

FIGURA No. 17. Bacillus cereus al microscopio de luz. Observe las cadenas de bacilos (estreptobacilos) Gram Positivos. (1.000X).

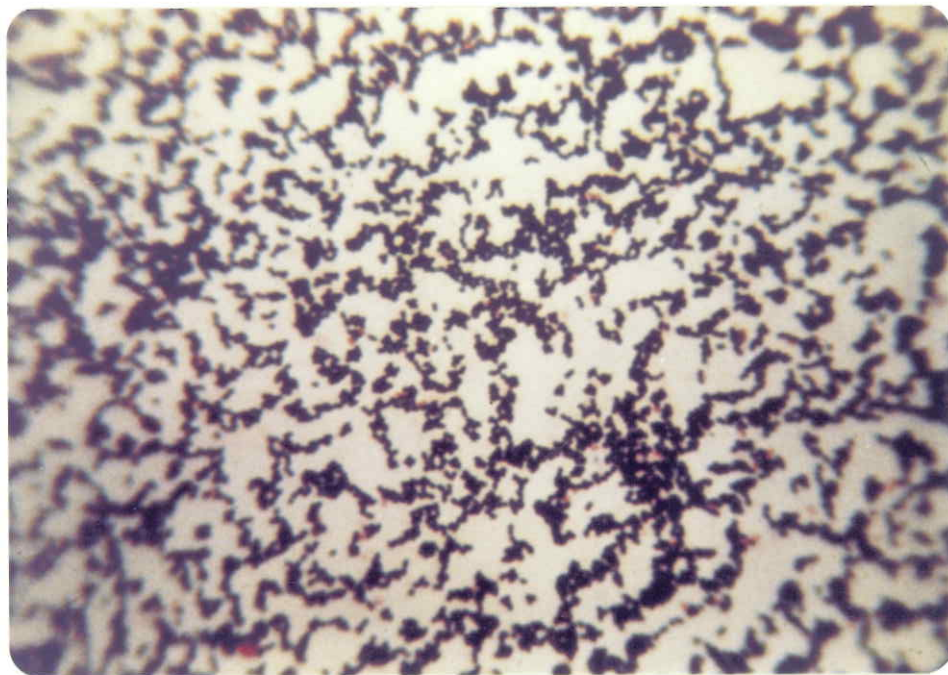


FIGURA No. 18. Micrococos Gram positivos al microscopio de luz (1.000X).

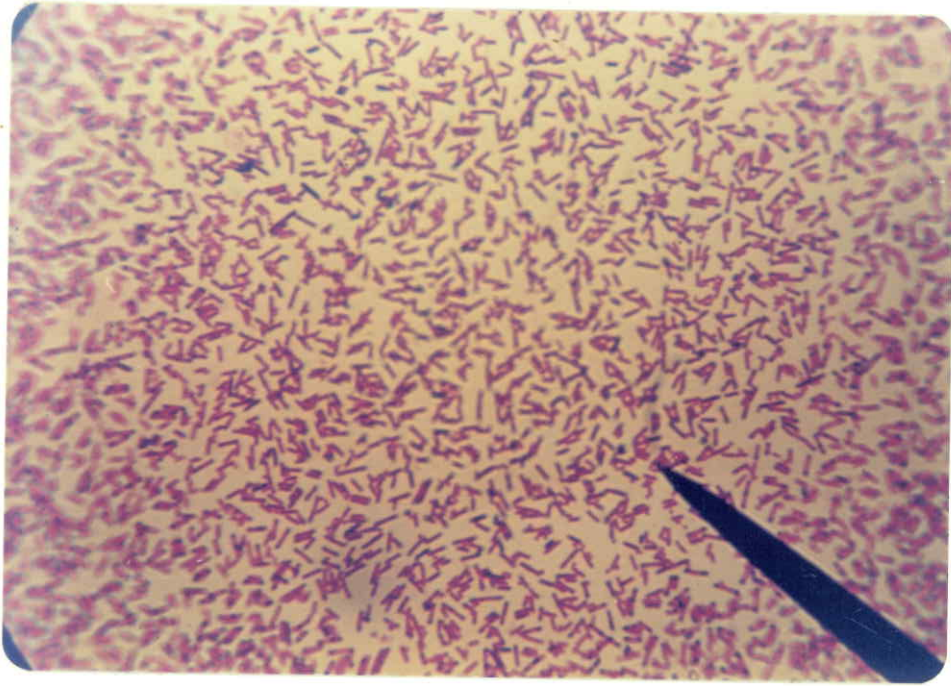


FIGURA No. 19. Bacilos cortos, Gram positivos al microscopio de luz . (1000X).

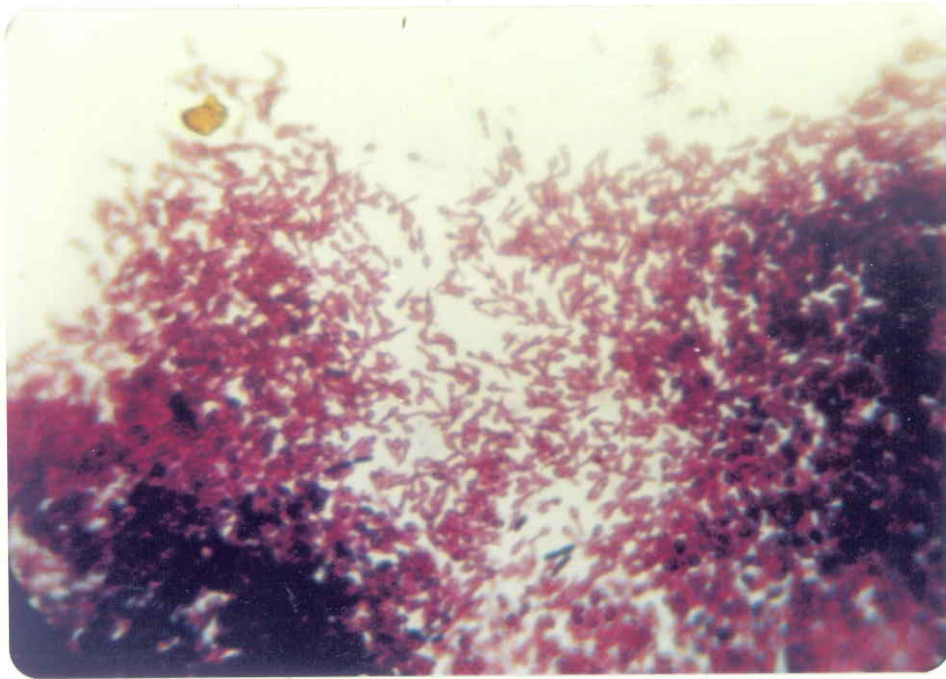


FIGURA No. 20. Clostridium sp, Gram positivos al microscopio de luz. (1000X). Observese la forma característica de fósforo de la bacteria.

Esta prueba se repitió en dos ocasiones encontrándose consistencia en los resultados respecto al aislamiento e identidad de los microorganismos.

De aquí se pudieron deducir varias características de la infección del huésped por bacterias que permitieron programar otras pruebas con el fin de determinar la especie patógena al huésped así:

- Los bacilos con morfología de "fósforo" e inmóviles (figura No. 20), sólo se encontraron cuando se colocó el huésped en un medio de crecimiento anaeróbico, estaban presentes en aislamientos de la parte externa tanto de larvas muertas por bacteriosis como larvas sanas, lo cual podía indicar que se trataba de una bacteria contaminante. En crecimiento aeróbico y en cajas de Petri con Agar-sangre no se encontró este tipo de bacteria. La morfología de estas bacterias corresponde al género Clostridium de acuerdo a la descripción hecha en el manual de Bergey's, (Holmes)(32). Las bacterias de este género se caracterizan por ser contaminantes del suelo y causantes de la "Gangrena en Vertebrados".
- En todas las pruebas tanto en Agar-sangre como en caldo nutritivo (crecimiento aeróbico y anaeróbico) se observó consistentemente en los aislamientos de la parte interna de larvas enfermas y en larvas sanas (Testigo), la presencia de bacterias con morfología de cocos muy pequeños(0,1-1,0 nanómetros(nm) de diámetro) inmóviles y Gram positivas (figura No. 18). Junto a este tipo

de bacterias y en los mismos aislamientos, se observó la presencia de bacilos cortos (1,5-2,5 nm de longitud) móviles y Gram positivos (figura No. 19).

El hecho de que estas bacterias se encontraron en la parte interna tanto en larvas sanas como muertas por bacteriosis, sugiere que son bacterias que se encuentran normalmente en el huésped posiblemente interviniendo en los procesos de digestión. Esto se pudo observar de nuevo más adelante, ya que en algunos de los cortes transversales de las larvas se encontraron estas bacterias en el intestino medio.

- Otro tipo de bacterias en forma de varillas alargadas (3-5nm) en cadena (Streptobacilos, figura No. 17), móviles y Gram positivos, se encontraron en los aislamientos de larvas enfermas por bacteriosis tanto en la parte externa como interna de dichas larvas. Este tipo de bacterias no se encontró en las larvas sanas (Testigo), su crecimiento fué muy bueno tanto en Agar-sangre (Aeróbico) como en caldo nutritivo (Anaeróbico). La forma de la colonia es ramificada (figura No. 10).

Sus características morfológicas al microscopio, así como el crecimiento de la colonia, sugerían que podía tratarse de la especie Bacillus cereus. Esta especie se ha reportado como patógena en varias especies de lepidopteros (Kuno) (38).

Con esta bacteria se hicieron pruebas de patogenicidad en el huésped utilizando grupos de 10 larvas de segundo y tercer instar y efectuando repeticiones. Los síntomas de patogenicidad se reprodujeron al inocular las larvas con 0,2 ml de una suspensión de células bacteriales en agua provenientes de cultivos de la bacteria sobre Agar-sangre. De acuerdo con estas observaciones se prepararon cultivos puros de la bacteria en Agar-sangre a 37°C para efectuar las pruebas de caracterización.

4. 1. 5 Caracterización de la bacteria patogénica.

La caracterización de la bacteria que se encontró consistentemente causando patogenicidad en el huésped, se hizo en base a la serie de pruebas bioquímicas recomendadas por Carter (13) y Buchanan y Gibbons (9), los resultados de las pruebas se presentan en la tabla No. 7.

Estos resultados están de acuerdo con las pruebas de caracterización establecidas para la especie Bacillus cereus Barkland y Barkland. La bacteria se encontró consistentemente causando patogenicidad en larvas del huésped en diferentes estados de crecimiento. Las larvas y pupas atacadas presentaban síntomas característicos como: Ennegrecimiento, inmovilidad y momificación en estados avanzados de post-muerte (figura No. 15), lo cual las distingue de las larvas afectadas por los virus de granulosis y poliedrosis nuclear.

TABLA No. 7. Observaciones y pruebas para la caracterización de la especie Bacillus cereus.

Pruebas	Resultado
1. Morfología al microscopio	- Gram positivas - Bacilos alargados con longitud de 10-12 nm y anchura de 3-5 nm. - Móviles - Sin presencia de cristales de proteína intracelulares. - Posee esporas de forma elíptica o cilíndrica que tienen una posición central en la célula bacterial.
2. Productos de fermentación sobre glucosa.	- Ácidos - Gas (CO ₂).
3. Producción ácida sobre arabinosa xilosa y manitol	- Negativo
4. Reducción de nitratos (NO ₃) a nitritos (NO ₂)	- Positivo
5. Reacción en clara de huevos.	- Positivo
6. Crecimiento en Agar Anaeróbico	- Positivo
7. Crecimiento en Agar Alkalino y Citrato	- Positivo
8. Descomposición de Tyrosina	- Positivo
9. Ureasa	- Positiva
10. Hidrolisis de almidón	- Positiva
11. Crecimiento a 65°C	- Negativo
12. Detección de acetilmetil-carbinol	- Positiva
13. Hemolisis	- Altamente positiva, hay destrucción total de glóbulos rojos (figura No. 10)

En las observaciones realizadas durante los diferentes ensayos se encontró que la bacteria puede causar enfermedad en las larvas de S. frugiperda, sola ó en combinación con los virus de poliedrosis y granulosis.

Esta bacteria posee un amplio rango de huéspedes entre los insectos del orden Lepidoptera y ha sido reportada en numerosas ocasiones como bacteria entomopatógena tanto en condiciones de campo como de laboratorio.

Wai Nam to et al (62) la encontraron causando enfermedad en larvas de T. ni que estaban siendo inoculadas con un virus de poliedrosis nuclear. Dichos investigadores aprovecharon la presencia ocasional de la bacteria para medir su patogenicidad en larvas en 5 días de edad de este Noctuidae, sola y asociada con virus de poliedrosis nuclear, encontrando que la bacteria B. cereus es patogénica a T. ni y puede actuar sola ó en combinación con VPN para causar patogenicidad en el huésped, pero no se encontró relación sinérgica cuando actuaron ambos microorganismos simultáneamente.

Además concluyeron que la patogenicidad de B. cereus sobre T. ni es menor que la causada por B. thuringiensis y que la mortalidad observada en el huésped cuando actúa solo ó en combinación con VPN no es lo suficientemente grande como para justificar su utilización en programas de control biológico.