

EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL MOSQUITO CULEX QUINQUEFASCIATUS

Martha Giselle Rivera Pineda

M.Sc. Microbiología, Universidad Autónoma de Colombia. giselariver@gmail.com

Sandra Patricia Garzón Lozano

Ingeniera Ambiental, Universidad Autónoma de Colombia

Luz Inés Villarreal Salazar

Ingeniera Ambiental, Universidad Autónoma de Colombia

Recibido: 12-08-2009, aceptado: 17-11-2009, versión final: 17-11-2009

RESUMEN

En busca de una alternativa de control del mosquito *Culex quinquefasciatus* en áreas urbanas se desarrolló el proyecto: "Evaluación de microorganismos biocontroladores sobre el mosquito *Culex quinquefasciatus*" cuyo objetivo fue evaluar la capacidad biocontroladora de diferentes hongos entomopatógenos sobre larvas del mosquito a nivel de laboratorio. Se evaluaron 16 aislamientos de hongos en diferentes concentraciones. Se constataron diferencias en el porcentaje de mortalidad producido en larvas de *Cx. quinquefasciatus* dependientes del tipo de aislamiento, de la concentración utilizada y del tiempo de exposición. Los aislamientos que presentaron el nivel de mortalidad más alto pertenecen a la especie *Metarhizium anisopliae*, seguidos por aislamientos de la especie *Beauveria bassiana*. El aislamiento que presentó el mayor nivel de mortalidad (100%) en menor tiempo de exposición (24 horas) fue *Metarhizium anisopliae* 99068 en una concentración de 1×10^6 e/ml. Por lo tanto este aislamiento es recomendado para su evaluación en campo y desarrollo de un producto comercial.

Palabras clave: control biológico/ *Culex quinquefasciatus*/ hongos entomopatógenos/ *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

Looking for a control alternative of *Culex quinquefasciatus* in urban areas, the research: "Biocontrol microorganisms evaluation against the mosquito *Culex quinquefasciatus*" was developed, with the objective of assess entomopathogenic fungi against mosquito larvae in laboratory essays. Sixteen fungal isolates were evaluated, in different spore concentrations. Differences in larvae mortality were obtained, according to fungal isolate, spore concentration and exposure time used. Fungal isolates which displayed the higher mortality level were *Metarhizium anisopliae* isolates, followed by *Beauveria bassiana*. The isolate that achieved the higher mortality level (100%) in the shorter period of time (24 hours) against *Culex quinquefasciatus* larvae, was *Metarhizium anisopliae* 99068 with a spore concentration of 1×10^6 spores/ml. Therefore this isolate is recommended for field evaluation and for a commercial product development.

Key words: Biological Control / *Culex quinquefasciatus* / entomopathogenic fungi / *Metarhizium anisopliae*.

1. INTRODUCCIÓN

Un problema común de las zonas urbanas cercanas a embalses, humedales y ríos es la presencia del mosquito o zancudo cuyo nombre científico corresponde a *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae). La picadura de este mosquito ocasiona problemas de salud como alergias e infecciones dérmicas y se ha confirmado como vector de Filariasis (*Wuchereria bancrofti* y *Dirofilaria immitis*), del virus del Nilo occidental y de los virus causantes de la encefalitis de San Luis y la encefalitis equina venezolana, entre otros (Rivas *et al.* 1997; Goddard, Roth, Reisen, & Scott, 2002).

Este mosquito tiene un ciclo de vida cuyas etapas de huevo, larva y pupa se desarrollan en el agua y una etapa de adulto que se desarrolla en un medio terrestre y aéreo (Marino, 1995). Las hembras requieren como alimento la sangre para madurar y depositar sus huevos los cuales son ovipositados en forma de balsa en aguas residuales con alto contenido de materia orgánica (Villarreal & González, 1995)

El desarrollo de las larvas del mosquito *C. quinquefasciatus*, se ve ampliamente favorecido por la presencia de vegetación acuática flotante y muy especialmente de la planta conocida como buchón (*Eichornia crassipes*). Esta planta protege las larvas del mosquito de la radiación solar directa y de los depredadores.

En Colombia, *Culex quinquefasciatus* se distribuye por todo el territorio nacional en alturas que van desde los 0 hasta los 3000 metros sobre el nivel del mar. (Becerra 1992, citado por García & Londoño, 2007).

Dentro de las alternativas de control de especies plaga y vectores de enfermedades tropicales se encuentran: el control químico, el control biológico y el mejoramiento del medio ambiente.

El control biológico es una alternativa de menor impacto ecológico que el control químico, al igual que permite un manejo seguro para la salud humana. El éxito del control biológico se basa en la exacta ubicación de aquellos sitios

donde se crían las especies a controlar y la acertada elección del agente controlador.

Este artículo describe los resultados de la investigación "Evaluación de microorganismos biocontroladores sobre el mosquito *Culex quinquefasciatus*" realizada en el programa de ingeniería ambiental de la Universidad Autónoma de Colombia y cuyo objetivo fue evaluar la capacidad biocontroladora de diferentes hongos entomopatógenos sobre larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* a nivel de laboratorio.

2. METODOLOGÍA

2.1. Obtención de larvas

Las larvas utilizadas en los bioensayos fueron recolectadas en sitios con proliferación de *Eichornia crassipes* (buchón): Sector del Dique y sector Neruda en el embalse del Muña (municipio de Sibaté) y el Río Bogotá (límites entre Mosquera y el Distrito).

Las larvas recolectadas fueron colocadas en cuarentena con un mínimo de 72 horas, seleccionando las larvas activas de tercer estadio para la realización de los bioensayos.

2.2. Selección y obtención de hongos entomopatógenos

Los microorganismos utilizados para la realización de bioensayos fueron obtenidos a partir de dos fuentes: Aislamientos cedidos por la Fundación Centro de Biotecnología Mariano Ospina Pérez¹ (Tabla 1), y Hongos aislados e identificados durante el desarrollo del proyecto.

La metodología de aislamiento de hongos consistió en la recolección de cadáveres de insectos de la ronda del humedal La Conejera (Bogotá) y su posterior tratamiento en laboratorio. Los insectos recolectados fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y fueron colocados en cámara húmeda para posibilitar el desarrollo de hongos entomopatógenos, en aquellos casos donde esta haya sido la causa de la muerte del insecto. En los casos donde se evidenció la presencia de hongos, las

estructuras presentes (micelio o esporas) fueron transferidas al medio de cultivo Sabouraud con cloranfenicol (SDAC).

La identificación de hongos a nivel de género se realizó a través de identificación de estructuras de reproducción características y comparación con claves taxonómicas (Domsch, Anderson, 1980; Humber, 1988; Lomer & Lomer, 1996).

Tabla 1

Aislamientos cedidos por el Centro de Biotecnología
Mariano Ospina Pérez

Aislamiento	Género y especie	Insecto hospedero
CEN 9205	<i>Beauveria bassiana</i> Cebiopest®	ORDEN LEPIDOPTERA- Larva <i>Diatraea saccharalis</i>
CEN 9236	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Desconocido
CEN 9301	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	ORDEN LEPIDOPTERA- Larva <i>Leptopharsa gibbicarina</i>
CB 990614	<i>Metarhizium anisopliae</i>	ORDEN COLEOPTERA- Larva <i>Premnotrypes vorax</i>
CB 99068	<i>Metarhizium anisopliae</i>	ORDEN COLEOPTERA- Adulto
CB Eu2	<i>Beauveria bassiana</i>	ORDEN LEPIDOPTERA- Larva <i>Euprosterina eleasa</i>
CB Le1	<i>Beauveria bassiana</i>	ORDEN LEPIDOPTERA- Larva <i>Loxotoma elegans</i>

2.3. Realización de Bioensayos

Se suspendieron las esporas de cada hongo entomopatógeno en solución de Tween 80® al 0.05%. La concentración de cada suspensión se determinó mediante recuento microscópico de esporas en cámara de Neubauer y se ajustó mediante diluciones decimales de acuerdo a la concentración de cada tratamiento.

Los bioensayos se realizaron con larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus* de tercer estadio basándonos en la metodología diseñada por Montero, G. (comunicación personal, febrero 1995).

2.4. Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar. Cada tratamiento contó con cuatro réplicas. Cada réplica consistió en un vaso de precipitado de 600 ml de capacidad con un volumen de 250ml de suspensión de esporas de cada hongo en concentraciones comprendidas entre 1×10^5 y 1×10^7 esporas/ml, en solución de Tween 80 al 0.05%.

A cada vaso de precipitado fueron adicionadas 21 larvas de tercer estadio. Las larvas fueron expuestas en forma continua durante 5 días y se agregó alimento (truchina) a cada vaso. Los Bioensayos se realizaron en condiciones de laboratorio (temperatura promedio de 18°C)

Se estableció un control para los tratamientos realizados en el mismo periodo de tiempo. Cada control consistió en 4 vasos de precipitado con 21 larvas cada uno en las mismas condiciones de los tratamientos pero sin aplicación de hongo.

La variable respuesta evaluada fue el porcentaje de mortalidad obtenido a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición.

Los datos de porcentaje de mortalidad fueron corregidos mediante la fórmula de Abbott (Abbott, 1925):

$$\% \text{ mortalidad expuestos} - \% \text{ mortalidad control} \\ X \quad 100 \\ 100 - \% \text{ mortalidad control}$$

Esta fórmula fue aplicada siempre que la mortalidad del control se encontró entre el 5% y 20%. Aquellos bioensayos donde la mortalidad en el testigo fue superior al 20% fueron descartados (WHO, 2005).

2.4. Análisis estadístico

Se realizó la transformación de los datos de mortalidad a través de la fórmula = $\text{Arcsen}(\sqrt{X/100})$, con el fin de normalizar los datos. Se realizó el análisis de varianza ANOVA y se compararon las medias proporcionales mediante la prueba de Tukey. Se tomó como límite el 5% (0,05) para el valor de la significación. Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 11.5.0 (2002).

La variable independiente fue el tiempo de exposición expresado en horas, mientras la variable dependiente o variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad (% mortalidad) para todos los análisis; también, se tuvieron en cuenta tres variables factor que fueron:

- Aislamiento
- Concentración
- Género de hongo

Se procedió a analizar los resultados de la siguiente manera:

- Se analizó cada aislamiento comparando las concentraciones entre si.
- Se compararon los aislamientos del mismo género con cada concentración evaluada.
- Se compararon los aislamientos de diferentes géneros con cada concentración evaluada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 2 muestra Los hongos aislados a partir de cadáveres de insectos y utilizados para los bioensayos con larvas de *Cx. quinquefasciatus*, y las tablas 3 a 7 muestran los tratamientos realizados con los datos de mortalidad promedio obtenidos y corregidos de acuerdo a la fórmula de Abott (1925).

Tabla 2
Aislamientos a partir de cadáveres de insectos

Código aislamiento	Género	Insecto hospedero	Lugar de aislamiento
FUAC S1-02	<i>Paecilomyces sp.</i>	Orden COLEOPTERA- Adulto	Embalse del Muña Zona Dique Hospital
FUAC S1-03	<i>Lecanicillium sp.</i>	Orden COLEOPTERA- Adulto	Embalse del Muña Zona Dique Hospital
FUAC S1-05	<i>Penicillium sp.</i>	Orden DIPTERA- Larva <i>Culex quinquefasciatus</i>	Embalse del Muña Zona Dique Hospital
FUAC S1-13	<i>Penicillium sp.</i>	Orden COLEOPTERA- Adulto	Embalse del Muña Zona Dique Hospital
FUAC S2-02	<i>Lecanicillium sp.</i>	Orden COLEOPTERA- Adulto	Humedal La Conejera
FUAC S2-06	<i>Paecilomyces sp.</i>	Orden COLEOPTERA- Adulto	Humedal La Conejera
FUAC S2-07	<i>Hirsutella sp.</i>	Orden COLEOPTERA- Adulto	Humedal La Conejera
FUAC S2-10	<i>Lecanicillium sp.</i>	Orden COLEOPTERA- Adulto	Humedal La Conejera
FUAC S2-19	<i>Lecanicillium sp.</i>	Orden COLEOPTERA- Adulto	Humedal La Conejera

Tabla 3
 Datos promedio de mortalidad corregida según Abbot expresados en porcentaje para la especie *Beauveria bassiana*

Hongo	Concentración	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
<i>Beauveria bassiana</i> 9205	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	38,7	57,3	73,3	77,3	80,0
<i>Beauveria bassiana</i> 9205	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	0,0	4,4	20,6	63,2	63,2
<i>Beauveria bassiana</i> 9205	[1 x 10 ⁵ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Beauveria bassiana</i> Eu2	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	29,4	29,4
<i>Beauveria bassiana</i> Eu2	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	24,3	53,3	66,7
<i>Beauveria bassiana</i> Le1	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	80,3	89,5	89,5

Tabla 4
 Datos promedio de mortalidad corregida según Abbot expresados en porcentaje para el género *Lecanicillium*

Hongo	Concentración	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
<i>Lecanicillium</i> sp. S1-03	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	3,8	12,0	15,1
<i>Lecanicillium</i> sp. S1-03	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	0,0	2,4	19,0	31,0	41,7
<i>Lecanicillium</i> sp. S2-02	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lecanicillium</i> sp. S2-02	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lecanicillium</i> sp. S2-02	[1 x 10 ⁵ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	5,9	5,9
<i>Lecanicillium</i> sp. S2-10	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	8,9	19,9	20,5	46,6	65,8
<i>Lecanicillium</i> sp. S2-10	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lecanicillium</i> sp. S2-19	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	0,0	13,4	41,1	54,8	61,6
<i>Lecanicillium</i> sp. S2-19	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	1,7	3,1	3,1

Tabla 5
 Datos promedio de mortalidad corregida según Abbot expresados en porcentaje para la especie *Metarhizium anisopliae*

Hongo	Concentración	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
<i>Metarhizium anisopliae</i> 9236	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	25,0	57,3	87,5	88,9	90,3
<i>Metarhizium anisopliae</i> 9236	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	19,6	78,1	78,1	78,1	78,1
<i>Metarhizium anisopliae</i> 99068	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>Metarhizium anisopliae</i> 99068	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>Metarhizium anisopliae</i> 99068	[1 x 10 ⁵ esporas/ml]	0,0	0,0	17,6	47,1	47,1	47,1
<i>Metarhizium anisopliae</i> 990614	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	21,5	93,0	93,0	98,6	100,0
<i>Metarhizium anisopliae</i> 990614	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	74,3	97,1	98,6	98,6	100,0
<i>Metarhizium anisopliae</i> 990614	[1 x 10 ⁵ esporas/ml]	0,0	0,3	43,8	63,0	72,6	75,3

Tabla 6
 Datos promedio de mortalidad corregida según Abbot expresados en porcentaje para el género *Paecilomyces*

Hongo	Concentración	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
<i>Paecilomyces lilacinus</i> 9301	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	0,0	3,7	13,7	16,3	24,0
<i>Paecilomyces</i> sp. S1-02	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	6,5
<i>Paecilomyces</i> sp. S1-02	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	8,1
<i>Paecilomyces</i> sp. S2-06	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	1,1
<i>Paecilomyces</i> sp. S2-06	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Paecilomyces</i> sp. S2-06	[1 x 10 ⁵ esporas/ml]	0,0	0,0	16,7	62,7	65,3	68,0

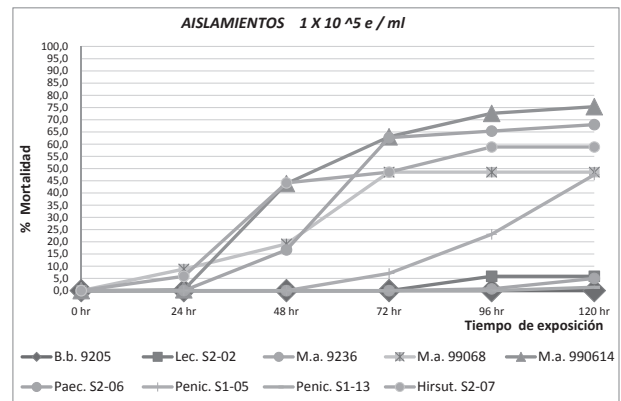
Tabla 7
 Datos promedio de mortalidad corregida según Abbot expresados en porcentaje para los géneros *Penicillium* e *Hirsutella*

Hongo	Concentración	0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
<i>Penicillium</i> sp. S1-05	[1 x 10 ⁷ esporas/ml]	0,0	0,0	2,9	33,8	33,8	33,8
<i>Penicillium</i> sp. S1-05	[1 x 10 ⁵ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	7,1	23,1	47,4
<i>Penicillium</i> sp. S1-05	[1 x 10 ⁴ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Penicillium</i> sp. S1-13	[1 x 10 ⁶ esporas/ml]	0,0	6,8	6,8	12,3	12,3	12,3
<i>Penicillium</i> sp. S1-13	[1 x 10 ⁵ esporas/ml]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4
<i>Hirsutella</i> sp. S2-07	[1 x 10 ⁵ esporas/ml]	0,0	0,0	12,3	12,3	28,8	39,7
<i>Hirsutella</i> sp. S2-07	[1 x 10 ⁵ esporas/ml]	0,0	5,9	44,1	48,5	58,8	58,8

3.1. Análisis por concentración: 1x10⁵ e/ml

En la gráfica 1 se presentan los resultados de los 9 aislamientos evaluados en la concentración de 1x10⁵ e/ml. De acuerdo a la prueba de Tukey podemos ordenar estos aislamientos en 3 grupos:

1. Aislamientos que expresaron la máxima mortalidad a las 72 horas y no se diferencian significativamente entre sí:
 - a. *Metarhizium anisopliae* 990614 (63,01%), *Metarhizium anisopliae* 99068 (48,63%), y *Synnematium* S2-07 (48,53%).
2. Aislamientos que expresaron el máximo nivel de mortalidad a las 120 horas, sin diferenciarse en forma significativa con el anterior grupo:
 - a. *Penicillium* S1-05 (47,44%).
3. Aislamientos cuyo nivel de mortalidad fue equivalente a 0%:
 - a. *Beauveria bassiana* 9205, *Lecanicillium* S2-02, *Metarhizium anisopliae* 9236 y *Penicillium* S1-13.



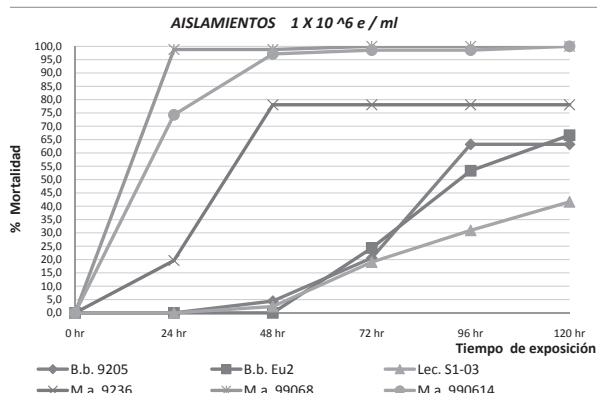
Gráfica 1. Porcentaje de mortalidad en la concentración 1 x 10⁵ esporas/ml

3.2. Análisis por concentración: 1x10⁶ e/ml

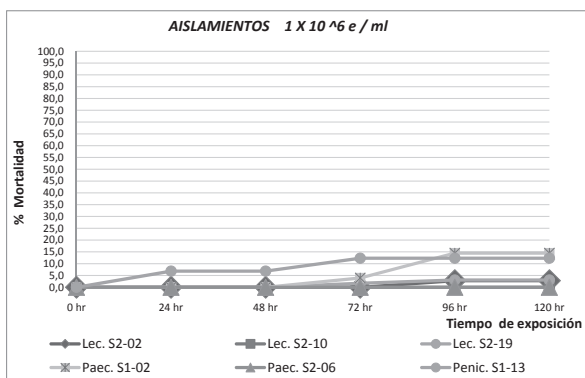
En forma similar a la anterior concentración, los resultados obtenidos con 12 aislamientos evaluados con la concentración de 1x10⁶ e/ml, se presentan en dos grupos de aislamientos. En la gráfica 3 se presentan los aislamientos que presentaron niveles de mortalidad superiores a 40% y en la gráfica 4 los aislamientos que presentaron valores por debajo del 40%.

De acuerdo al análisis de medias por la prueba de Tukey podemos agrupar los aislamientos de la siguiente manera:

1. Aislamientos que presentaron mortalidades equivalentes al 100%:
 - a. En 24 horas: *Metarhizium anisopliae* 99068.
 - b. En 48 horas: *Metarhizium anisopliae* 990614 y *Metarhizium anisopliae* 9236.
2. Aislamientos que presentaron mortalidades intermedias:
 - a. En 96 horas: *Beauveria bassiana* 9205 (63,24%) y *Beauveria bassiana* Eu2 (53,33%).
 - b. En 120 horas: *Lecanicillium* S1-03 (41,67%).
3. Aislamientos que presentaron mortalidades equivalentes a 0%:
 - a. *Lecanicillium* S2-02; *Lecanicillium* S2-10; *Lecanicillium* S2-19; *Paecilomyces* S1-02; *Paecilomyces* S2-06 y *Penicillium* S1-13.



Gráfica 2. Porcentaje de mortalidad superior al 40% en la concentración 1 x 10⁶ esporas/ml



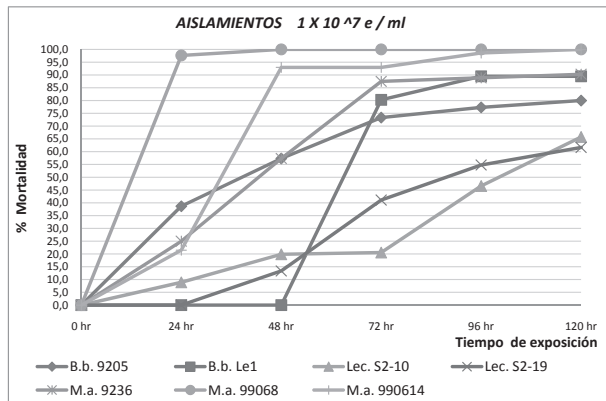
Gráfica 3. Porcentaje de mortalidad inferior al 40% en la concentración 1 x 10⁶ esporas/ml

3.3. Análisis por concentración: 1x10⁷ e/ml

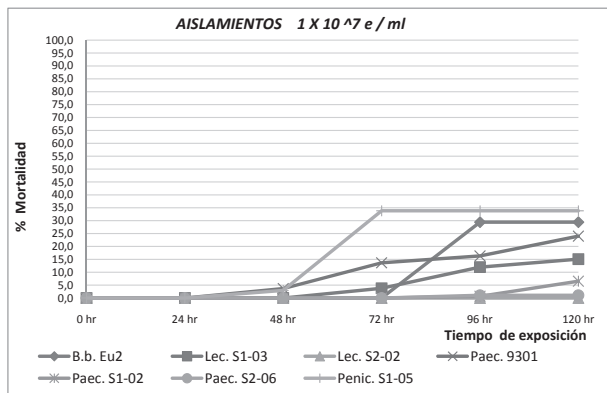
Las gráficas 1 y 2 se presentan los resultados obtenidos con 14 aislamientos en la concentración más alta evaluada, 1x10⁷ e/ml. En la primera gráfica están representados los 7 aislamientos que alcanzaron mortalidades por encima del 50% y en la segunda gráfica aquellos aislamientos que presentaron mortalidades por debajo del 50%.

Con base en la comparación realizada entre las medias obtenidas mediante la prueba de Tukey, podemos establecer un orden de la siguiente manera:

1. Aislamientos que presentaron un nivel de mortalidad equivalente al 100%:
 - a. En 24 horas: *Metarhizium anisopliae* 99068.
 - b. En 48 horas: *Metarhizium anisopliae* 990614
 - c. En 72 horas: *Beauveria bassiana* Le1 y *Metarhizium anisopliae* 9236.
 - d. En 96 horas: *Beauveria bassiana* 9205.
2. Aislamientos que presentaron un nivel de mortalidad intermedio:
 - a. En 120 horas: *Lecanicillium* S2-10 (65,75%) y *Lecanicillium* S2-19 (61,64%).
3. Aislamientos que presentaron un nivel de mortalidad bajo:
 - a. En 72 horas: *Penicillium* S1-05 (33,82%).
 - b. En 96 horas. *Beauveria bassiana* Eu2 (29,41%).
4. Aislamientos que presentaron un nivel de mortalidad equivalente a 0%:
 - a. *Lecanicillium* S1-03; *Lecanicillium* S2-02; *Paecilomyces* S1-02; *Paecilomyces* S2-06 y *Paecilomyces* lilacinus 9301.



Gráfica 4. Porcentaje de mortalidad superior al 50% en la concentración 1×10^7 esporas/ml



Gráfica 5. Porcentaje de mortalidad inferior al 50% en la concentración 1×10^7 esporas/ml

3.4. Análisis general

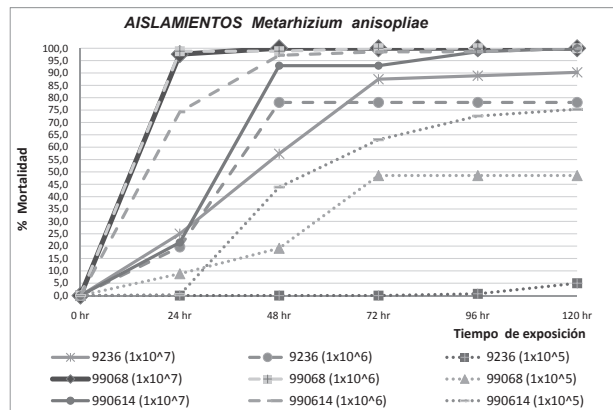
Los aislamientos B.b.9205 y B.b.Le1, presentaron la máxima mortalidad a las 72 horas (no hay diferencias significativas con las mortalidades presentadas a las 96 y 120 horas). Estos aislamientos no presentaron diferencias significativas en sus niveles de mortalidad entre sí a partir de las 72 horas. El aislamiento B.b.Eu2 presentó un nivel de mortalidad significativamente más bajo (29,41%) que los otros dos aislamientos, y fue alcanzada a las 96 horas.

Para el género *Lecanicillium*, no se presentaron diferencias significativas entre los aislamientos S2-02 y el S1-03, en ninguno de los tiempos evaluados, al igual que entre los aislamientos S2-10 y S2-19. A partir de las 72 horas se presentan diferencias significativas entre S1-03 y S2-19 al igual que entre S2-02 y S2-19. A las 96 horas se

presenta diferencia significativa entre S2-10 y S2-02, y a las 120 horas entre S2-10 y S1-03. Los aislamientos S2-10 y S2-19 presentaron el porcentaje de mortalidad más alto a las 120 horas, 65,75% y 61,64% respectivamente.

Los tres aislamientos de la especie *Metarhizium anisopliae* alcanzaron el mismo nivel de mortalidad, en diferentes tiempos de exposición. A partir de las 72 horas no se presentaron diferencias significativas en la mortalidad presentada por los tres aislamientos. Sin embargo el aislamiento 99068 alcanzó este nivel a las 24 horas (97,62%), el aislamiento 990614 lo hizo a las 48 horas (92,96%) y el aislamiento 9236 a las 72 horas (87,5%).

El aislamiento que presentó el mayor nivel de mortalidad (100%) en menor tiempo de exposición (24 horas) fue *Metarhizium anisopliae* 99068 en una concentración de 1×10^6 e/ml.



Gráfica 6. Porcentaje de mortalidad de aislamientos de *Metarhizium anisopliae*

En la gráfica 6, se observa que *M. anisopliae* 99068 en concentraciones de 1×10^7 e/ml y 1×10^6 e/ml presentó un porcentaje de mortalidad del 100% a las 24 horas de exposición, sin diferencias significativas entre ellas. Mientras que en la concentración 1×10^5 e/ml, la máxima mortalidad fue de 48,53% a las 72 horas, presentando diferencias significativas con las otras concentraciones en todos los periodos de tiempo.

El comportamiento de los tres aislamientos de la especie *Metarhizium anisopliae* en la con-

centración de 1×10^6 e/ml fue muy similar a la presentada con la concentración de 1×10^7 e/ml. No se presentaron diferencias significativas en la mortalidad a partir de las 72 horas, entre los tres aislamientos. Al igual que con la concentración 1×10^7 e/ml, el aislamiento 99068 alcanzó el máximo nivel a las 24 horas (98,81%). Los aislamientos 990614 (97,14%) y 9236 alcanzaron el máximo nivel a las 48 horas (78,09%).

No se presentaron diferencias significativas entre los aislamientos de concentración 1×10^5 e/ml a las 24 horas de exposición. A las 48 horas de exposición se presentó diferencia significativa entre el aislamiento 9236 y el aislamiento 990614, y a partir de las 72 horas los aislamientos 99068 y 990614 no presentaron diferencias significativas entre sí, pero sí en relación con el aislamiento 9236. El máximo nivel de mortalidad alcanzado por los aislamientos 99068 y 990614 fue de 48,53% y 63,01% respectivamente, a las 72 horas de exposición, y de 5,0% para el aislamiento 9236, a las 120 horas de exposición.

Como conclusión el aislamiento 99068 de la especie *Metarhizium anisopliae* en las concentraciones de 1×10^6 e/ml y 1×10^7 e/ml, presentó una mortalidad cercana al 100% en el tiempo más corto registrado (24 horas). Los otros aislamientos también presentaron mortalidades cercanas al 100% en un tiempo de exposición mayor (48 y 72 horas).

El aislamiento 99068 de la especie *Metarhizium anisopliae* en las concentraciones 1×10^6 e/ml y 1×10^7 e/ml, presentó una mortalidad cercana al 100% en el tiempo más corto registrado (24 horas). Los otros aislamientos también presentaron mortalidades cercanas al 100% en un tiempo de exposición mayor (48 y 72 horas). Aunque *M. anisopliae* ha sido aislado de un amplio rango de insectos hospederos es bien conocido que aislamientos individuales poseen considerable especialización con respecto a su rango de hospederos. Las diferencias en su patogenicidad es un indicativo de la gran variabilidad genética ocurrida de forma natural. Los mosquitos no están reportados como hospederos naturales del género *Metarhizium*, pero

diversos aislamientos han demostrado su virulencia en condiciones de laboratorio. Scholte *et al.* (2003) demostraron la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos del vector de la malaria *Anopheles gambiae* y el vector de la filarisis *Culex quinquefasciatus*. A nivel de laboratorio, existen reportes de control sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* durante un período de un mes (Ramoska, 1982). Pereira (1998) obtuvo un 90,0% de mortalidad en larvas de *C. quinquefasciatus* con el aislamiento 1037 de *Metarhizium anisopliae*, en contraste con aislamientos de la especie *Beauveria bassiana* que no superaron el 20,0% de mortalidad. El aislamiento *M. anisopliae* 99068 produjo la mortalidad de las larvas en tan solo 24 horas, resultado reportado también por Alves *et al.* (2002) para un aislamiento de *M. anisopliae* aplicado en suspensión, reportando también que su efectividad se perdía después de tres días.

El principal modo de acción en las larvas de mosquito es la obstrucción del pasaje de aire a través de los dos troncos traqueales de la larva. Las esporas de *M. anisopliae* se adhieren a las válvulas perispiraculares, germinan y penetran a través de la cutícula dentro del hemocele. Los espiráculos son obstruidos y la falta de aire y posiblemente las toxinas producidas por el hongo en la hemolinfa causan la muerte de la larva. Sin embargo *M. anisopliae*, es uno de los hongos que puede matar al insecto, antes de que ocurra una invasión masiva de los órganos del insecto, y dos toxinas (destruxinas A y B) han sido aisladas del micelio y de filtrados de cultivos del hongo (Roberts, 1966). Quesada-Moraga *et al.* (2006), evaluaron la eficacia de filtrados de cultivos de 25 aislamientos de 4 especies de hongos contra *Spodoptera littoralis* y encontraron una cepa efectiva de *M. anisopliae* (01/58-Su). Mohanty *et al.* (2008) encontraron que los filtrados de cultivos de *M. anisopliae* en caldo de quitina poseían un potencial como agente de control biológico contra mosquitos.

Estos estudios podrían explicar los resultados obtenidos en la presente investigación, en el cual los aislamientos de *Metarhizium aniso-*

pliae evaluados fueron capaces de matar larvas de tercer estadio del mosquito *Culex quinquefasciatus*, en un lapso de tan solo 24 horas.

4. CONCLUSIONES

Se constató que las diferencias en los niveles de mortalidad obtenidas son dependientes de las variables evaluadas como son: género, especie, aislamiento, concentración de esporas, y tiempo de exposición de las larvas.

Los tres aislamientos del género *Paecilomyces* (S1-02, S2-06 y 9301), dos del género *Lecanicillium* (S1-03 y S2-02), dos del género *Penicillium* (S1-05 y S1-13) y uno de la especie *Beauveria bassiana* (Eu2) presentaron una mortalidad baja o nula (0 % - 33,8%) aún en la concentración más alta evaluada (1×10^7 e/ml), por lo cual estos aislamientos no son recomendados como candidatos a nuevas evaluaciones de laboratorio o de campo, dado que el uso de concentraciones superiores implicarían costos muy altos en un programa de control del mosquito.

Los aislamientos *Penicillium* S1- 05 (1×10^5 e/ml), *Lecanicillium* S2-10 (1×10^7 e /ml) y *Lecanicillium* S2-19 (1×10^7 e /ml) presentaron niveles de mortalidad de valor intermedio entre 47,4% y 65,8% en tiempos de 96 y 120 horas. No se recomienda la utilización de estos aislamientos para un programa de control de mosquitos debido al largo tiempo de exposición requerido, difícil de garantizar en condiciones de campo.

Los aislamientos que presentaron niveles de mortalidad altos pertenecen a la especie *Metarhizium anisopliae* (990614, 99068 y 9236) que presentaron mortalidad de 100% en concentraciones 1×10^6 y 1×10^7 e /ml en 24 y 48 horas; seguidos por aislamientos de la especie *Beauveria bassiana* (9205 y Le1) que presentaron una mortalidad de 100% a las 72 y 96 horas en concentración 1×10^7 e/ml. Estos aislamientos son recomendados para su evaluación a nivel de campo dado al alto grado de patogenicidad demostrado.

El aislamiento *Hirsutella* S2-07 evaluado en la concentración 1×10^5 e/ml arrojó un resultado de mortalidad significativamente igual a los aislamientos *Metarhizium anisopliae* 990614 y *Metarhizium anisopliae* 99068 a las 72 horas (48,5 % - 63,0%), por lo cual se recomienda optimizar la producción de esporas de este aislamiento y su evaluación a concentraciones mayores (1×10^6 y 1×10^7 e/ml).

Los tres aislamientos evaluados de la especie *Metarhizium anisopliae* (990614, 99068 y 9236) presentaron un comportamiento muy similar en cuanto al nivel de mortalidad alcanzado (100%) así como al tiempo de máxima mortalidad (48h - 72 h), en dos de las concentraciones evaluadas (1×10^6 e/ml y 1×10^7 e/ml). El aislamiento que presentó el mayor nivel de mortalidad (100%) en menor tiempo de exposición (24 horas) fue *Metarhizium anisopliae* 99068 en una concentración de 1×10^6 e/ml, por lo tanto se considera como un aislamiento promisorio para ser desarrollado como producto comercial, previa evaluación en condiciones de campo.

5. AGRADECIMIENTOS

Hacemos un especial reconocimiento al Dr. Henry Hanssen Villamizar (q.e.p.d.), quien se destacó como un gran líder de la Investigación científica en Colombia. Su estímulo y conocimiento fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

Agradecemos a la Fundación Centro de Biotecnología Mariano Ospina Pérez por permitirnos utilizar los hongos entomopatógenos de su banco de aislamientos y de sus productos comerciales.

Agradecemos al Profesor Luis Alejandro Masmele del Departamento de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Colombia, por su contribución al análisis estadístico de los datos.

REFERENCIAS

- Abbot, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology*, 18, 265-267
- Alves, S.B., Alves, L.F.A., Lopes, R.B., Pereira, R.M. & Vieira, S.A. (2002). Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). *Journal of Applied Entomology*, 126, (9), 504-509.
- Domsch, K.H. & Anderson, W.G. (1980). *Compendium of soil fungi*. Vol. 1.
- García, O.C. & Londoño, Y.L. Adaptación de *Culex quinquefasciatus* (Díptera: Culicidae) a tres diferentes pisos térmicos bajo condiciones de laboratorio. Bogotá, 2007, 119 p. Tesis para optar por el título de Médicos Veterinarios. Universidad de La Salle, Facultad de Medicina Veterinaria.
- Goddard, L.B., Roth, A.E., Reisen, W.K. & Scott, T.W. (2002). Vector competence of California mosquitoes for West Nile Virus. *Em Infect Dis*, 8, 1385-91.
- Humber, R.A. (1998). *Entomopathogenic Fungal Identification*. APS/ESA Workshop. USDA-ARS Plant Protection Research Unit. US Plant, Soil & Nutrition Laboratory. Tower Road Ithaca, NY 14853-2901.
- Lomer, C.H., & Lomer, C.J. (1996). *Lubilosa Insect Pathology Manual*. 244 p. Descargado el 26 de mayo de 2005 del URL: <http://www.lubilosa.org/>.
- Marino, H. (1995). *Estudios Básicos de Dípteros Hematófagos como modelo para la implementación en áreas problema de estrategias de control biológico y/o integrado*. Buenos Aires; CIC. - CEPAVE - UNLP/CONICET.
- Mohanty, S.S., Raghavendra, K., Mittal, P.K. & Dash, A.P. (2008). Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 1199-1202.
- Pereira, R. (1998). Potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for control of *Culex quinquefasciatus*. *Midwest Biological Control News On line*, 5, (3). Recuperado el día 24 de mayo de 2006, de URL: <http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/rev503.html>
- Quesada-Moraga E., Carrasco-Díaz, J.A, Santiago-Alvarez, C. (2006). Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *J Appl Entomol* 130: 442-452.
- Ramoska, W.A. (1982). An examination of the long-term epizootic potential of various artificially introduced mosquito larval pathogens. *Mosquito News* 42, 603-607.
- Rivas, F., Díaz, L., Cárdenas, V., Daza, E., Bruzón, L., & Alcalá, A. (1997). Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia. *Journal Infection Disease*; 175: 828-32.

- Roberts, D.W. (1966). Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. 1. Production in submerged and surface cultures, and in inorganic and organic nitrogen media. *J Invertebr Pathol* 8: 212-221.
- Scholte, E.J., Njiru, B.N., Smallgange, R.C., Takken, W., & Knols, B.G.I. (2003). Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Malaria Journal*, 2, 29
- Villareal, L.I., & González, C.J. (1995). "Familia Culicidae - larvas de especies vectoras en Colombia". En: SOCOLEN Sociedad Colombiana de Entomología (Ed). Seminario Invertebrados acuáticos y su utilización en estudios ambientales. 49-73.
- World Health Organization, WHO (2005). Guidelines For Laboratory And Field Testing Of Mosquito Larvicides: World Health Organization Communicable Disease Control, Prevention And Eradication Who Pesticide Evaluation Scheme. Recuperado el día 12 de septiembre de 2008 de URL: www.who.int/whopes/guidelines/en/

