

COMUNICACIÓN CORTA

Bacterias patógenas de larvas de *Bombyx mori* L. en áreas de reproducción en Cuba

Adrian A. Díaz Sánchez^I, Mylene Corzo López^I, Michel Báez Arias^{II}, Ivette Espinosa Castaño^{II}, Marlene Prieto Abreu^{III}, Roberto C. Fiallo Madruga^{III}, María del Carmen Pérez Hernández^{IV}, Yamila Martínez Zubiaur^{II}

^IDirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA, Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. ^{II}Departamento de Microbiología Veterinaria, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, CENSA, Autopista Nacional y Carretera de Tapaste, Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. ^{III}Estación de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Central España Republicana, CP 44280, Perico, Matanzas, Cuba. ^{IV}Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Carretera de Tapaste Km 3,5 San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Los aislados bacterianos SUR - 6, DiP/2012 y Oct/Y se obtuvieron a partir de gusanos de seda (*Bombyx mori* L.) infectados naturalmente, los cuales presentaban síntomas evidentes de flacheria bacteriana. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar los patógenos bacterianos asociados a estos síntomas observados en las crías de gusano de seda en zonas de Cuba, para establecer medidas de control y saneamiento. Los estudios morfológico, bioquímico y fisiológico de los aislados permitieron identificarlos como *Enterobacter cloacae* (SUR - 6), *Serratia marcescens* (DiP/2012) y *Acinetobacter baumannii* (Oct/Y), los cuales, en la literatura, son informados ampliamente como patógenos de insectos.

Palabras clave: *Bombyx mori* L., flacheria, septicemia bacteriana, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*.

Pathogenic bacteria of *Bombyx mori* L. larvae in breeding areas of Cuba

ABSTRACT: The bacterial isolates SUR - 6, DiP/2012 and Oct/Y were isolated from silkworms (*Bombyx mori* L.) infected naturally, which presented evident symptoms of bacterial flacheria. The goal of this study was to identify the bacterial pathogens associated with symptoms observed in silkworm breeding areas of Cuba, to establish control and sanitation measures. The morphological, biochemical and physiologic study allowed to identify these isolates as *Enterobacter cloacae* (SUR - 6), *Serratia marcescens* (DiP /2012), and *Acinetobacter baumannii* (Oct/Y), which are informed widely in the literature like pathogens of insects.

Key words: *Bombyx mori* L., flacheria, bacterial septicemia, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*.

La sericultura constituye el único campo de la agricultura que se dedica a la reproducción a gran escala del gusano de seda (*Bombyx mori* L.), lepidóptero con alto valor económico y domesticado para la producción de seda por más de 5000 años (1). En China, esta actividad ocupa una importante posición en la vida económica y cultural de su historia; representa el principal país productor y exportador mundial de seda, con cifras que superan el 70 % de la producción mundial,

lo que representa ingresos superiores a los 8000 millones de dólares (2).

En Cuba, las investigaciones para la introducción de gusanos de seda comenzaron hace aproximadamente 10 años; sin embargo, no fue hasta el año 2011 cuando se dio inicio a su propagación masiva. El gusano de seda es afectado por múltiples tipos de patógenos, como son bacterias, protozoos, hongos y

virus que causan enfermedades conocidas como flacheria, grasseeria, muscardina y pebrina. Sin embargo, la flacheria posee gran importancia, pues provoca pérdidas en las crías de hasta 70 % (3). Por tanto, la identificación y caracterización de nuevas especies patógenas es de sumo interés para la toma de medidas de control y saneamiento (4).

Los principales síntomas de la enfermedad están asociados a la pérdida de apetito en los individuos enfermos, la piel y el cuerpo se tornan flácidos, y las larvas no tardan en morir, después de lo cual se ennegrecen, la piel se rompe y dejan escapar un líquido oscuro de olor desagradable (3).

Las bacterias poseen una función activa en el desarrollo de la enfermedad, ya que pueden actuar como patógenos individuales o en combinación con algún virus. Por tal razón son consideradas como causa probable de enfermedades epizoóticas, así la flacheria microbiana puede ser originada por un patógeno bacteriano o viral (5). La flacheria bacteriana se clasifica en tres grupos denominados septicemia, toxicosis bacteriana y enfermedades entéricas bacterianas (6).

En zonas de cría del gusano de seda en Cuba se observaron individuos con diferentes sintomatologías y comportamientos similares a los descritos para la presencia de patógenos. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar los patógenos bacterianos asociados a la sintomatología observada en las crías de gusano de seda.

Los muestreos se realizaron en áreas de producción en la Habana, durante los meses de septiembre de 2012 a febrero de 2013. Se colectaron de 10 a 14 larvas de gusano de seda *B. mori* por cada una de las naves de producción que presentaron síntomas como: exudación, cambio de coloración a amarillo brillante, segmentos hinchados, necróticos, vómitos, excreta de heces fecales líquidas y semisólidas. Las larvas se trasladaron al Departamento de Fitopatología del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Estas larvas, de diferentes edades y fechas de crianza, se alimentaron desde su eclosión con hojas de morera (*Morus alba* L.).

Las larvas se desinfestaron mediante inmersión en etanol (95%-10s), posteriormente en hipoclorito de sodio (5% - 1 min), y por último se lavaron de 4 a 5 veces con agua destilada (7). Se tomó una muestra del tracto digestivo, que se maceró y colocó en un tubo eppendorf con 200 µl de solución salina estéril (0,85%). A partir de la muestra, se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-7} , que se sembraron en medio Columbia Agar Base (BIOCEN) suplementado con san-

gre de carnero (5%) y medio Agar MacConkey (BIOCEN), respectivamente. Las placas se sellaron con parafilm e incubaron a 37°C durante 24 horas.

Los aislamientos se incubaron en placas Petri con Agar Nutriente (37°C-24 h), en este período se observaron las características de las colonias como color, olor, transparencia, humedad, forma y tipo de borde. La morfología celular se determinó mediante tinción de Gram (8), se realizaron las pruebas de catalasa y oxidasa (9), así como crecimiento en medio Agar MacConkey (BIOCEN). El resto de los análisis bioquímicos y fisiológicos se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (10). Los resultados permitieron identificar el género bacteriano de los aislados, mediante la comparación con otras bacterias descritas en la literatura.

En el 85% de las muestras colectadas se obtuvieron aislamientos bacterianos, y de esta cifra se consideraron de mayor importancia, debido a la pureza y abundancia de su crecimiento, el 35% de los mismos. Los aislados SUR-6 y Oct/Y produjeron colonias de color blanco, bordes regulares y mucosas, mientras que el aislado DiP/2012 produjo colonias de color rojo en agar nutriente. Las cepas aisladas comparten características morfológicas y culturales con los géneros *Enterobacter* spp. (SUR-6), *Serratia* spp. (DiP/2012) y *Acinetobacter* spp. (Oct/Y) (Tabla 1).

Los resultados demostraron que el aislado SUR - 6 es una bacteria anaerobia facultativa, ya que puede utilizar y producir ácidos mediante la fermentación de azúcares, tales como: amigdalina, arabinosa, glucosa, melobiosa, manitol, sacarosa, sorbitol y ramnosa. Además, las pruebas de la beta-galactosidasa (ONPG), arginina deshidrolasa, ornitina descarboxilasa, producción de acetoina (Voges-Proskauer) y de utilización del citrato como fuente de carbono fueron positivas. La bacteria fue incapaz de fermentar el carbohidrato inositol, y fueron negativas también las pruebas de la lisina descarboxilasa, producción de H_2S , ureasa, triptófano desaminasa, producción de indol y gelatina de Kohn. Con estos resultados se logró identificar este microorganismo como *Enterobacter cloacae* (Tabla 2).

El aislamiento DiP/2012 representó una bacteria anaerobia facultativa, que puede utilizar y producir ácidos mediante la fermentación de la mayoría de los azúcares empleados, excepto melobiosa, arabinosa y ramnosa. Fueron positivas las pruebas de la beta-galactosidasa (ONPG), lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, gelatina de Kohn, ureasa y de utilización del citrato como fuente de carbono. Por otro lado, fueron negativas las pruebas de la arginina deshidrolasa, producción de H_2S ,

TABLA 1. Principales características morfológicas de los aislados obtenidos./ *Principal morphological characteristics of the isolates.* *: No realizada/ *Not carried out.*

Características	Aislados		
	SUR - 6	DiP/2012	Oct/Y
Tinción de Gram	(-)	(-)	(-)
Morfología	Bacilos rectos	Bacilos rectos	Cocobacilos
Motilidad	(+)	(+)	(+)
Flagelos	(+)	(+)	(-)

TABLA 2. Resultados de la pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a los aislados SUR - 6, DiP/2012 y Oct/Y/ *Results of the biochemical and physiological tests of SUR - 6, DiP/2012 and Oct/Y isolates.*

Pruebas Bioquímicas	Aislados		
	SUR - 6	DiP/2012	Oct/Y
Orto-nitro-fenil β -Dgalactopiranúsido	(+)	(+)	(-)
Arginina deshidrolasa	(+)	(-)	(-)
Lisina descarboxilasa	(-)	(+)	(-)
Ornitina descarboxilasa	(+)	(+)	(-)
Utilización del citrato	(+)	(+)	(-)
Tiosulfato sódico, producción de H ₂ S	(-)	(-)	(-)
Ureasa	(-)	(+)	(-)
Triptófano desaminasa	(-)	(-)	(-)
Triptófano, producción de Indol	(-)	(-)	(-)
Producción de acetoína (Voges-Proskauer)	(+)	(-)	(-)
Gelatina de Kohn	(-)	(+)	(+)
Fermentación/Oxidación de glucosa	(+)	(+)	(+)
Fermentación/Oxidación de manitol	(+)	(+)	(-)
Fermentación/Oxidación de inositol	(-)	(+)	(-)
Fermentación/Oxidación de sorbitol	(+)	(+)	(-)
Fermentación/Oxidación de ramnosa	(+)	(-)	(-)
Fermentación/Oxidación de sacarosa	(+)	(+)	(-)
Fermentación/Oxidación de melobiosa	(+)	(-)	(+)
Fermentación/Oxidación de amigdalina	(+)	(+)	(-)
Fermentación/Oxidación de arabinosa	(+)	(-)	(+)
Citocromo Oxidasa	(-)	(+)	(-)
Nitrato de potasio, producción de NO ₂	(+)	(+)	(-)
Nitrato de potasio, reducción a gas N ₂	(-)	(-)	(-)
Catalasa	(+)	(+)	(+)
Oxidasa	(-)	(+)	(-)
Anaerobio facultativo	(+)	(+)	(-)

producción de acetoína (Voges-Proskauer), triptófano desaminasa, producción de indol y gelatina de Kohn. Por tanto, con estos resultados se logró identificar este microorganismo como *Serratia marcescens*.

El aislado Oct/Y, es una bacteria aerobia, debido a su incapacidad de utilizar y producir ácidos mediante

la fermentación de los azúcares, a excepción de los carbohidratos glucosa, melobiosa y arabinosa, los cuales son empleados por la misma como fuente de carbono; el resto de las pruebas realizadas, a excepción de la gelatina de Kohn, fueron negativas, lo que permitió identificarlo como *Acinetobacter baumannii*.

Los resultados de las pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas básicas posibilitaron identificar los aislados como *Enterobacter cloacae* (SUR - 6), *Serratia marcescens* (DiP/2012) y *Acinetobacter baumannii* (Oct/Y), los cuales fueron informados en la literatura como patógenos de insectos (2, 11, 12, 13).

Actualmente se conocen una gran variedad de géneros bacterianos patógenos de *B. mori*, entre estos se destacan especies pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus* (12). En el caso de la septicemia, es causada comúnmente por *Bacillus* spp, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* Bizio y *Aeromonas* spp., aunque se informó que la virulencia de estas bacterias difiere, por lo que los síntomas y el curso de la enfermedad no son uniformes (11).

Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo permitieron establecer programas para la prevención y control de estos patógenos, a fin de evitar el incremento de las pérdidas en las producciones de la crianza afectada. Además, son la base para estudios futuros que permitirán conocer y profundizar en la patogenicidad de estas entidades bacterianas y sus efectos sinérgicos con otros patógenos, como el virus de la poliedrosis nuclear en *B. mori* (BmNPV).

REFERENCIAS

1. Karthikairaj K, Prasannakumar K, Isaiarasu L. Use of Plant Extracts for the Control of Flacherie Disease in Silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). International Journal of Microbiological Research. 2013;4(2):158-161.
2. Guo-Ping K, Xi-Jie G. Overview of silkworm pathology in China. African Journal of Biotechnology. 2011;10(79):18046-18056.
3. Chairman K, Singh A, Padmalatha C, Alagumuthu G. Effect of marine extracts on the microbial pathogens causing flacherie in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012; 1858-1861.
4. Zhang JS, Tang X, Xu L, Zhu F. Isolation and identification of a pathogen, *Providencia rettgeri*, in *Bombyx mori*. Journal of Bacteriology Research. 2013;5(2):22-28.
5. Govindan R, Devaiah MC. Bacterial Flacherie of Silkworm. Silkworm pathology Technical Bulletin. 1995;3:1-169.
6. Jing W. Silkworm Pathology. Beijing: China Agriculture Press. 2000:122-30.
7. Cappelozza S, Saviane A, Tettamanti G, Squadrin M, Vendramin E. Identification of *Enterococcus mundtii* as a pathogenic agent involved in the "flacherie" disease in *Bombyx mori* L. larvae reared on artificial diet. Journal of Invertebrate Pathology. 2011;106:386-393.
8. Yano DE. Técnicas en el Laboratorio de Microbiología. Curso: Técnicas de microbiología en Control de la Calidad Brasil. 1991.
9. Schadd NW. Laboratory guide to identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul: The American Phytopathological Society; 1988.
10. Benner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed 2005.
11. Chen Y, Huang J. Occurrence and control of the silkworm bacterial septicemia. Yun Nan Agricultural Science and Technology. 2008;3.
12. Amala RG, Ranjith SA. Probiotic supplementations to improve commercial characteristics, disease resistance and protein in the silkworm. World Journal of Biological Research. 2011;004(2):12-25.
13. Youngjin P, Kilho K, Kim Y. A Pathogenic Bacterium, *Enterococcus faecalis*, to the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*. Journal Asia - Pacific Entomology. 2002;5(2):221-225.

Recibido: 10-3-2014.
Aceptado: 7-10-2014.