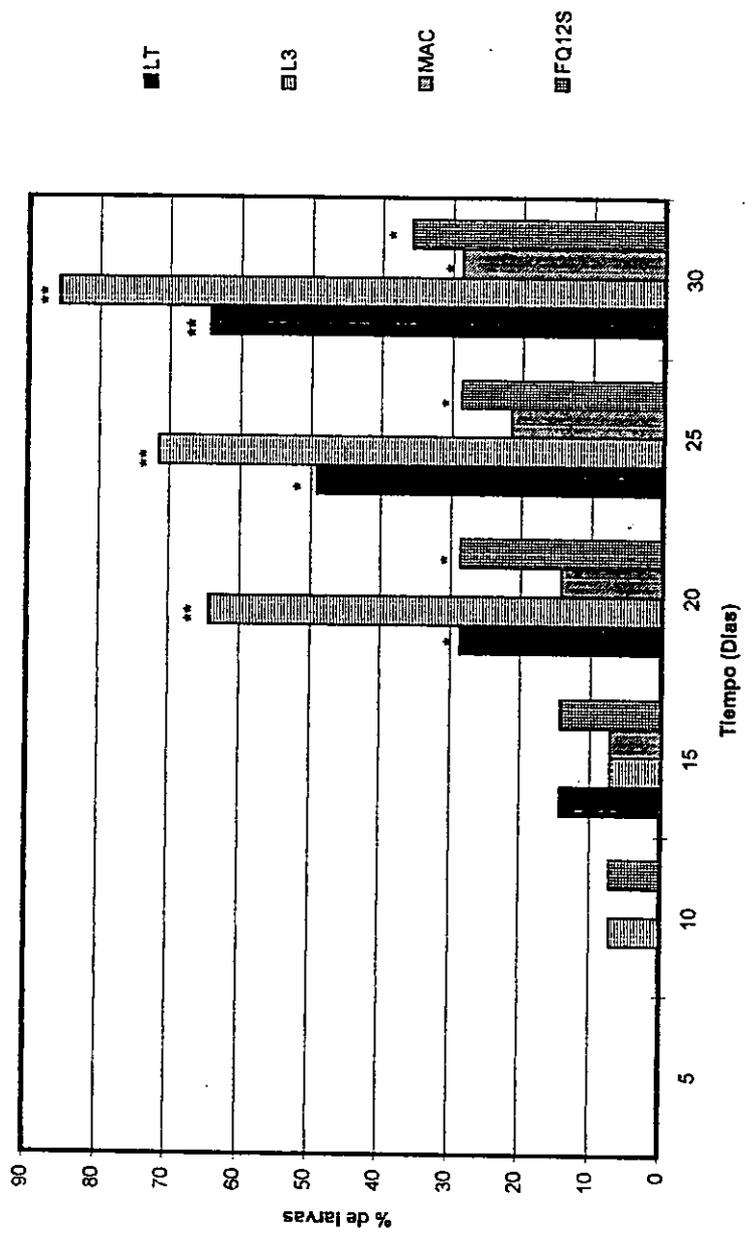
Intervalos (días)	Categorías	Tratamientos				
		CONTROL	LT	L3	MAC	FQ12S
5	A	0	0	0	0	0
	A+OS	0	0	0	0	0
10	A	0	0	0	0	7.1
	A+OS	0	0	7.1	0	0
15	A	0	0	0	0	14.3
	A+OS	0	14.3	7.1	7.1	0
20	A	0	0	0	7.1	28.6*
	A+OS	0	28.6*	64.3**	7.1	0
25	A	0	0	0	7.1	28.6*
	A+OS	0	42.9*	71.4**	14.2	0
30	A	0	0	7.1	7.1	28.6*
	A+OS	0	64.3**	71.4**	21.3*	7.1
χ^2			AB	A	ABC	C

Los asteriscos indican las diferencias significativas entre los tratamientos y el lote control de (χ^2 , * = (P < 0.05), ** = (P < 0.01)), n = 14 larvas por tratamiento.

Los tratamientos compartiendo la misma letra mayúscula del extremo inferior indican que no tienen diferencias significativas entre ellos respecto a ambas categorías a los 30 días.

¹ Por otros síntomas se entiende al conjunto de cambio de color, anorexia y pérdida de peso de la larva en tratamiento.

Gráfica 1. Porcentajes de larvas de *P. trichodes* de 3^{er} estadio que desarrollaron síntomas¹ de enfermedad ambarina a intervalos de 5 días en el bioensayo.



¹Síntomas de la enfermedad se considera a la presencia simultanea de: cambios de color, pérdida de peso y anorexia. El lote control no presentó larvas con síntomas de enfermedad. (X², * = (P<0.05); **=(P<0.01))

De acuerdo con O'Callaghan (1989) la aparición del color ámbar en las larvas de *Cz* infectadas por *S. entomophila*, se da por el consumo de los cuerpos grasos del abdomen de las larvas. Este consumo se asocia a los síntomas característicos de la enfermedad en donde la larva inhibe su alimentación (Grimont *et al.*, 1988) y recurre a las reservas presentes en los cuerpos grasos para obtener energía.

En el presente estudio el color ámbar se manifestó inicialmente como un color amarillo claro distinguible del color blanco-lechoso o gris claro que normalmente presenta la región del tórax-abdomen de las larvas sanas. A partir de los 25 días el color ámbar observado en larvas enfermas o muertas adquirió un tono ocre oscuro distribuido en el último segmento del tórax y primeros segmentos abdominales. Esta observación coinciden con los reportes de la EA (o mielosa) citados por Trought *et al.* (1982), Stucki *et al.* (1984) y Jackson *et al.* (1993).

El color ámbar ha sido observado en larvas de *Cz* con la enfermedad ambarina, así como en larvas próximas a la pupación (Jackson *et al.*, 1993). Sin embargo, dicha similitud, también observada en *Pt* pudo ser controlada en el presente estudio para discernir entre larvas enfermas y larvas sanas próximas a la pupación. La característica más evidente de larvas de *Ph* próximas a la pupación es la posición de las patas que se doblan en un ángulo de 45° (Villalobos, com. pers.) y esto no se observó en el presente estudio.

Otro factor que apoya la hipótesis de que la aparición del color corresponde a síntomas de EA inducida por la infección en el bioensayo, es el referente a las fechas de pupación de *Pt* en la Joya de Salas. En el ciclo de vida de *Pt* durante el primer año de vida, la mayoría de las larvas inviernan como terceros estadios de noviembre a inicios de marzo

marzo y alcanzan los estadios de pupas y adultos para finales de marzo y principios de abril respectivamente, del segundo año de vida (Villalobos, 1997a). En este estudio los bioensayos se realizaron de septiembre a octubre (Bioensayo 1) y de octubre a noviembre (Bioensayo 2) de 1996 con larvas de tercer estadio de *Pt* en su segundo año de ciclo de vida (Villalobos, 1997a). Por lo que las fechas de pupación de *Pt* no son coincidentes con el tiempo en que se realizaron los bioensayos.

E.2. Supervivencia y morbi-mortalidad.

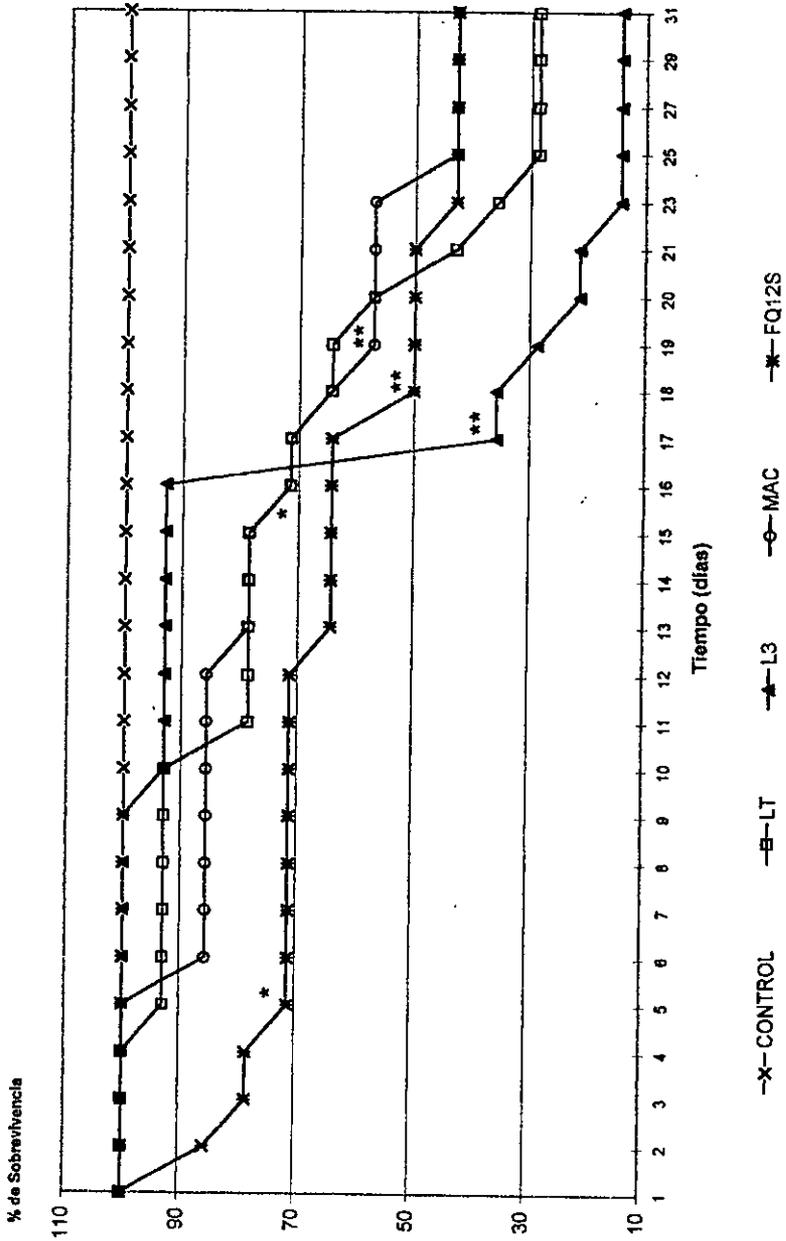
En la gráfica 2 se presentan los porcentajes de larvas sanas que sobrevivieron durante el bioensayo. Las cepas inoculadas manifestaron su efecto en la supervivencia a diversos periodos de tiempo y con diferente intensidad (Cuadro 6). El porcentaje de larvas sobrevivientes fue: para LT de 42.9%, para L3 de 57.2 %, para MAC de 50% y para FQ12S de 71.5%; de éstas se presentó la EA en el 33.3%, 75%, 14.3% y 40 % respectivamente.

Stucki *et al.* (1984) definen como cepas bacterianas patógenas, a aquellas que causen síntomas visibles de enfermedad en más del 50% de larvas sobrevivientes. En esta definición no se consideran a las larvas muertas con evidencias de EA. Por lo que las cuatro cepas utilizadas en este estudio sólo la cepa L3 se engloba dentro de dicha definición.

El presente trabajo se propone un índice de morbi-mortalidad (obtenido de la suma de los porcentajes de larvas vivas presentando uno o varios síntomas de EA y el porcentaje de las larvas cuya muerte puede ser atribuida a la EA). Los Índices de Morbi-mortalidad mas altos corresponden a las cepas L3 y LT con el 86 % y el 64 % respectivamente, lo que permite corroborar la patogenicidad de la cepa L3 y proponer a la LT como potencialmente patógena (Gráfica 3).

Gráfica 2. Sobrevivencia de larvas vivas sanas de *Ph. trichodes* 3^{er} estadio en bioensayo de infección por ingesta de cepas bacterianas candidatas.

(χ^2 , * = (P<0.05); ** = (P<0.01))



El índice de morbi-mortalidad de las cepas L3 y LT tuvo incrementos significativos (χ^2 , ($P < 0.01$)) respecto al control de 86 al 64% respectivamente (Cuadro 6). Grimont *et al.* (1988) reportó que del 79 al 100% de larvas de *Cz* infectadas por *Se* en suelo enferman o mueren después de 14 días. Un 73% de morbilidad de larvas de *Cz* se presentó en bioensayos de infección con la misma bacteria, sin suelo y condiciones similares a las del presente estudio (Jackson, 1988). Los datos de morbilidad de la cepa L3 son los únicos similares a los reportados por los autores anteriores. Dos posibles explicaciones a estos resultados son: a) las cepas del presente estudio son menos virulentas que las de Nueva Zelanda; y b) la menor biomasa de larvas de *Cz* en comparación a larvas de *Pt* pudo causar una menor susceptibilidad de estas últimas a la EA.

El tiempo mínimo en que se presentaron decrementos (\leq al 50%) significativos (χ^2 , ($P < 0.01$)), respecto al control, en la sobrevivencia para las CP fue diferente. Para la cepa L3 fue al día 17, para FQ12S fue el día 18; para LT fue al día 21; y para MAC fue al día 25. Este tiempo se puede considerar como el tiempo letal del 50 % de los organismos en tratamiento ⁽⁴⁾. Jackson, (1989) indica que para larvas de *C. zealandica* infectadas en el laboratorio a 20°C, el LT_{50} tiene lugar después de los 30 días. Es decir las larvas de esta especie infectadas muestran rápidamente síntomas de la enfermedad pero permanecen hasta 30 días o más sobreviviendo en esta condición. En este estudio, lo que se puede considerar como el LT_{50} , es aquel que se presentó entre los días 17 y 25 para los tratamientos L3 y MAC respectivamente.

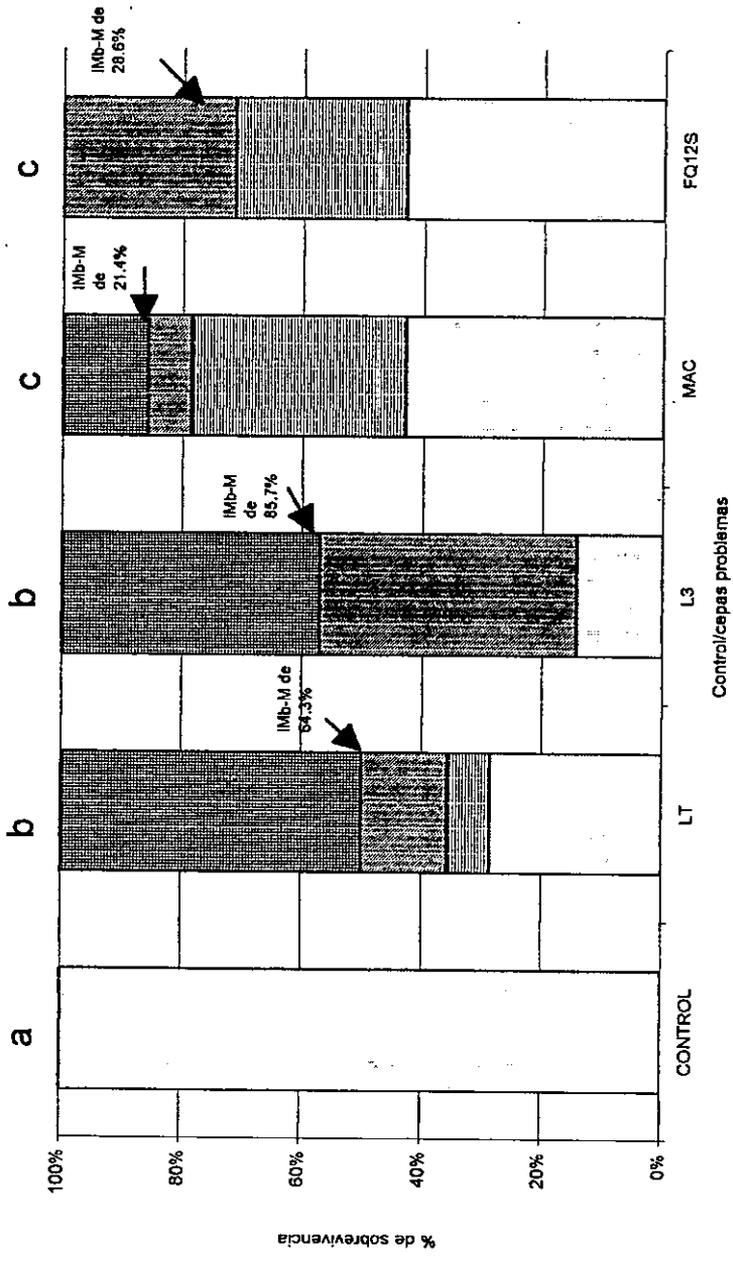
⁴ LT_{50} , Lethal Time. Tiempo medio letal, es el tiempo en que el 50% de los organismos en tratamiento están muertos por causa de este.

Cuadro 6. Número y porcentaje de las larvas de *Ph. trichodes* asignados a diferentes categorías de acuerdo a su condición a los 30 días de bioensayo.

Categorías	Tratamientos					
	Control n (%)	LT n (%)	L3 n (%)	MAC n (%)	FQ12S n (%)	
Sanas	14 (100)	4 (28.6)**	2 (14.3)**	6 (42.9)**	6 (42.9)**	
Muertas por otras causas.	0	1 (7.1) NS	0 NS	5 (35.7)*	4 (28.6)*	
Vivas con CA	0	2 (14.3) NS	6 (42.9)**	1 (7.1) NS	4 (28.6)*	
Muertas con CA	0	7 (50.0)**	6 (42.9)**	2 (14.3) NS	0 NS	
Índice de Morbi-mortalidad	0	64.3**	85.7**	21.4 NS	28.6*	

CA= larvas con color ámbar. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre el lote control y los tratamientos. n= 14 por tratamiento. (X², *-(P<0.05), **-(P<0.01). NS= No significativo. El índice de Morbi-mortalidad representa la suma de los porcentajes de larvas que presentaban color ámbar y el porcentaje de larvas que presumiblemente murieron por enfermedad ámbar durante el bioensayo a los 30 días.

Gráfica 3. Porcentajes de sobrevivencia para *Phyllofaga trichodes* a los 30 días de bioensayo



□ Sanas ▨ Muertas por otras causas ▤ Vivas con enfermedad ámbar ▩ Muertas con síntomas de enfermedad ámbar
 Los Tratamientos compartiendo la misma letra no tienen diferencias significativas (X^2) entre ellos en las 4 categorías en estudio. Tanto las larvas vivas con enfermedad ambarina como larvas muertas con síntomas de enfermedad ambarina están incluidas dentro del Índice de morbi-mortalidad (IMb-M).

E.3. Alimentación de las larvas en bioensayo.

La inhibición de la alimentación (anorexia) se registró desde el primer intervalo de observación (fase temprana) en algunos tratamientos (Cuadro 7). Con la cepa MAC se observó un incremento significativo con respecto al control (X_i^2 , $P < 0.01$) en el nivel de anorexia observado en el intervalo de 0 a 5 días. La cepa FQ12S mostró su efecto anoréxico por primera vez en el intervalo de los 6 a los 10 días. Un efecto anoréxico tardío se observó en el intervalo de los 16-20 días donde los tratamientos L3, MAC y FQ12S tuvieron incrementos significativos (X_i^2 , $P < 0.01$) con respecto al control en el número de larvas sobrevivientes anoréxicas. La cepa LT que tuvo incrementos significativos en la morbilidad (Sección E.2.) produjo incrementos significativos en anorexia hasta los 21-30 días en donde las larvas sobrevivientes dejaron de comer por más de 5 días consecutivos.

Algunas larvas sanas del lote control dejaron de comer por primera vez en el intervalo de 11 a 15 días. Es posible que esto obedezca al inicio de la diapausa invernal que se presenta normalmente en estos insectos (Richter, 1958 en Villalobos, 1991). Es claro que durante el presente experimento las condiciones de temperatura y humedad se mantuvieron relativamente constantes. Sin embargo todavía no se ha demostrado si esta disminución de la alimentación observada en larvas sanas pudiera deberse a algún factor intrínseco. Villalobos (1991) observó que larvas de *Macrodactylus mexicanus* del bosque de Chapultepec, realizaron migraciones al suelo profundo conforme se acercaba el invierno aún cuando las condiciones en el laboratorio fueron óptimas.

El patrón observado en la anorexia durante el presente estudio tuvo dos etapas definidas: una temprana de los 0 a los 10 días y otra tardía después de los 16 a los 30 días. Dicho patrón tiene diferencias notables a lo reportado en Cz por Jackson *et al.* (1993) quienes observaron que la inhibición de la alimentación se presenta de 2 a 5 días después

de inducir la infección con cepas patogénicas de *S. entomophila*. Es posible que se requiera una mayor dosis para infectar a larvas de *Pt* para lograr efectos similares a lo observado en *Cz*. Esta puede ser una evidencia que sugiere una menor virulencia en las cepas de *Serratia* aisladas en el presente estudio. Otra posibilidad es que el efecto de las cepas patógenas esté enmascarado por factores como la madurez de la fase larvaria que la hace menos susceptible a la infección.

Cuadro 7. Número y porcentaje de larvas de 3^{er} estadio de *Ph. trichodes* sobrevivientes que presentaron anorexia durante 5 días sucesivos a diferentes intervalos de tiempo en el bioensayo.

Intervalo de tiempo (días)	Tratamientos					
	CONTROL	I.T	I.3	MAC	FQ12S	
0-5	0	0 NS	1 (7.14) NS	5 (35.7) **	0 NS	
6-10	0	2 (15.4) NS	2 (14.3) NS	4 (33.3) *	4 (40) **	
11-15	2 (14.3)	3 (23.1) NS	1 (7.14) NS	5 (41.7) NS	4 (40) NS	
16-20	2 (14.3)	5 (38.5) NS	8 (66.7) **	5 (55.6) *	6 (60) *	
21-30 ¹	2 (14.3)	5 (100) **	7 (87.5) **	7 (100) **	6 (66.7) **	

¹ Las revisiones de alimentación se hicieron cada tercer día.
n= 14 por tratamiento. (X²; *, (P<0.05); **, (P<0.01)); Diferencias respecto al control. NS= No significativo.

FALTA PAGINA

No.

46

E.4. Peso de las larvas en bioensayo de infección.

Como se muestra en la Gráfica 4 los tratamientos L3, MAC y FQ12S tienen incrementos del peso en los 10 días iniciales de infección (aproximadamente de 5% de incremento). Estos datos indican que las CP fueron más bien un alimento que un organismo patógeno para las larvas. Similares incrementos iniciales de peso en larvas de *Cz* alimentadas con zanahorias conteniendo cepas de *Serratia* no patógena han sido observados por Nuñez-Valdéz (com. pers, 1997).

Es hasta los 25 y 30 días que las cepas LT y L3 causan un decremento significativo en el peso (Análisis de Varianza pareado, $P < 0.01$) respecto al control. Para el término del bioensayo estos tratamientos tuvieron decrementos de aproximadamente el 35% del peso inicial de las larvas. En los datos del peso promedio de las larvas del lote control se observó un decremento de hasta el 22% del peso inicial al final del ensayo. Este hecho junto con la anorexia detectada en este lote son evidencias que apoyan la hipótesis de que estos insectos se encontraban al inicio de la diapausa invernal.

Trought *et al.* (1982) reportaron promedios de peso de larvas sanas del 28 al 16% (una media de 20.2%) más altos que para larvas con EA. Jackson (1988) reportó un similar porcentaje (20.4%) en el peso de larvas sanas y con EA. La pérdida de peso está relacionada a los síntomas de EA como el color ámbar y la anorexia. Larvas de *Cz* con EA reducen su alimentación o dejan de comer limpiando su intestino el cual se torna de color ámbar. Una larva sana normal de esta especie con una alimentación activa generalmente tiene un tracto alimenticio de color gris o negro y numerosos sacos corporales grasos blancos que son visibles a través del integumento translúcido (Jackson *et al.*, 1993). Estas reservas alimenticias son utilizadas por las larvas que presentan EA. Una larva con

muestras visibles de EA tiene un deterioro progresivo de las células grasas (atrofización), tanto como progresa la enfermedad. En estados finales de la EA en Cz las reservas de grasa y albúmina están reducidas a niveles mínimos y el intestino se encuentra vacío (Jackson *et al.*, 1993). Una consecuencia de esta atrofización es el decremento del peso de las larvas con EA.

F. Recuperación de bacterias a partir del hospedero infectado.

La recuperación de bacterias se hizo de los tratamientos en los que se desarrolló la EA en larvas de *Pt* y que corresponden a LT, L3, MAC y FQ12S.

De estos tratamientos se utilizaron dos larvas con EA y se procedió al aislamiento del agente causal (como se describe en la Sección C.1). En cada caso se seleccionaron 4 colonias que presentaron las características morfológicas de *Serratia* en el medio de cultivo ALB.

En el cuadro 8 se observa que de las 16 cepas reaisladas (r), 7 no se desarrollaron en ATC por lo que fueron descartadas. Asimismo, se eliminó a las cepas 23 y 45 por su incapacidad para reducir nitratos. La comparación de las cepas inoculadas (i) con las cepas recuperadas (r), indica que en cada caso, al menos una de las 4 cepas reaisladas, mostró un patrón bioquímico idéntico a las cepa inoculada. Para la cepa LT fue la cepa número 50, para L3 las cepas 32 y 33, para MAC la cepa 44 y para FQ12S la número 40.

Las CP patógenas presentan características morfológicas culturales y fisiológicas similares a *Serratia* de acuerdo con las pruebas mencionadas en O'Callaghan y Jackson (1993), Nuñez-Valdéz (1994) y Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994) para identificar a esta especie. Es importante señalar que las dos cepas aisladas en Cuernavaca (LT y L3) difieren de las aisladas en la Facultad de Química, UNAM (MAC

y FQ12S) en cuanto a su reacción en ADNA, AADO y fermentación de lactosa.

La comparación de los resultados obtenidos con las reacciones reportadas en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994) indica que las cepas LT y L3 pueden estar relacionadas con 4 especies de *Serratia*, que dan una reacción negativa a las prueba de DNasa y que corresponden a *S. rubideae* (con 1% de cepas negativas), *S. marcescens* (10% de cepas negativas), *S. liquefaciens* (24 a 11% de cepas negativas) y *S. fonticola* (100% negativas).

Las cepas MAC y FQ12S difieren claramente de *S. fonticola* en la producción de desoxirribonucleasa y en la utilización de adonitol; de *S. entomophila* en la utilización de Itaconato que es la característica que la diferencia de las otras nueve especies de *Serratia*. La reacción negativa a lactosa de las cepas MAC y FQ12S permite diferenciarlas de *S. rubideae* en donde el 100% de las cepas reportadas dan una reacción positiva; en tanto que comparten características con las otras siete especies de *Serratia*.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman las indicaciones de O'Callaghan y Jackson (1993) respecto a que la identificación efectuada con los tres medios diferenciales debe ser verificada con otras pruebas complementarias, por lo que se procedió a comparar a las CP LT y L3 con 4 especies de *Serratia* (Cuadro 9) y a MAC y FQ12S con 7 especies de *Serratia* (Cuadros 10 y 11).

La identificación de *Serratia* y su aislamiento a partir de larvas de *Pt* coinciden con los estudios de Poprowsky y Yule (1990), quienes reportan 25 especies bacterianas asociadas a larvas de *Phyllophaga* e indican que *S. marcescens* fue la cuarta especie en orden de importancia. Asimismo mencionan que la muerte por infección bacteriana sólo se diagnosticó en el 3% de las larvas examinadas. Ellos consideraron que la incidencia de

**ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

total de enfermedades bacterianas fue baja y por lo tanto la regulación natural de la población de *Phyllophaga* por bacterias entomopatógenas no fue importante durante los años de su investigación.

Existen numerosos trabajos en donde se reporta a *Serratia* como patógeno de diversos insectos, pero en ellos no se describe la sintomatología de la enfermedad que producen (Bucher y Stephens, 1959; Steinhaus, 1959; Podwaite y Cozenza, 1976; Grimont y Grimont, 1978; Grimont, *et al.*, 1979). En cambio se describe a *S. entomophila* y *S. proteomaculans* como agentes causales de la EA y se indica que otras cepas de *Serratia* que han sido aisladas de insectos, al ser probadas en larvas de Cz no producen la EA (Grimont *et al.*, 1988; Stucki *et al.*, 1984); dicha información es contradictoria con los resultados obtenidos en el presente estudio, debido a que aún cuando la identificación preliminar indica que las bacterias aisladas pertenecen a *Serratia*, ninguna se desarrolló en Agar Itaconato que es una característica básica de *S. entomophila*.

Cuadro 8. Resultados del patrón bioquímico de las cepas inoculadas (i) y de las cepas recuperadas (r) de larvas de *Ph. trichodes* que desarrollaron enfermedad durante el bioensayo.

Medios de cultivo	Serratia spp.	LTI			L3i			L3r			MACi			MACr			FQ12S			FQ12Sr		
		22	23	50	51	31	32	33	34	35	37	43	44	38	40	45	46					
ATC	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
ADNA	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AADO	d	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
AITA	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
**																						
Citocromo-Oxidasa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Red. de Nitratos	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
O/i:	F	F	F	F	O	F	F	F	F	F	F	F	F	O	F	F	F	F	F	F	F	F
D-glucosa, prof. ác. de	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prod. de H ₂ S	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* O'Callaghan y Jackson (1993), Nuñez-Valdéz (1994).

** Holt *et al.* (1994)

- ATC. Agar Talco-Capriolito
- ADNA. Agar dexosiribonucleasa
- AADO. Agar Adonitol
- AITA. Agar Itaconato
- O/F. Prueba de la Oxido-Fermentación de Hugh y Leifson

+, crecimiento en placa
i, cepas inoculadas
r, cepas recuperadas

G. Identificación de las cepas aisladas.

En los cuadros 9-11 se observa que las cepas inoculadas LT, L3, MAC y FQ12S presentan el mismo patrón bioquímico de las cepas reaisladas de las larvas que desarrollaron enfermedad durante el bioensayo (LT_r, L3_r, MAC_r, y FQ12S_r).

En el Cuadro 9 se presenta la comparación del patrón bioquímico reportado para 4 cepas de *Serratia* con las CP LT y L3. Con *S. rubidaea* difieren en la producción de Indol, hidrólisis de gelatina, utilización de Malonato, fermentación de ramnosa y sorbitol y en la producción de lipasa. Difieren de *S. marcescens* en la ornitina descarboxilasa, hidrólisis de gelatina, fermentación de arabinosa, lactosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa y xilosa así como en la hidrólisis de lípidos; y son diferentes de *S. fonticola* en la producción de Indol. En tanto que comparten el 100% de las PB con *S. liquefaciens*.

En el cuadro 10 se observa que la cepa FQ12S es diferente a *S. ficaria* en las pruebas de Lisina descarboxilasa, fermentación de L-arabinosa, glicerol, sacarosa y D-xilosa; con *S. liquefaciens* es diferente en la producción de Indol, Ornitina desacarboxilasa, fermentación de L-arabinosa, sacarosa y de D-xilosa; de *S. grimesii* difiere en las pruebas de arginina dehidrolasa, ornitina descarboxilasa, producción de gas a partir de glucosa, fermentación de L-arabinosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa y D-xilosa. Con *S. odorifera* difiere en la fermentación de L-arabinosa, mio-inositol, melibiosa, L-ramnosa, D-xilosa; con *S. plymutica* difiere en las pruebas de rojo de metilo, lisina descarbixilasa, fermentación de L-arabinosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa y D-xilosa; con *S. proteamaculans* en la ornitina descarboxilasa, producción de gas en la glucosa, fermentación de L-arabinosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa, y D-xilosa; y con *S. Marcescens* en la prueba de ornitina descarboxilasa y en la fermentación de la sacarosa lo

que indica FQ12S comparte con *S. marcescens* el 95% de las pruebas aplicadas.

Los resultados expuestos en el cuadro 11 indican que la cepa MAC es diferente de *S. ficaria* en las pruebas de lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, fermentación de L-arabinosa, y de D-xilosa; de *S. liquefaciens* en la prueba de rojo de metilo, fermentación de d-adonitol y sacarosa; distinta a *S. grimesii* en la fermentación de glucosa, L-arabinosa, melibiosa, rafinosa, y D-xilosa; de *S. odorifera* en la fermentación de L-arabinosa, mio-inositol, melibiosa, L-ramnosa, sacarosa y D-xilosa; de *S. plymuthica* en las pruebas de rojo de metilo, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, fermentación de L-arabinosa, melibiosa, rafinosa, D-xilosa y utilización de tartrato; es diferente de *S. proteomaculans* en la producción de gas a partir de glucosa, fermentación de adonitol, melibiosa, rafinosa, y D-xilosa en tanto que comparte el 100% de las características con *S. marcescens*.

Otras características observadas en las 4 cepas son las siguientes: forma de bacilo o cocabacilo, no formadoras de esporas, buen desarrollo a las 24 h en Gelosa nutritiva y ALB dando lugar a la formación de colonias de 1.5 a 2 mm de diámetro, circulares, de bordes lisos, elevación convexa, superficie lisa mucosa, brillante, márgenes enteros, densidad opaca blanco lechosa y acromógenas.

Considerando que en este estudio se colectaron larvas de *Pt* con síntomas de enfermedad ambarina y que durante los bioensayos se logró inducir la misma sintomatología, así como, que se reportan como agentes causales de la EA en Cz a *S. entomophila* y *S. proteamaculans* se esperaba la identificación de alguna de estas especies. Sin embargo aún cuando se logró el aislamiento de *Serratia* las CP se identificaron como *S. liquefaciens* (LT y L3) y *S. marcescens* (MAC y FQ12S) las que durante los bioensayos indujeron una sintomatología similar.

En este sentido Jackson *et al.* (1991) indican que es raro que dos especies de un mismo género puedan causar la misma enfermedad, no obstante se ha demostrado que *S. entomophila* y *S. proteamaculans* producen la EA con características indistinguibles. Lo anterior a generado interrogantes acerca de como se desarrollo la patogenicidad en estas bacterias. La hipótesis de estos autores se refieren a un posible intercambio genético entre especies. Estos mismos autores en 1989, utilizaron diferentes especies y biotipos de *Serratia* aislados de diversos insectos y al inocularlas en larvas de *Cz* demostraron que ninguno produjo infección y síntomas de EA, por lo que surge el planteamiento de que si las cepas aisladas en el presente estudio corresponden a *S. marcescens* y *S. liquefaciens* este sería el primer trabajo en el que se reporta a estas especies como agentes causales de la EA en *Pt.*

Es importante mencionar que en los estudios de bacterias asociadas con insectos la ubicación taxonómica de las bacterias ha sido repetidamente modificada, tal es el caso de *Bacillus sphingidis* y de *Bacillus apisepticus* (*Pseudomonas apisepticus*) las cuales fueron reclasificadas por Lysenko (1963) como *S. marcescens* y más tarde por Grimont *et al.* (1979) como el biotipo A4a de esta especie. Del mismo modo *Bacillus melolonthae liquefaciens*, *Cloaca B* tipo 71-12A, *Bacillus noctuarum*, *Paracolobactrum rhyncoli* y *Pseudomonas noctuarum* mediante estudios de taxonomía numérica fueron reclasificados como *S. liquefaciens* (Grimont *et al.*, 1979).

Bucher (1973) indica que los estudios ecológicos de *Serratia* son difíciles especialmente por la confusión tan grande que existe en la taxonomía de este género. Actualmente la utilización de métodos médicos basados en un conjunto grande de características fisiológicas y datos de la relación de polinucleotidos ha permitido mejorar

en forma notoria este tipo de estudios. La revisión bibliográfica relacionada con la taxonomía de *Serratia* indica algunos cambios; por ejemplo: Grimont *et al.* (1988) señalan a *S. entomophila* como positiva en la fermentación de D-adonitol, celobiosa, glicerol y mio-inositol, en tanto que en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994) y Farmer y Kelly (1991) estas mismas pruebas están señaladas como negativas; asimismo Grimont *et al.* (1988) considera un complejo integrado por *Serratia liquefaciens*, *proteomaculans* y *grimesii* en tanto que actualmente estas se describen como especies separadas. Aún cuando los resultados obtenidos evidenciaron que las CP corresponden a *S. liquefaciens* y *S. marcescens* los reportes sobre *S. entomophila* y *S. proteomaculans* como agentes causales de la EA nos indujeron a efectuar la comparación del patrón bioquímico de estas especies con el de las CP; y se observó que con respecto a *S. entomophila* además de diferir en la utilización de Itaconato, en las otras 40 pruebas aplicadas las cepas LT y L3 difieren en 14 de estas, FQ12S en 4 y MAC en 5, en tanto que respecto a *S. proteomaculans* LT y L3 difieren en 7 pruebas y FQ12S y MAC en 6, lo que indica que las CP están más relacionadas con *S. liquefaciens* y *S. marcescens* y se recomienda ratificar o rectificar esta identificación mediante técnicas de biología molecular.

Cuadro 9. Tabla diagnóstica para cuatro especies de *Serratia* y las CP LT y L3

Pruebas Bioquímicas	rubideae	marcescens	liquefaciens	fonticola	LT ₁	LT _r	L3 ₁	L3 _r
Gram (24 h)	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa (24 h)	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de Indol	-	-	-*	-	+	+	+	+
Catalasa (24 h)	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	(-)	(-)	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	-*	+	+	+	+
Citrato de Simmons	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S, prod. de	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de urea	-	(-)	-	(-)	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	d	+	+	+	+	+	+	+
Arginina dehidrolasa	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	+	+++	+++	-	-	-	-
Movilidad	(+)	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	+	+	+++	-	-	-	-	-
Desarrollo en KCN	(-)	+	+	d	+	+	+	+
Utilización de malonato	+	-	-	(+)	-	-	-	-
D-Glucosa, prod. ácido de	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucosa, prod de gas	d	D	(+)	(+)	+	+	+	+
Prod. de ácido de:								
D-adonitol	+	D	-	+	+	+	+	+
l-arabinosa	+	-	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	+++	-	-	-	-
Glicerol	(-)	(+)	+	(+)	+	+	+	+
mio inositol	(-)	(+)	d	d	+	+	+	+
Lactosa	+	-	-*	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	+	-	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	+	-	(+)	+	+	+	+	+
L- rhamnosa	-	-	(-)	(+)	+	+	+	+
D- sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	(-)	+	+	+	+
D-xilosa	+	-	+	(+)	+	+	+	+
Tartrato de Jordans	d	(+)	(+)	d	+	+	+	+
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilización de acetato	(+)	D	d	(-)	-	-	-	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+
Desoxirribonucleasa	+++	+++	(+)	-	-	-	-	-
Lipasa	+	+	(+)	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F

Holt *et al.* (1994)

+ = 90 - 100 % de las cepas positivas

(+) = 76 - 89 % de las cepas positivas

(-) = 11 - 25 % de las cepas positivas

- = 0 - 10 % de las cepas positivas

ONPG = O-nitrofenil -β-D-galactopiranoside

F = Fermentativa

Farmer y Kelly (1991):

* = 1 - 9 % de cepas positivas

** = 1 - 9 % de cepas negativas

d = 11 - 75 % de las cepas positivas

Cuadro 10. Tabla diagnóstica para siete especies de *Serratia* y la CP FQ12

Pruebas bioquímicas	ficaria	marcescens	liquefaciens	grimesii	odorifera	plymuthica	proteoma- culans	FQ12 _i	FQ12 _r
Gram (24 h)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa (24 h)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de indol	-	-	-*	-	D	-	-	-	-
Catalasa (24 h)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	d	(-)	+	(+)	D	+	d	-	-
Voges-Proskauer	d	+	+	d	D	(+)	(+)	+	+
Citrato de Simmons	+	+	+	+	+	d	+	+	+
H ₂ S, prod. de	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de urea	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Arginina dehidrolasa	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	+	+***	+	D	-	+	-	-
Movilidad	+	+	+	+	+	d	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	+	+	+***	+	+	d	+	+	+
Desarrollo en KCN	d	+	+	+	D	d	+	+	+
Utilización de malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucosa, prod. ácido	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucosa, prod de gas	-	d	(+)	+	-	d	+	-	-
Producción de ácido de:									
D-adonitol	-	d	-	-	d	-	-	-	-
l-arabinosa	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	+	+	-	d	d	-	+	+
Mio inositol	d	(+)	D	-	+	d	-	-	-
Lactosa	(-)	-	-	-	d	(+)	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	d	-	(+)	+	+	+	+	-	-
Rafinosa	d	-	(+)	+	d	+	+	-	-
L- rhamnosa	d	-	(-)	-	+	-	d	-	-
D- sorbitol	+	+	+	+	+	d	(+)	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	d	+	+	-	-
D-xilosa	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Tartrato de Jordans	(-)	(+)	(+)	-	+	+	-	+	+
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+	+	(+)	d	+	+
Utilización de acetato	d	d	D	-	d	d	-	-	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Desoxirribonucleasa	+**	+**	(+)	+	+	+	+	+	+
Lipasa	+	+	+	+	d	d	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	d	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F

Bergey (1994):

+= 90 - 100 % de las cepas positivas

(+) = 76-89 % de las cepas positivas

(-) = 11 - 25 % de las cepas positivas

- = 0 - 10 % de las cepas positivas

d = 11 - 75 % de las cepas positivas

ONPG = O-nitrofenil-β-D-galactopiranoside

F = Fermentativa

Balows *et al.* (1991):

* = 1 - 9 % de cepas positivas

** = 1 - 9 % de cepas negativas

Cuadro 11. Tabla diagnóstica de siete especies de *Serratia* y la CP MAC.

Pruebas bioquímicas	ficaria	marcescens	liquefaciens	grimesii	odorifera	plymuthica	proteoma- culans	MAC _i	MAC _r
Gram (24 h)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa (24 h)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de indol	-	-	-*	-	D	-	-	-	-
Catalasa (24 h)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	d	(-)	+	(+)	D	+	d	-	-
Voges-Proskauer	d	+	+	d	D	(+)	(+)	+	+
Citrato de Simmons	+	+	+	+	+	d	+	+	+
H ₂ S, prod. de	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de urea	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Arginina dehidrolasa	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	+	+**	+	D	-	+	+	+
Movilidad	+	+	+	+	+	d	+	+	+
Hidrólisis de gelatina	+	+	+**	+	+	d	+	+	+
Desarrollo en KCN	d	+	+	+	D	d	+	+	+
Utilización de malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucosa, prod. ácido	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucosa, prod de gas	-	d	(+)	+	-	d	+	-	-
Producción de ácido de:									
D-adonitol	-	d	-	-	d	-	-	-	-
l-arabinosa	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	+	+	-	d	d	-	+	+
Mio inositol	d	(+)	d	-	+	d	-	-	-
Lactosa	(-)	-	-	-	d	(+)	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiosa	d	-	(+)	+	+	+	+	-	-
Rafinosa	d	-	(+)	+	d	+	+	-	-
L- rhamnosa	d	-	(-)	-	+	-	d	-	-
D- sorbitol	+	+	+	+	+	d	(+)	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	d	+	+	+	+
D-xilosa	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Tartrato de Jordans	(-)	(+)	(+)	-	+	+	-	-	-
Hidrólisis de esculina	+	+	+	+	+	(+)	d	+	+
Utilización de acetato	d	d	d	-	d	d	-	-	-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Desoxirribonucleasa	+**	+**	(+)	+	+	+	+	+	+
Lipasa	+	+	+	+	d	d	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	d	+	+	+
O/F	F	F	F	F	F	F	F	F	F

Bergey (1994):

+ = 90 - 100 % de las cepas positivas

(+) = 76-89 % de las cepas positivas

(-) = 11 - 25 % de las cepas positivas

- = 0 - 10 % de las cepas positivas

d = 11 - 75 % de las cepas positivas

ONPG = O-nitroferul-β-D-galactopiranoside

F = Fermentativa

Balows *et al.* (1991):

+ = 1 - 9 000% de cepas positivas

** = 1 - 9 % de cepas negativas

VI. Conclusiones.

- 6.1 En la Joya de Salas, ejido "20 de Abril". Reserva de la biosfera "El Cielo". Tamaulipas, se confirmó la presencia de larvas enfermas de *Phyllophaga trichodes* con síntomas parecidos a la enfermedad ambarina.
 - 6.2 Los muestreos extensivos realizados en el surco siguiendo a la yunta, sugieren que la frecuencia de esta enfermedad fue baja durante el período en el que se realizó el presente estudio.
 - 6.3 Con base en los Postulados de Koch existen fuertes evidencias de que la Enfermedad Ambarina en larvas de *Ph. trichodes* es producida por bacterias del genero *Serratia*.
 - 6.4 Los resultados del bioensayo realizado en el presente estudio sugieren que las Cepas Problemas pueden tener un patrón de infección diferente con respecto al patrón reportado para la Enfermedad Ambarina en *Costelytra zealandica* en Nueva Zelandia.
 - 6.5 Los resultados de las pruebas bioquímicas para identificar a los agentes causales de Enfermedad Ambarina en *Ph. trichodes* corresponden a *S. liquefaciens* (Cepas LT y L3) y *S. Marcescens* (Cepas MAC y FQ12S).
-

VII. Bibliografía.

- BBL. 1971. Manual de procedimientos de Laboratorio y de productos, BBL. 5ª. Edición. Editorial Asociados, S. A. México. pp. 213
- Bucher, G. E. & J. M. Stephens. 1959. Bacteria of grasshoppers of western Canada: Y. The Enterobacteriaceae. *Journal of Insect Pathology*. 1: 356-73
- Bucher, G. E. 1973. Definition and identification of insect pathogens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 217: 8-17
- Contreras, A., S. Medellín, G. Aguiluz, J. Montenegro, A. Hernández & V. Sosa. 1994. Plan comunitario de Recursos Naturales. Ejido Veinte de abril (Joya de Salas), Municipio de Jaumave. Reserva de la Biosfera "El Cielo", Tamaulipas. México. Serie Desarrollo Comunitario No. 1. Instituto de Ecología, A. C., y Terra Nostra, A. C. México. pp. 74
- Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. N. Ginsberg, W. B. Wood & M. MacMarty. 1973. Microbiology. Chapter 22. Host-Parasite relations in bacterial diseases. Second Edition. Harper and Row, Publ. New York pp. 629-65
- DIFCO. 1978. Manual de bacteriología (Recopilación y técnicas). Gráficas MIRASA. España. pp. 343
- Farmer III, J. J. & M. T. Kelly. 1991. Enterobacteriaceae, chapter 36. En: MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. Ballows, A., Hausler, W. J. Jr., Herrmann, K. L., Isenberg, H. D., Shadomy, H. J. (Eds.). Fifth edition, Am. Soc. for Microbiology, Washington, D. C., pp. 360-83
- Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg & P. G. Briggs. (Eds.) 1981. Manual of methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology. USA. pp. 524
- Grimont, P. A. D. & F. Grimont. 1978. The genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology*. 33: 221-48
- Grimont, P. A. D., F. Grimont & O. Lysenko. 1979. Species and biotype identification of *Serratia* strains associated with insects. *Current Microbiology*. 2: 139-42
- Grimont, P. A. D. & F. Grimont. 1981. The genus *Serratia*. Chapter 97. En: THE
-

- PROKARYOTES, A HANDBOOK ON HABITAT, ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA. Starr, M. P., and Stolp, H. (Eds.) Springer-Verlag, Vol. II, pp.1188-1203.
- Grimont, P. A. D. & F. Grimont. 1984. Family I. Enterobacteriaceae. Genus VIII. *Serratia* Bizio 1823, 288. En: BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Krieg, N. R., et al. (Ed.). Williams and Wilkins. Vol. I. pp. 477-84
- Grimont, P.A., T. A. Jackson, E. Ageron & M.J. Noonan, 1988. *Serratia entomophila* sp. Nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of systematic Bacteriology*. 38 (1): 1-6
- Helig, G. H. J. 1992. Biological control of the New Zealand grass grub. Thesis Bachelor of Science. International Agricultural College 'Larenstein' Wageningen. The Netherlands.
- Holt, J.G., N. R. Krieg, P.H. Sneath, J. T. Staley & S. T. Williams, (eds.). 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Facultatively Anaerobic Gram-negative rods. Group 5. Ninth edition. Williams & Wilkins. USA pp. 175-289
- Jackson, T. A. 1984. Honey Disease, an indicator of population decline in grass grub. *Proc. 37th N. Z. Weed and Pest Control Conf.* p: 113-6
- Jackson, T. A. 1989. Effect of infection by the bacterium *Serratia entomophila* on feeding and pasture damage by grass grub larvae. *Proc. 41st N. Z. Weed and Pest control Conf.* p: 135-7
- Jackson, T. A. 1989. Development of *Serratia entomophila* as an inundative biological control agent for the grass grub, *Costelytra zealandica*. *Proc. 5th Australasian Conf. On Grassl. Invert. Ecol.* p: 55-62
- Jackson, T. A., J.F. Pearson, M. O'Callaghan, H. K. Mahanty & M.J. Willocks. 1992. Pathogen to product-development of *Serratia entomophila* Enterobacteriaceae as a commercial biological control agent for the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*). En: USE OF PATHOGENS IN SCARABAB PEST MANAGEMENT. Jackson, T. A., Glare, T.R. (eds.). Intercept. Andover, Hampshire. pp. 191-98.
- Jackson, T. A., A. M. Hunger & T. R. Glare. 1993. Pathology of amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J.*
-

- Invertebr. Pathol.* 61: 123-30.
- Klein, M. G. & T. A. Jackson.** 1992. Bacterial diseases of Scarabs. En: USE OF PATHOGENS IN SCARAB PEST MANAGEMENT. T. R. Glare and T. A. Jackson (Eds.) Intercept Andover, Hampshire. pp. 43-61
- Krieg, A.** 1987. Diseases caused by bacteria and other prokaryotes. En: EPIZOOTIOLOGY OF INSECT DISEASES. Fuxa, J. R.; Tanada, Y. (Eds.). Wiley-Interscience Publication. USA. pp. 323-55
- Larragoiti Flores, G., M. E. Ortega Medrano & F. J. Trujillo Arriaga.** 1981. Parasitismo de *Pediobius foveolatus* (Hymenoptera: Eulophidae) sobre *Epilachna varivestis* y *E. Obscurella* (Coleoptera: Coccinellidae) y patogenicidad de *Serratia* spp. (Eubacteriales: Enterobacteriaceae.) Sobre *E. varivestis*. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Univ. Autónoma de Chapingo. México. pp. 95
- López-Olguín, J. F. & A. Aragón.** 1989. Estimación de pérdidas ocasionadas por insectos fitófagos del maíz en una comunidad de Amatlán, Sierra Norte de Puebla.- Memorias del XXIV Congreso Nacional de Entomología. pp. 250.
- MacFaddin, J. F.** 1990. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Edita. Medica Panamericana, S.A. México. pp. 301.
- Mallet, J.** 1989. The Evolution of insecticide resistance, has the insects won? *TREE*. 34: 373-81
- Manual Oxoid.** 195. Publicado por UNIPATH. España. pp. 394
- Morón, M. A.** 1984. Escarabajos: 200 millones de años de evolución. Publicación del Instituto de Ecología, A. C. México.
- Morón, M. A. & R. A. Terrón.** 1988. Entomología práctica. Publicación del Instituto de Ecología, A. C. México. pp. 500
- National Academy of Sciences.** 1989. Manejo y control de plagas de insectos. Ed. LIMUSA. México. pp. 522
- Núñez-Valdéz, M. E.** 1993. Perspectivas de la biología molecular en el control de larvas de Scarabaidea de importancia agrícola. En: DIVERSIDAD Y MANEJO SOBRE PLAGAS SUBTERRANEAS. Morón, M. A. (Ed.) IV Mesa Redonda sobre plagas subterráneas. Soc. Méx. de Entomología. Inst. de Ecología, A. C. Xalapa, Veracruz. México. pp. 1-6
-

- Núñez-Valdéz, M. E. 1994. Identification and analysis of the virulence factors in *Serratia entomophila* causing Amber disease to the grass grub *Costelytra zealandica*. Ph.D. Dissertation, University of Canterbury, Christchurch. New Zealand.
- Núñez-Valdéz, M. E. & H. K. Mahanty. 1996. The amb2 locus from *Serratia entomophila* confers anti-feeding effect on larvae of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Gene*. 172(1): 75-79
- O'Callaghan, M. 1989. The soil Ecology of *Serratia entomophila* a bacterial pathogen of the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica* (White). Ph. D. Dissertation University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.
- O'Callaghan, M. & T. A. Jackson. 1993. Isolation and enumeration of *Serratia entomophila* -a bacteria pathogen of the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. *Journal of Applied Bacteriology*. 75: 307-14.
- Pimentel, D., T. W. Culliney, D. J. Reinemann & K. B. Beckman. 1989. Low-input sustainable agriculture using ecological management practices. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 27: 3-24
- Podgwaite, J. D. & Cosenza, B. J. 1976. A strain of *Serratia marcescens* pathogenic for larvae of *Lymantria dispar*: Infectivity and mechanisms of pathogenicity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 27: 199-208
- Poprawski, T. J. & W. N. Yule. 1990. Bacterial pathogens of *Phyllophaga* spp. (Col., Scarabaeidae) in southern Quebec, Canada. *J. Appl. Ent.* 109: 414-22
- Puig, H. & R. Bracho. (eds.) 1987. El Bosque Mesófilo de Montaña de Tamaulipas. Instituto de Ecología, A. C. México. pp. 186
- Ridsdill-Smith, T. J. & R. J. Roberts. 1976. Insect density effects in root feeding by larvae of *Sericesthis nigrolineata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. ApPl. Ecol.* 13: 423-28
- Ríos-Rosillo, F. & S. Romero-Parra. 1982. Importancia de los daños al maíz por insectos en el estado de Jalisco, México. (Coleoptera). *Folia Entomológica Mexicana*. 52: 41-60
- Rodríguez-del-Bosque, L. A. 1988. *Phyllophaga crinita* (Burmeister): historia de una plaga del suelo (1955-1988).- En: III MESA REDONDA SOBRE PLAGAS DEL SUELO. Morón, M., Deloya, C.L. (Eds.) Soc. Mexicana de Entomología, Morelia,
-

Michoacán.

- Romero, P. S. 1980. Plagas del maíz en México. Memoria VIII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. México. pp. 21-28
- Sánchez-Ramos, G., J. R. Herrera-Herrera & S. Niño Maldonado. 1992. Reconocimiento preliminar de *Phyllophaga* sp.1 (Coleoptera: Anodontata) en áreas de cultivo de la reserva de la biosfera "El Cielo". *Biotam*. 4(1): 54-60
- Starr, M. P., P. A. D. Grimont, F. Grimont & P. B. Starr. 1976. Caprylate-Thallos Agar Medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 4(3): 270-76
- Steinhaus, E. A. 1959. *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. *Hilgardia*. 28: 351-80
- Stucki, G., T. A. Jackson & M. J. Noonan. 1984. Isolation and characterization of *Serratia* strains pathogenic for larvae of the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *New Zealand Journal of Science*. 27: 255-60
- Trought, T. E. T., T. A. Jackson & R. A. French. 1982. Incidence and transmission of a disease of grass grub (*Costelytra zealandica*) in Canterbury. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*. 10: 79- 82
- van Emden, H. E. 1989. Pest controls. Chapter 3. Biological control. 2nd edition. Edward Arnold published. London. UK, pp. 27-37
- Villalobos, F. J. 1991. The community structure of soil Coleoptera (Mélolonthidae) from a tropical grassland in Veracruz, Mexico. *Pedobiologia* 35: 225-38
- Villalobos, F. J. 1992. The potential of entomopathogens for the control of White grubs pests of corn in Mexico. En: USE OF PATHOGENS IN SCARAB PEST MANAGEMENT. Glare, T. R. and Jackson, T. A. (Eds.) Intercept Andover, Hampshire. pp. 253-60
- Villalobos, F. J. 1994. The role of soil organic matter in the sustainable management of the grass grub *Costelytra zealandica* (White) in Canterbury pastures. Ph. D. Dissertation, University of Canterbury, Christchurch. New Zealand.
- Villalobos, F.J. 1995. El manejo sostenible de plagas del suelo: el caso de las larvas de Melolonthidae. En: MÉTODOS ALTERNATIVOS AL QUÍMICO PARA EL CONTROL DE PLAGAS. CONTROL DE PLAGAS CON MÉTODOS
-

- ALTERNATIVOS AL QUÍMICO. Aragón, G. A. (Ed.) Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología. Puebla, Pue. México. pp. 69-89
- Villalobos, F. J. 1997a. The sustainable management of White grubs (Coleoptera. Melolonthidae) pest of corn in "El Cielo" Biosphere Reserve, Tamaulipas, Mexico. *Journal of Sustainable Agriculture*. (En prensa)
- Villalobos, F. J., K. M. Goh, D. J. Saville & R. B. Chapman 1997b. Interactions among soil organic matter, levels of the indigenous entomopathogenic bacterium *Serratia entomophila* in soil, amber disease and the feeding activity of the scarab larva of *Costelytra zealandica*: a microcosm approach. *Applied Soil Ecology* 5: 231- 46
- Wilson, C. J., H. K. Mahanty & T. A. Jackson. 1992. Adhesion of bacteria (*Serratia* spp.) to the foregut of grass grub (*Costelytra zealandica* (White)) larvae and its relationship to the development of amber disease. *Biocontrol Science and Technology*. 2: 59-64
-