

ANTAGONISMO ENTRE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y BACTERIAS PRESENTES EN LA CUTÍCULA DE CUCARACHAS URBANAS

Lozano Francisco¹, Gutierrez Alejandra².

¹Proyecto Biodiversidad de Hongos Patógenos de Insectos de Interés Agrícola y Salud Humana (11N780) - FCNyM-UNLP. Av. 60 y 122, La Plata (1900), La Plata, Argentina. Contacto: becauseiamamc@gmail.com

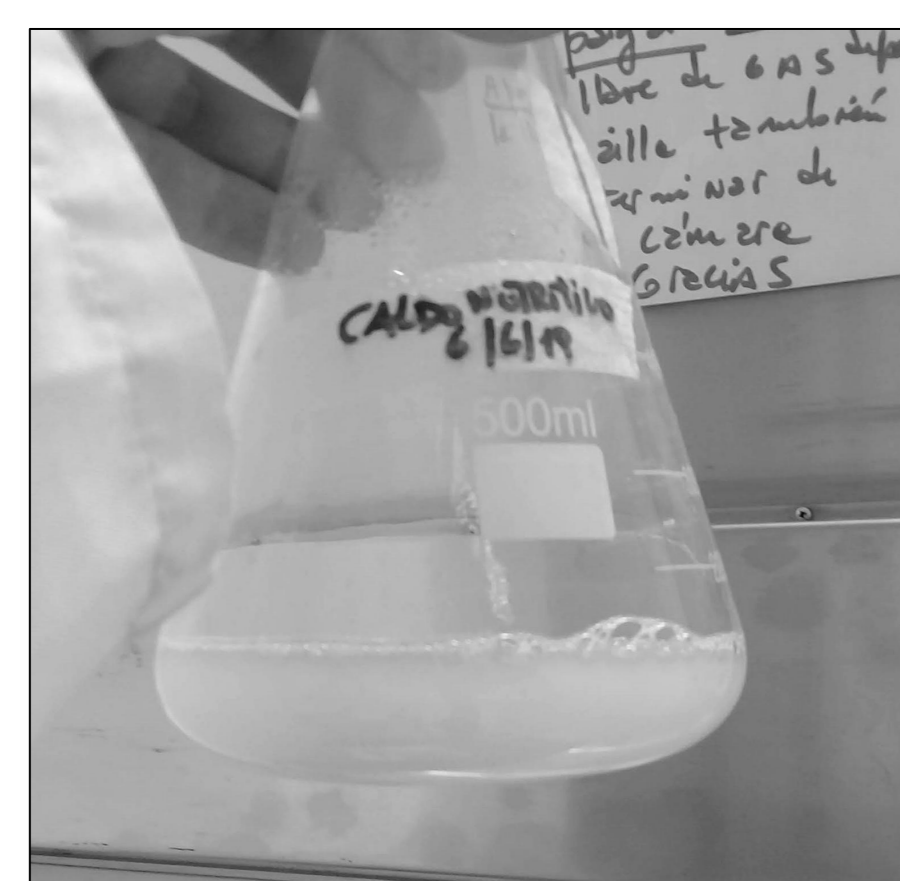
²Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (CEPAVE-UNLP-CONICET) Bv. 120 y 60, La Plata (1900), La Plata, Argentina. Contacto: gutialeja@gmail.com

INTRODUCCIÓN

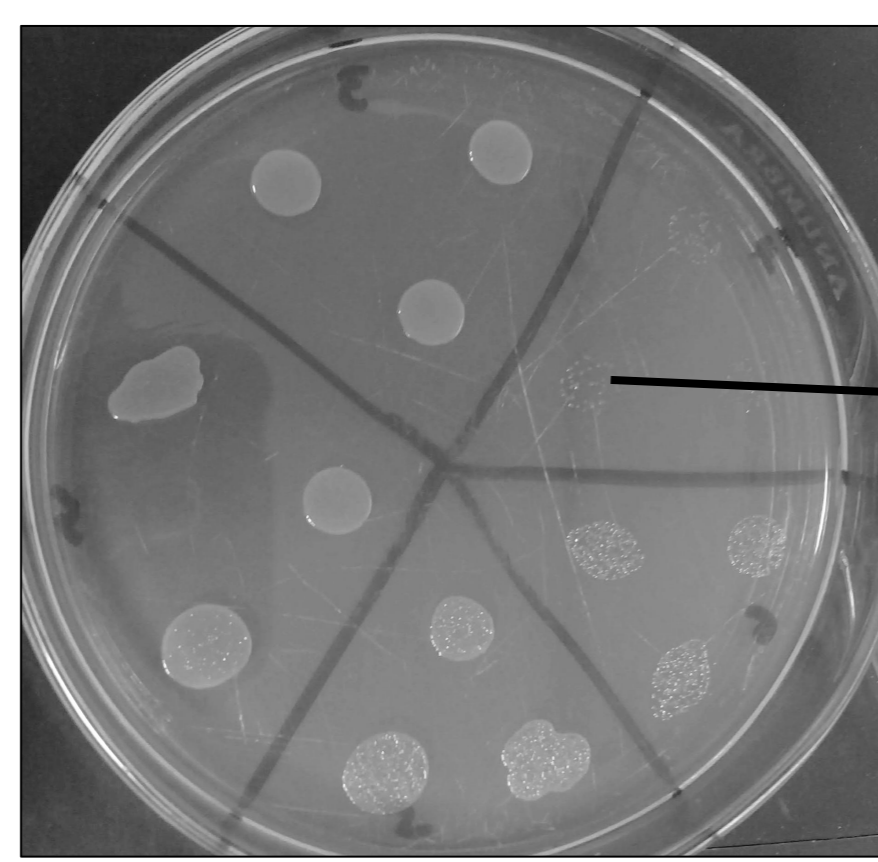
En una primera instancia de trabajo se observó que la acción de *Metarhizium anisopliae* (*Ma*) (Hypocreales: Clavicipitaceae) sobre *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Blattellidae) y *Periplaneta fuliginosa* (S.) (Blattodea: Blattidae) es inhibida por la acción de los microorganismos presentes en su cutícula. La cepa bacteriana 10D se aisló de la cutícula de la cucaracha *Periplaneta fuliginosa* y se identificó como *Serratia marcescens* basándose en la secuencia de ADNr 16S. Se planteó como objetivo comprobar *in-vitro* si la bacteria aislada inhibe el crecimiento del hongo *M. anisopliae* CEP085.

MATERIALES Y MÉTODOS

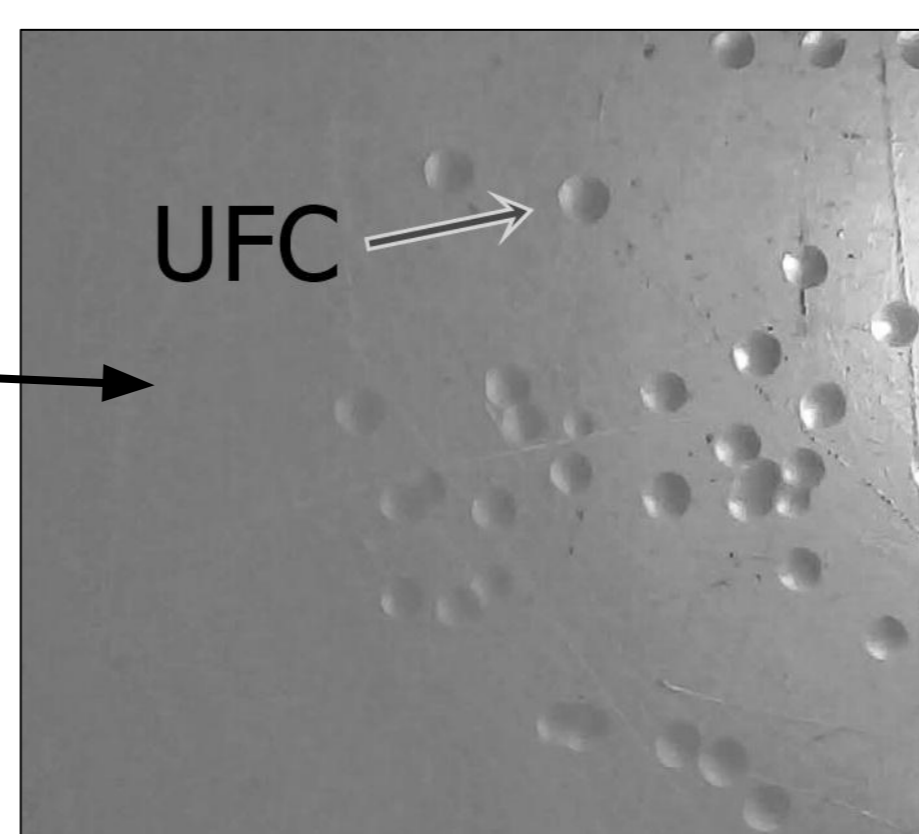
Unidades Formadoras de Colonias (UFC): El objetivo es cuantificar las bacterias viables en el caldo nutritivo. Se realizaron 8 diluciones de la muestra y se sembraron las últimas 4 diluciones en una caja con Agar nutritivo. Se cuantificó luego de 24 hs. en incubadora a 27°C mediante la fórmula $UFC/mL = \text{No. de colonias por placa} \times \text{inversa del factor de dilución} / \text{ml de la muestra sembrada}$.



Bacteria *Serratia marcescens* (10D) en caldo nutritivo



Cuantificación de UFC en Agar nutritivo



Detalle de Unidades Formadoras de Colonias de *S. marcescens*

Resultados: Luego de 24 horas de crecimiento en agitación a 120 rpm se cuantificaron un promedio de $4,8 \times 10^{10}$ UFC/ml.

Antifungigrama: El objetivo de este ensayo fue estimar la actividad antifúngica de la bacteria *S. marcescens* a través del método de difusión de discos. Sobre una placa de Petri estéril, conteniendo medio SDYA, se colocó 1ml de una suspensión de esporas de *M. anisopliae* de 1×10^5 conidios/ml y se distribuyó homogéneamente sobre la placa utilizando un ansa de Drigalski. Se distribuyeron tres papeles de filtro estériles de 5 mm de diámetro dentro de cada placa de Petri con una pinza estéril. Diez microlitros de la bacteria se colocaron sobre uno de los papeles de filtro, se realizó por duplicado, en el tercer disco de papel se agregaron 10 µl de solución fisiológica como control (Fig.1). Las placas fueron incubadas a 25°C durante 10 días, controlando el crecimiento diariamente. Después de la incubación se midieron los halos de inhibición. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



Cultivo de *M. anisopliae* CEP085

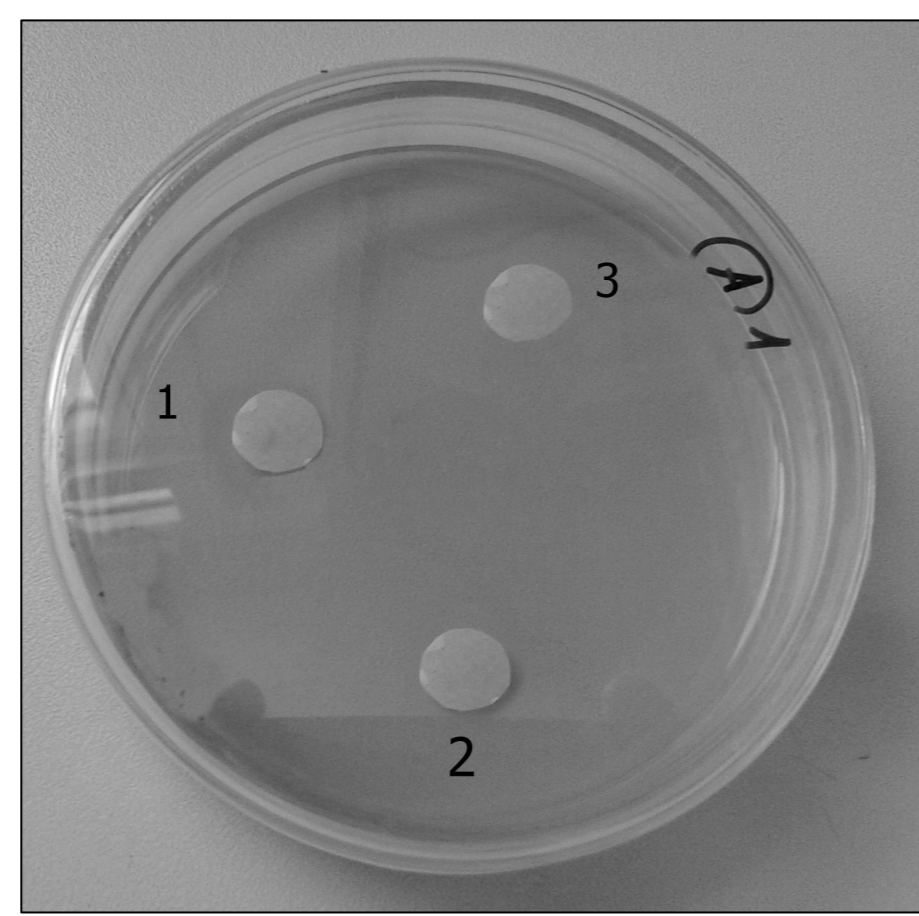


Figura 1. Los números 1 y 2 marcan el tratamiento y el 3 el control.

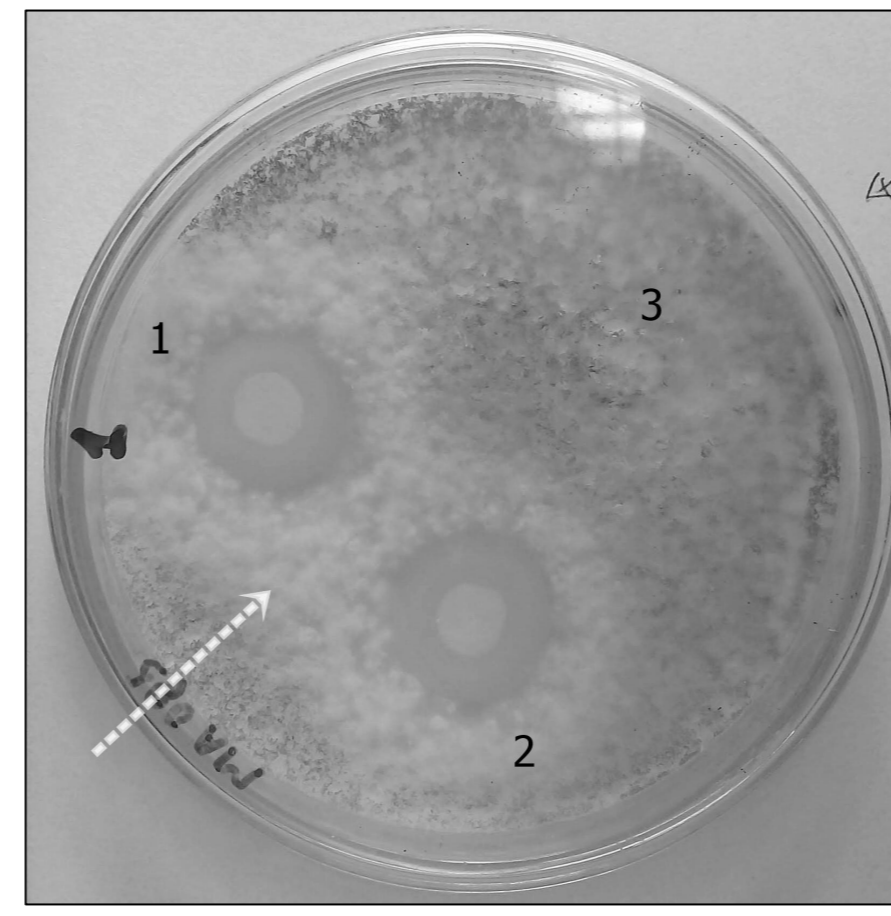


Figura 2. Detalle de la actividad antifúngica de *S. marcescens* (1y2) contra *M. anisopliae* 10 días postincubación

Resultados: El examen visual mostró que la bacteria inhibe la acción del hongo *M. anisopliae* CEP 085. El diámetro promedio de las zonas de inhibición que rodean los papeles de filtro que contenían 10 µl de la suspensión bacteriana alcanzó $10,5 \pm 3$ mm de inhibición de la esporulación, mientras que los 10 µl del control no produjeron zona de inhibición. En la Fig. 2 la flecha blanca marca la zona de inhibición donde hay ausencia de esporulación.

Viabilidad o porcentaje de germinación conidial: La suspensión de conidios de *M. anisopliae* (1×10^5 conidios / ml) se añadió a una suspensión de la bacteria (1×10^5 UFC / ml) en una relación 1:1, y se pipeteó 100 µl de la mezcla sobre la superficie de un portaobjetos que contiene 500 µl de medio de SDYA como sustrato. Los portaobjetos se colocaron sobre papel de filtro húmedo dentro de una placas de Petri estéril de 9 mm y se incubaron a 25 °C durante 24 horas (cámara de viabilidad). El número de conidios germinados (conidios que exhiben un tubo germinal mayor que el diámetro de los conidios) se determinó bajo microscopía óptica (400x) contando 600 conidios tres veces por cada combinación de hongos y bacterias y cada control que consistió en sembrar solo la suspensión fúngica. Se realizaron tres réplicas para cada prueba.



Cámara de viabilidad

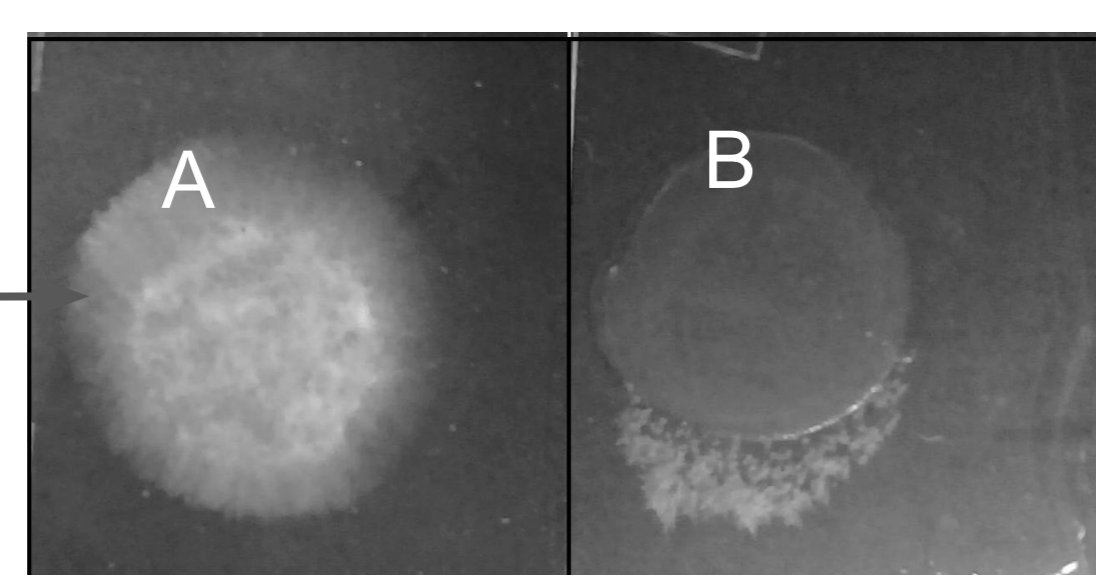


Figura 3.(A) Detalle de la viabilidad del hongo o control; (B) el hongo + la bacteria.

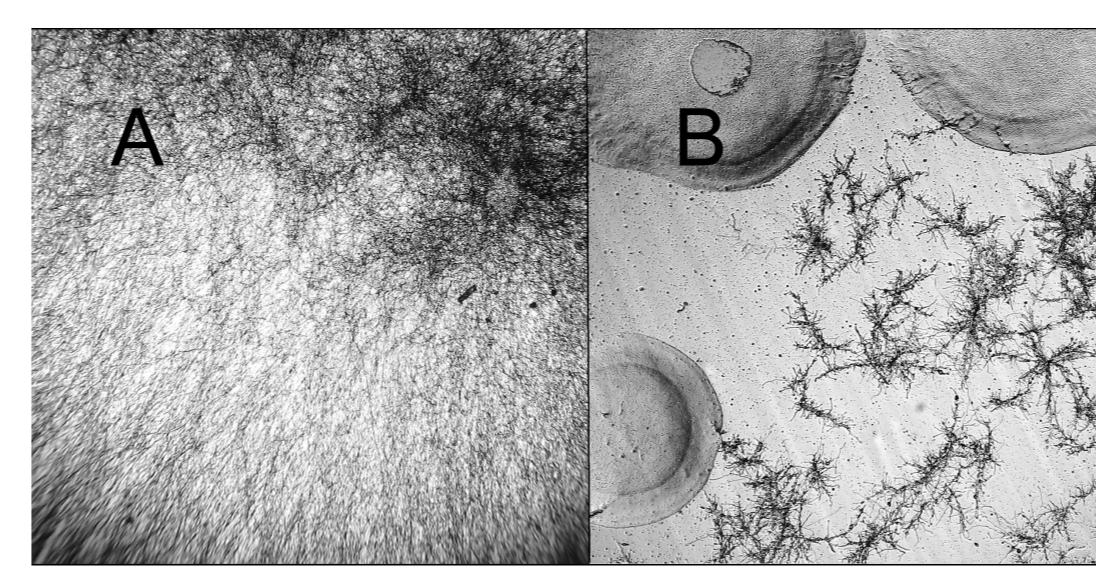


Figura 4.(A) Detalle al microscopio óptico la viabilidad del hongo; (B) el hongo + la bacteria (aumento total 40 veces)

Resultados: En este caso se observó una disminución de la germinación conidial en los tratamientos en comparación con el control (fig. 3 y 4). Sin embargo, este ensayo se debe repetir para cuantificar el porcentaje.

CONCLUSIONES

Si bien aún restan estudios por realizar podemos decir que la cepa 10D de *S. marcescens* no solo disminuyó la viabilidad del hongo, sino que también inhibió la esporulación de *Metarhizium anisopliae* CEP085. Estos estudios preliminares nos permiten suponer que los microorganismos presentes en la cutícula de las cucarachas podrían contribuir a la resistencia a la infección por hongos entomopatógenos. Al comprender el modo de acción del hongo *M. anisopliae* al colonizar la cutícula de las cucarachas citadas, podremos comprender la forma en que son capaces o no de infectar al hospedador y así contribuir a mejorar los métodos de aplicación de estos hongos.