

Germinación y reproducción in vitro de la bacteria *Paenibacillus (=Bacillus) lentimorbus*

Geovanny Fernández Redondo¹

Eduardo Hidalgo Jaminson²

Francisco Badilla Fernández³

RESUMEN. Con el objetivo de desarrollar una metodología de producción in vitro de la bacteria *Paenibacillus (=Bacillus) lentimorbus*, causante de la enfermedad lechosa en las larvas de los escarabajos, se analizó la germinación de las esporas en medios de cultivo artificiales. Suspensiones acuosas de esporas de *P. lentimorbus* fueron tratadas con cuatro, cinco y seis choques de 80 °C por 20 minutos, y luego se cultivaron sobre tres medios de cultivo sólidos (J, MYPGP y un nuevo medio, Y) preparados a tres niveles de pH. Los choques de temperatura mostraron ser un factor importante para inducir la germinación de las esporas y eliminar los contaminantes de los medios de cultivo. La mayor germinación se observó en el medio MYPGP preparado a un pH de 8,0 e inoculado con esporas tratadas con seis choques de temperatura. Esta combinación de tratamientos mostró los más bajos niveles de contaminación. Se estudió además la reproducción de las células vegetativas de la bacteria usando los medios J, MYPGP y Y preparados en forma líquida y a tres niveles de pH. La máxima concentración de células vegetativas ($2,6 \times 10^8$ vegetativos/mL) fue obtenida en el medio MYPGP a un pH de 8,0. Al realizar pruebas de patogenicidad con las células vegetativas germinadas sobre los medios sólidos y con las reproducidas en los medios líquidos, se observó una baja mortalidad de larvas de *Phyllophaga elenans* en un avanzado tercer estadio de desarrollo.

Palabras clave: enfermedad lechosa, germinación in vitro, *Paenibacillus lentimorbus*, *Phyllophaga elenans*.

ABSTRACT. *In vitro* germination and reproduction of *Paenibacillus (=Bacillus) lentimorbus*. Spore germination in artificial media was analyzed in order to develop an *in vitro* production methodology for *Paenibacillus (=Bacillus) lentimorbus*, a bacteria causing the milky disease on scarab larvae. Temperature shocks (up to six exposures of twenty minutes at 80 °C) showed to be an important factor for inducing spore germination and eliminating contamination bacteria in artificial media. Samples of aqueous suspensions of *P. lentimorbus* were treated with four, five, and six temperature shocks of 80 °C, of twenty minutes each, then cultured on three different solid media (J, MYPGP, and a new Y medium) prepared at three pH levels. The highest germination was observed with MYPGP prepared at pH 8.0 and cultivated with spores treated with six temperatures shocks. This treatment combination also showed the lowest contamination rate. The reproduction of vegetative cells was further studied using J, MYPGP, and Y prepared as liquid media at three pH levels. The maximum vegetative cell concentration (2.6×10^8 vegetative/mL media) was again obtained on MYPGP media prepared at pH 8.0. Pathogenicity tests with vegetative cells from spores germinated on solid artificial media and reproduced on liquid media produced a low mortality rate on late third instar larvae of *Phyllophaga elenans*.

Key words: *In vitro* germination, milky disease, *Paenibacillus lentimorbus*, *Phyllophaga elenans*.

Introducción

Las bacterias patógenicas de insectos más importantes se encuentran dentro de las familias Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae, Micrococcaceae y Bacillaceae. Entre ellas, solamente la última contiene 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, que facilitan su formulación como biocontroladores (St. Julian *et al.* 1973).

¹ Parte de la tesis de Postgrado del primer autor. CATIE. Turrialba, Costa Rica. geovanni@catie.ac.cr

² Unidad de Fitoprotección, CATIE. Turrialba, Costa Rica. ehidalgo@catie.ac.cr

³ Bioasesoría Internacional (BISA). Belén, Heredia, Costa Rica. franbad@racsa.co.cr

La primera descripción de un patógeno bacterial que ataca las larvas de un escarabajo fue hecha por Dutky (1940), quien describió la enfermedad lechosa del tipo A causada por *Bacillus popilliae* y la enfermedad lechosa del tipo B causada por *Bacillus lentimorbus*, las cuales atacan el escarabajo japonés (*Popillia japonica* Newman). El nombre de “enfermedad lechosa” se origina en 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.

Desde su descripción en 1940 se han realizado numerosos trabajos de investigación, entre los cuales es importante resaltar el estudio de Pattersson *et al.* (1999), donde se reclasifica la bacteria dentro del género *Paenibacillus*. El estudio de la secuencia del ARNr de *B. popilliae* y *B. lentimorbus* reveló su similitud con el género *Paenibacillus*, por lo que actualmente ambas se han reclasificado como *Paenibacillus popilliae* y *Paenibacillus lentimorbus*. El aislamiento 0292 utilizado en el presente trabajo se clasificó anteriormente dentro de la especie *popilliae* del género *Paenibacillus*, por la presencia de un cuerpo parasporal, pero estudios realizados por Harrison *et al.* (2000) demostraron que dicho aislado era miembro de la especie *P. lentimorbus*.

Según Klein y Kaya (1995), *P. lentimorbus* es un patógeno obligado con alta especificidad, por lo que no es posible encontrar infección cruzada entre las familias, subfamilias o géneros de las larvas de los escarabajos. Sin embargo, en un estudio de selección de cepas de *P. popilliae* y *P. lentimorbus* para el control de *Phyllophaga* sp. (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. Según los resultados de estos autores, el aislamiento 0292 fue aislado de una larva de *Phyllophaga vicina* criada en el laboratorio y causó la mayor infección en larvas del tercer estadio de *Phyllophaga elenans*. Otro ejemplo es el aislamiento 510, originario de una larva de *Anomala flavipennis*, que causó los mayores porcentajes de infección en larvas de *Phyllophaga menetriesi* cuando se inoculó por inyección.

Dado que *Paenibacillus* spp. es un patógeno obligado, crece muy mal en medios de cultivo artificial; por lo tanto, la reproducción *in vivo* es actualmente la

única forma confiable de producción comercial (Benintende y Marquez 1996). Por 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 *et al.* desarrollaron un medio estándar para obtener crecimiento de *P. popilliae*, conocido como “medio J” (Klein y Jackson 1992).

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

Autores como Krieger *et al.* (1996) exponen que la bacteria puede germinar en una proporción de 9% en un medio MYPGP⁴ modificado, y el crecimiento vegetativo puede ser mantenido a una temperatura óptima de 30 °C, pero no ocurre la esporulación.

Materiales y métodos

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Control Microbial de la Unidad de Fitoprotección del CATIE, ubicado en Turrialba, Costa Rica. Se utilizó el aislamiento 0292 de la bacteria *P. lentimorbus*, seleccionado y almacenado en esta misma unidad. Para la reproducción del inóculo inicial y pruebas posteriores de la bacteria se utilizaron larvas de *P. elenans*.

Experimento 1. Germinación de esporas de *P. lentimorbus* en medios artificiales

Se evaluó la germinación de las esporas de *P. lentimorbus* sobre medios sólidos de cultivo. Para la preparación de los tratamientos se utilizaron tres suspensiones de esporas de la bacteria, preparadas a una concentración de $5,5 \times 10^5$ esporas por mililitro de agua destilada estéril (esp/mL ADE), cuantificadas con la ayuda de un hemocitómetro. Se prepararon

⁴ Siglas en inglés de maltosa, extracto de levadura, potasio, glucosa y piruvato.

además los medios J, MYPGP y el medio Y, preparado según las determinaciones reportadas en el análisis químico de micro y macronutrientes realizado de la hemolinfa de larvas de *P. elenans* sanas e infectadas con *P. lentimorbus*, más el contenido de trealosa reportado en el análisis cuantitativo realizado en la hemolinfa de larvas sanas de *P. elenans*. Todos los medios se prepararon en forma sólida, según su composición, y se ajustó su pH a tres niveles: un nivel bajo (pH= 7,0), un nivel medio (pH= 7,5) y uno alto (pH= 8,0), utilizando NaOH 0,1 molar para aumentar el pH y HCl 0,1 molar para disminuirlo; 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 ADE, 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, dejando un intermedio de 12 horas entre cada choque de temperatura, período durante el cual las suspensiones se colocaron en una incubadora a 30 °C de temperatura y un fotoperíodo de 12 horas luz.

Al cuarto día, aproximadamente 12 horas después de realizado el último tratamiento de temperatura, se extrajeron las suspensiones de la incubadora y se inocularon los medios de cultivo sólidos con 10 µL de cada suspensión de esporas, para un conteo 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.

La identificación de las células vegetativas de la bacteria *P. lentimorbus* en los medios de cultivo se basó en características microscópicas —forma y diámetro del bacilo— y físicas —color y olor de las colonias obtenidas en los medios de cultivo—. Adicionalmente, se prepararon suspensiones de bacilos de la bacteria de las colonias de células vegetativas obtenidas en los medios de cultivo para ser inyectadas en larvas sanas de *P. elenans* de tercer instar de desarrollo, con el fin de confirmar la identidad y patogenicidad de la bacteria reproducida. Además, se prepararon suspensiones a partir de estas colonias para utilizarlas en el siguiente experimento de reproducción de células vegetativas en medios líquidos.

Se utilizó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 3 x 3 x 3, donde los factores fueron tres medios de cultivo, tres niveles de pH y tres tratamientos de temperatura, con tres repeticiones, para un total de 81 unidades experimentales. Se utilizaron los

medios MYPGP, J y Y, preparados a tres niveles de pH (7,0; 7,5 y 8,0), y los tratamientos térmicos fueron esporas con cuatro, cinco y seis choques de 80 °C por 20 minutos.

La variable evaluada fue el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de células vegetativas de *P. lentimorbus* en cada plato y la presencia o ausencia de contaminantes, cuya identificación se basó en todos aquellos crecimientos que no cumplían con las características de morfología de *P. lentimorbus* y apariencia de las colonias. Esta se reportó como una variable dicotómica, donde el número “0” corresponde a la ausencia de contaminantes y el número “1” indica presencia de contaminantes.

Experimento 2. Reproducción de células vegetativas en medios artificiales

Se analizaron tres medios líquidos de cultivo y se evaluó el efecto del pH como factor determinante en la reproducción de los bacilos. Se evaluaron los medios J líquido, MYPGP líquido y Y líquido. Todos los medios se prepararon en forma líquida, eliminando el agar de la receta, y se llevaron a tres diferentes niveles de pH utilizando NaOH 0,1 molar para aumentar el pH y HCl 0,1 molar para disminuirlo. Luego de esterilizar los medios a 121 °C por 25 minutos, se colocaron volúmenes de 100 mL de cada medio en erlenmeyers de 200 mL de capacidad.

Cada erlenmeyer fue inoculado con 1 mL de una suspensión de células vegetativas, preparada a una concentración de $5,5 \times 10^8$ células vegetativas por mililitro de agua destilada estéril (vegetativos/mL ADE), cuantificadas con la ayuda de un hemocitómetro, a partir de las esporas germinadas en el ensayo inicial, para obtener una concentración final de bacilos en cada medio de aproximadamente $5,5 \times 10^6$ vegetativos/mL ADE.

Al final del ensayo se preparó una suspensión de células vegetativas, reproducidas en el mejor medio líquido a una concentración de $1,0 \times 10^8$ vegetativos/mL ADE, y se inyectaron en 20 larvas sanas de tercer instar de *P. elenans* como método de verificación final de la patogenicidad de la bacteria reproducida.

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial, donde el factor A correspondió al medio de cultivo y el factor B correspondió al pH del medio. El diseño estuvo conformado por nueve tratamientos con tres repeticiones, para un total de 27 unidades experimentales. Los medios fueron incuba-

dos a 30 °C y un fotoperíodo de 12 horas luz, por cinco días.

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

Resultados y discusión

Experimento 1. Germinación de esporas de *P. lentimorbus* en medios artificiales

El análisis del contenido de trealosa presente en la hemolinfa de larvas de *P. elenans* sanas e infectadas mostró que las larvas sanas tienen un contenido de 1,46 mg/mL de trealosa en su hemolinfa, observándose una reducción del 37,7% en el contenido de este disacárido en la hemolinfa de larvas infectadas con la bacteria *P. lentimorbus*, alcanzando una concentración de 0,91 mg/mL de trealosa en la hemolinfa de las larvas infectadas. Estos resultados demuestran que la bacteria *P. lentimorbus* está utilizando la trealosa como fuente de energía y carbono para su reproducción.

El análisis químico de macro y microelementos de la hemolinfa de larvas sanas e infectadas con la enfermedad lechosa (Cuadro 1), realizado en los Laboratorios de Unidad de Servicio a la Industria de la Universidad de Costa Rica, reveló la presencia de elementos como 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. Con base en esta información, se concluye 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 1. Análisis químico de hemolinfa de larvas de tercer estadio de *Phyllophaga elenans* sanas e infectadas con la enfermedad lechosa (*Paenibacillus lentimorbus*, cepa 0292).

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

El medio Y estuvo compuesto por macro y microelementos en concentraciones muy similares a los contenidos reportados en el análisis químico de la hemolinfa de larvas sanas (Cuadro 2). Todos los elementos, excepto el cobalto, se agregaron en forma líquida provenientes de formulaciones foliares orgánicas o bionutrientes (Cytzyme[®]), 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 reporta-

Cuadro 2. Composición del medio Y, formulado con base en el contenido de elementos en la hemolinfa de larvas sanas de tercer estadio de *Phyllophaga elenans*.

Elemento	Concentración en hemolinfa sana	Concentración en el medio	Fuente ⁽²⁾
Mg ⁺² (ppm)	770,5	770,5	Mg TM 7%
S ⁻² (ppm)	0,8	0,508	CROP TM 4,5%
P ⁺⁴ (%m/m)	0,03	300,5	NPK TM 25,5 %P ₂ O ₂
Zn ⁺² (ppm)	18,2	18,2	Zinc TM 10,9%
Ca ⁺² (ppm)	152,0	152,0	Ca TM 11%
K ⁺ (%m/m)	0,188	571,6	NPK TM 25,5 %K ₂ O
Fe ⁺³ (ppm)	191,9	191,9	CROP TM 1,7%
Co ⁺² (ppm)	4,2	4,2	Co(C ₂ H ₂ O ₂) ₂ *4H ₂ O
N (%m/m)	0,4	724,5	Todos ⁽¹⁾
Mn ⁺² (ppm)	5,9	5,9	Mn TM 8,8%

⁽²⁾ Corresponde a fertilizantes foliares de origen orgánico.

⁽¹⁾ 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 nitrógeno en la triptona.

da en la hemolinfa de larvas sanas de *P. elenans* (1,46 mg/mL), 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.

En observaciones previas a este experimento se observó que la realización de uno, dos o tres tratamientos de calor favorece la germinación de las esporas de *P. lentimorbus*, pero no garantiza su pureza, por lo que se hace necesario determinar el número mínimo de tratamientos para la eliminación de contaminantes en inóculos preparados a partir de esporas de *P. lentimorbus* y su efecto sobre la germinación de éstas.

Aproximadamente 24 horas después del último tratamiento de temperatura, se presentaron colonias de contaminantes en los platos inoculados con esporas tratadas en cuatro ocasiones. La germinación de las esporas de *P. lentimorbus* comenzó seis días después del último tratamiento de temperatura en los platos inoculados con esporas tratadas en cinco ocasiones; un día después, se presentaron las primeras colonias en los platos inoculados con las esporas tratadas en seis 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 de temperatura posteriores a las 48 horas matarían las primeras esporas en proceso de germinación.

Aunque se obtuvo un coeficiente de variación alto (62,27%), el R^2 nos indica que hay un 96% de probabilidad de obtener estos mismos resultados en ensayos similares. El análisis de los resultados arrojó diferencias altamente significativas en el modelo ($F_{26,54} = 45,49$; $P = 0,0001$). Las diferencias aplican a todos los factores y todas sus interacciones. La interacción del medio MYPGP, preparado a un pH de 8,0 e inoculado con esporas tratadas en seis ocasiones a 80 °C, presentó los mayores porcentajes de germinación, con un promedio de 438 colonias ($F_{8,54} = 12,66$; $P = 0,0001$), lo que equivale a aproximadamente un 8% de germinación (Fig. 1), porcentaje muy similar al 9% reportado por Krieger *et al.* (1996) para el mismo medio (MYPGP).

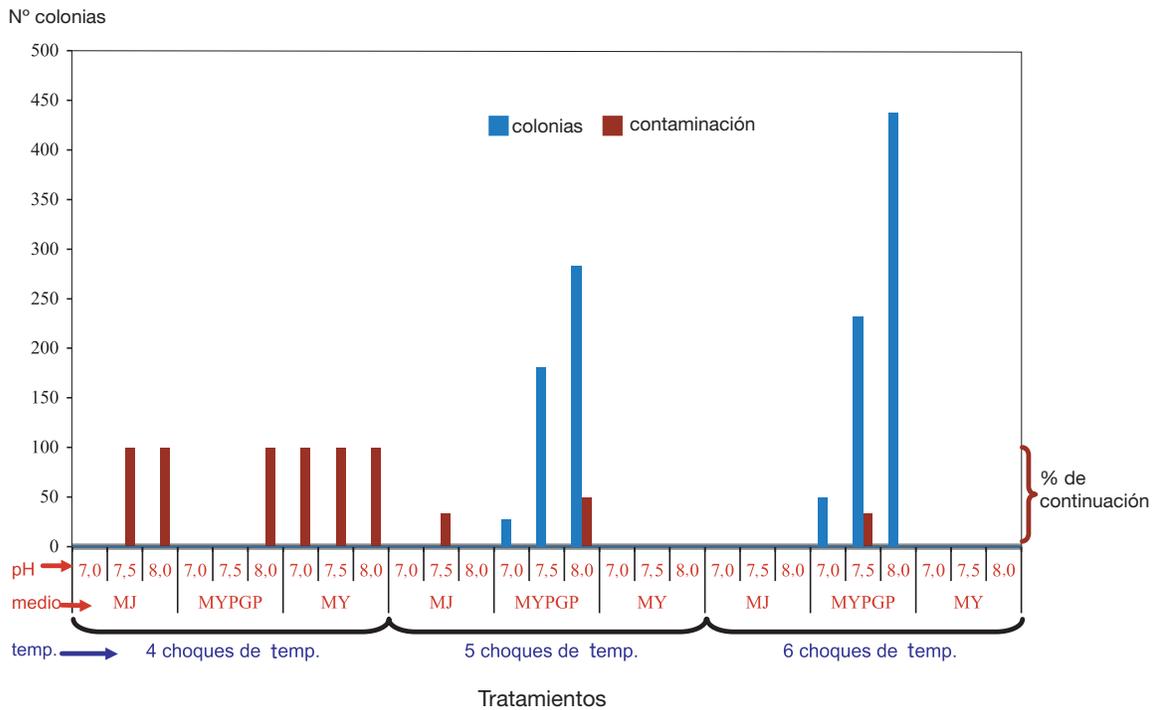


Figura 1. Número de colonias de *Paenibacillus lentimorbus* y porcentaje de contaminación en tres medios de cultivo (J, MYPGP, Y) preparados con tres niveles de pH (7,0; 7,5 y 8,0), e inoculados con esporas tratadas con cuatro, cinco y seis choques térmicos de 80 °C.

El segundo mejor tratamiento fue el mismo medio (MYPGP), preparado al mismo pH, inoculado con esporas tratadas en cinco ocasiones, donde se alcanzó aproximadamente un 5% de germinación. Es importante recalcar que en todos los platos del medio MYPGP preparados a diferentes niveles de pH se obtuvo germinación cuando se inocularon con esporas tratadas en cinco y seis ocasiones a 80 °C. Estos resultados concuerdan con los reportados por Curran y Evans (1944), donde la proporción de esporas que responden a tratamientos de pregerminación con calor depende del número de tratamientos aplicados. El mayor porcentaje de germinación se presenta en las esporas tratadas en seis ocasiones (Fig. 1).

El análisis de varianza para la presencia de contaminantes arrojó diferencias altamente significativas entre tratamientos ($F_{26,54}=55$; $P=0,0001$), con un coeficiente de variación del 32% y $R^2=0,963612$. Al analizar el efecto de los factores y sus interacciones, se encontró que el único factor que presenta diferencias altamente significativas es el número de choques térmicos ($F_{2,54}=703$; $P=0,0001$).

Hubo un crecimiento de contaminantes en todos los medios inoculados con esporas tratadas en cuatro ocasiones a 80 °C, por lo que es necesario tratar las esporas más de cuatro veces para eliminar la mayor cantidad de contaminantes (Fig. 1). La rápida germinación y desarrollo de contaminantes en este tratamiento impidió observar la germinación de las esporas de *P. lentimorbus*, pues estas se caracterizan por su lenta germinación.

Cabe resaltar que al aumentar el pH del medio aumentó el número de esporas germinadas (Fig. 1), lográndose el mayor porcentaje de germinación (8%) en el medio MYPGP, preparado a un pH de 8,0; en el medio MYPGP preparado a un pH de 7,5 se obtuvo una germinación del 4%, y en el medio MYPGP preparado a un pH de 7,0 el porcentaje de germinación fue inferior al 1%, cuando estos medios fueron inoculados con esporas tratadas con seis choques de 80 °C. El porcentaje de germinación aumenta con el número de tratamientos de temperatura y el pH del medio MYPGP. Asimismo, el porcentaje de contaminación disminuye conforme aumenta el número de tratamientos de temperatura.

Experimento 2. Reproducción de células vegetativas en medios artificiales

El experimento de reproducción de las células vegetativas en los medios Y, J y MYPGP, preparados en for-

ma líquida y con tres niveles de pH, presentó diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($F_{10,16}=10,30$; $P=0,0001$). Al analizar más detalladamente este diseño, se observó que 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 experimento. El R^2 indica que hay una probabilidad del 86% de obtener estos mismos resultados en ensayos similares; asimismo, el coeficiente de variación no es muy elevado (38%), a pesar de tratarse de concentraciones elevadas con números exponenciales, donde fácilmente se pueden cometer errores de conteo entre las repeticiones.

Se observaron diferencias altamente significativas entre los medios de cultivo evaluados ($F_{2,16}=47,41$; $P=0,0001$). El medio más eficiente para la reproducción de los bacilos fue el MYPGP, alcanzando una concentración de $2,6 \times 10^8$ células/mL de medio a los cinco días de inoculado (Fig. 2). En segundo lugar se encontró el medio J, con una concentración de $1,6 \times 10^8$ células/mL y, finalmente, el medio Y, el cual obtuvo una concentración de $1,1 \times 10^7$ células/mL.

No hubo diferencias significativas en la reproducción de células vegetativas entre los tres niveles de pH ($F_{2,16}=0,31$; $P=0,7388$). Tampoco hubo diferencia en la interacción del medio con el pH ($F_{4,16}=1,85$; $P=0,1691$), por lo que se puede deducir que el pH no es un factor determinante en la reproducción, resultados que concuerdan y ratifican lo expuesto por Weiner *et al.* (1966), quienes no observaron cambios importantes en los niveles de pH en la hemolinfa de larvas sanas e infectadas con la enfermedad lechosa.

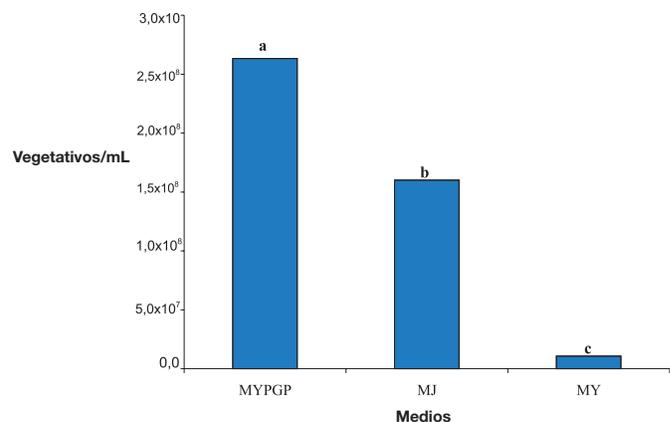


Figura 2. Concentración de células vegetativas de *Paenibacillus lentimorbus* en tres medios de cultivo (MYPGP, MJ, MY) (columnas con la misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la prueba de Duncan).

De acuerdo con 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. Sin embargo, como concluye Klein (1992), la esporulación de la bacteria no ocurre en este medio, ni se logró inducir este proceso en 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/mL, comparada con una concentración de $2,0 \times 10^9$ esporas/mL de hemolinfa (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*.

Al realizar pruebas de patogenicidad con las células vegetativas de *P. lentimorbus* germinadas en el medio sólido MYPGP (pH de 8,00) y las células vegetativas reproducidas masivamente en el mismo medio preparado en forma líquida, se comprobó la pérdida de virulencia, anteriormente reportada por Steinkraus y Tashiro (1955), de los bacilos reproducidos *in vitro*.

Los resultados anteriores demuestran que es posible lograr la germinación y posterior reproducción de la bacteria *P. lentimorbus* *in vitro*. Aunque no se obtuvo infección de la enfermedad lechosa en las larvas de *P. elenans* inyectadas con los bacilos germinados, ni con los bacilos reproducidos en los medios líquidos, ni fue posible inducir la esporulación de estos bacilos *in vitro*, no se debe abandonar la posibilidad de reproducir este importante organismo biológico bajo condiciones artificiales; por el contrario, se deben buscar nuevas alternativas que garanticen la cantidad y calidad del entomopatógeno reproducido.

Literatura citada

- Benintende, G; Márquez, A. 1996. Bacterias entomopatógenas. In Lecuona, RE. ed. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Buenos Aires, AR, Talleres Gráficos Mariano Mas. p. 61-72.
- Curran, HR; Evans, FR. 1944. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. Journal of Bacteriology 49: 335-346.
- Dutky, SR. 1940. Two new spore-forming bacteria causing milky disease of Japanese beetle larvae. Journal of Agricultural Research 61(1): 57-68.
- 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.
- 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, MX, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Sociedad Mexicana de Entomología. p. 165-172. *Publicación especial*.
- Klein, MG; Jackson, TA. 1992. Bacterial diseases of scarabs. In Jackson, TA; Glare, TR. eds. Use of pathogens in scarab pest management. Andover, UK, Intercept. p. 43-61.
- _____. 1992. Use of *Bacillus popilliae* in Japanese Beetle Control. In Jackson, TA; Glare, TR. eds. Use of pathogens in scarab pest management. Andover, UK, Intercept. p. 179-189.
- _____; Kaya, H. 1995. *Bacillus* and *Serratia* species for scarab control. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 90(1): 87-95.
- 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 Pests (3, 1996, New Zealand). Proceedings. New Zealand, AgResearch Lincoln. p. 79-87.
- 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, UK, Academic Press. p. 45-59.
- Patterson, 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.
- 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; 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.
- Steinkraus, KH; Tashiro, H. 1955. Production of milky disease spores (*Bacillus popilliae* Dutky and *Bacillus lentimorbus* Dutky) on artificial media. Science 121: 873-874.
- Tanada, Y; Kaya, HK. 1993. Insect pathology. 2 ed. San Diego, California, US, Academic Press 689 p.
- Weiner, BA; Kwolek, WF; Julian, GS; 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.