

Estudios para la reproducción *in vitro* de la bacteria *Paenibacillus lentimorbus* (*Bacillus lentimorbus*) para el control de larvas de *Phyllophaga elenans*.

GEOVANNY FERNÁNDEZ REDONDO

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE
INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA**

**PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO
Y LA CONSERVACIÓN**

ESCUELA DE POSGRADO

**Estudios para la reproducción *in vitro* de la bacteria *Paenibacillus
lentimorbus* (*Bacillus lentimorbus*) para el control de larvas de
Phyllophaga elenans.**

**Tesis sometida a consideración de la Escuela de Postgrado, Programa de Educación para el
Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
como requisito parcial para optar al grado de:**

Magíster Scientiae

Por

Geovanny Fernández Redondo

CATIE

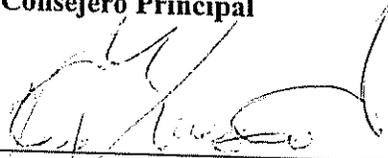
Turrialba, Costa Rica; 2002

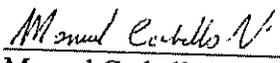
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

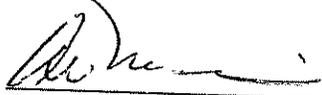
FIRMANTES:

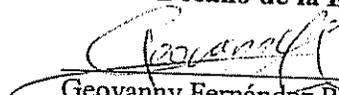

Eduardo Hidalgo Jamienson, M.Sc.
Consejero Principal


Vera Sánchez Garita, Ph.D.
Miembro Comité Consejero


Manuel Carballo, M.Sc.
Miembro Comité Consejero


Francisco Badilla Fernández, M.Sc.
Miembro Comité Consejero


Ali Moslemi, Ph.D.
**Director Programa de Educación y
Decano de la Escuela de Posgrado**


Geovanny Fernández Redondo
Candidato

DEDICATORIA

A mi mamá y papá que me apoyaron en todo momento y me han dado su amor a través de los tiempos en los buenos y malos momentos; a mi hermana Magda y mis hermanos Carlos y Ronald y todas esas personas que me han apoyado y alentado a recuperarme y continuar mi vida con éxito.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a DIOS el haberme permitido concluir con éxito mis estudios de maestría, pero sobre todo le doy gracias por permitirme vivir esta gran experiencia al lado de mis compañeros y amigos latinoamericanos.

Agradezco de sobremanera a Eduardo Hidalgo por toda la ayuda brindada en la elaboración de este proyecto y por ser, una vez mas, mi consejero de tesis. También quiero agradecer la ayuda de Manuel Carballo, Francisco Badilla y Vera Sánchez quienes fueron mis profesores asesores o miembros del comité de tesis.

En especial mi mas profundo agradecimiento a Vera quién no sólo cumplió su función como miembro del comité, si no que además se preocupó por mi superación académica y social al brindarme su apoyo incondicional en todo momento, gracias Vera, siempre te recordaré.

Al Luis Mora, profesor de química de la Sede Universitaria del Atlántico de la UCR; Ana Patricia Leandro química del Laboratorio de Suelos del CATIE; a Gerardo Rodríguez, profesor de Bioquímica de la UNA; Marco Tulio Lobo y Eduardo Obando Fonseca, profesores de la Escuela de Química de la UCR.

Agradezco a todo el personal del Laboratorio de Fitoprotección y el CATIE en general por su gran ayuda en todo momento, especialmente a Adolfo Martínez, Martín Hoopen, Claudio Arroyo, Jonny Garcia, Arturo Gamboa, Giselle Alvarado, Armando Portugués y a mi amiga Carmen García

Quiero dar gracias a mis mejores amigos de la promoción: Jenny Berganza y su esposo Rovell Guillén; Jorge Cruz López y su esposa Mercedes Gordillo; Katuska Andrew y su esposo José Luis, Héctor Ávila, Roger Meneses y su esposa Yossette y a mi amigo Jobert Angrand.

Y a esa mujer que llegó a mi vida en los últimos meses de estudio y me dio un nuevo aliento para concluir esta tesis con éxito.

BIOGRAFÍA DEL AUTOR

El autor de nacionalidad costarricense, nació en el mes de octubre de 1970, llegó a Turrialba en 1971, ciudad en la que cursó sus estudios de primaria en la Escuela Nuestra Señora de Sión y secundaria en el Colegio Técnico Profesional Agropecuario de la Suiza.

Efectuó sus estudios superiores en la Sede Universitaria del Atlántico de la Universidad de Costa Rica, ubicada en Turrialba en donde se graduó, en primer lugar, como bachiller en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotecnia en 1996, y en segundo lugar, como licenciado en esta misma especialidad obteniendo una mención de honor en su trabajo de tesis en el año 2000.

Ingresó al Programa de Estudios de Posgrado del CATIE en enero del año 2001, en donde obtuvo el título de Magister Scientiae con énfasis en Fitoprotección en diciembre del 2002.

CONTENIDO

Lista de figuras	ix
Lista de cuadros	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVO GENERAL	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
1.3 HIPÓTESIS	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Las larvas de los escarabajos	3
2.2 Bacterias entomopatógenas	3
2.3 Reclasificación taxonómica de <i>Bacillus popilliae</i> y <i>Bacillus lentimurbus</i>	4
2.4 Descripción de <i>Paenibacillus spp</i>	5
2.4.1 Ciclo de vida de <i>Paenibacillus spp</i>	6
2.4.2 Proteína cristalina de <i>Paenibacillus spp</i>	7
2.4.3 Desarrollo de la enfermedad lechosa	8
2.5 Producción <i>in vitro</i> de la bacteria	8
2.5.1 Crecimiento de la bacteria en medios selectivos	9
2.5.2 Germinación de las esporas	9
2.5.3 Esporulación	10
2.5.4 Pérdida de virulencia en medios artificiales	11
2.6 Requerimientos nutricionales de <i>Paenibacillus spp</i>	12
2.7 Requerimientos de oxígeno	13

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1 Localización.....	14
3.2 Material experimental.....	14
3.3 Obtención del inóculo.....	14
3.4 Descripción de las fases de desarrollo de <i>P. popilliae</i> y cambios que induce en las larvas durante su desarrollo.....	15
3.5 Germinación de <i>P. lentimorbus</i> en medios artificiales.....	16
3.5.1 Diseño experimental.....	16
3.5.2 Variables de respuesta.....	17
3.5.3 Tratamientos.....	18
3.6 Reproducción de células vegetativas en medios artificiales.....	19
3.6.1 Diseño experimental.....	19
3.6.2 Tratamientos.....	20
3.6.3 Variable de respuesta.....	20
3.7 Extracción de <i>P. lentimorbus</i> de larvas de <i>P. eleanans</i> infectadas y reproducción <i>in vitro</i> ..	21
3.7.1 Metodología.....	21
3.8 Esporulación <i>in vitro</i> de <i>P. lentimorbus</i>	22
3.8.1 Diseño experimental.....	22
3.8.2 Tratamientos.....	23
3.8.3 Variable de respuesta y análisis de datos.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1 Descripción de las fases de desarrollo de <i>P. lentimorbus</i> y cambios que produce en las larvas durante su desarrollo.....	24
4.2 Germinación de esporas y reproducción de células vegetativas en medios artificiales.....	28
4.2.1 Preparación del medio de cultivo para la reproducción <i>in vitro</i> de <i>P. lentimorbus</i>	28
4.2.2 Germinación de esporas de <i>P. lentimorbus</i> en los medios “J”, “Y” y “MYPGP”.....	29

4.3 Reproducción de estados vegetativos de <i>P. lentimorbus</i> en medios líquidos.....	32
4.3.1 Patogenicidad de las células vegetativos de <i>P. lentimorbus</i> germinadas y reproducidas <i>in vitro</i>	34
4.4 Curva de crecimiento de <i>P. lentimorbus</i> en el medio MYPGP	34
4.5 Esporulación	35
5. CONCLUSIONES	39
6. RECOMENDACIONES	40
7. LITERATURA CITADA	41
8. ANEXOS	47
ANEXO #1. METODOLOGÍA DE CRÍA MASIVA DE <i>Phyllophaga spp</i>	47
ANEXO #2. MEDIOS DE CULTIVO	49
ANEXO #3. ANÁLISIS QUÍMICO DE MARO Y MICRO-NUTRIENTES.....	51
ANEXO #4. ANÁLISIS QUÍMICO DE TREALOSA	53
ANEXO #5. ANÁLISIS DE VARIANZA	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustración del modo de reproducción y esporulación propuesta por Dutky (1940) para la bacteria causante de la enfermedad lechosa en larvas de escarabajo japonés6
- Figura 2. Proceso de germinación de las esporas de *P. lentimorbus*..... 24
- Figura 3. Ilustración del modo de germinación, reproducción y esporulación de la bacteria causante de la enfermedad lechosa (*P. lentimorbus*) en larvas de *P. elenans*..... 26
- Figura 4. Número de colonias promedio en el medio "MYPGP" preparados en 3 niveles de acidez e inoculado con esporas tratadas en 6 choques de 80°C. 31
- Figura 5. Número de colonias de *P. lentimorbus* y porcentaje de contaminación en tres medios de cultivo (MJ, MYPGP, MY), preparados a tres niveles de acidez (pH: 7,0; pH: 7.5; pH: 8.0), e inoculados con esporas tratadas con 4, 5 y 6 choques térmicos de 80 °C.... 32
- Figura 6. Concentración de células vegetativas de *P. lentimorbus* en tres medios de cultivo (MYPGP, MJ, MY). (Columnas con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí; Duncan) 33
- Figura 7. Curva de crecimiento de *P. lentimorbus* en el medio MYPGP preparado a un pH:8.0 35
- Figura 8. Esporulación de células vegetativas de *P. lentimorbus* en tres medios de cultivo tratadas con tres temperaturas durante 30 minutos 36
- Figura 9. Esporas de *P. lentimorbus*, producidas *in vivo* e *in vitro*, vistas a una intensidad de 40X y 100X en un microscopio de contraste de fase..... 37

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Tratamientos resultantes de la combinación de los factores Medio (A), pH (B) y temperatura (C); utilizados para el ensayo de germinación de esporas de *P. lentimorbus in vitro*..... 18
- Cuadro 2. Combinación de los factores medio y acidez utilizados para la reproducción de *P. lentimorbus in vitro*. 20
- Cuadro 3. Combinaciones de los factores medio y temperatura utilizados en el ensayo de esporulación *in vitro* de *P. lentimorbus*. 23
- Cuadro 4. Análisis químico de hemolinfa de larvas de tercer estadio de *P. elenans* sanas e infectadas con la enfermedad lechosa (*Paenibacillus lentimorbus*, cepa 292)..... 27
- Cuadro 5. Composición del medio “Y”, formulado con base el contenido de elementos en la hemolinfa de larvas de tercer estadio de *P. elenans*..... 29

RESUMEN

Con el objetivo de desarrollar una metodología de producción *in vitro* de la bacteria causante de la enfermedad lechosa en larvas de escarabajos (*Paenibacillus lentimorbus*), se estudió las fases de desarrollo de la bacteria en larvas de *P. elenans* infectadas bajo condiciones de laboratorio; posteriormente, se determinaron las condiciones necesarias para la germinación de las esporas, reproducción y esporulación de las células vegetativas de la bacteria *in vitro*.

Se determinó que la temperatura es un factor determinante para la germinación de las esporas de *P. lentimorbus* en medios de cultivo artificiales. Se propuso un ciclo de vida completo para bacteria retomando las fases de reproducción y esporulación descritas por Dutky (1940). Así mismo se determinó que las larvas de *P. elenans* sanas presentan un pH= 7,41 en su hemolinfa y su tracto digestivo muestran un pH= 7,75, valores que no varían significativamente en larvas infectadas con la bacteria *P. lentimorbus*, obteniéndose un pH=7,20 en la hemolinfa, y un pH=7,78 en el tracto digestivo de larvas infectadas con la enfermedad lechosa.

Se determinó además, en esta primera fase, que elementos como el azufre, hierro, cobalto y manganeso disminuyen significativamente su concentración en larvas de *P. elenans* con el desarrollo de la enfermedad lechosa, por lo que se presume que estos elementos son esenciales para el desarrollo de la bacteria y deben ser incluidos en el medio artificial para el desarrollo *in vitro* de *P. lentimorbus*; finalmente se analizó el contenido de trealosa en larvas sanas e infectadas con la bacteria *P. lentimorbus*, obteniéndose valores de 1,46 mg/ml y 0,91 mg/ml respectivamente.

Se analizó la germinación de las esporas de *P. lentimorbus* tratadas con 4, 5 y 6 choques de 80°C de temperatura por 20 minutos y cultivadas sobre tres medios de cultivo sólidos preparados a tres niveles de acidez. Dos de los cuales (MJ y MYPGP) han sido reportados en la literatura y un tercer medio de cultivo fue desarrollado con base en los análisis de micro y macronutrientes realizados en este estudio, y con los contenidos de trealosa reportados en esta investigación. Se determinó que el medio MYPGP preparado a un pH=8,00 es el mejor para la germinación de las esporas. Se estableció además una relación proporcional entre el número de choques de temperatura y la cantidad de esporas germinadas, así como también entre la acidez del medio y el porcentaje de germinación, por el contrario, se estableció una relación inversamente proporcional entre el número de choques de temperatura y la presencia de contaminantes.

Se evaluó la reproducción de los estados vegetativos de la bacteria sobre los mismos tres medios evaluados para germinación pero preparados en forma líquida y con tres niveles de acidez,

se observó una concentración máxima de vegetativos de $2,6 \times 10^8$ veg/ml en el medio MYPGP preparado a un pH=8,00.

Se realizaron pruebas de patogenicidad con los vegetativos germinados sobre los medios sólidos y reproducidos en medios líquidos, donde se detectó pérdida de virulencia en dichos vegetativos. Por lo que se procedió a extraer los vegetativos de larvas infectadas con la bacteria *P. lentimorbus* y se cultivaron sobre el medio MYPGP preparado en forma líquida a una acidez o pH= 8,00 para estimar la curva de crecimiento de la bacteria sobre este medio; alcanzándose una concentración máxima de vegetativos a las 62 horas de inoculado el medio.

En un último ensayo se analizó el efecto de tres temperaturas y la concentración de nutrientes sobre la esporulación de los vegetativos; determinándose que el exponer las células vegetativas de la bacteria a un choque de 5°C por 30 minutos induce la esporulación, y rechazándose además la teoría de la deficiencia nutricional como factor inductor de la esporulación de *P. lentimorbus*. Como resultado adicional se obtuvo un 10% de infección en larvas de *P. elenans* de un avanzado tercer estado de desarrollo, cuando estas se alimentaron con raíces de maíz inoculadas con esporas producidas *in vitro* a una dosis de 2.0×10^8 esp/ml.

SUMMARY

Laboratory studies were carried out with *Paenebacillus (Bacillus) lentimorbus*, one of the causing agents for the milky disease on scarab larvae, aiming to develop an *in vitro* production methodology. Its specific needs for spore germination, vegetative reproduction and spore formation were investigated.

Temperature shocks (up to six exposures of twenty minutes at 80°C) showed to be an important factor for inducing spore germination and elimination of contaminant bacteria in artificial media. Microscope monitoring of the germination and spore formation process, allowed to propose a model for the complete life cycle for this bacterium, complementing the model proposed by Dutky (1940). No significant changes on the pH of haemolymph or midgut was detected between healthy and infected *Phyllophaga elenans* larva. pH values obtained for healthy haemolymph and midgut was 7,41 and 7,75 respectively, compared to 7,20 and 7,78 on diseased larvae.

A comparison of the nutrient content of healthy and diseased haemolymph showed a significant reduction of Sulfur, Iron, Cobalt and Manganese caused by the development of the milky disease. This suggests that these elements might be essential for the bacteria reproduction and therefore should be included in the artificial media. Another component significantly reduced throughout the development of the disease was Trehalose, which concentration decreased from 1.46 mg/ml to 0.91 mg/ml.

To observe *P. lentimorbus* spore germination, samples of aqueous spore suspensions were treated with 4, 5 and 6 temperature shocks of 80°C for 20 minutes then cultured onto three different solid media (MJ, MYPGP and a novel "MY" media) prepared at three pH levels. The higher germination was observed with MYPGP at pH 8,00 and treated with six temperature shocks. This treatment combination also showed the lowest rate of contamination.

The reproduction of vegetative cells was studied on using MJ, MYPGP and MY prepared as liquid media at three pH levels. The maximum vegetative cell concentration ($2,6 \times 10^8$ veg/ml) was obtained on MYPGP media prepared at pH:8,00. The growth curve on this media showed the maximum concentration of vegetative cells after 62 hours of incubation at 30°C.

Pathogenicity test with vegetative cells from spores germinated on solid artificial media and reproduced on liquid media, produced no mortality on late third instar larvae of *P. elenans*.

Finally, the effect of temperature and nutrient reduction on the sporulation of vegetative cells of *P. lentimorbus* was studied. Induction of sporulation was obtained by exposing the vegetative cells to 5°C temperature for 30 minutes then incubating at 30°C for five days. The levels of spore concentration obtained using this method, was equal or higher to the initial concentration of vegetative cells. Pathogenicity test of these spores, using *per os* inoculation on late third instar larvae of *P. elenans*, yielded 10% infection.

1. INTRODUCCIÓN.

Los escarabajos y sus larvas constituyen unas de las mayores plagas en un amplio rango de cultivos agrícolas, forestales y campos de entretenimiento. La gran cantidad de especies dañinas incluidas dentro del Orden Coleóptera se encuentran ampliamente distribuidas alrededor del mundo. En Centroamérica y México el género dominante es *Phyllophaga*, el cual pertenece a la sub-familia Melolonthinae. (Saunders, Coto y King 1998).

Las larvas del género *Phyllophaga* viven en el suelo y pasan por tres estados de desarrollo, sin embargo solamente el tercero tiene importancia económica ya que se alimenta de las raíces de un amplio rango de hospederos (King 1984).

Debido al alto grado de contaminación de suelos y aguas subterráneas que produce y a la baja eficiencia de los insecticidas de suelo para el control de esta plaga el control químico no ha logrado ser eficiente; lo cual ha contribuido a considerar el control biológico como una opción.

El ambiente en el cual se desarrollan larvas de los escarabajos se caracteriza por la alta diversidad de microorganismos que regulan sus poblaciones lo cual se ha considerado una ventaja para el control de las especies dañinas. Dentro de este enfoque el controlador biológico más promisorio son las bacterias *Paenibacillus popilliae* y *P. lentimorbus*, debido a su alta especificidad, gran resistencia a altas temperaturas y baja humedad, y sobre todo por su prolongada viabilidad que les permite mantenerse activa en el suelo por años (Benintende y Márquez 1996).

En Costa Rica se han seleccionado cepas de *P. popilliae* y *P. lentimorbus* activas contra las especies de *Phyllophaga* más importantes en el país, y su capacidad infectiva ha sido confirmada a nivel de laboratorio (Hidalgo *et al.* 2000). Sin embargo, por tratarse de un patógeno obligado su reproducción en medios artificiales no ha tenido éxito. Actualmente su reproducción se realiza solamente *in vivo* la cual tiene un alto costo y limita su utilización en pruebas de campo con concentraciones adecuadas de esporas. Esto dificulta la obtención de resultados consistentes entre las pruebas de laboratorio y campo (Krieger, Franken, Schneter 1996), por lo tanto, se ha considerado la necesidad de desarrollar una metodología confiable de producción masiva de *P. popilliae* y *P. lentimorbus*, que permita la aplicación económica de concentraciones adecuadas de la bacteria en áreas extensas donde se presenten problemas de *Phyllophaga*.

1.1 Objetivo general:

Desarrollar una metodología de producción *in vitro* que permita la reproducción masiva de la bacteria *Paenibacillus lentimorbus* para el control de larvas de escarabajos.

1.2 Objetivos específicos:

1. Estudiar y conocer las fases de desarrollo de *P. lentimorbus* dentro de las larvas de los escarabajos.
2. Determinar las condiciones necesarias para la germinación y esporulación de las células bacterianas y los cambios que sufre la bacteria durante su multiplicación.
3. Estimar el efecto del pH, la temperatura y los nutrientes sobre la germinación de esporas de *P. lentimorbus* provenientes de larvas infectadas, y evaluar diversos medios para la reproducción de sus células vegetativas.
4. Evaluar la capacidad de esporulación de células vegetativas de *P. lentimorbus* en diferentes medios de cultivo y el efecto de la temperatura sobre este proceso con el fin de determinar los parámetros nutricionales y térmicos que regulan este proceso.

1.3 Hipótesis:

- La bacteria *Paenibacillus lentimorbus* puede ser reproducida *in vitro*.
- La acidez del medio de cultivo es el factor determinante para la germinación de las esporas de la bacteria.
- La reducción en la concentración de nutrientes en el medio de cultivo es el factor que induce la esporulación de las células vegetativas de *P. lentimorbus*.

2 REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Las larvas de los escarabajos.

Alrededor del mundo se utilizan diferentes nombres populares para identificar a las larvas de los escarabajos plaga de los cultivos, comúnmente se utilizan nombres como jobotos, gusanos blancos y gallinas ciegas sin distinguir entre los géneros *Melolontha*, *Rhizotrogus*, *Phyllophaga*, *Holotrichia*, *Schizonycha*, *Brahmina*, *Lepidiota*, *Costelytra* (Melolonthinae) o *Anomala* (Rutelinae) (Morón 2000). Estas larvas son consideradas la principal plaga en gran cantidad de cultivos, pastos, forestales e incluso césped en áreas de recreación alrededor del mundo, pero la mayor importancia radica en que los daños causados por estas larvas son generalmente detectados cuando ya los cultivos han sido afectados y se dificulta la aplicación de soluciones prácticas de manera económica (Shannon y Carballo 1996).

Otro aspecto que dificulta el control de esta plaga es la amplia diversidad de especies dentro de este grupo. En Centro América y México se han identificado alrededor de 340 especies y por cada especie dañina existen aproximadamente 16 especies que pueden ser plagas potenciales y podrían causar mayores problemas que las especies plaga actuales si no se realiza un control adecuado sin alterar el equilibrio de los ecosistemas agrícolas (Morón 1994).

2.2 Bacterias Entomopatógenas.

Las bacterias patógenas más importantes de insectos se encuentran dentro de las familias Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae y Bacillaceae. De estas solamente la última incluye géneros formadores de esporas como *Bacillus* y *Clostridium*, algunos de los cuales incluyen especies que han sido utilizadas en el control de insectos por poseer toxinas o estructuras con alta resistencia a condiciones adversas facilitando su formulación como biocontroladores (St. Julian *et al.* 1973).

La primera descripción de un patógeno bacterial atacando larvas de un escarabajo la realizó Dutky en 1940, quien describió la enfermedad lechosa del Tipo A causada por *B. popilliae* y la enfermedad lechosa del Tipo B causada por *B. lentimorbus*, ambas atacando el escarabajo Japonés (*Popillia japonica* Newman). El nombre de enfermedad lechosa se origina de la apariencia lechosa de las larvas infectadas por estas bacterias, las cuales al crecer y esporular se acumulan por billones en la hemolinfa de las larvas. Estos reportes fueron confirmados por, Steinkraus (1957) quien también reportó esta bacteria como un controlador eficiente de larvas de *Popillia japonica* (Newman).

En Estados Unidos se ha utilizado por más de 50 años la bacteria *Paenibacillus spp* para el control de larvas del escarabajo japonés. No obstante, Klein (1992) considera que un mayor uso de esta bacteria como controlador biológico depende principalmente de dos factores, en primer lugar del desarrollo de un método de producción *in vitro* que permita la obtención de esporas infectivas, y en segundo lugar del total entendimiento de la interacción entre la bacteria y sus diferentes hospedantes.

En la actualidad el único método de producción de *Paenibacillus spp.* se basa en la inyección de la bacteria en larvas sanas de escarabajos, que luego de desarrollar la enfermedad son sacrificadas para extraer la bacteria y preparar formulaciones en polvo a una concentración de 10^8 esporas/g. Estas formulaciones pueden ser aplicadas a una dosis de 11 kg/ha, siguiendo un patrón cuadrículado en el cual que se esparce aproximadamente $2,0 \times 10^8$ esporas cada 1,3 m (Jackson 1996).

2.3 Reclasificación taxonómica de *Bacillus popilliae* y *Bacillus lentimorbus*.

Desde su descripción en 1940 se han realizado numerosos trabajos de investigación dentro de los cuales es importante resaltar el estudio realizado por Pattersson *et al.* (1999), donde se reclasifica la bacteria dentro del género *Paenibacillus*, en un estudio de la secuencia del ARNr de *B. popilliae* y *B. lentimorbus* revela la similitud de éstas con el género *Paenibacillus*; por lo que actualmente ambas se han reclasificado dentro del género *Paenibacillus*; como *Paenibacillus popilliae* y *P. lentimorbus*.

En su primera descripción, Dutky (1940) sugiere que la producción de un cuerpo parasporal por *B. popilliae*, ausente en *B. lentimorbus*, es la principal diferencia entre ambas especies; sin embargo, en estudios posteriores realizados por Krywienczyk y Luthy (1974) se propone la existencia de una sola especie, *B. popilliae*, con tres variedades denominadas en ese entonces como *B. popilliae* var. *popilliae*, *B. popilliae* var. *lentimorbus* y *B. popilliae* var. *melolonthae*. Con base en el tamaño y la posición de la spora y el cuerpo parasporal. Milner (1981) clasificó todos los aislados de la bacteria causante de la enfermedad lechosa dentro de cuatro grupos (A1, A2, B1 y B2) de variedades de *B. popilliae*.

Posteriormente en 1998, al realizar un estudio de ADN sobre 34 aislamientos de la bacteria se demostró la presencia de cuerpos parasporales, anteriormente considerado una característica exclusiva de *P. popilliae*, en aislados asociados con la especie *P. lentimorbus*. Esta misma estructura se encontró en aislados de *P. lentimorbus* relacionados con *P. popilliae*. Esto demuestra que los métodos de clasificación basados en características físicas y de crecimiento sobre algunos medios de cultivo es inapropiado (Rippere *et al.* 1998).

Un ejemplo claro de esto es el caso del aislamiento '292', utilizado en el presente trabajo, el cual se clasificó anteriormente dentro de la especie *popilliae* del género *Paenibacillus*, por la presencia de un cuerpo parasporal, pero en estudios realizados por Harrison *et al.* (2000), se demostró que dicho aislado era miembro de la especie *P. lentimurbus*.

2.4 Descripción de *Paenibacillus spp.*

En 1940, Dutky describió las células vegetativas de la bacteria como bastones delgados que miden de 0,9-5,2 μm , con reacciones de coloración Gram variables o negativas en la fase exponencial de cultivo, presenta una reacción catalasa negativo y resiste temperaturas entre los 17 y 34 °C. El crecimiento vegetativo de *Paenibacillus sp* se caracteriza por ser aeróbico aunque tiene el potencial de ser anaeróbico bajo circunstancias que lo ameritan (Benintende y Marquez 1996), con división más similar a la formación de lámina que constricción. Las esporas son elipsoidales localizadas central o terminalmente dentro de un esporangio hinchado que puede o no ser acompañado por uno o varios cuerpos parasporales refractarios (Krieger, Franken y Schnetter 1996). Estas esporas se pueden formar, según reportes de Obenchain y Ellis (1990), únicamente sobre medios complejos

Se pueden observar cuerpos parasporales refractarios, numerados de 0 a 2 según características de las subespecies, que algunas veces se desarrollan dentro del esporangio durante la morfogénesis. Los esporangios maduros, contienen las esporas y los cuerpos parasporales, se acumulan en la hemolinfa de larvas infectadas en concentraciones tan altas como $2-3 \times 10^{10}$ esporas por mililitro. La bacteria *Paenibacillus spp.* se caracteriza por ser un patógeno obligado altamente específico de las larvas de los escarabajos, produciendo en ellos la llamada enfermedad lechosa. Sus principales hospedantes se localizan dentro de las familias Melolonthinae, Rutelinae y Dynastinae del Orden Coleoptera. La enfermedad lechosa se puede presentar en todas las etapas larvales de los escarabajos y en escasas ocasiones se encuentra en pupas y adultos (Jackson 1999).

Según Klein y Kaya (1995), al ser este un patógeno obligado con alta especificidad, no es posible encontrar infección cruzada entre las familias o subfamilias de las larvas de los escarabajos, ni aún entre géneros. Sin embargo, en un estudio de selección de cepas de *B. popilliae* para el control de *Phyllophaga sp* realizado por Hidalgo *et al.* (1998), se observó que algunos aislamientos provenientes de especies e incluso géneros diferentes resultaron ser virulentos hacia otras especies de larvas de escarabajos, entendiéndose por patogenicidad como la habilidad de un microorganismo de provocar una enfermedad y virulencia como la intensidad o grado de la enfermedad (Leucona y Alves 1996).

Según los resultados de Hidalgo *et al.* (1998), el aislamiento 292, utilizado en esta investigación, fue aislado de una larva de *P. vicina* criada en el laboratorio y causó la mayor infección en larvas del tercer estadio de *P. eleanans*. Otro ejemplo es el aislamiento 510, originario de una larva de *Anomala flavipennis* que causó los mayores porcentajes de infección en larvas de *P. menetriesi* cuando se inoculó vía inyección.

2.4.1 Ciclo de vida de *Paenibacillus* spp.

En la primera descripción hecha por Dutky (1940), se detalla como en las 12 horas posteriores a la infección de las larvas no se presentan cambios en la bacteria, cumplido este período se inicia una reducción gradual en el número de esporas hasta un 50% a las 30 horas, a partir de este momento aparecen las primeras formas vegetativas, generalmente en pares. Transcurridas 48 horas el número de vegetativos aumenta considerablemente mientras que el número de esporas se reduce a una tercera parte.

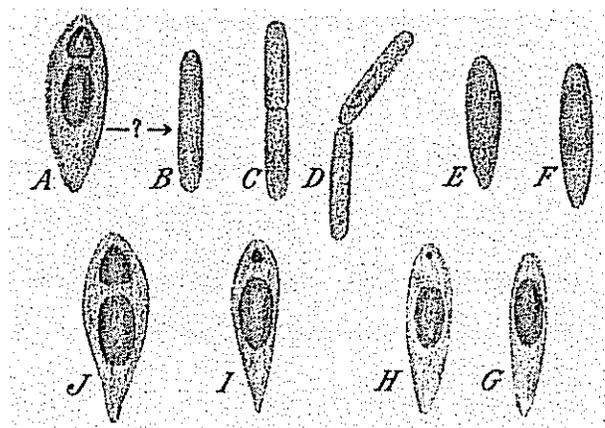


Figura 1. Ilustración del modo de reproducción y esporulación propuesta por Dutky (1940) para la bacteria causante de la enfermedad lechosa del Tipo A en larvas de escarabajo japonés.

Posterior a las 72 horas de la infección los finos bastones comienzan a hincharse mostrando la presencia de una vacuola oval localizada centralmente y ocurre la formación de la endospora. A partir de este momento se observa la formación de un pequeño gránulo en el extremo de la célula que formará el cuerpo parasporal, en la figura 1 se muestra el modo de reproducción y esporulación de la bacteria del tipo A causante de la enfermedad lechosa en larvas del escarabajo japonés, nótese como entre los pasos A y B hay un signo de interrogación que denota que el modo de germinación de las esporas no ha sido determinado con exactitud.

En el sexto día de la infección el número de esporas es lo suficientemente alto para producir turbidez en la hemolinfa y se observa la apariencia lechosa en el interior de las larvas. El máximo número de esporas se alcanza a los 7 o 10 días después de la infección.

2.4.2 Proteína cristalina de *Paenibacillus* spp.

P. popilliae y algunos aislados de *P. lentimorbus* producen cuerpos parasporales que contienen una proteína relacionada con la delta endotoxina de *Paenibacillus thuringiensis*. No obstante, la evidencia que relaciona esta proteína con la patogenicidad de estas bacterias es indirecta (Yousten 2000). Algunos autores como Zhang *et al.* (1994), sugieren que las proteínas encontradas en *P. popilliae* y *P. thuringiensis* comparten un origen común.

En estudios realizados por Sharpe y Detroy (1979) se demostró que la endotoxina de *Bacillus thuringiensis* sp. *galleriae* facilita la infección de las larvas con esporas de *P. popilliae* producidas *in vitro*. Por lo tanto se ha sugerido que la endotoxina cristalina de *P. thuringiensis* encapsulada podría ser combinada con esporas o células vegetativas de *P. popilliae* para aumentar su infectividad en el campo. Sin embargo, en los bioensayos de laboratorio y pruebas de campo con formulaciones conteniendo ambas bacterias (*P. popilliae* y *P. thuringiensis* var. *kustaki*) no se ha obtenido aumento en la infectividad (Obenchain y Ellis 1990).

Según Franken, Zhang y Schnetter (1996), el rol que juega la proteína cristalina de *P. popilliae* durante la patogenicidad no se conoce, pero se puede asumir que juega un papel similar al de la proteína cristalina de *P. thuringiensis*, dado a las similitudes encontradas entre estas proteínas.

En estudios recientes realizados por Krieger y Schnetter (1999) se ha confirmado que la solubilidad de la proteína cristalina juega un papel importante en la patogenicidad y selectividad de *P. popilliae*. Estos autores demostraron que la combinación de proteínas cristalinas y células vegetativas causan infección, en contraste, las esporas o células vegetativas sin proteína cristalina no son infectivas. Basados en la reducción de la alimentación de las larvas, en los días posteriores a la aplicación de altas dosis de proteínas cristalinas, Krieger y Schnetter (1999) establecieron el supuesto de la toxicidad de la proteína cristalina sobre las células del intestino.

A su vez, los anteriores autores establecieron la teoría de la infección en base al rol de la proteína cristalina, en la cual se establece que después de la ingestión de los esporangios por las larvas, la espora y la proteína cristalina son liberadas por esporangiolisis, una pequeña cantidad de proteínas cristalinas solubilizadas permiten a las células flageladas atravesar el epitelio del intestino y entrar a la hemolinfa.

2.4.3 Desarrollo de la enfermedad lechosa.

Para que se inicie el desarrollo de la enfermedad lechosa es necesario, como en todo proceso patológico natural, que las esporas de la bacteria entren en el hospedante. El proceso de infección se da en el momento que las larvas se alimentan e ingieren esporas junto con raíces y materia orgánica. Una vez dentro del intestino de las larvas, las esporas germinan y atraviesan la pared intestinal hasta el hemocele donde se da la reproducción acelerada de los bacilos hasta el punto en que la deficiencia nutricional limite su multiplicación e induzca la esporulación (Jackson 1999).

El proceso de penetración mediante el cual las esporas atraviesan la pared intestinal es considerado un paso crucial para que ocurra la infección y se vincula con la selectividad de la bacteria hacia algunas larvas de escarabajos, así como el cuerpo parasporal juega un papel importante, según algunos autores como Franken, Krieger y Schnetter (1996), en la patogenicidad de esta bacteria.

Después de que las larvas son infectadas con esporas de *Paenibacillus spp* y se ha iniciado el ciclo de la bacteria, la muerte del hospedante puede ocurrir en aproximadamente un mes, dependiendo de su estado nutricional y de la cantidad de inóculo ingerido así como de factores ambientales. La causa final de la muerte de las larvas infectadas con la enfermedad lechosa no se conoce con precisión, hay teorías que exponen la producción de toxinas caloríficas letales (Dutky 1963): otras la atribuyen a disturbios en enzimas oxidativas importantes (Beard mencionado por Dutly 1963); pero la teoría más fuerte atribuye la muerte de las larvas a la reducción en ellas de los cuerpos grasos y el agotamiento general (Sharpe y Detroy 1979)

Para efectos de estudio se ha dividido el desarrollo de la enfermedad lechosa en 4 fases: en la primera fase todas las células de la bacteria son vegetativas; en la fase 2 un 90% de las células son vegetativas; en la fase 3 hay entre un 65-76% de células vegetativas y entre un 17-28% de las células contienen esporas; y en la fase 4 un 95% de las células contienen esporas. Las larvas pueden morir durante todas las fases pero, es mayor durante la fase 2 o 3. Las larvas se tornan de color blanco lechoso en la fase 4 y menos del 30% de las larvas infectadas llegan hasta esta fase (St. Julian *et al.* y Klein mencionados por Tanada y Kaya 1993).

2.5 Producción *in vitro* de la bacteria.

Dado que *Paenibacillus spp.* es un patógeno obligado crece muy mal en medios de cultivos artificiales, por lo tanto la reproducción *in vivo* es actualmente la única forma confiable de producción comercial (Benintende y Marquez 1996). Dado su alto potencial como insecticida biológico para el control de larvas de escarabajos, se considera necesario desarrollar un método de

producción masiva que garantice una alta calidad de esporas infectivas y que además resulte económicamente rentable (Klein y Jackson 1992).

Según Stahly *et al.* (1992) las esporas o células vegetativas libres de hemolinfa provenientes de larvas infectadas pueden ser directamente colocadas sobre un medio con agar, pero su crecimiento es bajo. En 1963 St. Julian y colaboradores desarrollaron un medio estándar para obtener crecimiento de *P. popilliae*, este medio se conoce como medio J (Klein y Jackson 1992)

En ensayos realizados por Guarín (1997) se evaluaron 13 medios de cultivo para la producción de *P. popilliae*. Los mejores resultados se obtuvieron con el medio Younsten en sus diferentes combinaciones (Younsten-Urea, Younsten-Agua de coco, Younsten-Hemolinfa y Younsten solo), y con el medio J suplementado con hemolinfa de larvas de escarabajos. Con este último medio se observó una mayor formación de colonias con un menor crecimiento que el obtenido en los medio Younsten sólo y con hemolinfa.

2.5.1 Crecimiento de la bacteria en medios selectivos.

En 1977, Milner desarrolló un método para cuantificar esporas de *P. popilliae* en el suelo. El método se basó en la lenta germinación que presentan las esporas de *P. popilliae* en medios de cultivo comparada con la germinación rápida de otras bacterias esporulantes. El método consiste en tomar una muestra de suelo y suspenderla en un medio que promueva la germinación de *P. popilliae*, luego se procede a someter la suspensión a 7 ciclos de incubación y calor. Cada ciclo consiste de 40 minutos de incubación y 20 minutos de calor a una temperatura de 70°C para de esta manera eliminar las esporas germinadas y células vegetativas de otros microorganismos.

El método anterior presenta la desventaja de consumir mucho tiempo, además de presentar un error de cuantificación bastante elevado, por lo que basados en el reporte realizado por Pridham *et al.* (1965), en el cual se describe la resistencia de algunos aislamientos de *P. popilliae* al antibiótico vancomicina, Stahly *et al.* (1992), desarrollaron un medio selectivo con vancomicina para el aislamiento de esporas de *P. popilliae* del suelo y de productos comerciales formulados con esporas de *P. popilliae*.

2.5.2 Germinación de las esporas.

El primer paso importante para lograr el crecimiento de *Paenibacillus spp* sobre medios artificiales es romper el estado de dormancia de las esporas y para lograr esto se han propuesto tratamientos como el envejecer las esporas en una suspensión de agua a temperatura ambiente por varios meses, con este procedimiento se obtiene un crecimiento lento de la bacteria en el medio "J", alcanzando los máximos diámetros de colonias después de 7 días a 25-28 °C (Milner 1981).

Autores como Krieger, Franken y Schnetter (1996) exponen que la bacteria puede germinar en una proporción de 9% en un medio MYPGP modificado y el crecimiento vegetativo puede ser mantenido a una temperatura óptima de 30°C pero no ocurre la esporulación.

Otros autores como Lüthy, Wyss y Ettliger (1970) han utilizado tratamientos de temperatura para inducir la germinación de las esporas en medios de cultivo.

2.5.3 Esporulación.

Otro paso importante en la reproducción de *Paenibacillus* spp en medios artificiales es el lograr su esporulación *in vitro*. Aunque el crecimiento vegetativo de la bacteria es bueno en algunos medios artificiales, la formación de esporas es ocasional. Según reportes de Steinkraus y Thashiro (1955), las esporas ocasionalmente obtenidas no presentan la forma típica observada en la bacteria producida *in vivo*. Pruebas de virulencia realizadas por estos autores con esporas producidas *in vitro* revelaron altos niveles de virulencia cuando estas fueron inyectadas en larvas del escarabajo europeo, pero estos niveles decayeron significativamente cuando las esporas se suministraron por ingestión a las larvas.

Lo anterior demuestra, según estos autores, que las esporas capaces de producir la enfermedad lechosa en larvas de escarabajos puede ser producidas sobre medios artificiales; y además sugieren que la deficiencia de un nutrimento esencial en la hemolinfa de las larvas podría iniciar la esporulación de las células vegetativas de la bacteria.

En un trabajo realizado por Luthy *et al.* (1970) se determinó que la adición de una gota de hemolinfa de *Phyllophaga anxia* al medio denominado Grace, es suficiente para estimular el crecimiento de los bacilos e impulsar la esporulación. Así mismo se demostró que los mejores resultados se obtienen al agregar 35 gotas de hemolinfa al medio, observando además que las esporas formadas *in vitro* no difieren de las obtenidas *in vivo*. Este trabajo demuestra la presencia de un nutrimento esencial en la hemolinfa de los insectos para el desarrollo y esporulación de *B. popilliae*.

Una esporulación limitada puede ser obtenida cuando la bacteria es transferida de un medio nutritivo a un medio pobre y cultivado a altas temperaturas (37°C). Otros sistemas para inducir esporulación son la adición de carbón activado al medio líquido, un procedimiento de cultivo en agitación y reposo o la adición de una porción específica de extrato de levadura (Tanada y Kaya 1993).

Debido a la baja esporulación de la bacteria en medios de cultivo, se han sugerido formulaciones de células vegetativas encapsuladas; sin embargo, se ha observado poca eficacia y

seguridad al utilizar estas formulaciones. La falta de infectividad de estas preparaciones ha sido atribuida a la ausencia de cuerpos paraesporales. Aunque no se observó respuesta tóxica en larvas de *Melolontha* cuando se alimentaron o inyectaron con cuerpos parasporales de sus razas adaptadas, por lo que no se puede atribuir la falta de infectividad a la ausencia del cuerpo parasporal (Obenchain y Ellis 1990).

La baja esporulación obtenida en el medio de cultivo MYPGP podría superarse realizando algunas modificaciones en su constitución, tal como lo lograron Dugman y Stahly (1983) en la reproducción de la bacteria *Bacillus larvae*. Estos autores obtuvieron una esporulación de $5,0 \times 10^8$ esporas/ml de esta bacteria al modificar el medio MYPGP eliminando el Muller Hinton broth, el cual, según los resultados obtenidos, inhibe la esporulación de *B. larvae* y remplazando el K_2HPO_4 por una solución buffer de Tri-maleato, además de modificar las concentraciones de los restantes ingredientes.

2.5.4 Pérdida de virulencia en medios artificiales.

La pérdida de virulencia de las esporas producidas en medios artificiales reportada por Steinkraus y Thashiro (1955) ha sido reforzada por autores como Schwartz y Sharpe (1970), quienes no obtuvieron desarrollo de la enfermedad lechosa en larvas del tercer instar de *Popillia japonica*, expuestas a suelo inoculado con una concentración de dos billones de esporas por kilogramo de *Bacillus popilliae* producida en medios artificiales, ni cuando estas larvas ingirieron concentraciones de 2×10^5 esporas/ml de la bacteria en una suspensión acuosa del mismo origen. Lo anterior evidencia la aparente pérdida de infectividad de las esporas de la bacteria producidas en laboratorios sobre medios artificiales.

Stahly y Klein (1992) analizaron lotes de esporas producidas *in vitro* bajo el nombre comercial Grub Attack y determinaron que la mayoría de ellos contenían la bacteria *Bacillus polymyxa* pero no *B. popilliae*. También examinaron 4 productos formulados por American Type Culture (ATCC, Rockville, MD), y en uno de los cultivos se identificó la bacteria *B. polymyxa* y los otros contenían *B. amylolyticus*. Con base en los resultados anteriores estos autores concluyeron que la baja virulencia de los productos *in vitro* se debe principalmente a la poca confiabilidad de los métodos para la producción de esporas *B. popilliae* puras.

La baja confiabilidad de los métodos actuales para la producción comercial de *P. popilliae in vitro* también fue demostrada por Redmond y Potter (1995), quienes analizaron muestras de *B. popilliae* producido tanto *in vitro* (Producto Grub Attack) como en *in vivo* (Productos Doom). Se identificaron nuevamente las bacterias *B. polymyxa*, *B. popilliae* y *B. amylolyticus* en

concentraciones de $1,8 \times 10^9$, $2,6 \times 10^7$ y $2,1 \times 10^6$ esporas por gramo respectivamente. En las muestras de Grub Attack, de todas los lotes analizados sólo uno presentó esporas de *B. popilliae* además de las bacterias anteriormente mencionadas. Asimismo se descubrió que los lotes de Grub Attack se formularon con diferentes mezclas de cultivos y que unos pocos lotes incluían esporas de *B. popilliae* producidas *in vivo*. En estos ensayos también se comprobó los bajos niveles de infectividad de los productos formulados bajo el nombre de Grub Attack, los cuales fueron probablemente el efecto de las esporas producidas *in vivo* adicionadas en algunos lotes. En cuanto a las esporas producidas *in vivo* y comercializadas bajo el nombre Doom se obtuvieron moderados niveles de infectividad (39-43%) a una dosis de $4,0 \times 10^9$ esporas/kilogramo de suelo.

2.6 Requerimientos nutricionales de *Paenibacillus* spp.

En estudios realizados por Rhodes *et al.* (1966) sobre la composición de la hemolinfa en larvas de escarabajos se ha determinado que no hay una equivalencia significativa de la glucosa presente. Los niveles de trehalosa decrecen sólo en un tercio durante el crecimiento de la bacteria, lo que significa que *P. popilliae* utiliza la trehalosa como fuente de carbón y energía para su crecimiento y esporulación dentro del hospedero (Bhumiratana, Anderson y Costilow 1974). Por su parte Rhodes *et al.* (1966) reportan que los sub-productos formados durante el crecimiento de la bacteria en medios conteniendo glucosa o trehalosa son los mismos. Sin embargo Bhuriratana, Anderson y Costilow (1974), observaron que la respiración de *P. popilliae* fue aproximadamente el doble en medios que contenían trehalosa en comparación con los medios que contenían glucosa como sustrato.

Al analizar hemolinfa de larvas de *Popillia japonica* (Newman) sanas e infectadas con la enfermedad lechosa, Shotwell *et al.* (1965) encontraron un incremento del ácido glutámico, la β -alamina, el ácido aspártico, la fenilamina, la teonina, serina y la lisina en las larvas infectadas y a su vez encontraron concentraciones más bajas de glicina, tirosina e histelina en estas larvas. Es importante destacar que estos resultados corresponden a larvas infectadas con *P. popilliae*, ya que según estos autores, las larvas infectadas con *P. lentimorbus* muestran diferencias en la composición de los aminoácidos, como son altas concentraciones de histeina, prolina, ácido glutámico, glicina y lisina. El ácido glutámico es el único aminoácido que aumenta su concentración con el curso de la infección. Los aminoácidos que disminuyen su concentración después de la infección con *P. lentimorbus* son glicina, tirosina, histeina, prolina alamina, valina, isoleucina y argina. Según estos autores no hay reducción del total de aminoácidos después de la infección con la enfermedad lechosa.

En 1964 Sylvestre y Costillow, ya habían reportado que los aminoácidos glicina, tirosina y histelina, anteriormente mencionados por Shotwell *et al* (1965), disminuyen su concentración con la infección, y que eran esenciales para el crecimiento de la bacteria

El papel de los ácidos orgánicos fue estudiado por Stubblefield y colaboradores (1966), quienes observaron altas concentraciones de los ácidos málico, glucolítico, tartárico, pirúvico y glioxílico en la hemolinfa de larvas infectadas. El ácido pirúvico incrementa su concentración en la hemolinfa de larvas enfermas con el transcurso de la enfermedad lechosa, lo que podría significar que este ácido está involucrado en la esporulación de *P. popilliae*. Así mismo no se detectaron cambios significativos en la concentración de ningún ácido volátil durante el curso de la infección.

El efecto de la enfermedad lechosa sobre las proteínas fue estudiado por Shotwell *et al* (1965), quienes indican que el nivel de proteína y su composición no cambian marcadamente durante la infección de la enfermedad lechosa. Por su parte, Bennett, Shotwell y Hall (1968), tomaron muestras de hemolinfa de larvas sanas y enfermas del escarabajo Japonés (*Popillia japonica*), y determinaron que durante el curso de la enfermedad desaparece una proteína y otras partículas más pequeñas incrementan marcadamente su concentración. Esto sugiere que la bacteria está consumiendo una proteína o bien los mecanismos de defensa del hospedero inician la producción de enzimas que desdoblan esa proteína para combatir al patógeno.

Otro factor importante estudiado por Bennett y Shotwell (1972) es el papel de los lípidos en el desarrollo de *P. popilliae*. Para ello compararon los contenidos de lípidos en la hemolinfa de larvas sanas e infectadas con la enfermedad lechosa, detectando un contenido total de 5,7 a 7,2 mg/ml en larvas sanas, el cual se reduce hasta en un 45% en larvas infectadas con la enfermedad lechosa. Aunque, los mecanismos por los cuales ocurre esta reducción no son conocidos, algunas teorías proponen la alteración en la permeabilidad de la membrana o la alteración de la actividad enzimática que permite la esporulación de la bacteria.

2.7 Requerimientos de oxígeno.

Aunque el estado vegetativo de *P. popilliae* se caracteriza por ser aeróbico (Obenchain y Ellis 1990), o bien anaeróbico facultativo (Benintende y Márquez 1996), en ensayos realizados por Dutky (1947) se reporta que la bacteria es marcadamente sensible al oxígeno, por lo que el mejor crecimiento de la bacteria se obtiene bajo condiciones completamente anaeróbicas. Esto es reforzado por Travers y Faust (1982) quienes sugieren que *P. popilliae* es una bacteria anaeróbica con tolerancia aeróbica.

Con el fin de determinar los requerimientos de oxígeno para *P. popilliae*, Weiner y colaboradores (1966), midieron la concentración de oxígeno en larvas de *Popillia japonica* sanas e infectadas con la enfermedad lechosa, observaron que la concentración fue significativamente menor en larvas recién infectadas, cuando sólo es posible encontrar células vegetativas de la bacteria en la hemolinfa de la larva. Sin embargo, cuando estaban presentes las esporas y las células vegetativas de la bacteria en la hemolinfa los niveles de oxígeno, tanto en larvas sanas como infectadas, fueron similares

3 MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Localización:

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Control Microbial de la Unidad de Fitoprotección del CATIE, ubicado en Turrialba, Costa Rica.

3.2 Material experimental:

Se utilizó el aislamiento 0292 de la bacteria *Paenibacillus lentimorbus* seleccionada y almacenada en el Laboratorio de Control Microbial de la Unidad de Fitoprotección del CATIE.

Para la reproducción del inóculo inicial y pruebas posteriores de la bacteria se utilizaron larvas de *Phyllophaga elenans* criadas en laboratorio de acuerdo a la metodología descrita por Hidalgo *et al* (2000)(Anexo 1).

3.3 Obtención del inóculo.

Para la reproducción del inóculo inicial se inyectaron larvas de *P. elenans* utilizando una microjeringa Hamilton de 250 µl. En cada larva se colocaron 5 µl de una suspensión de esporas de *P. lentimorbus* a una concentración de $1,0 \times 10^8$ esp/ml para una dosis final de $5,0 \times 10^5$ esp/larva. Después de 20 días las larvas infectadas se sacrificaron sumergiéndolas durante 30 segundos en agua caliente (80 °C), y posteriormente se desinfectaron sumergiéndolas en alcohol al 70% durante 5 minutos.

Para la extracción del inóculo se hizo una incisión dorsal en la cutícula del abdomen de las larvas, las cuales se colocaron dentro de un tubo para microcentrifuga de 1,5 ml de volumen conteniendo 1 ml de agua destilada estéril durante 1 hora, permitiendo que la bacteria sedimentara en el fondo del tubo.

3.4 Descripción de las fases de desarrollo de *P. lentimorbus* y cambios que induce en las larvas durante su desarrollo.

Para la descripción de las fases de desarrollo de *P. lentimorbus* se prepararon suspensiones de esporas en agua destilada estéril a una concentración de 1×10^7 esp/ml. A esta suspensión se le aplicaron dos choques de temperatura (80°C durante 20 minutos) en un horno (Fisher Scientific-IsoTemp[®] 500 series), el segundo choque se aplicó 24 horas después del primero. Después de cada choque de temperatura se colocó la suspensión en una incubadora a 30°C y un fotoperiodo de 12 horas luz por 24 horas.

Posteriormente se preparó una lámina portaobjetos fija con las esporas tratadas y se colocó en el microscopio de luz con una cámara de video que monitoreo el avance de la germinación de las esporas de *P. lentimorbus*. Para evitar el desecamiento de las láminas, éstas se sellaron con esmalte transparente para uñas.

En una segunda etapa, se extrajo la hemolinfa de larvas infectadas con *P. lentimorbus* en sus primeras etapas de desarrollo, y se colocó en portaobjetos para observar, de la forma propuesta anteriormente, la esporulación de las células vegetativas.

Se determinó además, el cambio en el pH del trato digestivo y la hemolinfa, inducido por el desarrollo de la bacteria. Para ello se extrajo la hemolinfa de larvas sanas e infectadas y se preparó un macerado del tracto digestivo de las mismas larvas para medir su acidez con la ayuda de un pHmetro. Para permitir un contacto adecuado del electrodo del pHmetro con la muestra de hemolinfa y tracto digestivo se prepararon muestras de 5 ml, tanto de hemolinfa como del contenido del tracto digestivo, utilizando aproximadamente 50 larvas de *P. elenans*.

Se realizó un análisis químico de macro y micro elementos presentes en la hemolinfa de larvas sanas y enfermas para conocer su composición y de esta manera determinar las necesidades básicas de la bacteria para su reproducción; a su vez se determinó el contenido de trealosa en la hemolinfa de larvas sanas e infectadas con la enfermedad lechosa.

3.5 Germinación de esporas de *P. lentimorbus* en medios artificiales.

Se evaluó la germinación de las esporas de *P. lentimorbus* sobre medios sólidos.

Para la preparación de los tratamientos se utilizaron tres suspensiones de esporas de la bacteria a una concentración de $5,3 \times 10^5$ esporas/ml en agua destilada. Se prepararon además los medios MJ (Anexo 2), MYPGP (Anexo 2) y el medio "Y" preparado según las determinaciones realizadas en el ensayo inicial. Todos los medios se prepararon en forma sólida, según su composición, y se ajustó su acidez en tres niveles, un nivel bajo (pH=7,00), un nivel medio (pH=7,50) y uno alto (pH=8,00); utilizando HCl 0,1 molar y NaOH 0,1 molar; posteriormente se esterilizaron a 121 °C por 25 minutos.

Una vez preparadas las suspensiones de esporas a una concentración de $5,5 \times 10^5$ esp/ml, se realizaron los tratamientos de temperatura a 80 °C por 20 minutos en un horno (Fisher Scientific IsoTemp[®] 500 series), en cuatro, cinco y seis ocasiones cada 12 horas según cada tratamiento. Una vez realizado cada tratamiento de temperatura se colocaron las suspensiones en una incubadora a 30°C de temperatura y un fotoperiodo de 12 horas luz.

Al cuarto día, aproximadamente 12 horas después de realizado el último tratamiento de temperatura se inocularon los medios sólidos con 10 µl de cada suspensión para un aproximado de 5500 esporas por plato, posteriormente se esparcieron las esporas sobre la superficie del plato con la ayuda de un asa plana y se incubaron a 30 °C.

De las colonias de células vegetativas obtenidas en los cultivos se prepararon suspensiones de bacilos para inyectar larvas sanas de *P. elenans* del tercer instar de desarrollo, como método de verificación de la identidad y patogenicidad de la bacteria reproducida. Además se prepararon suspensiones a partir de estas colonias para ser utilizadas en el siguiente experimento de reproducción de células vegetativas en medios líquidos.

3.5.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3x3x3, en donde los factores fueron 3 medios de cultivo, 3 niveles de acidez y 3 tratamientos de temperatura, con 3 repeticiones, para un total de 81 unidades experimentales

Los medios utilizados fueron un medio MYPGP, Medio J y el medio Y; preparados a tres niveles de acidez (pH: 7,00, pH: 7,50 y pH: 8,00); y los tratamientos térmicos fueron esporas con 4, 5 y 6 choques de 80°C por 20 minutos

El modelo estadístico utilizado para el análisis de las variables fue el siguiente:

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

En donde:

μ	:	promedio general
α_i	:	efecto directo del medio de cultivo (Factor A)
β_j	:	efecto directo del pH (Factor B)
γ_k	:	efecto directo de la temperatura (Factor C)
$(\alpha\beta)_{ij}$:	efecto de la interacción de los factores A y B
$(\alpha\gamma)_{ik}$:	efecto de la interacción de los factores A y C
$(\beta\gamma)_{jk}$:	efecto de la interacción de los factores B y C
$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$:	efecto de la interacción de los factores A, B y C
ϵ_{ijk}	:	variación debida al error experimental

3.5.2 Variables de respuesta:

La variable a evaluar fue el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de células vegetativas de *P. lentimorbus* y la presencia o no de contaminantes la cual se reportó como una variable dicotómica en donde el número “0” corresponde a la ausencia de contaminantes y el número “1” indica presencia de contaminantes.

3.5.3 Tratamientos:

Cuadro 1. Tratamientos resultantes de la combinación de los factores Medio (A), pH (B) y Temperatura (C); utilizados para el ensayo de germinación de esporas de *P. lentimorbus in vitro*.

Factor A (medio)		Factor B (pH)	Factor C (Temp)		
			4 veces C1	5 veces C2	6 veces C3
MYPGP	A1	pH bajo= B1	A1B1C1	A1B1C2	A1B1C3
		pH medio= B2	A1B2C1	A1B2C2	A1B2C3
		pH alto= B3	A1B3C1	A1B3C2	A1B3C3
MJ	A2	pH bajo= B1	A2B1C1	A2B1C2	A2B1C3
		pH medio= B2	A2B2C1	A2B2C2	A2B2C3
		pH alto= B3	A2B3C1	A2B3C2	A2B3C3
MY	A3	pH bajo= B1	A3B1C1	A3B1C2	A3B1C3
		pH medio= B2	A3B2C1	A3B2C2	A3B2C3
		pH alto= B3	A3B3C1	A3B3C2	A3B3C3

3.6 Reproducción de células vegetativas en medios artificiales

Se analizaron 3 medios de cultivo líquidos y se evaluó el efecto del pH como factor determinante en la reproducción de los bacilos.

Los medios evaluados fueron el medio J líquido, medio MYPGP líquido y el Medio Y líquido. Todos los medios se prepararon en forma líquida (Anexo 2) eliminando el agar de la receta y se llevaron a 3 diferentes niveles de acidez (pH) utilizando NaOH 0,1 molar para aumentar el pH y HCl 0,1 molar para disminuirlo, luego se colocaron volúmenes de 100 ml de cada medio en erlenmeyer de 200 ml de capacidad.

Cada erlenmeyer fue inoculado con 1 ml de una suspensión de células vegetativas preparada a una concentración de $5,5 \times 10^8$ veg/ml, a partir de las esporas germinadas en el ensayo inicial (3.5), para obtener una concentración final de bacilos en cada medio de aproximadamente $5,5 \times 10^6$ veg/ml.

Al final del ensayo se preparó una suspensión de células vegetativas reproducidas en el mejor medio líquido a una concentración de $1,0 \times 10^8$ veg/ml, y se inyectaron en 20 larvas sanas del tercer instar de *P. elenans* para verificar la virulencia de la bacteria reproducida.

3.6.1 Diseño experimental:

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial 3^2 , donde el factor A corresponde al medio de cultivo y la variable B correspondió a la acidez del medio.

El diseño estuvo conformado por 9 tratamientos con 3 repeticiones para un total de 27 unidades experimentales. Los medios fueron incubados a 30 °C y un fotoperiodo de 12 horas luz por 5 días.

El modelo estadístico utilizado para el análisis de las variables fue el siguiente:

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \alpha\gamma_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

En donde:

- μ : promedio general
- α_i : efecto directo del medio (A)
- γ_j : efecto directo del pH (B)
- $\alpha\gamma_{ij}$: efecto de la interacción del medio y el pH (AB)
- ϵ_{ijk} : variación debida al error experimental

3.6.2 Tratamientos:

Cuadro. 2. Combinación de los factores medio y acidez utilizados para la reproducción de *P. lentimorbus in vitro*.

Medio	Acidez
MJ	pH bajo
	pH medio
	pH alto
MYPGP	pH bajo
	pH medio
	pH alto
MY	pH bajo
	pH medio
	pH alto
TOTAL= 9x3	= 27 unidades

3.6.3 Variable de respuesta:

La variable evaluada fue la concentración de células vegetativas por mililitro en cada medio, determinados con la ayuda de un hematocímetro en una sola medición a los 5 días de iniciado el ensayo.

Se realizaron observaciones constantes del avance en el desarrollo de la bacteria en los diferentes medios para de esta manera verificar lo expuesto en la literatura y de esta forma detectar cualquier anomalía y maximizar la producción de esporas de la bacteria.

3.7 Extracción de *P. lentimorbus* de larvas de *P. elenans* infectadas y reproducción *in vitro*.

Para facilitar la obtención de la bacteria *P. lentimorbus* en medios de cultivo puro se procedió a modificar la metodología inicialmente propuesta, para de esta manera garantizar la pureza del inóculo y su patogenicidad.

3.7.1 Metodología:

Se tomó una larva de *P. elenans* del tercer instar infectada con la enfermedad lechosa, después de desinfectar su superficie con hipoclorito de sodio al 2%, se procedió a perforar la cápsula cefálica con un alfiler entomológico. La primer gota de hemolinfa se desechó para evitar la presencia de contaminantes, la segunda gota se recolectó en un tubo de microcentrífuga conteniendo 1 ml de medio MYPGP líquido a un pH de 8,00.

Después de dejar reposar la muestra por aproximadamente 2 horas se extrajo una alícuota de 10 μ l de la superficie del medio inoculado con hemolinfa infectada y se colocó en un plato de medio MYPGP sólido preparado a un pH= 8,00, el medio se incubó a 30°C.

Posteriormente se tomó una colonia germinada sobre el medio sólido y se colocó en un vial con medio MYPGP líquido, pH:8,00 para que los bacilos se reprodujeran masivamente en forma pura.

Una vez obtenido el inóculo en forma pura se procedió a determinar la curva de crecimiento en el medio MYPGP preparado a un pH= 8,00. Los conteos de células vegetativas se realizaron cada 24 horas con la ayuda de un hematocímetro de 0,1 mm de profundidad, en un microscopio de contraste de fase.

Se colocaron 100 ml del medio en tres enlenmeyer de 200 ml de capacidad y se inocularon con 100 μ l de la suspensión de vegetativos de *P. lentimorbus* previamente preparada a una concentración de $8,0 \times 10^7$ veg/ml para obtener una concentración final de aproximadamente $8,0 \times 10^4$ veg/ml en cada enlenmeyer, los medios fueron incubados a una temperatura de 30°C y un fotoperíodo de 12 horas luz.

3.8 Esporulación *in vitro* de *P. lentimorbus*.

Se estudió el efecto de los nutrientes y la temperatura como factores determinantes en la inducción de la esporulación de las células vegetativas de *P. lentimorbus* producidas *in vitro*.

Se prepararon 350 ml de medio MYPGP, pH=8.0 para la reproducción masiva de células vegetativas de *P. lentimorbus*. Al alcanzar el pico de crecimiento, determinado en el ensayo anterior (3.7), se procedió a preparar 27 tubos de centrifuga de 25 ml de capacidad en los cuales se colocaron 12 ml de medio con células vegetativas. Estos tubos se centrifugaron por 20 minutos a 3 000 rpm.

Concluido el proceso de centrifugación se extrajeron 10 ml del medio supernatante en 9 tubos, en los cuales se colocó 10 ml de agua destilada estéril; en otros 9 tubos se extrajo 10 ml del medio supernatante y se colocaron 10 ml de un medio pobre (Anexo 2.) en nutrientes propuesto por Steinkraus y Tashiro (1955); y los restantes 9 tubos permanecieron con el medio supernatante.

Los 27 tubos se agitaron para permitir que las células vegetativas se mezclaran uniformemente y permanecieron en los tubos 24 horas en una incubadora a 30°C y 12 horas luz, transcurrido este tiempo se realizaron choques de temperatura, colocando tres tubos de cada medio con sus células vegetativas por 30 minutos a tres diferentes temperaturas; 9 tubos se colocaron en un horno a una temperatura de 55°C, otros nueve tubos se colocaron en un refrigerador a 5°C y los restantes 9 se trasladaron a un cuarto con una temperatura controlada de 24 °C en donde se colocaron todos los tubos después de realizados los choques de temperatura.

Al final del ensayo se realizó un prueba de patogenicidad con las esporas de *P. lentimorbus* reproducidas *in vitro* inoculando raíces de maíz pregerminado con una suspensión de $2,0 \times 10^8$ esp/ml. Luego se colocaron 20 larvas de *P. elenans* del tercer instar de desarrollo en vasos individuales de 200 ml de capacidad con una raíz inoculada y se agregó una capa de suelo de 100 g.

Las larvas se incubaron a 24°C y se alimentaron con semilla de maíz pregerminada cada 15 días, durante 45 días.

3.8.1 Diseño experimental:

Se utilizó un diseño factorial 3^2 con un arreglo completamente al azar en donde el factor A son 3 medios de cultivo y el factor B son 3 choques de temperatura. El ensayo estuvo compuesto por 3 repeticiones para un total de 27 unidades experimentales

3.8.2 Tratamientos:

El ensayo estuvo compuesto por 9 tratamientos, resultantes de la combinación de los dos factores analizados según se muestra en la tabla 3.

Cuadro 3. Combinaciones de los factores medio y temperatura utilizados en el ensayo de esporulación *in vitro* de *P. lentimorbus*.

Factor A (medio)		Factor B (temperatura)		
		B1 5°C	B2 24°C	B3 55°C
ADE	A1	A1B1	A1B2	A1B3
Medio pobre	A2	A2B1	A2B2	A2B3
MYPGP	A3	A3B1	A3B2	A3B3

3.8.3 Variable de respuesta y análisis de datos:

La variable a evaluar es la concentración de esporas formadas en cada tratamiento 5 días después de realizar los tratamientos de temperatura. A estos datos se les aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) y las medias se compararon a través de una prueba de Duncan.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Descripción de las fases de desarrollo de *P. lentimorbus* y cambios que produce en las larvas durante su desarrollo.

Cuatro días después de realizar el tratamiento de temperatura de 80 °C por 20 minutos a una suspensión de esporas de *P. lentimorbus*, con el fin de eliminar contaminantes e inyectar larvas de *P. elenans*, se observó germinación de las esporas, usando un microscopio de luz, a un aumento de 100X. Luego se procedió a inyectar larvas sanas de *P. elenans* con esporas germinadas para observar el desarrollo de los síntomas de la enfermedad lechosa.

Una vez comprobado visualmente el efecto inductor de la temperatura sobre la germinación de las esporas de *P. lentimorbus*, se prepararon láminas portaobjetos fijas y se monitoreó el proceso de germinación. En el transcurso de este proceso se observó claramente como dentro del esporangio, la espora y el cuerpo parasporal van desapareciendo poco a poco, el esporangio y su contenido interno se torna ligeramente transparente y la espora se va adelgazando hasta tomar una forma muy delgada con extremos aguzados (Figura 2).

La bacteria modifica su forma adquiriendo un aspecto similar a la preespora o espora joven descrita por Dutky (1940) y Black (1968), por lo que se puede comparar la germinación de las esporas de *P. lentimorbus* con un proceso inverso al proceso de esporulación.

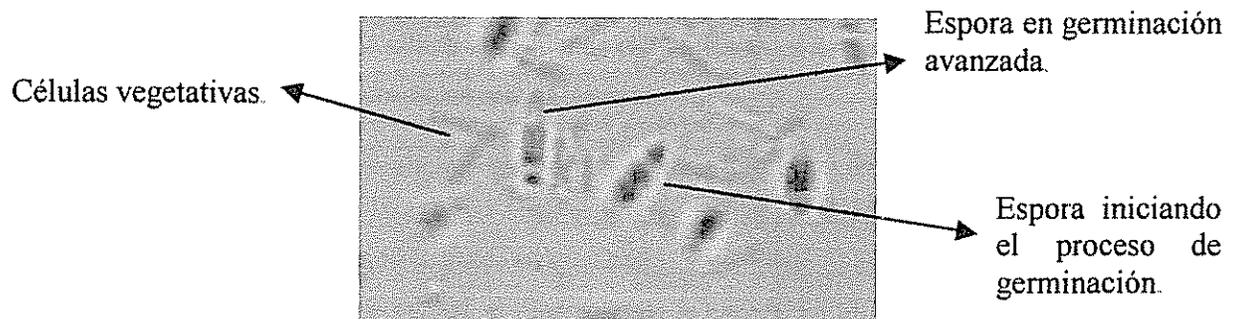


Figura 2. Proceso de germinación de las esporas de *P. lentimorbus*.

En la figura 2 se puede apreciar una espora de *P. lentimorbus* iniciando el proceso de germinación; en este estado la espora oval modifica su forma alargando sus extremos hasta tomar una forma elíptica en donde la espora y el cuerpo parasporal van desapareciendo gradualmente. El proceso por el cual la espora modifica su forma inicial, empieza aproximadamente 48 horas después del primer tratamiento a 80 °C y se extiende por otras 96 horas más hasta que la célula elíptica se

adelgazan totalmente y forman un fino bacilo casi imperceptible en un microscopio de luz a una intensidad de 100X; esta célula vegetativa o bacilo iniciará su multiplicación en forma logarítmica una vez concluido el proceso de germinación.

Los resultados obtenidos para la cepa 292 de *P. lentimorbus*, son consistentes con los observados por Evans y Curran (1943), y Curran y Evans (1945) para diferentes especies de *Bacillus*. En estos reportes se menciona como un precalentamiento de las esporas puede inducir la germinación en esporas de algunas bacterias termotolerantes.

Las fases del proceso de esporulación fueron observadas en hemolinfa de larvas infectadas con la enfermedad lechosa. Estas muestras se extrajeron de larvas de *P. elenans* en las cuales la infección se encontraba en una etapa media, y se prepararon láminas fijas.

En el figura 3 se puede apreciar el ciclo completo de la bacteria *Paenibacillus lentimorbus* propuesto en esta investigación; el ciclo inicia con la espora oval (paso 1) que durante el proceso de germinación irá modificando su forma alargando sus extremos hasta adquirir una forma elipsoidal similar a la observada en el paso 5 que luego se adelgazará completamente (paso 6).

Cuando la concentración de células vegetativas es lo suficientemente elevada dentro de las larvas se inicia el proceso de esporulación; el cual fue similar al descrito por Dutky (1940), al inicio de este proceso las células vegetativas individuales comienzan a hincharse lentamente como se muestra en la figura 3 a partir del paso número 11, los bacilos son alargados con bordes redondeados y presentan una forma cilíndrica en donde el citoplasma es de apariencia homogénea, no diferenciándose ninguna estructura en las células jóvenes.

Conforme avanza el desarrollo de las células se observa la formación de un pequeño gránulo localizado centralmente que luego dará forma a una estructura similar a una vacuola que formará la espora, esta vacuola aumenta su tamaño hasta ocupar casi por completo el esporangio y adquiere una apariencia refractaria conforme avanza el desarrollo de la espora, en el extremo se notará la formación del cuerpo parasporal.

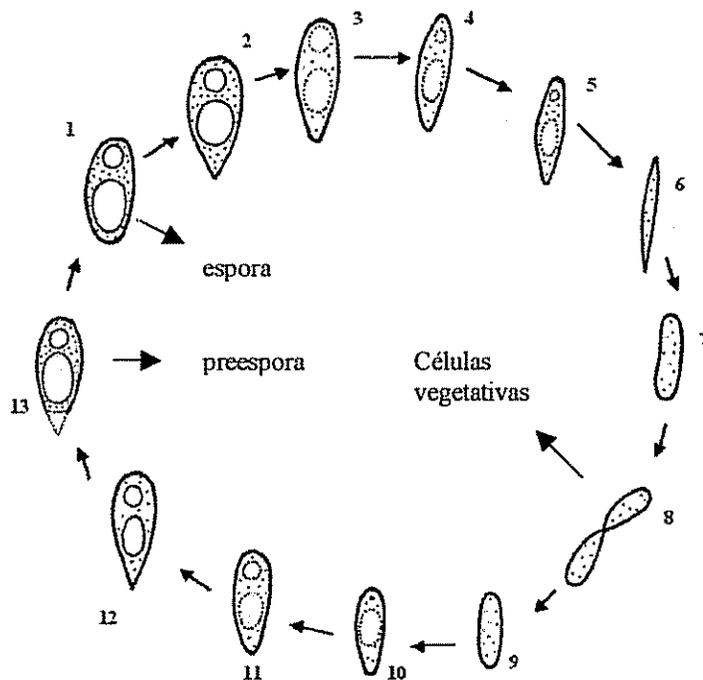


Figura 3. Ilustración del modo de germinación, reproducción y esporulación de la bacteria causante de la enfermedad lechosa (*P. lentimorbus*) en larvas de *P. eleanans*.

Al medir la acidez en las muestras de hemolinfa y del contenido del tracto digestivo de *P. eleanans* se determinó que la hemolinfa de larvas sanas presenta un pH=7,41, y su tracto digestivo muestra una acidez de pH=7,75. Estos valores se mantienen muy similares en larvas infectadas con la cepa 292 de *P. lentimorbus*. La hemolinfa de una larva enferma mostró un pH=7,20 y en el contenido del tracto digestivo la acidez fue pH= 7,78. Esto demuestra que el efecto del desarrollo de la enfermedad lechosa sobre la acidez es casi nulo y que posiblemente los cambios en el pH tampoco son un factor determinante para estimular el inicio de la esporulación de *P. lentimorbus*.

Weiner *et al.* (1966) concuerdan con estas observaciones al concluir que el pH no varía significativamente entre larvas sanas e infectadas con la enfermedad lechosa, aunque en sus observaciones estos autores reportan valores menores a los observados en este estudio. Esto podría deberse a que se trata de especies de escarabajos y condiciones ambientales muy diferentes.

El análisis químico de macro y micro elementos de la hemolinfa de larvas sanas e infectadas con la enfermedad lechosa (Anexo 3), realizado en los Laboratorios de Unidad de Servicio a la

Industria de la Universidad de Costa Rica, reveló la presencia de elementos como el magnesio, azufre, fósforo, zinc, calcio, potasio, hierro, cobalto, nitrógeno y manganeso, de los cuales solamente el azufre, hierro, cobalto y manganeso disminuyen significativamente su concentración con el desarrollo de la enfermedad lechosa (Cuadro 4), por lo que se puede decir que estos elementos son esenciales para el desarrollo *in vivo* de la bacteria, y deben ser incluidos en el medio artificial para evaluar su efecto sobre el desarrollo *in vitro* de *P. lentimorbus*.

Cuadro 4. Análisis químico de hemolinfa de larvas de tercer estadio de *P. elenans* sanas e infectadas con la enfermedad lechosa (*Paenibacillus lentimorbus*, cepa 292).

Elemento	Hemolinfa Sana	Hemolinfa infectada	Unidades
Mg	770,5	1127,7	ppm
S	0,8	0,3	ppm
P	0,03	0,13	%m/m
Zn	18,2	359,7	ppm
Ca	152,0	521,8	ppm
K	0,188	0,189	%m/m
Fe	191,9	140,2	ppm
Co	4,2	1,9	ppm
N	0,4	0,8	%m/m
Mn	5,9	1,6	ppm

Por su parte, el análisis del contenido de trealosa (Anexo 4), realizado en los laboratorios de la Escuela de Bioquímica de la Universidad Nacional de Costa Rica, reveló que las larvas sanas poseen un contenido de 1,46 mg/ml de trealosa en su hemolinfa, mientras que en larvas infestadas con la enfermedad lechosa se detectó una reducción del 37,7% en el contenido de este disacárido, alcanzando una concentración de 0,91 mg/ml.

El papel de la trealosa, principal azúcar presente en la hemolinfa de los insectos, en la reproducción de la bacteria causal de la enfermedad lechosa en larvas de escarabajos, a sido ampliamente estudiado por Rodees, *et al.* (1966); Bhumiratana, Anderson y Costilow (1974), estos autores coinciden en que los niveles de trealosa decrecen en aproximadamente un tercio durante la reproducción de la bacteria en la hemolinfa de las larvas de los escarabajos. Estos reportes son muy similares al 37,7% encontrado en el presente estudio, por lo que se puede deducir que efectivamente la bacteria *P. lentimorbus* esta utilizando la trealosa como una fuente importante de carbono y energía para su desarrollo, y a partir de los resultados observados se calculó que para la reproducción *in vitro* el medio artificial debe poseer un contenido de trealosa similar al detectado en larvas sanas.

4.2 Germinación de esporas y reproducción de células vegetativas en medios artificiales.

4.2.1 Preparación del medio de cultivo "Y" para la reproducción *in vitro* de *P. lentimorbus*.

Con base en las determinaciones realizadas en el ensayo anterior (4.1) se procedió a preparar un medio sólido, al que se le denominó medio "Y", compuesto por macro y microelementos en concentraciones muy similares a los contenidos reportados en el análisis químico de la hemolinfa de larvas sanas, la composición de este medio se muestra en la cuadro 5. Todos los elementos, excepto el Cobalto, se agregaron en forma líquida provenientes de formulaciones foliares orgánicas o bionutrientes (Cytozyme®), por lo que el contenido de los elementos se basó en la composición de cada formulación foliar tomando como base el contenido de los elementos más concentrados.

Adicional a los macro y micronutrientes, se agregó una concentración de trealosa similar a la encontrada en larvas sanas de *P. elenans* (1,46 g/l), más 5,0 g/L de Triptona y 15 g/l de extracto de levadura. Para la solidificación del medio se utilizó agar granulado (DIFCO) a razón de 20 g/l.

Cuadro 5. Composición del medio "Y", formulado con base el contenido de elementos en la hemolinfa de larvas sanas de tercer estadio de *P. elenans*.

Elemento	Concentración en hemolinfa sana	Concentración en el medio	Fuente*
Mg	770,5 ppm	770,5 ppm	Mg TM 7%
S	0,8 ppm	0,508 ppm	CROP TM 4,5%
P	0,03 %m/m	300,5 ppm	NPK TM 25,5 %P ₂ O ₂
Zn	18,2 ppm	18,2 ppm	Zinc TM 10,9%
Ca	152,0 ppm	152,0 ppm	Ca TM 11%
K	0,188 %m/m	571,6 ppm	NPK TM 25,5 %K ₂ O
Fe	191,9 ppm	191,9 ppm	CROP TM 1,7%
Co	4,2 ppm	4,2 ppm	Co(C ₂ H ₂ O ₂) ₂ *4H ₂ O
N	0,4 %m/m	724,5 ppm	Todos**
Mn	5,9 ppm	5,9 ppm	Mn TM 8,8%

* Corresponde a fertilizantes foliares de origen orgánico.

** Todos los fertilizantes son nitrogenados por lo que la cantidad de nitrógeno total en el medio es la suma del total agregado por cada fertilizante más el contenido de N en la triptona.

4.2.2 Germinación de esporas de *P. lentimorbus* en los medios "J", "Y" y "MYPGP":

En observaciones previas se determinó que el realizar un solo tratamiento de temperatura promueve la germinación de las esporas pero no garantiza la eliminación de los contaminantes por lo que se compararon variaciones en el número de choques térmicos para medir su efecto sobre la germinación y como herramienta para eliminar contaminantes.

Al analizar el efecto de los medios de cultivo sólidos, preparados en tres niveles de acidez, sobre la germinación de esporas tratadas a una temperatura de 80 °C por 20 minutos, en cuatro,

cinco y seis ocasiones, se puede notar como efectivamente el tratamiento de temperatura estimula la germinación.

Aproximadamente 24 horas después del último tratamiento de temperatura se presentaron colonias de contaminantes en los platos inoculados con esporas tratadas en 4 ocasiones. La germinación de las esporas de *P. lentimorbus* dio inicio 6 días después del último tratamiento de temperatura en los platos inoculados con esporas tratadas en 5 ocasiones; un día después se presentaron las primeras colonias en los platos inoculados con las esporas tratadas en 6 ocasiones.

La germinación tardía de las esporas se debió posiblemente a la muerte de las primeras esporas germinadas, ya que como se verificó anteriormente, el proceso de germinación inicia aproximadamente 48 horas después del primer tratamiento de temperatura por lo que tratamientos posteriores a las 48 horas matarían las primeras esporas en germinar.

Aunque el coeficiente de variación es alto (Anexo 5.1), vemos como el R^2 presenta un 96% de probabilidad de obtener estos mismos resultados en ensayos similares. El análisis de los resultados arrojó diferencias altamente significativas en el modelo ($F_{26,54}$: 45.49; P :0.0001) (Anexo 5.1). Las diferencias aplican a todos los factores y todas sus interacciones. La interacción del medio MYPGP preparado a un pH: 8,00 e inoculado con esporas tratadas en seis ocasiones a 80°C, presentó los mayores porcentajes de germinación con un promedio de 438 colonias ($F_{8,54}$ =12.66; P =0.0001) (Anexo 5.1), lo que equivale aproximadamente a un 8% de germinación, porcentaje muy similar al 9% reportado por Krieger, Franken y Schnetter (1996) en el mismo medio (MYPGP).

El segundo mejor tratamiento fue el mismo medio (MYPGP), preparado a la misma acidez, inoculado con esporas tratadas en 5 ocasiones, en donde se alcanzó aproximadamente un 5% de germinación. Es importante recalcar que en todos los platos del medio MYPGP preparados a diferentes niveles de acidez, se obtuvo germinación cuando se inocularon con esporas tratadas en 5 y 6 ocasiones a 80°C.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Curran y Evans (1944), quienes reportan que la proporción de esporas que responden a tratamientos de pregerminación con calor es dependiente del número de tratamientos aplicados, como se puede observar, el mayor porcentaje de germinación se presenta en las esporas tratadas en 6 ocasiones.

El análisis de varianza para la presencia de contaminantes dio diferencias altamente significativas entre tratamientos ($F_{26,54}$: 55; P : 0.0001)(Anexo 5.2), con un coeficiente de variación del 32% y un R^2 del 96%. Al analizar el efecto de los factores y su interacciones nos encontramos

con que el único factor que presenta diferencias altamente significativas es el número de choques térmicos ($F_{2, 54}: 703; P: 0.0001$).

Hubo crecimiento de contaminantes en todos los medios inoculados con esporas tratadas en 4 ocasiones a 80°C, por lo que es necesario tratar las esporas en más de 4 ocasiones para eliminar la mayor cantidad de contaminantes (Figura 5).

Es importante resaltar como al aumentar la acidez del medio aumentó el número de esporas germinadas (Figura 4), lográndose un porcentaje de germinación mayor (8%) en el medio MYPGP preparado a un pH=8,00, en el medio MYPGP preparado aun pH=7,50 se obtuvo una germinación del 4%, y por último, en el medio MYPGP preparado a un pH=7,00 el porcentaje de germinación fue inferior al 1%, cuando estos medios fueron tratados con 6 choques de 80 °C.

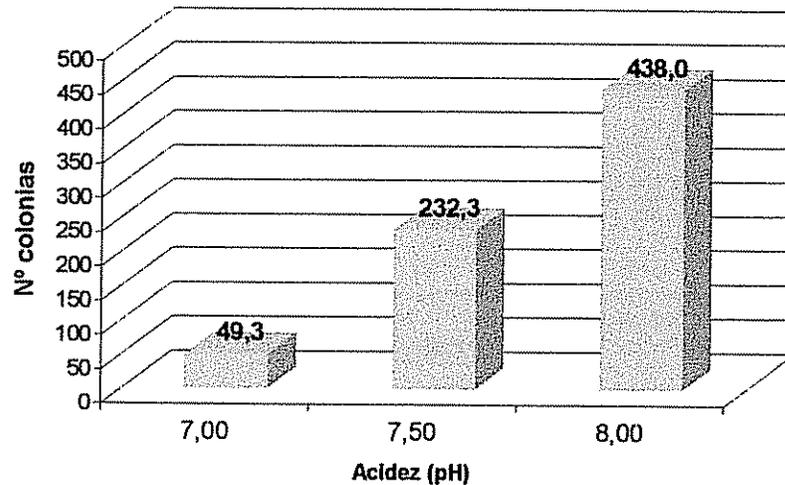


Figura 4. Número de colonias promedio en el medio “MYPGP” preparados en 3 niveles de acidez e inoculado con esporas tratadas con 6 choques de 80°C.

Con base en los resultados anteriores se acepta la hipótesis nula planteada, la cual expone que la acidez es un factor determinante para la germinación de las esporas de *P. lentimorbus*, pero además nos encontramos con dos factores determinantes como lo son el medio de cultivo y la temperatura.

En la figura 5 se observa como aumenta el porcentaje de germinación conforme aumenta el número de tratamientos de temperatura y conforme aumenta el pH del medio MYPGP. Así mismo el porcentaje de contaminación disminuye conforme aumenta el número de tratamientos de temperatura.

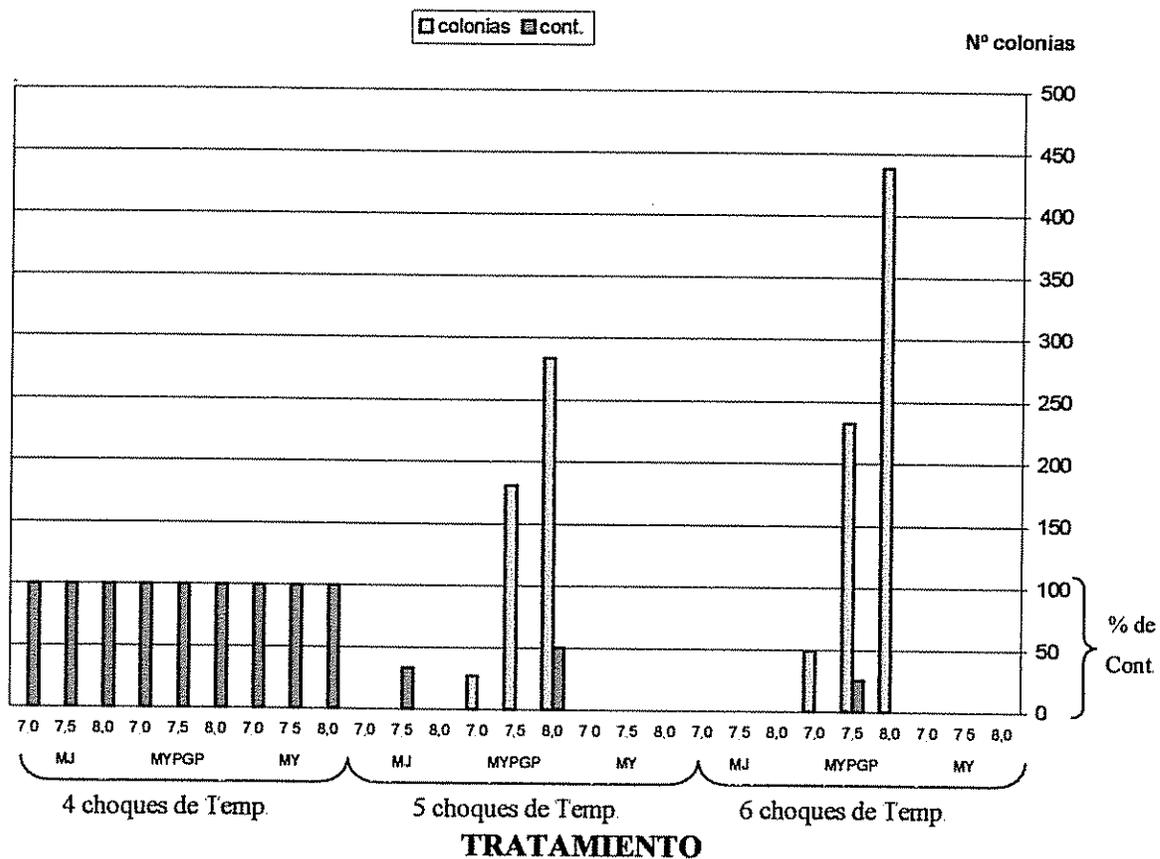


Figura 5. Número de colonias de *P. lentimorbus* y porcentaje de contaminación en tres medios de cultivo (MJ, MYPGP, MY), preparados con tres niveles de acidez (pH:7,00; pH:7,50; pH:8,00), e inoculados con esporas tratadas con 4, 5 y 6 choques térmicos de 80 °C.

4.3 Reproducción de estados vegetativos de *P. lentimorbus* en medios líquidos.

La reproducción de las células vegetativas en los mismos medios "Y", "J" y "MYPGP" (Anexo 2), preparados en forma líquida y con tres niveles de acidez, difirió significativamente entre los tratamientos ($F_{10, 16}=10,30$; $P= 0.0001$) (Anexo 5.3). Analizando más detalladamente este diseño observamos como los bloques no son significativos en el análisis, resultado que evidencia las condiciones controladas de la incubadora en la que se llevó a cabo el ensayo.

El R^2 nos dice que hay una probabilidad del 86% de obtener estos mismos resultados en ensayos similares, así mismo el coeficiente de variación (38%) no es muy elevado a pesar de

tratarse de concentraciones elevadas con números exponenciales en donde fácilmente se pueden cometer errores de conteo entre las repeticiones.

Se observó una diferencia altamente significativa entre los medios de cultivo evaluados ($F_{2,16} = 47,41$; $P = 0,0001$). El medio más eficiente para la reproducción de los bacilos es el medio MYPGP, alcanzando una concentración de bacilos de $2,6 \times 10^8$ veg/ml a los 5 días de inoculado. (figura 6). En segundo lugar tenemos el medio "J" con una concentración de $1,6 \times 10^8$ veg/ml, y finalmente tenemos el medio Y en el cual obtuvo una concentración de $1,1 \times 10^7$ veg/ml.

En cuanto a la acidez, no hubo diferencia significativa en la reproducción de células vegetativas entre los tres niveles de acidez ($F_{2,16} = 0,31$; $P = 0,7388$). Tampoco hubo diferencia en la interacción del medio con la acidez ($F_{4,16} = 1,85$; $P = 0,1691$), por lo que se puede deducir que la acidez no es un factor determinante en la reproducción, resultados que concuerdan y ratifican los datos obtenidos en la medición de acidez realizada en un inicio en larvas sanas e infectadas con la enfermedad lechosa, en donde no hay cambios importantes en la acidez de la hemolinfa de ambas larvas. Datos similares reportaron Weiner *et al.* (1966), al no se observar cambios importantes en los niveles de acidez en la hemolinfa de larvas sanas e infectadas con la enfermedad lechosa.

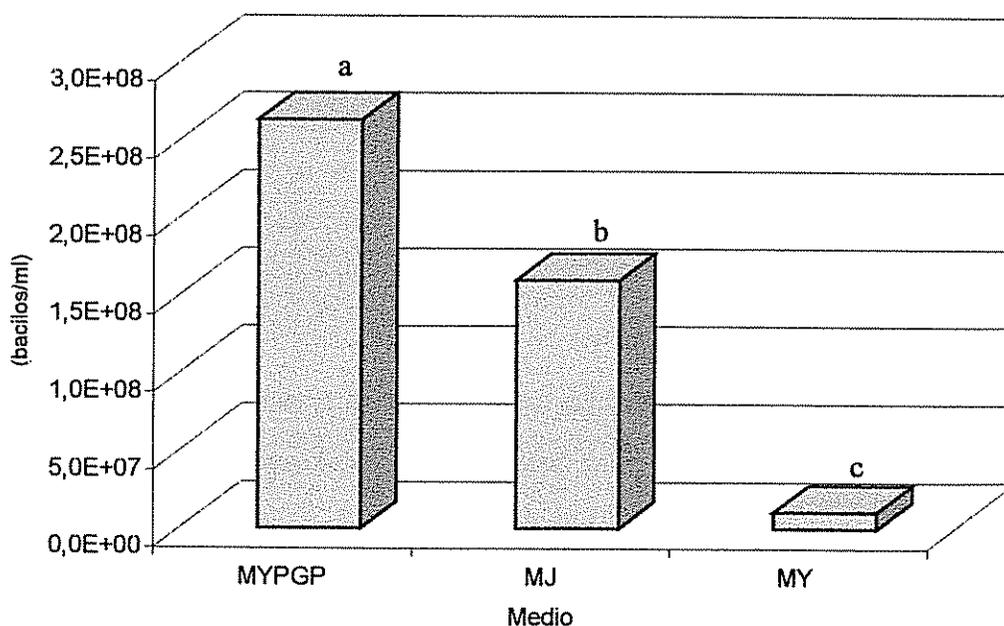


Figura 6. Concentración de células vegetativas de *P. lentimorbus* en tres medios de cultivo (MYPGP, MJ, MY). (Columnas con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí; Duncan)

De acuerdo a los resultados de los ensayos de germinación de esporas en medios sólidos y reproducción de células vegetativas en medios líquidos, el medio MYPGP presentó las mejores cualidades para ambas fases, pero, como concluye Klein (1992), la esporulación de la bacteria no ocurre en este medio, ni se logró inducir este proceso con el nuevo medio desarrollado en este estudio; por lo que es necesario buscar nuevas alternativas que permitan alcanzar este último y esencial paso en el proceso de reproducción de la bacteria.

Considerando que en el medio MYPGP se alcanza una concentración final de $2,5 \times 10^8$ bacilos por mililitro, comparado con una concentración de $2,0 \times 10^9$ esporas por mililitro (Langford *et al* y Beard mencionados por Tanada y Kaya, 1993) alcanzada en una larva de escarabajo infectada, el MYPGP es aún un medio muy pobre para la reproducción eficiente de *P. lentimorbus*.

4.3.1 Patogenicidad de los vegetativos de *P. lentimorbus* germinados y reproducidas *in vitro*.

Al finalizar este ensayo se realizaron pruebas de virulencia con células vegetativas de *P. lentimorbus* germinadas en el medio MYPGP (pH:8,00) y las células reproducidas masivamente en el mismo medio y se comprobó la pérdida de virulencia, anteriormente reportada por Steinkraus y Tashiro (1955), en los bacilos reproducidos *in vitro*, por lo que fue necesario proponer otra metodología para la obtención del inóculo inicial. En este sentido se propone extraer el inóculo inicial de larvas infectadas con la enfermedad lechosa y cultivar los bacilos en los medios seleccionados en los ensayos de germinación y reproducción realizados en este estudio, coincidentemente el medio seleccionado en ambos ensayos es el medio MYPGP preparado a un pH=8,00.

4.4 Curva de crecimiento de *P. lentimorbus* en el medio MYPGP.

Después de obtener inóculo puro procedente de larvas infectadas con la enfermedad lechosa se procedió a estimar la curva de crecimiento de la bacteria en el medio MYPGP (Anexo 2) preparado a un pH: 8,00, y se observó un crecimiento exponencial (Figura 7), en donde la concentración de bacilos permanece constante las primeras 24 horas, después de las cuales se inicia la reproducción, alcanzando su máxima concentración aproximadamente 62 horas después de inoculado el medio.

En observaciones realizadas por Lüthy *et al.* (1970) se reporta que el punto de máxima concentración de bacilos *in vitro* se alcanza 4 días después, pero hay que considerar en primer lugar que el autor utilizó el medio Grace's, muy diferente al medio MYPGP utilizado en este estudio,

además de que el medio utilizado tuvo un pH=6,80; por lo que no se puede comparar los resultados. Lo único comparable en estos estudios es la forma de la curva de crecimiento y además la concentración máxima de bacilos la cual es ligeramente mayor a $1,0 \times 10^8$ veg/ml en ambos medios.

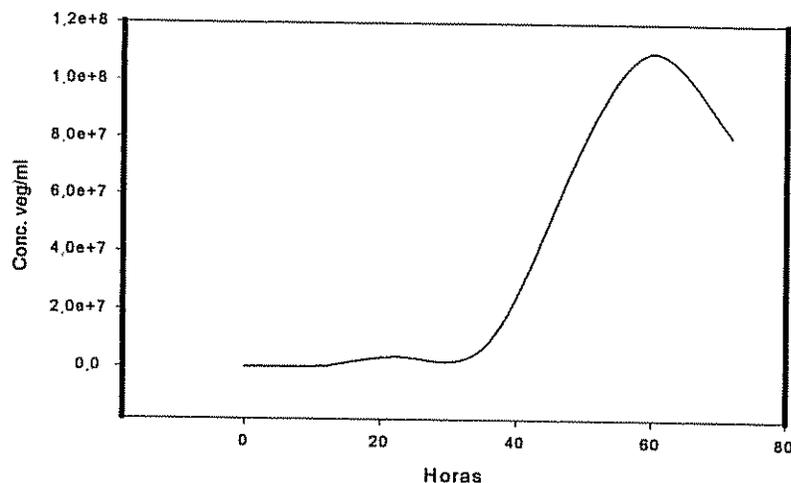


Figura 7. Curva de crecimiento de *P. lentimorbus* en el medio MYPGP preparado a un pH:8,0.

4.5 Esporulación:

Al alcanzar el pico de crecimiento vegetativo es necesario inducir la esporulación, ya que esta no ocurre en condiciones normales y como se puede apreciar en la curva de crecimiento (Figura 3), la concentración de células vegetativas disminuye rápidamente después de alcanzar el pico de crecimiento vegetativo.

En observaciones realizadas, en las larvas infectadas por inyección con la enfermedad lechosa, se percibió un ligero cambio de temperatura en la superficie de las larvas. Según Guarín (1997) las larvas infectadas que alcanzan la fase III de desarrollo de la enfermedad lechosa dan una sensación térmica de “frías al tacto” muy diferente a la de larvas sanas.

Tomando en cuenta esta observación y al ver el efecto de la temperatura sobre la germinación de las esporas en los ensayos iniciales, se planteó la interrogante del efecto de la temperatura sobre la esporulación de las células vegetativas, por lo que se procedió a tratar las células vegetativas de la bacteria con cambios de temperatura de 25°C por arriba y por debajo de la temperatura a la cual se incubaron los bacilos (30°C).

En este proceso es importante analizar también la teoría expuesta por algunos autores como Steinkraus y Tashiro (1955), quienes proponen que la deficiencia de nutrientes es el factor inductor del proceso de esporulación de *P. lentimorbus*, por lo que se procedió a reducir la concentración de nutrientes por centrifugación de los bacilos y agregando agua destilada estéril a un primer tratamiento; en un segundo tratamiento se agregó el medio propuesto por Steinkraus y Tashiro (1955) para promover la esporulación y por último, como tercer tratamiento se probó el dejar las células vegetativas en el medio MYPGP.

Estos tres medios fueron sometidos a un choque de temperatura por 30 minutos y posteriormente se incubaron a 24 °C durante 5 días; el choque de temperatura se realizó a tres diferentes intensidades (4°C, 24°C y 55°C), en un ensayo no planificado al inicio.

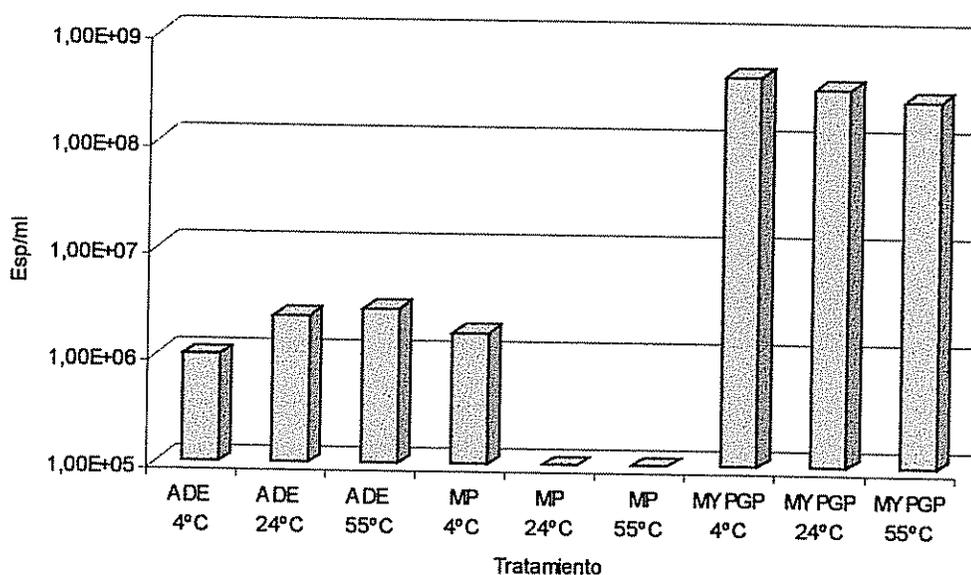


Figura 8. Esporulación de células vegetativas de *P. lentimorbus* en tres medios de cultivo tratadas con tres temperaturas durante 30 minutos.

Al analizar los resultados de este experimento se observaron diferencias altamente significativas ($F_{8,18}: 967.88$; $P: 0.0001$) (Anexo 5.4). Estas diferencias se originaron en los factores medio y temperatura y sus interacciones ($F_{4,18}: 77.34$; $P: 0.0001$). El análisis de las interacciones indicó que la mayor cantidad de esporas se alcanzó en el medio MYPGP tratado con temperaturas de 4°C, seguido en segundo y tercer lugar por los tratamientos compuestos por el mismo medio (MYPGP) tratado a 24°C y 55°C, respectivamente.

De acuerdo a estos resultados se rechaza la hipótesis nula, la cual plantea que el factor que induce la esporulación es la deficiencia nutricional. En la figura 8 se puede observar claramente que el factor inductor de la esporulación de *P. lentimorbus* no es la deficiencia nutricional ya que el agua destilada estéril y el medio pobre en nutrientes no favorecieron este proceso.

Aunque el efecto de la temperatura no es claro, se puede ver como las células vegetativas producidas en el medio MYPGP preparado a un pH:8,00 y tratadas con un choque de temperatura de 4°C incrementaron su concentración, obteniéndose una concentración final de $4,4 \times 10^8$ esp/ml partiendo de una concentración inicial de $3,6 \times 10^8$ veg/ml. No ocurriendo lo mismo en los demás tratamientos de temperatura sobre el mismo medio. Este ligero aumento en la concentración se puede deber a un estímulo de los bacilos previo a su esporulación. El conteo final de esporas se realizó 5 días después de realizar los tratamientos de temperatura, tiempo suficiente para completar el ciclo de la bacteria en medios de cultivo artificiales.

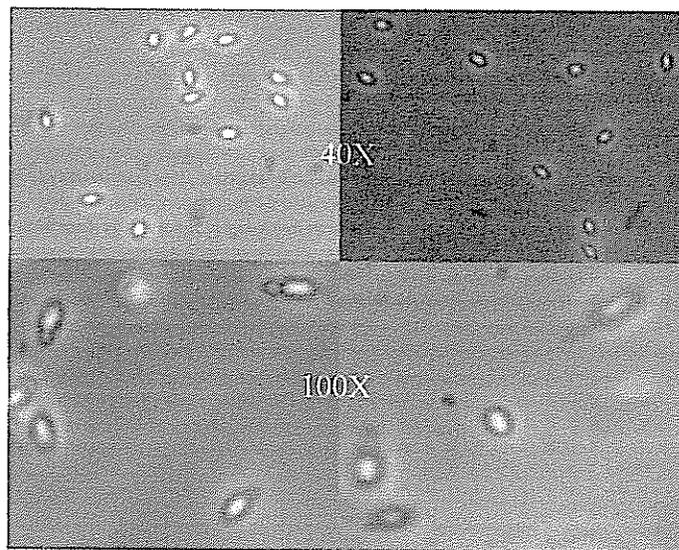


Figura 9. Esporas de *P. lentimorbus*, producidas *in vivo* (izquierda) y producidas *in vitro* (derecha); vistas a una intensidad de 40X arriba y 100X abajo en un microscopio de contraste de fase.

Como se puede apreciar en la figura 9, las esporas de *P. lentimorbus* producidas *in vitro* son muy similares a las producidas *in vivo*, si las vemos a una intensidad de 40X en un microscopio de contraste de fase; pero si aumentamos la intensidad del objetivo a 100X vemos como las esporas producidas *in vitro* carecen de una formación clara del cuerpo

parasporal. Esporas similares fueron obtenidas por Haynes y Rodees (1969), utilizando el medio "J" y agregando carbón activado para inducir una limitada esporulación.

Al finalizar esta última etapa se realizó una prueba de patogenicidad con larvas del tercer estado de desarrollo y se observó que al inocular raíces de maíz pregerminado con las esporas producidas *in vitro* se obtuvo un 10% de infección lo que comprueba que la metodología utilizada para producción *in vitro* de *P. lentimorbus* es adecuada.

El obtener un 10% de infección con las esporas producidas *in vitro* es un resultado alentador si se toma en cuenta que la prueba de patogenicidad se realizó inoculando raíces de maíz pregerminado con una suspensión de esporas de aproximadamente de $2,0 \times 10^8$ esp/ml, y dicha prueba se realizó en las últimas semanas del mes de noviembre, utilizando larvas de *P. elenans* en un avanzado tercer estado de desarrollo.

Lo anterior revela que, aunque la prueba con esporas de *P. lentimorbus* producidas *in vitro* se realizó bajo condiciones poco favorables, como lo son una concentración baja de esporas, uso de larvas que se encontraban en un avanzado estado de desarrollo y, además de que las esporas se suministraron vía ingestión; fue posible observar dos larvas con los síntomas de la enfermedad lechosa a mediados del mes de diciembre.

Milner (1974) reporta que en ensayos realizados con esporas de *B. popilliae* producidas *in vivo* se puede infectar larvas de *Rhopaea verreauxi* con la enfermedad lechosa cuando esta se suministra vía inyección, sin embargo, cuando larvas sanas de la misma especie se alimentan con dosis de $1,0 \times 10^9$ esp/larva de la bacteria, no se produce infección.

Tashiro y Steinkraus (1966) reportan porcentajes de hasta un 70% de infección cuando larvas de *Amphimallon majalis* se inyectan con esporas de *B. popilliae* producidas *in vivo*, no obstante, en pruebas de exposición a suelo inoculado con dosis de $2,0 \times 10^9$ esp/kg de suelo, no se produce infección en ninguna larva.

Fernández (1999), expone que hay un desarrollo de resistencia conforme avanza el desarrollo de las larvas, por lo que es de esperar que larvas de *P. elenans* más jóvenes sean altamente susceptibles al uso de esporas producidas *in vitro* con la técnica utilizada en este estudio.

5. CONCLUSIONES:

- 1 La reproducción *in vitro* de *P. lentimorbus* es una alternativa viable aplicando la metodología planteada en esta investigación
- 2 *P. lentimorbus* es una bacteria tolerante a cambios de temperatura por lo que su germinación y esporulación *in vitro* son favorecidos por cambios térmicos.
- 3 El porcentaje de germinación *in vitro* de las esporas de *P. lentimorbus* aumentó al aumentar la cantidad de choques de temperatura aplicados previo a su cultivo en medios artificiales, así como también aumentó con la acidez del medio de cultivo.
- 4 La deficiencia nutricional no fue el factor determinante en la esporulación de las células vegetativas de *P. lentimorbus*.
- 5 El medio MYPGP reúne las condiciones mínimas necesarias para la germinación, reproducción y esporulación de *P. lentimorbus in vitro*.
- 6 La temperatura fue un adecuado tratamiento para la eliminación de contaminantes en el cultivo *in vitro* de la bacteria causante de la enfermedad lechosa en las larvas de escarabajos

6. **RECOMENDACIONES:**

- Realizar pruebas de patogenicidad y virulencia de las esporas de *P. lentimorbus* reproducidas *in vitro* sobre larvas de escarabajos del primer, segundo y tercer estado de desarrollo jóvenes.
- Realizar más estudios sobre los contenidos nutricionales necesarios para el desarrollo de la bacteria causante de la enfermedad lechosa en larvas de escarabajos, con el fin de desarrollar nuevos medios de cultivo *in vitro* en los cuales la reproducción de la bacteria sea mayor.
- Desarrollar nuevas metodologías de cultivo *in vitro* que permitan obtener una mayor eficiencia en la reproducción de *P. lentimorbus*; y realizar además, una comparación de costos entre la producción *invitro* e *in vivo*.
- Realizar estudios mas detallados sobre los factores inductores de la esporulación de la bacteria *P. lentimorbus in vitro*.

7. LITERATURA CITADA.

- Benintende, G ; Márquez, A. 1996. Bacterias entomopatógenas. In Leucona, RE. ed. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina. p. 61-72.
- Bennett, GA; Shotwell, OL. 1972. Haemolymph lipids of healthy and diseased Japanese beetle larvae. *Journal of Insect Physiology*. 18: 53-62.
- Bennett, GA; Shotwell, OL; Hall, HH. 1968. Hemolymph proteins of healthy and disease larvae of the Japanese Beetle, *Popillia japonica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 11: 112-118.
- Bhumiratana, A; Anderson, RL; Costilow, RN. 1974. Trehalose Metabolism by *Bacillus popilliae*. *Journal of Bacteriology* 119(2): 484-493.
- Black, SH. 1968. Cytology of milky disease bacteria. I. Morphogenesis of *Bacillus popilliae* in vivo. *Journal of Invertebrate Pathology*. 12: 148-157.
- Curran, H.R; Evans, F.R. 1944. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 49, 335-346.
- Dingman, DW. 1994. Physical properties of three plasmids and the presence of interrelated plasmids in *Bacillus popilliae* and *Bacillus lentimorbus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 63(3):235-243
- Dingman, DW; Stahly, DP. 1983. Medium promoting of sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology* 46(4):860-869.
- Dutky, SR. 1963. The milky diseases. In Steinhaus, EA, ed. *Insect pathology*. Londres, Academic Press. p. 75-115.
- Dutky, SR. 1940. Two new spore-forming bacteria causing milky disease of Japanese beetle larvae. *Journal of Agricultural Research* 61(1): 57-68.
- Dutky, SR. 1947. Preliminary observations on the growth requirements of *Bacillus popilliae* Dutky and *Bacillus lentimorbus* Dutky. *Journal of Bacteriology* 54: 267.

- Evans, F.R; Curran, H.R. 1943. The accelerating effect of sublethal heat on spore germination in mesophilic aerobic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 46, 513-523.
- Fernández, G. 1999. Producción y evaluación de *Bacillus popilliae* contra *Phyllophaga eleanans* (Col: Scarabaeidae) en laboratorio. Tesis Lic. Ing. Agr. Turrialba, CR: Universidad de Costa Rica. 68 p.
- Franken, E; Krieger, L; Schnetter, W. 1996. *Bacillus popilliae*: a difficult pathogen. *Bulletin-OILB-SROP* 19(2): 40-45.
- Franken, E; Zhang, J; Schnetter, W. 1996. The crystal protein of *Bacillus popilliae* binds to the brush border membrane of susceptible grubs. Program and Abstracts SIP 29th Annual meeting and IIIrd International colloquium on *Bacillus thuringiensis*. Universidad de Córdoba, Córdoba, España. p. 27
- Guarin, J. H. 1997. Estudio de la patogenicidad de *Bacillus popilliae* Dutky sobre *Phyllophaga obsoleta* Blanchard y de medios nutritivos para su producción. Tesis Mag. Sc. Medellín, Universidad Nacional de Colombia. 83 p.
- Harrison, H; Patel, R; Yousten, AA. 2000. *Paenibacillus* associated with milky disease in Central and South American scarabs. *Journal of Invertebrate Pathology*. 76: 169-175.
- Haynes, WC; Rhodes, LJ. 1969. Course of Sporulation of *Bacillus popilliae* in liquid medium containing activated carbon. *Journal of Invertebrate Pathology*. 13: 161-166.
- Hebbar, KP; Lumsden, RD. 1999. Formulation and fermentation of biocontrol agents of cacao fungal pathogens: example of *Trichoderma* species. In Workshop on Research Methodology in Biocontrol of Plant Diseases: with special reference to fungal diseases of cocoa. (1999, Turrialba, CR), Eds U. Krauss; P. Hebbar. Workshop Manual. Turrialba, C.R., CATIE. p 63-68.
- Hidalgo, E; Shannon, PJ; Flores, L. 1998. Selección de cepas de *Bacillus popilliae* para el control de especies de *Phyllophaga* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE). In Morón, MA; Aragón, A. eds. Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edáficos Americanos. Puebla, México. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. Puebla, México. p 165-172.

- Hidalgo, E; Smith, SM; Shannon, PJ; Arroyo, C. 2000. Metodología para la cría masiva de *Phyllophaga* spp (COL: SCARABAEIDAE). Manejo Integrado de Plagas 56: 70-74.
- Jackson, T. 1999. Bacterias para el control de insectos. In Hidalgo, E. ed. Control de plagas agrícolas y forestales con agentes microbiológicos. Manual Teórico - Práctico. Turrialba, Costa Rica, CATIE. s p.
- Jackson, TA. 1996. Utilización de bacterias para el control de insectos plaga de la agricultura. In Leucona, RE. ed. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina. p. 255-260.
- Kaya, HK; Klein, MG; Burlando, TM; Harrison, RE; Lacey, LA. 1992. Prevalence of two *Bacillus popilliae* Ducky morphotypes and blue disease in *Cyclocephala hirta* LeConte (Coleoptera: Scarabaeidae) populations in California. Pan-Pacific Entomologist 68:38-45
- King, ABS. 1984. Biology and identification of white grubs (*Phyllophaga*) of economic importance in Central America. Tropical Pest Management 30(1): 36-50
- Klein, M y Kaya, H. 1995. *Bacillus* and *Serratia* species for scarab control. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Brasil 90(1): 87-95
- Klein, M.G; Jackson, T.A. 1992. Bacterial diseases of scarabs. In Use of pathogens in scarab pest management. Eds. T.A. Jackson, T.R. Glare. Intercept Ltd., Andover, UK, Intercept Andover. pp. 43-61.
- Klein, MG. 1992. Use of *Bacillus popilliae* in Japanese Beetle Control. In Use of Pathogens in Scarabac Pest Management. Eds. T.A. Jackson; T.R. Glare. Intercept Ltd., Andover, pp 179-189.
- Krieger, L; Franken, E. & Schnetter, W. 1996. *Bacillus popilliae* var. *melolontha* H1, a pathogen for the May beetles, *Melolontha* spp. In International Lincoln Workshop on microbial control of soil dwelling pest. Proceedings (3, 1996, New Zealand). New Zealand, AgResearch Lincoln p. 79-87.
- Krieger, L y Schnetter, W. 1999. *Bacillus popilliae* subsp. *melolonthae* H1, a pathogen for the European Cockchafer- Investigations into infection biology. Scarab Biocontrol News. Nº 4: 5.

- Krywienczyk, J; Luthy, P. 1974. "Sérológica relationship between three varieties" of *Bacillus popilliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 23:275.
- Leucona, RE; Alves, SB. 1996. Epizootiología. *In* Leucona, RE. ed. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina. p. 61-72.
- Lüthy, P; Wyss, Ch; Ettliger, L. 1970. Behavior of Milky Disease Organisms in a Tissue Culture System. *Journal of Invertebrate Pathology*. 16, 325-330.
- Milner, RJ. 1974. A new variety of milky disease, *Bacillus popilliae* var. *rhopaea* from *Rhopaea verreauxi*. *Australian Journal of Biological Science*. 27: 235-247.
- Milner, RJ. 1977. A method for isolating milky disease, *Bacillus popilliae* var. *rhopaea*, spores from soil. *Journal of Invertebrate Pathology*. 30: 283-287.
- Milner, RJ. 1981. Identification of the *Bacillus popilliae* group of insect pathogens. *In* Burges, HD. ed. Microbial control of pest and plant diseases. 1970-1980. Londres, Academic Press. P. 45-59
- Morón, MA. 2000. Taxonomy and biology of the scarabaeidae. *Scarab Biocontrol News*. N° 5: 5.
- Morón, M.A. 1994. Diagnóstico y taxonomía de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) en Centroamérica. *In* Seminario-Taller Centroamericano sobre la Biología y Control de *Phyllophaga* spp. CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico N° 277. 132p.
- Obenchain, FD; Ellis, BJ. 1990. Safety considerations in the use of *Bacillus popilliae*, the milky disease pathogen of scarabaeidae. *In* Laird, M; Lacey, LA; Davidson, EW. eds. Safety of microbial insecticides. Boca Raton, Florida. CRC Press. P. 189-201.
- Pattersson, B; Rippere, KE; Yousten, AA; Priest, FG. 1999. Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov. and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 531-540.
- Pridham, TG; Hall, HH; Jackson, RW. 1965. Effects of antimicrobial agents on the milky disease bacteria *Bacillus popilliae* and *Bacillus lentimorbus*. *Applied Microbial*. 13: 1000-1004.

- Redmond, CT; Potter, DA. 1995 Lack of efficacy of *In vivo*- and Putatively *In vitro*- produced *Bacillus popilliae* against field populations of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in Kentucky. *Journal of Economic Entomology* 88(4): 846-854.
- Rhodes, RA; Sharpe, ES; Hall, HH; Jackson, RW. 1966. Characteristics of the vegetative growth of *Bacillus popilliae*. *Applied Microbiology*. 14:189-195.
- Rippere, KE; Tran, MT; Yousten, AA; Hilu, KH; Klein, MG. 1998. *Bacillus popilliae* and *Bacillus lentimorbus*, bacteria causing milky disease in Japanese beetles and related scarab larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48: 395-402.
- Saunders, JL; Coto, DT; King, ABS. 1998. Plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central. Serie Técnica, Manual Técnico N°29. 2ª ed. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 305 pp.
- Schwartz Junior, PH; Sharpe, E. 1970. Infectivity of spores of *Bacillus popilliae* produced on a laboratory medium. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 126-128.
- Shannon, P; Carballo, M. 1996. Biología y control de *Phyllophaga* spp: Memorias. Turrialba, C.R, CATIE- PRIAG-ALA. (Serie Técnica. Informe Técnico/ CATIE; N° 277). 132 p.
- Sharpe, ES; Detroy, RW. 1979. Fat body depletion, a debilitating result of milky disease in Japanese beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 34: 92-94.
- Shotwell, OL; Bennett, GA; Hall, HH; Stubblefield, RD; Peters, JE; Van Etten, CH; Jackson, RW. 1965. Amino acids in the haemolymph of diseased *Popilliae japonica* (Newman) larvae. *Journal of Insect Physiology* 11: 671-682.
- St. Julian, G; Bulla, LA; Sharpe, ES; Adams, GL. 1973. Bacteria, Spirochetes, and Rickettsia as insecticides. *Annals New York Academy of Sciences*. 217: 65-75.
- Stahly, DP; Klein, MG. 1992. Problems with *in vitro* production of spores of *Bacillus popilliae* for use in biological control of the Japanese beetle. *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 283-291.
- Stahly, DP; Takefman, DM; Livasy, CA; Dingman, DW. 1992. Selective medium for quantitation of *Bacillus popilliae* in soil and in commercial spore powders. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(2): 740-743.

- Steinhaus, EA 1957. Microbial diseases of insects. *Annual Review of Microbiology* 11: 165-182.
- Steinkraus, KH; Tashiro, H. 1955. Production of milky disease spores (*Bacillus popilliae* Dutky and *Bacillus lentimorbus* Dutky) on artificial media. *Science* 121: 873-874.
- Stubblefield, RD; Bennett, GA; Shotwell, OL; Hall, HH; Jackson, RW. 1966. Organic acids in the haemolymph of healthy and diseased *Popillia japonica* (Newman) larvae. *Journal of Insect Physiology* 12: 949-956.
- Sylvester, CJ; Costilow, RN. 1964. Nutritional requirements of *Bacillus popilliae*. *Journal of Bacteriology* 87(1): 114-119.
- Tanada, Y and Kaya, HK. 1993. *Insect pathology*. 2. ed. San Diego, California, Academic Press. 689 p.
- Tashiro, H; Steinkraus, KH. 1966. Virulence of species and strains of milky disease bacteria in the European chafer, *Amphimallon majalis* (Razoumowsky). *Journal of Invertebrate Pathology* 8: 382-389.
- Travers RS; Faust, RM. 1982. Effects of oxygen on glucose utilization in *Bacillus popilliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 39: 236-237.
- Weiner, BA; Kwolek, WF; Julian, GST; Hall, HH; Jackson, RW. 1966. Oxygen concentration in larval hemolymph of the Japanese Beetle, *Popillia japonica*, infected with *Bacillus popilliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 8: 308-313.
- Yousten, AA. 2000. Biodiversity of entomopathogenic sporeforming bacteria. *Scarab Biocontrol News*. N° 5: 16.
- Zhang, J; Krieger, L; Franken, E; Scherf, S; Schnetter, W. 1994. Characterization of the parasporal crystal of *Bacillus popilliae* subsp. *melolonthae* 1. In *International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*. (6, 1994, Montpellier, France). Montpellier v 2, p. 337.

8. ANEXOS

ANEXO #1.

METODOLOGÍA DE CRÍA MASIVA DE *PHYLLOPHAGA SPP.* (COL: SCARADAEIDAE)

Oviposición:

Se colectan los insectos adultos en el campo utilizando trampas de luz portátiles o manualmente. Veinticinco parejas de adultos se colocan en baldes de 25 galones con perforaciones en la tapa y conteniendo aproximadamente 16 litros de suelo humedecido (este suelo es sometido a una temperatura de 93 °C por 24 horas en un esterilizador de suelo para invernadero, y extendido por al menos 48 horas para permitir la eliminación de gases tóxicos que pueden causar la muerte de los insectos). Hojas tiernas de guácimo (*Guazuma ulmifolia*), se colocan dentro de los baldes como alimento y soporte durante la cópula. Este material se reemplaza cada cuatro a cinco días para evitar descomposición.

Extracción de huevos.

La extracción de huevos se realiza manualmente removiendo el suelo sobre bandejas con una espátula plástica. Los larvas tardan entre 10 y 15 días para eclosionar. Durante este período son mantenidos en pots pequeños, con una cantidad mínima de suelo húmedo, para detectar huevos no viables (aquellos que no llegan a hincharse en ese tiempo).

Eclosión y desarrollo del primer estadio larval.

Para la eclosión de las larvas e inicio del desarrollo se utilizan cajas plásticas con tapa, de aproximadamente 16 litros (40x 30x 13 cm) con suelo y plántulas de arroz como alimento. La siembra de arroz se realiza sobre una capa de suelo esterilizado húmedo de aproximadamente 3 cm de espesor, 6-7 días antes de ser utilizadas. Las partes aéreas de las plántulas de arroz se cortan con tijeras y se retiran de las cajas, luego grupos de 100 huevos hinchados son colocados en la superficie y cubiertos con una capa de suelo y semilla de arroz (remojada en agua durante 24 horas), estos se incuban a 23-24 °C durante 25-30 días, agregando una nueva capa de suelo y semilla de

arroz a los 10 días. Es importante cortar y retirar el tallo y hojas de las plántulas de arroz para reducir el desarrollo de ácaros.

Cría del segundo y tercer estadio larval.

Después de 25-30 días, alrededor del 50% de las larvas ha pasado a segundo estadio y es necesario separarlas para evitar canibalismo. A partir de este momento las larvas se crían individualmente en vasos plásticos de 200ml con 100ml de suelo esterilizado, suministrando semanalmente 2 plántulas de maíz de 6 días de edad. Las larvas que aún se encuentren en primer estadio al momento de la revisión se colocan nuevamente en la caja, suministrando nuevas plántulas de arroz para que continúen su desarrollo (Hidalgo *et al.*, 2000)

ANEXO #2. MEDIOS DE CULTIVO

1. Medio Nutritivo Líquido (MJ)

Ingredientes:

- _ 5.0 g de Tryptone
- _ 15.0 g de Extracto de levadura
- _ 3.0 g de K_2HPO_4 (fosfato de potasio)
- _ 2.0 g de Glucosa (esterilizada por filtración) dextrosa.
- _ 1000 ml de agua destilada

Preparación:

Disolver los ingredientes en el agua destilada a un pH de 7,3-7,5. Si desea un medio sólido, agregar 20 gms de agar y una barra de agitación magnética. Calentar hasta hervir, esterilice por 15 minutos a 121 °C y 15 psi. Agregar la glucosa después de que la mezcla se enfríe.

2. Medio MYPGP

Ingredientes:

- _ 10,0 g de caldo Mueller-Hinton
- _ 10,0 g de extracto de levadura
- _ 3,0 g de K_2HPO_4 anidro-ortofosfato hidrógeno dipotásico (fosfato de Potasio)
- _ 1,0 g de $C_3H_3O_3Na$ Piruvato de sodio
- _ 0,5 g de Glucosa (esterilizada por filtración)
- _ 1000 ml de agua destilada

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada. Ajuste el pH a 7,1. Si desea un medio sólido agregar 20 g de agar y una barra de agitación magnética. Calentar hasta hervir, luego esterilizar por 15 minutos a 121 °C y 15 psi. Agregar la glucosa después de que la mezcla se enfríe.

3. Medio pobre propuesto por Steinkraus y Tashiro (1955), para la esporulación de *P. letimorbus*.

Ingredientes.

1,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

0,2 g de KCL

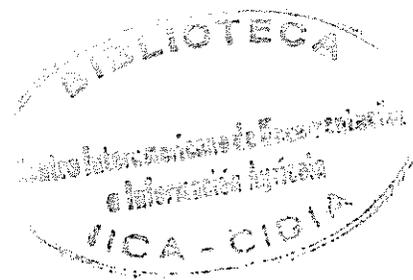
0,2 g de MgSO_4

0,2 g de Yeast extract

1000ml de Agua destilada

Preparación:

Disolver todos los ingredientes en 1000 ml de agua destilada y autoclavar el medio a 121°C y 15 psi por 15 minutos, si se desea un medio sólido agregar 15 g de agar



ANEXO #3. Análisis químico de maro y micro-nutrientes.



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
ESCUELA DE QUIMICA
LABORATORIO DE UNIDAD DE SERVICIO A LA INDUSTRIA
Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio"
☎ 207-4470, 207-4471 Facs. (506)253-5020

03 de setiembre de 2002

Informe de Análisis N-329-02

Nombre del solicitante: CATIE

Teléfono: 556-1632

Atención: Geovanny Fernández.

Fecha de recepción: 20-08-02

Fecha de análisis: 03 -09-02

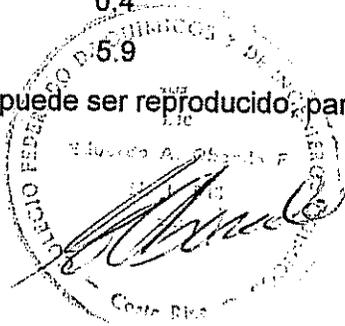
Descripción de las muestras: Dos muestras de hemolinfa larval del escarabajo de mayo (*Phyllophaga elenans*)

Muestreado por: el cliente

Método de análisis utilizado: Absorción atómica y espectrofotometría ultravioleta- visible.

Resultados:	Hsana	Hinf.
Mg (ppm)	770.5	1127.7
S (ppm)	0.8	0.3
P (%m/m)	0.03	0.13
Zn (ppm)	18.2	359.7
Ca (ppm)	152.0	521.8
K (%m/m)	0.188	0.189
Fe(ppm)	191.9	140.2
Co (ppm)	4.2	1.9
N (%m/m)	0.4	0.8
Mn(ppm)	5.9	1.6

Este informe no puede ser reproducido, parcial o totalmente, sin la aprobación escrita de este laboratorio



Lic. Eduardo Obando F
Químico N.I. 543
Director del Laboratorio
Unidad de Servicio a la Industria

ANEXO #4. Análisis químico de trealosa.

22 Octubre del 2002

Geovanny Fernández Redondo
Estudiante de Maestría, CATIE

Estimado Geovanny:

Por medio de la presente deseo reportar los resultados del análisis del contenido del disacárido **trealosa** presente en muestras de hemolinfa de larvas de escarabajos. Las muestras son: infectadas con la bacteria *bacillus popilliae* y muestras sanas. Las mismas fueron suministradas por el interesado.

Los resultados promedio obtenidos son los siguientes:

Muestras sanas: 1.46 mg/mL de trealosa

Muestra infectada: 0.91 mg/mL de trealosa

El análisis se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y las condiciones fueron las siguientes:

Cromatógrafo: Perkin-Elmer, series 4 con bomba cuaternaria

Detector: Índice de refracción (IR), modelo LC-25 de Perkin-elmer.

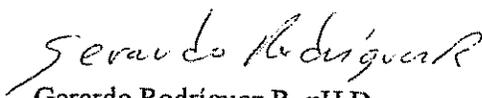
Columna: Supelcogel C-610H de 30 cm x 7.8 mm

Fase móvil: 0.1% H₃PO₄, a 0.5 mL/min

Temp : 30 °C, (ver catálogo **Supelco** 2001, pág. 144-147.

Tiempo de análisis: 15 minutos, tiempo de retención: 11.5 minutos.

Sin más por el momento,



Gerardo Rodríguez R, p.H.D.
Profesor, UNA.



ANEXO #5.

ANÁLISIS DE VARIANZA

1. ANDEVA Ensayo 1. Germinación de esporas de *P. lentimorbus* en medios artificiales.

Variable dependiente: colonias

F	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr>F
Modelo	26	923090.8	35503.5	45.49	<0.0001**
Error	54	42140.7	780.4		
Total	80	965231.5			

R²	C.V.	Raíz de CME	Media
0.96	62.27	27.93533	44.86420

Fuente Variación	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr>F
Medio	2	326073.0	163036.5	208.92	<0.0001**
pH	2	69311.5	34655.8	44.41	<0.0001**
Temp.	2	90182.2	45091.1	57.78	<0.0001**
Medio * pH	4	138623.0	34655.8	44.41	<0.0001**
Medio * Temp.	4	180364.5	45091.1	57.78	<0.0001**
pH * Temp.	4	39512.2	9878.0	12.66	<0.0001**
Medio*pH*Temp.	8	79024.4	9878.0	12.66	<0.0001**
Total	26	923090.8			

2. Variable dependiente: contaminación

Fuente Variación	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr>F
Modelo	26	17.65432099	0.67901235	55.00	<0.0001**
Error	54	0.66666667	0.01234568		
Total	80	18.32098766			

R^2	C.V.	Raíz de CME	Media
0.96	32.14	0.111111	0.345679

Fuente Variación	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr>F
Medio	2	0.02469136	0.01234568	1.00	0.3746 ^{ns}
ph	2	0.02469136	0.01234568	1.00	0.3746 ^{ns}
Temp	2	17.35802469	8.67901235	703.00	<0.0001**
Medio * pH	4	0.04938272	0.01234568	1.00	0.4157 ^{ns}
Medio * Temp.	4	0.04938272	0.01234568	1.00	0.4157 ^{ns}
Ph * Temp	4	0.04938272	0.01234568	1.00	0.4157 ^{ns}
Medio*pH*Temp.	8	0.09876543	0.01234568	1.00	0.4469 ^{ns}
Total	26	17,65432100			

3. ANDEVA Ensayo 2. Selección de medio de cultivo

Variable dependiente: células vegetativas/ml de *P. lentimorbus*.

Fuente Variación	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr>F
Modelo	10	3.1×10^{17}	3.1×10^{16}	10.30	<0.0001**
Error	16	4.9×10^{16}	3.1×10^{15}		
Total	26	3.6×10^{17}			

R^2	C.V	Raíz de CME	Media
0.86	38.2	55326117	1.4×10^8

Fuente Variación	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr>F
bloque	2	4.5×10^{14}	2.3×10^{14}	0.07	0.9282 ^{ns}
Medio	2	2.9×10^{17}	1.4×10^{17}	47.41	<0.0001**
ph	2	1.9×10^{15}	9.4×10^{14}	0.31	0.7388 ^{ns}
Medio * pH	4	2.3×10^{16}	5.6×10^{15}	1.85	0.1691 ^{ns}
Total	10	3.2×10^{17}			

4. ANDEVA Ensayo 3. Esporulación de células vegetativas de *P. lentimorbus* en medios líquidos.

Variable dependiente: esporas/ml de *P. lentimorbus*

Fuente Variación	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr>F
Modelo	8	7.92x10 ¹⁷	9.90x10 ¹⁶	967.88	<0.0001**
Error	18	1.84x10 ¹⁵	1.02x10 ¹⁴		
Total	26	7.94x10 ¹⁷			

R²	C.V	Raíz de CME	Media
0.997681	8.52	10114621	118740741

Fuente Variación	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F	Pr>F
Medio	2	7.45x10 ¹⁷	3.72x10 ¹⁷	3639.71	<0.0001**
Temperatura	2	1.58x10 ¹⁶	7.89x10 ¹⁵	77.13	<0.0001**
Medio*Temp	4	3.16x10 ¹⁶	7.91x10 ¹⁵	77.34	<0.0001**
Total	8	7.94x10 ¹⁷			