

Reproducción y esporulación in vitro de la bacteria *Paenibacillus (=Bacillus) lentimorbus* para el control de larvas de *Phyllophaga elenans*

Geovanny Fernández Redondo¹
Eduardo Hidalgo Jaminson²
Francisco Badilla Fernández³

RESUMEN. Se extrajeron células vegetativas de la bacteria entomopatógena *Paenibacillus lentimorbus* de larvas de *Phyllophaga elenans* infectadas con la enfermedad lechosa con el objetivo de reproducir la bacteria sobre medios artificiales, obteniéndose el máximo incremento en la curva de crecimiento 62 horas después de cultivada en el medio MYPGP a un pH de 8,0. Se estudió el efecto de tres temperaturas y la deficiencia de nutrientes sobre la esporulación de la bacteria. Se determinó que exponer las células vegetativas de la bacteria a un choque de 4 °C por 30 minutos induce la esporulación, no encontrando el mismo efecto al utilizar el estrés nutricional como inductor de la esporulación. Se obtuvo un 10% de infección en larvas de *P. elenans* de un avanzado tercer estadio de desarrollo, cuando estas se alimentaron con una raíz de maíz inoculada con esporas producidas in vitro a una dosis de $2,0 \times 10^8$ esp ml⁻¹.

Palabras clave: enfermedad lechosa, esporulación, MYPGP.

ABSTRACT. In vitro reproduction of the bacteria *Paenibacillus lentimorbus* to control *Phyllophaga elenans* larvae. Vegetative cells of the entomopathogenic bacteria *Paenibacillus lentimorbus* were extracted from infected larvae of *Phyllophaga elenans*, in order to reproduce them using artificial media. The highest increment was obtained with MYPGP media at pH 8, 62 hours after inoculation. The effect of three temperature shocks and nutritional stress on spore formation were tested. The exposure of vegetative cells to short periods of low temperature (4 °C for 30 minutes) induced sporulation, whereas nutritional stress showed no effect. A 10% infection of late third instar larvae of *P. elenans* was achieved when fed with maize roots soaked with a suspension of in vitro produced spores at 2.0×10^8 esp ml⁻¹.

Key words: milky disease, MYPGP, sporulation.

Introducción

Los escarabajos y sus larvas constituyen una de las mayores plagas en un amplio espectro de cultivos agrícolas y forestales, así como del césped en campos de entretenimiento. La gran cantidad de especies dañinas incluidas dentro del orden Coleoptera se encuentran bien distribuidas alrededor del mundo. En Centroamérica y México el género dominante es *Phyllophaga*, que pertenece a la subfamilia Melolonthinae (Saunders et al. 1998).

Las larvas del género *Phyllophaga* viven en el suelo y pasan por tres estadios de desarrollo, de los cuales solamente el tercero tiene importancia económica, ya que se alimenta de las raíces de gran variedad de hospederos (King 1984).

El ambiente en el cual se desarrollan las larvas de los escarabajos se caracteriza por la gran diversidad de microorganismos que regulan sus poblaciones, lo cual se ha considerado como una ventaja para el control de las especies dañinas. Dentro de este enfoque, los con-

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

troladores biológicos más promisorios son las bacterias *Paenibacillus popilliae* y *Paenibacillus (=Bacillus) lentimorbus*, debido a su alta especificidad, elevada resistencia a altas temperaturas y baja humedad y, sobre todo, por su viabilidad prolongada, que les permite mantenerse activas en el suelo durante 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 en el laboratorio (Hidalgo et al. 2000). Sin embargo, por tratarse de patógenos obligados, su reproducción en medios artificiales no ha tenido éxito. Actualmente su reproducción se realiza solamente in vivo, lo 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 et al. 1996).

Debido a lo anterior se ha considerado 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*.

Según Stahly et al. (1992), las esporas o células vegetativas libres de hemolinfa provenientes de larvas infectadas pueden colocarse directamente sobre un medio con agar, pero su crecimiento es bajo.

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 *Popilliae 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^{-1} 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 (Woodstream Corporation, PA, EUA) y determinaron que la mayoría de ellos contenían la bacteria *Bacillus polymyxa* pero no *Bacillus popilliae*. También examinaron cuatro productos formulados por American Type Culture (Rockville, MD, EUA); en

uno de los cultivos se identificó la bacteria *B. polymyxa* y los otros contenían *Bacillus 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 de *B. popilliae* puras.

Esta reducida confiabilidad de los métodos actuales para la producción comercial in vitro de *P. popilliae* in vitro también fue demostrada por Redmond y Potter (1995), quienes analizaron muestras de *B. popilliae* producido tanto in vitro como in vivo. 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 g^{-1} , respectivamente. En las muestras de Grub Attack, de todos los lotes analizados solo uno presentó esporas de *B. popilliae* además de las bacterias anteriormente mencionadas.

Se puede obtener una esporulación limitada cuando la bacteria se transfiere de un medio nutritivo a uno pobre y se cultiva a altas temperaturas (37 °C). Otros sistemas para inducir la 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 estrato de levadura (Tanada y Kaya 1993).

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*, seleccionada y almacenada en esta misma unidad. Para la reproducción del inóculo inicial y las pruebas posteriores de la bacteria se utilizaron larvas de *P. elenans*.

Ensayo 1. Extracción de *P. lentimorbus* de larvas de *Phyllophaga elenans* infectadas y su reproducción in vitro

Para facilitar la obtención de la bacteria *P. lentimorbus* en medios de cultivo puro, se procedió a extraer el inóculo inicial de larvas infectadas con la enfermedad lechosa para de esta manera garantizar la pureza del inóculo y su patogenicidad.

Se tomó una larva de *P. elenans* del tercer instar con síntomas de la enfermedad lechosa, y después de desinfectar su superficie con hipoclorito de sodio al 2%, se procedió a perforar la cápsula cefálica con un alfiler entomológico estéril. La primera gota de hemolinfa se desechó para evitar la presencia de contaminantes, la segunda gota se recolectó en un tubo de microcentrí-

fuga con 1 ml de medio MYPGP líquido preparado a un pH de 8,00 (10,0 g Mueller-Hinton; 10,0 g extracto de levadura; 3,0 g K_2HPO_4 ; 1,0 g $C_3H_3O_3Na$ y 0,5 g glucosa en 1,0 L de agua destilada).

La muestra se dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente y, posteriormente, se extrajo una parte 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=8,0. Luego, se incubó a 30 °C durante 48 h.

Una vez desarrolladas las colonias de la bacteria sobre el medio sólido, se colocó una de ellas en un vial con medio MYPGP líquido, pH 8,0, y se dejó reposar durante aproximadamente 50 h en una incubadora a 30 °C para que los bacilos se reprodujeran masivamente en forma pura.

Posteriormente, se colocaron 100 ml del medio MYPGP (pH 8,0) en tres frascos Erlenmeyer de 200 ml de capacidad y se inocularon con 100 μ l de la suspensión de células vegetativas de *P. lentimorbus*, preparada al inicio del ensayo en el medio MYPGP líquido, con una concentración de $8,0 \times 10^7$ células ml^{-1} para obtener una concentración final de aproximadamente $8,0 \times 10^4$ células ml^{-1} en cada frasco. Los medios se incubaron a 30 °C y un fotoperíodo de 12 h luz en forma estática.

Una vez obtenido el inóculo en forma pura, se procedió a determinar la curva de crecimiento de la bacteria en el medio MYPGP preparado a un pH de 8,0, incubando el medio de cultivo a 30 °C y con fotoperíodo de 12 h luz en forma estática.

Para determinar la curva de crecimiento de la bacteria, se contaron las células vegetativas cada 12 h con la ayuda de un hemocitómetro de 0,1 mm de profundidad, en un microscopio de contraste de fase a una intensidad de 40X. De cada frasco se tomaron tres muestras a las cuales se les realizó tres conteos. Posteriormente se obtuvo un promedio de células vegetativas por conteo y se graficó tomando como eje X el tiempo, para observar el comportamiento del crecimiento de la bacteria.

Ensayo 2. Esporulación in vitro de *P. lentimorbus*

En observaciones previas se percibió un cambio de temperatura en la superficie de las larvas infectadas por inyección con la bacteria *P. lentimorbus*. 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 las larvas sanas.

Tomando en cuenta esta observación, y considerando el efecto de la temperatura sobre la germinación de las esporas reportado por Fernández et al. (2004), 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 aproximadamente 25 °C por arriba y 25 °C por debajo de la temperatura a la cual se incubaron los bacilos (30 °C).

Se analizó 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 (ADE) a un primer tratamiento; en un segundo tratamiento se agregó el medio pobre en nutrientes propuesto por Steinkraus y Tashiro (1955) para promover la esporulación (MP); y, por último, como tercer tratamiento se probó dejar las células vegetativas en el medio MYPGP.

Se prepararon 350 ml de medio MYPGP, pH de 8,0, para la reproducción masiva de células vegetativas de *P. lentimorbus*. Al alcanzar el pico de crecimiento determinado en el ensayo anterior, se procedió a preparar 27 tubos de centrífuga de 25 ml de capacidad, con 12 ml de medio con células vegetativas. Estos tubos se centrifugaron por 20 minutos a 3000 rpm.

Concluido el proceso de centrifugación, se extrajeron y desecharon 10 ml del medio sobrenadante en nueve tubos; posteriormente, se colocó 10 ml de ADE en cada tubo; en otros nueve tubos se extrajo y desechó 10 ml del medio sobrenadante y se colocaron 10 ml de un MP en nutrientes, y los restantes nueve tubos permanecieron con el medio sobrenadante.

Los 27 tubos se agitaron manualmente para permitir que las células vegetativas de la bacteria se mezclaran uniformemente. Estas permanecieron en los tubos durante 24 h en una incubadora a 30 °C y 12 h luz. Transcurrido este tiempo, se realizó un choque de temperatura colocando tres tubos de cada medio con sus células vegetativas por 30 minutos a tres diferentes temperaturas; nueve tubos se colocaron en un horno a una temperatura de 55 °C, otros nueve tubos se colocaron en un refrigerador a 4 °C y los otros nueve se trasladaron a un cuarto con una temperatura controlada de 24 °C. Posteriormente se colocaron todos los tubos en un cuarto con una temperatura controlada de 24 °C, donde se incubaron por 5 días después de realizado el choque de temperatura.

Diseño experimental

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

La variable evaluada fue 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).

Al final del ensayo se llevó a cabo una prueba de patogenicidad como método de verificación de la identidad de la bacteria 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^{-1} de ADE. Luego se colocaron 20 larvas de *P. elenans* del tercer instar 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 limpia cada 15 días, durante 45 días.

Resultados y discusión

Ensayo 1. Extracción de *P. lentimorbus* de larvas de *P. elenans* infectadas y reproducción in vitro

Después de obtener el inóculo, se procedió a estimar la curva de crecimiento de la bacteria en el medio MYPGP (pH 8,0), y se observó un crecimiento exponencial (Fig. 1), en donde la concentración de bacilos permanece constante las primeras 24 h de incubación, después de las cuales se inicia la reproducción exponencial de la bacteria, alcanzando su máxima concentración ($1,1 \times 10^8$ células ml^{-1}) aproximadamente 62 horas después de inoculado el medio.

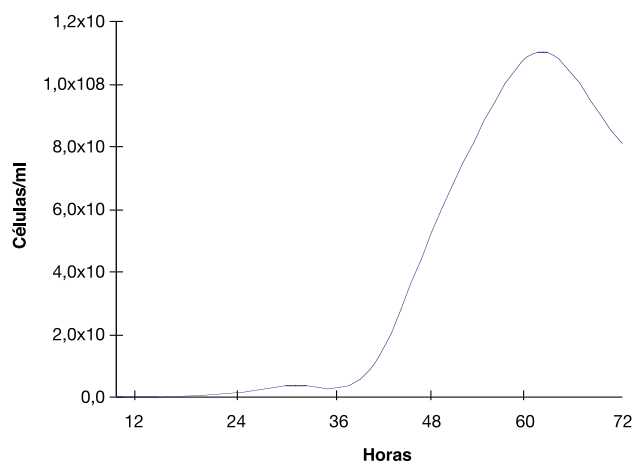


Figura 1. Curva de crecimiento de *Paenibacillus* (=Bacillus) *lentimorbus* en el medio MYPGP preparado a un pH: 8,0.

Lüthy et al. (1970) obtuvieron una concentración máxima de $2,0 \times 10^8$ células ml^{-1} de bacilos de *Paenibacillus* sp. reproducidos in vitro, 4 días después de inocular el medio Grace's preparado a un pH: 6,8 y agregar hemolinfa de *Phyllophaga anxia* al medio.

Ensayo 2. Esporulación in vitro de *P. lentimorbus*

Al alcanzar el pico de crecimiento vegetativo es necesario inducir la esporulación de la bacteria, ya que esta no ocurre en condiciones normales y, como se aprecia en la curva de crecimiento (Fig. 1), la concentración de células vegetativas disminuye rápidamente después de alcanzar el pico de crecimiento vegetativo.

Se observaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($F_{8,18} = 967,88$; $P = 0,0001$). Estas diferencias se originaron tanto en los factores aislados como en las interacciones de estos ($F_{4,18} = 77,34$; $P = 0,0001$). La mayor cantidad de esporas se alcanzó en la interacción del medio MYPGP inoculado con vegetativos tratados a una temperatura de 4°C , seguido en segundo y tercer lugar por los tratamientos compuestos por el mismo medio inoculado con vegetativos tratados a 24°C y 55°C , respectivamente.

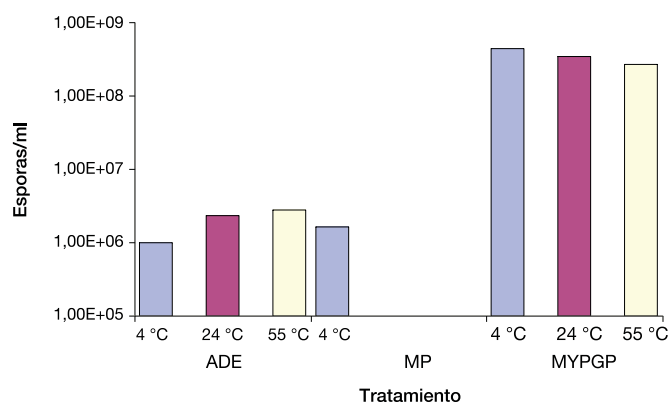


Figura 2. Esporulación de células vegetativas de *Paenibacillus* (=Bacillus) *lentimorbus* en tres medios de cultivo tratadas con tres temperaturas durante 30 minutos.

El factor inductor de la esporulación de *P. lentimorbus* no es la deficiencia nutricional, ya que el ADE y el MP no favorecieron este proceso (Fig. 2).

Las esporas de *P. lentimorbus* producidas in vitro son muy similares a las producidas in vivo si se observan a una intensidad de 40X en un microscopio de contraste de fase, pero si se aumenta la intensidad del objetivo a 100X, las esporas producidas in vitro carecen de una formación clara del cuerpo parasporal.

Al finalizar este ensayo se realizó una prueba de patogenicidad con larvas de *P. elenans* en un tercer estadio de desarrollo larval y se observó que al inocular raíces de maíz pregerminado con las esporas producidas in vitro se obtuvo un 10% de infección, lo cual comprueba que la metodología utilizada para producción in vitro de *P. lentimorbus* es adecuada.

Aunque obtener un 10% de infección con las esporas producidas in vitro es un resultado poco alentador, se debe tomar en cuenta que la prueba de patogenicidad se realizó en condiciones poco favorables, como son la utilización de una concentración baja de esporas (aproximadamente de $2,0 \times 10^8$ esp ml⁻¹), utilización de larvas de *P. elenans* en un avanzado estado de desarrollo larval y, además, que las esporas se suministraron vía ingestión, por lo que lo verdaderamente importante es la comprobación de la patogenicidad del inóculo reproducido in vitro cuando este se suministró vía ingestión.

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 por inyección, sin embargo, cuando larvas sanas de la misma especie se alimentan con dosis de $1,0 \times 10^9$ esp larva⁻¹ de la bacteria producida in vivo, no se produce infección.

Tashiro y Steinkraus (1966) obtuvieron hasta un 70% de infección cuando inyectaron larvas de *Amphimallon majalis* 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⁻¹ 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 más susceptibles al uso de las esporas producidas in vitro con la técnica utilizada en este estudio.

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, AR, INTA. p. 61-72.
- Fernández, G. 1999. Producción y evaluación de *Bacillus popilliae* contra *Phyllophaga elenans* (Col: Scarabaeidae) en laboratorio. Tesis Lic. Ing. Agr. Turrialba, CR, Universidad de Costa Rica. 68 p.
- _____; Hidalgo, JE; Badilla, FF. 2004. Germinación y reproducción in vitro de la bacteria *Paenibacillus (=Bacillus) lentimorbus*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 73:35-41.
- Guarin, JH. 1997. Estudio de la patogenicidad de *Bacillus popilliae* Dutky sobre *Phyllophaga obsoleta* Blanchard y de medios nutritivos para su producción. Tesis Mag. Sc. Medellín, CO, Universidad Nacional de Colombia. 83 p.
- 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.
- King, ABS. 1984. Biology and identification of white grubs (*Phyllophaga*) of economic importance in Central America. Tropical Pest Management 30(1):36-50
- 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.
- 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.
- 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.
- Saunders, JL; Coto, DT; King, ABS. 1998. Plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central. 2 ed. Turrialba, CR, CATIE. 305 p. (Serie Técnica, Manual Técnico no 29).
- Schwartz Junior, PH; Sharpe, E. 1970. Infectivity of spores of *Bacillus popilliae* produced on a laboratory medium. Journal of Invertebrate Pathology 15:126-128.
- 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.
- _____; 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, US, 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.