



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN-MANAGUA

**Instituto Politécnico de la Salud “Luis Felipe Moncada”
Departamento de Bioanálisis Clínico**

**Trabajo monográfico para optar al título de
Licenciado en Microbiología**

Tema:

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti*, UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA, Octubre 2017-Abril 2018.

Autores:

**Br. Tercero Padilla Nubia Gabriela
Br. Medrano Guerrero Soylen Xiomara**

Tutora:

**Msc. Martha Xiomara Guerrero Delgado.
Msc. Ciencias Farmacéuticas con orientación en Biología clínica.
Lic. Bioanálisis clínico**

Asesor metodológico:

**Ing. Msc. Víctor Monzón
Ing. Agrónomo
Msc. Agroecología y desarrollo sostenible
UNA**

Managua, 9 de abril 2019.

Tema:

Ensayo de hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector

***Aedes aegypti* POLISAL-UNAN-MANAGUA, Octubre 2017-Abril 2018.**

Índice

1. Introducción.....	12
2. Antecedentes	13
3. Justificación	17
4. Planteamiento del problema.....	18
4.1 Preguntas directrices	19
5. Objetivos	20
6. Marco teórico.....	21
6.1 Agente etiológico	21
6.1.1 <i>Beauveria bassiana</i>	21
6.1.2 <i>Metarhizium anisopliae</i>	22
6.1.3 Calidad de la cepa	23
6.2 Epidemiología.....	24
6.2.1 Bioinsecticida	24
6.2.2 Control biológico	24
6.2.3 Modo de acción.....	25
6.2.4 Ventajas y desventajas de su aplicación.....	27
6.4 <i>Aedes aegypti</i>	28
6.4.1 Características	28
6.4.2 Ciclo de vida.....	29
6.4.3 Enfermedades que transmite.....	30
6.5 Parámetros	30
6.5.1 Efectividad	30
6.5.2 Parámetros de Eficacia	31
7. Diseño metodológico.....	32
7.1 Tipo de estudio:.....	32
7.2. Área de estudio:	32
7.3. Universo, muestra y tamaño de la muestra:	32
7.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de la información	35
7.5 Operacionalización de variables.....	44
7.6 Procedimiento para la recolección de la información	47

7.7 Plan de tabulación y análisis	47
8. Análisis y Discusión de los resultados.....	48
9. Conclusiones	60
10. Recomendaciones.....	61

Dedicatoria

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios, por ser mi fuente de sabiduría y fortaleza para continuar en el proceso de obtener uno de mis anhelos más deseados.

A mis padres Manuel Tercero y Nubia Padilla, por su amor, paciencia, y sacrificios hechos en todos estos años, por inculcar en mí un ejemplo de esfuerzo y valentía para no temer a las adversidades porque Dios y ustedes estarán conmigo. Es para mí un privilegio y orgullo ser llamada su hija.

A mi hermana Andrea Tercero por el apoyo moral que me has brindado a lo largo de los años que hemos compartido juntas en esta vida, espero puedas ver en mí, al igual que en nuestros padres un apoyo y ejemplo a seguir, siempre esfuézzate y lucha por tus sueños. ¡Fighting!

A nuestra tutora Msc. Martha Xiomara Guerrero Delgado por ser nuestra constante guía en el proceso de este trabajo, a todas las personas que nos han apoyado, quienes abrieron sus puertas y compartieron sus conocimientos con nosotras.

Muchísimas gracias a todos y a cada uno de ustedes, les respeto y llevaré en el corazón.

Nubia Tercero Padilla

“El temor de Jehová es el principio de la sabiduría, y el conocimiento del Santísimo es la inteligencia”.

Proverbios 9:10

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, primeramente a nuestro padre celestial quien me brindó sabiduría, entendimiento, comprensión y fortaleza para finalizar una etapa más de mi vida, siendo él único, quien me impulsa a seguir adelante a pesar de las adversidades o pruebas que se nos presente en el camino.

A mi madre Martha Xiomara Guerrero Delgado, que con paciencia, amor, sacrificios, apoyo y valentía con lo que ha luchado en todos estos años para que salgamos adelante y que en mi en estén sus valores para seguir creciendo en las experiencias de vida y saber enfrentarlas, me enorgullece y agradezco mucho ser su hija.

A mi abuelita Josefa Delgado que me enseñó su gran sabiduría, todos sus experiencias, sus consejos, su espiritualidad sobre la palabra de nuestro padre celestial, y sobre todo que “si vas hacer algo, has lo bien y no a medias”. Ella fue y es grande a su manera.

A mi Michelle Velásquez Aguilar, que me ayudo a recolectar larvas y sobre todo que me apoyo a seguir en este trabajo investigativo y espero ser de ayuda y brindarle mi apoyo a ella en un futuro, así como ella lo fue; espero le sea de ejemplo.

A nuestra Tutora Msc. Martha Xiomara Guerrero Delgado por guiarnos, transmitir sus conocimientos y brindarnos su tiempo en nuestro trabajo investigativo, y paciencia para la ejecución y desarrollo de dicho estudio.

Soylen Medrano Guerrero

“Fortaleced las manos cansadas, afirmad las rodillas endebles”

Isaías 35:3

Agradecimientos

Por sobre todo a nuestro Dios por darnos la vida, sabiduría, inteligencia y fortaleza para llegar al final de esta tesis investigativa.

A nuestros padres, hermanas y familiares, por su apoyo y confianza e inspirarnos a dar lo mejor de nosotras al enseñarnos a luchar para alcanzar nuestras metas.

A Msc. Martha Xiomara Guerrero Delgado por su apoyo, paciencia, dedicación y compartir con nosotras sus conocimientos y enseñanzas para realizar esta tesis.

Al Ing. Víctor Monzón por aceptar trabajar con nosotras, apoyándonos y dedicando tiempo al recibirnos cuando fue necesario, por compartir sus conocimientos y enseñanzas en el transcurso del estudio.

A todo el personal del Área de Entomología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) por apoyarnos brindándonos el espacio que necesitábamos para realizar para desarrollar nuestros ensayos, así como el interés que depositaron en nuestro estudio, aconsejándonos diferentes técnicas las que han adquirido a lo largo de sus años en el campo laboral.

Al personal del de Docencia del Departamento de Bioanálisis Clínico quienes nos brindaron tiempo para la entrega de este estudio, así mismo por el interés que demostraron en la investigación.

Valoración del Especialista

El mosquito Aedes aegypti, es de gran importancia por ser el principal vector de enfermedades como el Dengue, Chikungunya, y el Zika en ambientes antrópicos, estando presente en áreas domiciliarias y peri domiciliarias, donde la única forma de evitar epidemias es a través del control del insecto vector, por lo cual a lo largo de los años se han utilizado diferentes plaguicidas donde a muchos de estos se les ha empleado excesivamente produciendo efectos negativos en el suelo, agua, ambiente y en la salud de los seres humanos, así como la resistencia del insecto al producto debido a que cada vez se requieren dosis altas.

Para reducir estos efectos se procura la implementación de sistemas o estrategias sostenibles y más saludables, basados en el conocimiento de las relaciones entre los cultivos, el ambiente y los organismos presentes en el campo. Una de las alternativas es el uso de hongos entomopatógenos, los cuales son microorganismos capaces de infectar y provocar enfermedades en insectos, causándoles finalmente la muerte, estos son específicos ya que no dañan organismos no blancos y tienen un efecto favorable en las plantas.

El propósito de nuestro estudio es ensayar hongos entomopatógenos para la formulación de bioinsecticidas, su concentración y viabilidad a partir de las cepas de Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae así mismo la efectividad y su eficacia para el control de Aedes aegypti ante la propuesta de la OMS de buscar otras alternativas para disminuir el número de casos de dengue, Chikungunya, y Zika como parte de la vigilancia epidemiológica

Por lo que hago constar que el estudio monográfico cumple con los requisitos metodológicos y científicos técnicos, como tutora avalo a los autores de la misma para la presentación y defensa ante el jurado calificador.

Msc. Martha Xiomara Guerrero D.
Msc. Ciencias Farmacéuticas con orientación en Biología clínica.
Lic. Bioanálisis clínico
Docente Titular, IPS– UNAN Managua

Resumen

Los hongos patógenos de insectos, conocidos como hongos entomopatógenos, penetran, invaden y se multiplican dentro del insecto provocando su muerte. Estos organismos fueron los primeros en identificarse como los causantes de enfermedades en los insectos, por lo tanto son estudiados para su utilización como bioinsecticidas; definiéndolos como cualquier organismo vivo (hongos, virus, bacterias, etc.) o sustancias sintetizadas por los mismos (toxinas), capaz de matar a los insectos.

Se realizó un estudio cuasi-experimental prospectivo de corte transversal, que tiene como finalidad el Ensayo de hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* POLISAL-UNAN-MANAGUA, Octubre 2017-Abril 2018.

El ensayo mostró para su formulación que los hongos entomopatógenos se encontraban en una viabilidad entre el 95%-98% en las concentraciones finales de 0.3 gr/ml, 0.2 gr/ml y 0.1 gr/ml. De los bioinsecticidas empleados el más efectivo fue *M. anisopliae* con la mayor concentración, 0.3 gr/ml, la cual obtuvo el 100% de mortalidad al 7º día, seguido por *B. bassiana* que alcanzó el 100% pero al 8º día, a diferencia del Conjugado de los mismos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) donde llegó al pico máximo de mortalidad hasta el 9º día tomando más tiempo en comparación de los otros; así mismo la buena eficacia de los bioinsecticidas ante el vector fue indicada a través de la Concentración letal media (CL50).

Se recomienda seguir promoviendo más investigaciones en el campo de la Micología en el uso de los hongos entomopatógenos como bioinsecticida y alternativa para el control del vector *A. aegypti* en larvas de III estadio, siendo este transmisor del virus del Dengue, Chikungunya y Zika, ya que estas presentan susceptibilidad a ellos.

1. Introducción

El aumento en la reproducción del vector *Aedes aegypti* ha ocasionado un crecimiento en el porcentaje de enfermedades transmitidas por este en los últimos años, como respuesta a esto se ha optado como medida preventiva atacar al mosquito con diversos químicos en el ambiente, sin embargo este ha adoptado resistencia a estos; los hongos entomopatógenos nos ofrecen una alternativa de control biológico, siendo muy eficaces en ello, además nos ofrecen medidas que reducen la contaminación ambiental y disminuyen los problemas de salud de la población.

Este estudio es reproducible, ya que es económico, por tal razón en otros países latinoamericanos se han creado programas agrícolas los cuales han ido demostrando a medida que las técnicas mejoran, el potencial de eficacia de los hongos entomopatógenos sobre diversos vectores responsables de enfermedades y destrucción de plagas en los campos, reduciendo no solo las pérdidas económicas en el sector agrícola como también las tasas de mortalidad por enfermedades como el Dengue, Zika y Chikungunya.

En Nicaragua, productores de café, repollo, plátano y chile dulce han logrado reducir el daño causado por las plagas mediante el uso de agentes microbianos (hongos y bacterias principalmente), sin afectar la salud humana ni el ambiente, manteniendo cosechas libres de plaguicidas sintéticos, sin embargo en el país no se cuenta con sistemas capaces de producir más alternativas, para reducir las plagas en los campos, tales como los hongos entomopatógenos, así como disminuir la reproducción del vector *Aedes aegypti* el cual se ha transformado en una de las principales problemáticas para el sector salud, debido a que estos están desarrollando diversos mecanismos estratégicos de evasión hacia los químicos con los cuales son tratados para su manejo y reducir las enfermedades transmitidas por el vector (Alas Marroquin, 2000) (Monzón, 2001).

2. Antecedentes

Vaquedano, L. 2006. En un estudio sobre, Efecto de la aplicación de hongos entomopatógenos para el control de plagas en el cultivo de pepino, en el Valle de Comayagua, Honduras. El objetivo de este estudio fue evaluar los hongos entomopatógenos, Bazam (*Beauveria bassiana*) y Metazam (*Metarhizium anisopliae*) para el control de *Diaphania hyalinata* y Verzam (*Lecanicillium lecanii*) y Bazam (*Beauveria bassiana*) para el control de áfidos (*Aphis sp.*) y mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en el Valle de Comayagua, Honduras, en la época seca en el cultivo de pepino. Con este estudio se concluyó que para el control de *Diaphania hyalinata*. En pepino se puede sustituir los productos químicos Spinosad, Indoxacarb y Methoxyfenozide con *B. bassiana* o *M. anisopliae*, ya que son igual de eficientes ($P=0.1771$), son más baratos y no se encontró diferencia en el rendimiento (Vaquedano Gamez, 2006).

Téllez A. & col. 2009. En México se realizó el estudio de la interacción hongo entomopatógenos–insecto que tiene por objetivo explorar los diferentes mecanismos de los hongos entomopatógenos para infectar a los insectos y los mecanismos que los insectos tienen para defenderse. El conocimiento de dichos procesos puede ayudar en el aislamiento, selección y mejora de cepas fúngicas para su utilización como agentes de control biológico y/o en el cuidado de especies benéficas de insectos (Tellez Jurado, Cruz Ramirez, Mercado, Asaff, & Arana, 2009).

Motta P. & Murcia B. 2010 -2011, la Universidad de Taubaté Brasil, realizaron un trabajo sobre “Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas”. El artículo describe los hongos entomopatógenos de mayor utilización para el control biológico de plagas, el mecanismo de acción de los mismos sobre su hospedero, así como investigaciones realizadas sobre el comportamiento *in vitro* e *in situ* de los hongos de mayor utilización para el control de ciertos insectos. De igual manera, se describe las formulaciones que se utilizan para el desarrollo de esta biotecnología en campo. En el desarrollo de bioplaguicidas los hongos entomopatógenos son una opción viable para disminuir el detrimento del medio ambiente (Motta & Murcia-Ordoñez, 2011).

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



García C. & col. 2012 Sinaloa, México, realizó un estudio sobre “Insecticidas biorracionales para el control de mosquito y moscas negras en Sinaloa” donde la presencia de mosquitos es un problema importante de salud, cada temporada de primavera-verano. Se presentan diversas especies entre las que destacan: *Aedes aegypti* (Linneus), *Anopheles albimanus* (Wiedemann), *Culex quinquefasciatus* (Say) y moscas negras de la familia *Simulidae*. En este trabajo se dan a conocer a los diferentes insecticidas biorracionales y su efecto biológico (inhibidor, repelente, larvicida, adulticida) que pueden ser utilizados para el combate de las diferentes etapas del desarrollo de estos insectos. Por su modo de acción, los biorracionales que se pueden utilizar para el control de estos insectos son: el Spinosad y *Bacillus thuringiensis* (Berliner) var. *israeliensis* para larvas, y para adultos Spinosad y *Beauveria bassiana* (Vuill.); así como los extractos de ajo, neem, canela y albahaca para ambas etapas. Los resultados preliminares del estudio de efectividad de biorracionales demostraron que la aplicación de cipermetrina abajas dosis y los extractos acuosos de las plantas, lograron bajar los índices de larvas en criaderos y la infestación poblacional de mosquitos y moscas negras en sitios turísticos, disminuyendo las molestias causadas por estos insectos en el lugar de estudio (García, Gomez, Lopez, & Leon, 2012).

Ardila Y. 2013. En la Universidad Nacional de Colombia se realizó el estudio: “Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre *Eurhizococcus colombianus* Jakubski (Hemiptera: Margarodidae), plaga de Mora (*Rubus glaucus* Benth.)”. En este estudio se evaluó la patogenicidad de 25 aislamientos nativos y comerciales de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus* en concentración de 10^7 conidias/ml sobre ninfas de primer instar de *E.colombianus*. Los resultados indican que el aislamiento *M. anisopliae* A778 es el más promisorio para la formulación de una estrategia de manejo de la Perla de Tierra Colombiana en sistemas productivos de Mora (Ardila Ríos, 2013).

Cisnero L. & col. 2014 presentaron un trabajo donde se evaluó la compatibilidad “*in vitro*” de dos hongos entomopatógenos nativos de Chiapas, *Gliocladium virens* y *Trichoderma longibrachiatum* con dos insecticidas comerciales: AquaReslin® Super y Anvil®, La compatibilidad se estimó mediante efectos en las variables de germinación conidial, crecimiento vegetativo y esporulación de cada uno de los hongos

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



entomopatógenos. La concentración de 1.5% del insecticida AquaReslin® Super con los hongos *G. virens* y *T. longibrachiatum*, fueron las mejores combinaciones que podrían ser propuestas como una estrategia integrada en el control de *Aedes aegypti*, el principal vector del Dengue en México (Cisnero, Rodriguez, Penilla, & Vázquez, 2014).

Alcalde J. & col .2014. El presente trabajo evaluó el efecto biocida de diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* CCB- LE302 y *Beauveria bassiana* CCB-LE265 sobre larvas III de *Aedes aegypti*, en condiciones de laboratorio. Las cepas de los hongos fueron obtenidos de SENASA. Las larvas de *A. aegypti*, procedentes del cerro Pesqueda, provincia y distrito de Trujillo, fueron mantenidas a temperatura 24 ± 2 ° C y humedad relativa $70 \% \pm 10$. Se diseñaron 8 grupos experimentales, 4 grupos control y 5 repeticiones de 20 larvas cada uno. Para *M. anisopliae* CCB-LE302, se utilizaron las concentraciones 2.5×10^7 ; 2.5×10^6 ; 2.5×10^5 y 2.5×10^4 conidios/ml; obteniéndose la CL50 y CL90 al 6to día de aplicación con 3.9×10^4 y 1.6×10^5 conidios/ml respectivamente, sobre larvas III de *A. aegypti*. Para *B. bassiana* CCB-LE265, se utilizaron las concentraciones 1.3×10^6 aplicación con 3.6×10^7 conidios/ml; 1.3×10^7 y 1.3×10^6 ; 1.3×10^5 y 1.3×10^4 conidios/ml; obteniéndose la CL50 y CL90 al 5to día. Se concluye que los hongos entomopatógenos ensayados presentan capacidad biocida (Alcalde Mosqueira, Roldán Rodríguez, Saravia Cueva, & Collantes Silva, 2014).

Aramillo J. & col. En el año 2015 se realizó el estudio: “*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo”. *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son usados para controlar la broca del café. Estudios previos demostraron que una mezcla de cepas diferentes genéticamente de *B. bassiana* era más virulenta que las cepas individuales. Para validar el efecto de esta mezcla y su combinación con *M. anisopliae*, se evaluó primero la virulencia en laboratorio y el efecto sobre la oviposición del insecto, lo cual resulto: en laboratorio, las cepas y mezclas causaron mortalidades sobre la broca entre el 91% y el 94% y la mezcla Cenicafé afectó la capacidad de oviposición del insecto hasta en un 87%. En campo, todos los tratamientos redujeron la infestación en los árboles entre el 18% y 47% respecto al testigo; se obtuvo máximo control con la mezcla Cenicafé más *M. anisopliae*; con porcentajes de broca inferiores al 6,6%, disminuyendo la población en los frutos infestados en un 40%. Las

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



aplicaciones periódicas de las cepas sobre frutos del suelo controlan la broca y disminuyen la progenie en los granos infestados (Góngora, Patricia, & Benavides, Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café, 2015).

3. Justificación

Los virus transmitidos por el mosquito *Aedes aegypti* son un serio problema de salud pública, debido a su alta incidencia en la población, *Aedes aegypti* presenta una amplia distribución principalmente en regiones tropicales y subtropicales.

Debido a que no hay un tratamiento específico y a una ausencia de vacunas a gran escala, el único método de controlar o prevenir la transmisión de los virus consiste en eliminar a los vectores por medios de insecticidas químicos, que entre ellos los más usados son los plaguicidas organofosforados y piretroides para el control de adultos y temefos para el control de larvas, mejorando las condiciones físicas de las viviendas, sin embargo, el uso indiscriminado de estos insecticidas sintéticos favorece la aparición de resistencia a la mayoría de estos productos disponibles en el mercado, además aplicando el método de distribución (fumigaciones) crean un riesgo de contaminación ambiental.

Es evidente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de control sobre el vector *Aedes aegypti*, como lo es la utilización de insecticidas naturales basados en uso de hongos entomopatógenos que a través de estudios se ha determinado la efectividad de estos. Por tal razón para esta investigación la producción de bioinsecticidas basados en el uso de hongos entomopatógenos resulta ser favorable para los diferentes sectores que año con año presentan problemas con el control adecuado de plagas y vectores, por lo cual su implementación en Nicaragua sería una solución viable debido a que la obtención de estos hongos es de bajo costo utilizando sustratos económicos como el arroz, su infectividad es específica y tienen mayor persistencia en el ambiente, por lo tanto a través de esta técnica se reducirían los problemas de salud en la población (Dengue, Zika y Chikungunya), beneficiando a los mismos.

4. Planteamiento del problema

El mosquito *Aedes aegypti*, es de gran importancia por ser el principal vector de enfermedades en ambientes antrópicos, este insecto hematófago tiene importancia médica y pecuaria, ya que toman su alimento del hombre, otros mamíferos y aves, está presente en áreas domiciliarias y peri-domiciliarias, donde la única forma de evitar epidemias es a través del control del insecto-vector, a lo largo de los años se han utilizado diferentes plaguicidas, de estos se les ha empleado excesivamente produciendo efectos negativos en el suelo, agua, ambiente y en la salud de los seres humanos, así también como la resistencia del insecto al producto debido a que cada vez se requieren dosis altas. El principal problema es su potencial como agente transmisor de enfermedades como el Dengue, Chikungunya y Zika.

Para reducir estos efectos se procura la implementación de sistemas o estrategias sostenibles y más saludables, basados en el conocimiento de las relaciones entre los cultivos, el ambiente y los organismos presentes en el campo. Una de las alternativas es el uso de hongos entomopatógenos, los cuales son microorganismos capaces de infectar y provocar enfermedades en insectos, causándoles finalmente la muerte, estos son específicos ya que no dañan organismos no blanco y tienen un efecto favorable en las plantas en las que se usan, los cuales tienen la capacidad de reducir las poblaciones de plagas como *A. aegypti*, *A. albimanus*, *C. quinquefasciatus* y simúlidos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 80 millones de personas se infectan anualmente, y cerca de 550 mil enfermos necesitan de hospitalización, 20 mil mueren como consecuencia de Dengue, más de 2.500 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y más de 100 países tienen transmisión endémica. Las tasas de letalidad registradas en algunos países americanos afectados oscilaron entre 5 al 15%. Se estima que para el año 2085 el cambio climático pondrá a 3.500 millones de personas en riesgo.

Por lo cual se hizo la siguiente pregunta:

¿Podrían utilizarse los hongos entomopatógenos como bioinsecticida para el control de *Aedes aegypti*?

4.1 Preguntas directrices

¿Cuál es la calidad de las cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en cuanto a su viabilidad, pureza y estabilidad morfológica?

¿Cuál es la concentración de conidias de los hongos entomopatógenos para la formulación de los bioinsecticidas?

¿Cómo comparar la efectividad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como bioinsecticida formulado para el control del vector?

¿Cómo se determinará los parámetros de eficacia del bioinsecticida frente al vector?

5. Objetivos

Objetivo general:

Ensayar los hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA, Octubre 2017-Abril 2018.

Objetivos específicos:

1. Verificar la calidad de las cepas de *Beauveria bassiana* -114 y *Metarhizium anisopliae monterosa* a través de la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica.
2. Determinar la concentración de conidias de las cepas en estudio para la formulación de los bioinsecticidas.
3. Comparar la efectividad de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como bioinsecticida formulado para el control del vector.
4. Determinar los parámetros de eficacia de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* frente al vector.

6. Marco teórico

6.1 Agente etiológico

Los primeros organismos que se identificaron como causantes de enfermedades en insectos fueron los hongos, debido a que era posible observar su crecimiento sobre el cuerpo de estos. Los hongos patógenos de insectos, conocidos como hongos entomopatógenos, penetran, invaden y se multiplican dentro de los insectos (Góngora, Patricia, & Benavides, 2009).

6.1.1 *Beauveria bassiana*

Se ha informado atacando a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de gran importancia agrícola. Entre las plagas más importantes controladas por este hongo están la broca del café, la palomilla del repollo y el picudo del plátano. Los insectos muertos por este hongo presentan una cubierta blanca algodonosa sobre el cuerpo, la cual está formada por el micelio y esporas del hongo (Monzón, 2001).

6.1.1.1 Taxonomía (Miranda Hernández, 2014)

<i>Beauveria bassiana</i>	Reino	Fungi
	Phylum	Ascomycota
	Subphylum	Pezizomycotina
	Clase	Sordariomycetes
	Orden	Hypocreales
	Familia	Cordycipitaceae
	Género	Beauveria
	Especie	Bassiana

6.1.1.2 Descripción morfológica de la colonia:

Es un hongo perteneciente a la clase de los sordariomycetes que en medio de cultivo específico (APD), crece formando una estructura algodonosa y polvosa de color blanco conocida como muscardina blanca. Cuando la colonia va envejeciendo se vuelve crema

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

amarillenta. El revés es de color rojizo en el centro cuando está en crecimiento y amarillo alrededor (Chirigaba, Gómez, & Garces, 2015).

6.1.1.3 Descripción microscópica:

Micelio septado, conidióforos de 1 a 2 μ de diámetro, de donde nacen conidios o esporas hialinas redondas y ovaladas de 2 a 3 μ de diámetro, que se insertan en el raquis (Chirigaba, Gómez, & Garces, 2015).

6.1.2 *Metarhizium anisopliae*

Este patógeno ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diversos órdenes. Algunas plagas que son afectadas por este hongo son la salivita de la caña de azúcar (*Aeneolamia* spp. y *Prosapia* sp.), y chinches plagas de diversos cultivos. Los insectos muertos por este hongo son cubiertos completamente por micelio, el cual inicialmente es de color blanco pero se torna verde cuando el hongo esporula (Monzón, 2001).

6.1.2.1 Taxonomía (Miranda Hernández, 2014)

<i>Metarhizium anisopliae</i>	Reino	Fungi
	Phylum	Ascomycota
	Subphylum	Pezizomycotina
	Clase	Sordariomycetes
	Orden	Hypocreales
	Familia	Clavicipitaceae
	Género	Metarhizium
	Especie	Anisopliae

6.1.2.2 Descripción morfológica de la colonia:

Las colonias generalmente están pegadas al medio, completamente redondas, de colores oliváceo, amarillento, verdoso o marrón oscuro dependiendo del proceso de aislamiento. El envés marrón, a veces verdoso cetrino (Galán Franco, 2012).

6.1.2.3 Descripción microscópica:

El conidióforo nace del micelio y es ramificado irregularmente con dos a tres ramas en cada septo; de 4 a 14 μ de longitud x 1.5 a 2.5 μ de diámetro. Sus fiálides cilíndricas en forma de clava, adelgazados en el ápice; miden 6 a 13 μ de longitud y 2 a 4 μ de diámetro. Las conidias pueden ser unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo que miden 3.5 a 9 de longitud x 1.5 a 3.5 μ de diámetro (Galán Franco, 2012).

6.1.3 Calidad de la cepa

El control de calidad comienza con la cepa e incluye las cepas de mantenimiento y la de producción. En ambos casos el principal objetivo es el conservar las cepas de los hongos entomopatógenos, preservando así las estabilidad morfológica, pureza y viabilidad por largos periodos de tiempo. Para conocer cada uno se describe así:

- Viabilidad: se define como la capacidad del microorganismo para multiplicarse en medio sólido formando una colonia.
- Pureza: tiene como finalidad establecer la proporción del agente biológico en la formulación e identificar los microorganismos contaminadores, contribuyendo a mejorar el proceso de producción y formulación de los entomopatógenos.
- Estabilidad morfológica: permite conservar el crecimiento y supervivencia de la estructura microbiana.

Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Dentro de estos métodos los más utilizados son la criocongelación y la liofilización (García y Uruburu, 2004). Sin embargo, se utiliza el método de conservación a corto plazo, lo que permite mantener cepas activas para su uso frecuente. La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido, para lo que se utilizan tubos con agar inclinado. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco.

En las cepas de producción deben evitarse los pases sucesivos, ya que se corre el riesgo de perder virulencia, un método que se usa frecuentemente para reactivar la acción insecticida del hongo es el pase del mismo por el insecto meta de donde posteriormente se reaisla la cepa. En este caso debe verificarse su pureza y las características principales que la identifican, y por supuesto el restablecimiento de su actividad biológica. El control de pureza y la actividad biológica de las cepas debe realizarse con la frecuencia necesaria para garantizar que mantenga las condiciones por las cuales ha sido seleccionada.

El control de calidad en la etapa de cepario debe realizarse con mucho rigor, debido a que es el inicio del proceso de producción, y la selección incorrecta de la cepa y del cultivo puro así como la presencia de contaminantes afectará los siguientes pasos del proceso, y por consiguiente la calidad y el rendimiento del producto obtenido (Monzón, 2001) (Castro Alfaro, 2014).

6.2 Epidemiología

6.2.1 Bioinsecticida

Esta palabra es un neologismo compuesto del griego βίος (bios= vida) y el latín insectus (insecto) y el elemento latino *-cida* (el que mata) (Etimologías, 2017). Definiendo así a los bioinsecticidas como cualquier organismo vivo (hongos, bacterias, virus, etc.) o sustancias sintetizadas (toxinas) por ellos, capaz de matar a los insectos.

6.2.2 Control biológico

Según (Lecuona, s.a) control biológico se define como la utilización o manejo de enemigos naturales u organismos benéficos nativos o introducidos (predadores, parasitoides, entomopatógenos, antagonistas, competidores, etc.) para reducir las poblaciones y efectos de las plagas (insectos, malezas, fitopatógenos, bioinsecticidas).

El hongo *Beauveria bassiana* es usado para el control de un gran número de insectos plagas y es la especie de entomopatógenos comercialmente más utilizados alrededor del mundo. *Metarhizium anisopliae*, al igual que *Beauveria*, es uno de los hongos entomopatógenos más comunes, con una distribución mundial. Una gran cantidad de

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



estudios de laboratorio ha mostrado el potencial de *M. anisopliae* como agente de control de mosquitos (Montoya Treminio, Maldonado Blanco, & col., s,a).

Viven naturalmente en el ambiente, suelos o en agua, así como también alojados en los mismos cuerpos de los insectos, causando su muerte en un plazo aproximado de cinco a siete días; con la posibilidad de propagar la enfermedad a otros insectos bajo condiciones favorables de temperatura y humedad (Chirigaba, Gómez, & Garces, 2015).

Según (Alean Carreño, 2003), la formulación del hongo es el proceso mediante el cual el ingrediente activo, es decir las conidias del hongo, se mezclan con materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes y otros aditivos. Estos materiales inertes ayudan a que el hongo se encuentre protegido al momento de la aplicación, evitar la sedimentación y la formación de grumos que tapen las boquillas (Delgado-Motta & Ordoñez-Murcia, 2011).

6.2.3 Modo de acción

Los hongos entomopatógenos actúan principalmente por contacto, cuando el hongo es capaz de penetrar el insecto e invadirlo, provocándole la muerte por micosis (Elosegui, 2006).

Para la multiplicación del hongo se necesita como sustrato de cultivo, un cereal, como lo es el arroz. El hongo posee crecimiento de color blanco característico en el caso de *B. bassiana*, por el contrario *M. anisopliae* se diferencia por poseer un crecimiento de color verde olivo. Al cabo de 15 días, se realiza la extracción de esporas del hongo que se encuentran en el arroz, utilizando agua con pH adecuado, ajustando una concentración de 1×10^8 esporas por ml de suspensión, la que debe ser diluida en agua limpia, para la aplicación a campo (Chirigaba, Gómez, & Garces, 2015).

El ciclo biológico de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* comprende dos fases: una patogénica y otra saprofítica. La fase de patogénesis ocurre cuando el hongo entra en contacto con el tejido vivo del huésped, y la saprofítica cuando el hongo completa su ciclo aprovechando los nutrientes del cadáver del insecto.

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



El proceso infectivo se completa en tres etapas: La primera etapa consiste en la germinación de los conidios emitiendo o no un tubo germinativo largo o corto, formando luego un apresorio. En este proceso juegan un rol importante los requerimientos nutricionales de las esporas y las condiciones ambientales presentes, observándose que *Beauveria* es más exigente en carbono y energía a comparación a *Metarhizium*. La penetración de las hifas del hongo es debido a una serie de transformaciones físicas y químicas; enzimas principalmente lipasas, proteasas y quitinasas, son producidas por la hifa ocasionándose una alteración de la cutícula, que facilita la entrada del hongo en el insecto. Un conidio puede germinar, sin embargo si no se dan las condiciones físicas, químicas y estímulos correspondientes no logra penetrar al hospedero. La duración de esta etapa es de 3 a 4 días.

La segunda etapa consiste en la invasión de los tejidos del insecto donde el hongo se multiplica, principalmente por gemación, produciendo formas miceliales libres y unicelulares llamadas blastosporas, generalmente antes que el hongo colonice totalmente el hemocele se da la muerte del insecto parasitado; esto se debe en gran parte a la acción de las toxinas quienes además actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del insecto. Estas pueden ser de dos tipos: a) macromoléculas proteicas y b) sustancias de bajo peso molecular. Las primeras son enzimas secretadas en cantidades significativas tanto en medios de cultivo como en el cuerpo del insecto. La serilproteasa y sulfidrilproteasa, han sido aisladas de *Metarhizium*; otras enzimas encontradas son lipasas, glicogenasas, amilasas y quitinasas. El segundo tipo corresponde a metabolitos secundarios, cuya producción es una propiedad genética de los hongos. Beauvericin, Beauveriloides, Bassianolide, Isarolide, Enniatinas y Oosporeina metabolitos aislados de *Beauveria*. Los nutrientes, pH, temperatura son factores que afectan la producción de estas toxinas, siendo las más comunes las destruxinas, demetildextruxina y protodextruxina.

Los síntomas de la enfermedad previos a la muerte son la pérdida de sensibilidad, incoordinación de movimientos y parálisis. La duración de esta etapa es de 2 a 3 días (SANIPRO, 2016).

Finalmente sigue la tercera etapa, que consiste en la esporulación del hongo después que las hifas atraviesan el integumento, si las condiciones son de alta humedad relativa, en un período de 24 a 48 horas ocurre la producción de esporas o conidias. Es en esta fase donde el insecto muerto adquiere una coloración característica de acuerdo al hongo, por ejemplo verde si es *Metarhizium* y blanco si es *Beauveria*, y el inicio de un nuevo ciclo al posarse los nuevos conidios sobre otros insectos (Monzón, 2001) (SANIPRO, 2016).

Para determinar la concentración de unidades infectivas presentes en el producto se realiza un conteo directo, para lo cual se emplean diferentes métodos, tal como:

- **Conteo en cámara:** se realiza usando un microscopio óptico y resulta un método muy eficaz, especialmente, cuando no es necesario usar el lente de inmersión. En este caso, el uso del contraste de fases facilita la visualización de las estructuras (Larrea Fernández, 2002).

6.2.4 Ventajas y desventajas de su aplicación

Se han desarrollado bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos para combatir múltiples plagas, ya que estos se multiplican y dispersan dentro del mismo cultivo favorecen la acción reguladora de la población insectos-plaga, sin embargo estos también poseen desventajas, debido a que son organismos vivos, su manejo y almacenamiento presentan limitaciones.

- **Ventajas**

→ Especificidad la cual varía considerablemente, algunos hongos infectan un amplio rango de hospederos y otros están restringidos a unos pocos o a una sola especie (García G., Cappello García, Leshner Gordillo, & Molina M., 2008).

→ Si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.

→ No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores.

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

→ Cuando el hongo no llega a causar la muerte directamente, se presentan efectos secundarios que alteran el normal desarrollo del ciclo de vida del insecto (Ibarra, Gamboa, Lopez, Medina, & Espejo, 2016).

→ Se pueden aplicar mezclas de hongos entomopatógenos con dosis sub-letales de insecticidas para lograr efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado (Gómez, Zapata, Torres, & Tenorio, 2014).

→ No se acumulan en la cadena alimenticia (Gómez, Zapata, Torres, & Tenorio, 2014).

→ No causan resistencia en la plaga, por lo que es una opción de manejo sostenible.

• **Desventajas**

→ Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta. Estas limitaciones están siendo contrarrestadas mediante el uso de aditivo (protectantes solares, aceites, anti-desecantes)

→ Requiere de condiciones de almacenamiento más exigentes que las moléculas inorgánicas, para evitar perder su patogenicidad (Ibarra, Gamboa, Lopez, Medina, & Espejo, 2016).

6.4 *Aedes aegypti*

6.4.1 Características

Aedes aegypti, es una especie tropical y subtropical originaria de África, ampliamente distribuida por el mundo. El mosquito *Aedes aegypti* vive en hábitats urbanos y se reproduce principalmente en recipientes artificiales. Son artrópodos de clase Insecta, orden Diptera, familia Culicidae y subfamilia Culicinae, que incluye los géneros *Aedes* y *Culex* (CEIP, 2016).

El adulto de *Aedes aegypti* tiene un dorso con bandas de color plateado o amarillo blanquecino sobre fondo oscuro y un dibujo característico en forma de lira en el dorso del tórax. El abdomen de la hembra tiende a ser puntiagudo en comparación al macho. Las patas están conspicuamente bandeadas y el último artejo de las patas posteriores es blanco.

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de los virus que causan el Dengue. Los seres humanos se infectan por picaduras de hembras infectadas, que a su vez se infectan

principalmente al succionar la sangre de personas infectadas. El virus infecta el intestino medio del mosquito y luego se extiende hasta las glándulas salivales en un período de entre 8 y 12 días; tras este período de incubación, el mosquito puede transmitir el virus a las personas al picarlas con fines exploratorios o alimentarios.

Vuelan pocos metros y pican de día en la vivienda junto a la que nacen. Cada hembra deposita relativamente pocos huevos (aproximadamente 140) durante una oviposición (puede haber 2 o más). Lo hace en colecciones de agua naturales o artificiales peridomiciliarias (charcos, tanques, cubiertas, recipientes descartables diversos, preferentemente de color oscuro) o en hoyos y cavidades de árboles y rocas. Los huevos pueden soportar la desecación durante un año y eclosionar tras unos 4 días de humedad (CEIP, 2016).

6.4.2 Ciclo de vida

El *Aedes aegypti* en condiciones naturales sobrevive un promedio de entre 15 y 30 días, su ciclo para poner huevos es de aproximadamente cada tres días. Su alimentación puede hacerla en cualquier momento (puede picar varias veces a las personas de una casa). Las proteínas en la sangre le son vitales para la maduración de los huevos.

Aedes aegypti tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: fase acuática con tres formas evolutivas diferentes (huevo, larva y pupa) y fase aérea o adulto (Catamarca, 2012).

- La fase acuática dura aproximadamente siete días, con rangos entre tres y doce dependiendo de la temperatura.
- Los huevos soportan la desecación hasta un año, por eso es muy frecuente encontrar grandes cantidades de larvas en las temporadas de lluvias, en diversos recipientes.
- El periodo de larvas comprende cuatro etapas evolutivas. El tiempo aproximado para pasar de una etapa a otra, es de aproximadamente 48 horas.
- El estado de pupa corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática. De ahí emerge (del agua) el mosquito que corresponde a la fase aérea.

- Una vez que los mosquitos hembras han emergido, buscan a los machos para copular y luego se alimentan con sangre para facilitar la maduración de los huevos. Realizan una postura cada 3 días y después de cada postura necesitan alimentarse con sangre.
- La sobrevivencia de los mosquitos adultos tiene un promedio de cuatro a ocho semanas, aunque puede variar por circunstancias climatológicas; la hembra sobrevive más tiempo que el macho y es más resistente a las variaciones de temperatura y humedad ambiental (Catamarca, 2012).

6.4.3 Enfermedades que transmite

Las hembras de este mosquito, que tiene por nombre *Aedes aegypti*, son el principal transmisor del Zika, el Dengue y Chikungunya, tres enfermedades que amenazan, hoy en día a la mayoría de los países de la región.

A los seres humanos les transmiten los virus las picaduras de hembras infectadas, que a su vez se contaminan al succionar la sangre de quienes tienen virus. En el momento de la picadura, estos mosquitos inyectan su saliva, la cual puede contener cuatro tipos de enfermedades: Zika, Dengue, Chikungunya o Fiebre amarilla.

De acuerdo con el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, este mosquito puede picar sin que nos demos cuenta ya que "se acerca por detrás y ataca en los tobillos y los codos". Normalmente prefieren picar a humanos, aunque a veces también atacan a perros y otros animales domésticos.

6.5 Parámetros

6.5.1 Efectividad

Se entiende por efectividad el logro de los resultados propuestos en forma oportuna. Es el óptimo empleo y uso racional de los recursos disponibles (materiales, dinero, personas), en la consecución de los resultados esperados. Es la conjunción de eficacia y eficiencia. Se le define como la óptima relación existente entre los productos, servicios o resultados alcanzados y el uso que se hace de los recursos.

Es necesario dejar bien claro que la eficiencia enfatiza en la óptima utilización de los recursos, en tanto que la eficacia se materializa en la obtención de resultados (Rojas, Jaimes, & Valencia, 2018).

6.5.2 Parámetros de Eficacia

6.5.2.1 Concentración letal media (CL50)

Es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado (Gamez Rojas & Ramirez Riveros, 2008).

La CL50 es el parámetro generalmente utilizado como criterio de eficacia de un insecticida, analizado de forma comparativa. Si la CL50 es baja será de mayor eficacia o mayor susceptibilidad el insecticida estudiado (Delgado Puchi, 2014).

6.5.2.2 Coeficiente de determinación (R^2)

El coeficiente de determinación también llamado R^2 , se define como la proporción de la varianza total de la variable explicada por la regresión; esta refleja la bondad del ajuste de un modelo a la variable que pretende explicar.

Es importante saber que el resultado del coeficiente de determinación oscila entre 0 y 1. Cuanto más cerca de 1 se sitúe su valor, mayor será el ajuste del modelo a la variable que estamos intentando explicar. De forma inversa, cuanto más cerca de cero, menos ajustado estará el modelo y, por tanto, menos fiable será. (López, 2017)

$$R^2 = \frac{\sum_{t=1}^T (\hat{Y}_t - \bar{Y})^2}{\sum_{t=1}^T (Y_t - \bar{Y})^2}$$

7. Diseño metodológico

7.1 Tipo de estudio:

- Cuasi-experimental-prospectivo de corte transversal.

Según (Hernández Sampieri & Fernández Collado, 2010), los diseños cuasi-experimentales también manipulan deliberadamente una variable independiente, para observar su efecto y relación con una o más variables dependiente. También que los sujetos no se asignan al azar a los grupos ni se emparejan, sino que dichos grupos ya están formados antes del experimento.

7.2. Área de estudio:

- ✓ Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-MANAGUA) ubicada de la Rotonda Universitaria 1 km al Sur, Villa Fontana, Managua
- ✓ Universidad Nacional Agraria (UNA), laboratorio de Hongos entomopatógenos; ubicado en carretera norte Km 12 ½.
- ✓ Centro Nacional de Referencia (CNDR). Se encuentra en el costado oeste, Colonia Primero de Mayo.

7.3. Universo, muestra y tamaño de la muestra:

- Universo: Larvas del vector *Aedes aegypti*
- Muestra: larvas de estadio III del vector *Aedes aegypti*
- Tamaño de la muestra: 900 larvas de estadio III del vector *Aedes aegypti*.
El tamaño de la muestra fue seleccionado en base al método que se aplica y que planteo la Red latinoamericana de Control de vectores (Bisset, y otros, 2005).

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

Se realizó un ensayo de 4 réplicas por cada bioinsecticida formulado más la combinación de los mismos. Detallándose a continuación:

*720 larvas de estadio III, divididas por cada replica dan un total de 240 larvas, de las cuales 80 se les aplicará bioinsecticida formulado (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y el Conjugado) fraccionado en 3 concentraciones (alta, media, baja) utilizando 20 larvas, disponiendo de 20 testigo control por cada repetición, dando un total de 60 testigo. De manera que se utilizó un total de 900 larvas de *A. aegypti*.

ENSAYOS							
Bioinsecticida	Larvas expuestas			Larvas no expuestas			Total
	Concentraciones			Testigos			
	1	2	3	1	2	3	
B.F <i>Beauveria bassiana</i>	80	80	80	20	20	20	300
B.F <i>Metarhizium anisopliae</i>	80	80	80	20	20	20	300
B.F Conjugado B.b + M.a	80	80	80	20	20	20	300
	240	240	240	60	60	60	900

CONCENTRACION MAYOR						
Bioinsecticida	Larvas expuestas				Larvas no expuestas	Total
	Réplicas				Testigos	
	1	2	3	4	1	
B.F <i>Beauveria bassiana</i>	20	20	20	20	20	100
B.F <i>Metarhizium anisopliae</i>	20	20	20	20	20	100
B.F Conjugado B.b +M.a	20	20	20	20	20	100
	60	60	60	60	60	300

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes*

***aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA**

CONCENTRACION MEDIA						
Bioinsecticida	Larvas expuestas				Larvas no expuestas	Total
	Réplicas				Testigos	
	1	2	3	4	1	
B.F <i>Beauveria bassiana</i>	20	20	20	20	20	100
B.F <i>Metarhizium anisopliae</i>	20	20	20	20	20	100
B.F Conjugado B.b +M.a	20	20	20	20	20	100
	60	60	60	60	60	300

CONCENTRACION BAJA						
Bioinsecticida	Larvas expuestas				Larvas no expuestas	Total
	Réplicas				Testigos	
	1	2	3	4	1	
B.F <i>Beauveria bassiana</i>	20	20	20	20	20	100
B.F <i>Metarhizium anisopliae</i>	20	20	20	20	20	100
B.F Conjugado B.b +M.a	20	20	20	20	20	100
	60	60	60	60	60	300

• Criterios de inclusión:

**Aedes aegypti* (larva estadio III) cumpla con las características morfológicas requeridas:

- Características de las larvas de estadio III: su cuerpo se divide en cabeza, tórax ovoide y su abdomen consta de 9 segmentos, su sifón es corto y ancho, tiene dos espinas prominentes laterales, en cada lado del tórax, fotofóbicas y su movimiento es serpentiforme muy marcado (Gutierrez Huamán & col., 2017).

*Calidad de la cepa y características del hongo *Beauveria bassiana* para el desarrollo del bioinsecticida fúngico.

*Calidad de la cepa y características del hongo *Metarhizium anisopliae* para el desarrollo del bioinsecticida fúngico.

7.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de la información

- **Cultivo puro de los hongos entomopatógenos:**

Del campo se recolectan insectos micosados o sospechosos de micosis (insectos melanizados y/o momificados); estos se desinfectaron suavemente en etanol al 70% o hipoclorito sódico por 1 minuto al 0.5% y/o alcohol al 70%. Se realizó siembras en medios para hongos como Agar Papa Dextrosa (APD) o Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) con antibióticos y se incubo a 23-27 grados ⁰C, revisando el material luego de 72 horas y hasta 14 días posteriores a la siembra.

- **Dilución seriada:**

El aislamiento por dilución seriada es el método más utilizado, consiste en colocar un insecto esporulado en un recipiente que contiene 10 ml de agua destilada estéril con 1 gota de Tween 80 al 0.1%. La suspensión resultante se debe agitar bien por 1 min, para que las conidias se desprendan del cuerpo del insecto. Como resultado se obtiene una suspensión concentrada del inóculo más otras partículas; esta suspensión es la solución madre. A partir de esta solución, se preparan diluciones en serie (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). La primera dilución (10^{-1}) se obtiene transfiriendo con una pipeta estéril 1 ml de la solución madre a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con 1 gota de Tween 80 al 0.1%, este se agita fuertemente durante 1 min. Luego se coloca 1 ml de esta suspensión en otro tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril más 1 gota de Tween 80 al 0.1%, obteniendo así la segunda dilución. Esta operación se repite varias veces hasta lograr obtener una serie de diluciones (10^{-1} hasta 10^{-6}). Para realizar la siembra y obtener los cultivos del hongo se deben usar las últimas diluciones (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}), se seleccionan estas diluciones ya que en estas se facilita el conteo de las conidias (Monzón, 2001).

- **Recuento de conidias**

Recuento de conidias o porcentaje de germinación, su objetivo es obtener la concentración del hongo, a partir de la cual se preparan las dosis a utilizar en el campo (Monzón, 2001). Para la identificación del número de esporas a colocar en la formulación se realizó un conteo con cámara de Neubauer de la esporulación de los hongos entomopatógenos en crecimiento.

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



Para el conteo de conidias se preparan diluciones en serie $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}$ y 10^{-6} con el fin de obtener una que permita realizar el conteo. La primera dilución la obtenemos pesando 1gr del hongo y colocándolo en 9 ml de agua destilada estéril en un tubo de ensayo, se agrega 1 gota de Tween 80 al 0.1% para homogenizar la solución, posteriormente, para obtener la siguiente dilución se transfirió con una pipeta estéril 1 ml de la primera dilución en el siguiente tubo con 9 ml de agua destilada estéril, se colocó al final 1 gota de Tween 80 al 0.1% y agitamos, se continua haciendo este proceso hasta llegar a la dilución 10^{-6} de la cual tomamos 1 ml y lo descartamos.

Se seleccionó las diluciones $10^{-4}, 10^{-5}$ y 10^{-6} para realizar el conteo conidial en cámara de Neubauer. Esta es una placa de cristal que tiene dos cámaras de 0.1 mm de profundidad. Cada cámara está dividida en nueve cuadrados de 1 mm^2 , adicionalmente, el cuadrado del centro llamado Retículo de Thomas está subdividido en cinco por cinco cuadrados agrupados, de los cuales en los cuatro cuadrantes esquineros y uno del centro se utilizaron para el conteo de las conidias. Se debe tomar en cuenta el hecho de que la cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados, lo cual es importante para definir cuáles son las conidias que se encuentran en el límite y que deben ser contadas. Generalmente se cuentan las conidias que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no así las conidias que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda. (Cañedo & Ames, 2004)

A partir de las diluciones antes mencionadas con una micropipeta se tomó $10 \mu\text{l}$ de la suspensión, se colocó en la cámara y luego en el microscopio, para observar las estructuras conidiales con el lente objetivo 40x, finalmente anotamos la cantidad encontrada, determinando la concentración de conidias con la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de } \frac{\text{conidias}}{\text{ml}} = \frac{\bar{X}}{f.d \times f.c}$$

Donde \bar{X} : es el total de número de conidias encontradas

f.d: factor de dilución empleado

f.c: número de cuadros contados

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



• **Colonia de *Aedes aegypti***

Para el desarrollo de los diferentes ensayos de susceptibilidad se emplearon larvas de *A. aegypti* provenientes de la colonia de cría mantenida en las instalaciones del departamento de Entomología, CNDR, la cual fue iniciada a partir de las larvas recolectadas en barriles y jarrones del Cementerio General. La cría de mosquitos se realizó siguiendo la metodología propuesta en el Manual de Indicaciones para Insectarios (Pérez, y otros, 2004).

El insectario en donde se desarrolló, la colonia contó con el equipamiento necesario para el control y manipulación de la temperatura, humedad y fotoperiodo, permitiendo el buen desarrollo de las poblaciones.

Para la cría de mosquitos resulta importante lograr un clima estable con temperatura y humedad óptima, por lo cual muchos investigadores coinciden que la temperatura debe oscilar entre 24-28 °C y 70-80% de humedad relativa (Pérez, y otros, 2004).

Fueron recolectados en las jaulas de cría, debido a la oviposición de las hembras en papel filtro de 12 cm de diámetro los cuales eran colocados en vasos de ovipostura. Estos vasos de ovipostura son pequeños vasos de vidrio pintados de color negro a los cuales se les añadía agua limpia por debajo de la mitad de capacidad y se les introducía 2 papeles filtros, estos eran reemplazados 1 vez por semana o bien cuando era necesario (Fig.6).

Los papeles con posturas pasan por el proceso de maduración del embrión, donde es necesario ser dejados por 24 horas a temperatura ambiente con el objetivo de que se sequen y se complete dicho proceso (Fig.5), si este se asegura entonces los huevos resisten la desecación por periodos de 6 meses a 1 año.

Posteriormente se envuelven en papel aluminio debidamente rotulados con la fecha en el que fue colocado y retirado, almacenándolos en recipientes herméticos de plásticos para evitar la acción de hormigas depredadoras (Fig.6) (Pérez, y otros, 2004).

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



Para la eclosión de los huevos, los mismos se deben colocar en agua declorada a temperatura ambiente y dejar en reposo 24 horas en un recipiente cerrado y protegido con una malla pequeña para evitar que se introduzca algún mosquito fugado.

- **Larva**

En este estudio los huevos fueron activados en palanganas de 25x 25 cm² con agua (Fig.5), de donde emerge una larva de primer estadio, cuyo tamaño es de 1 mm al inicio y al final, de 7mm, la cual pasa por tres estadios más (II, III, IV).

Se les adiciono entre 3-4 pequeñas piezas de alimento para ratones como fuente de alimento diario, así mismo se les cambio agua cada vez que se comenzaba a tornar amarilla a causa del alimento. Se estima que durante el período larvario cada larva debe consumir en total de 3 - 6 mg de alimento y consideran que este período del mosquito es sumamente importante, debido a que en esta etapa ellos almacenan proteínas y glicógeno, que son fundamentales para el desarrollo de los estadios de pupa y adulto (Pérez, y otros, 2004).

- **Pupas**

Las pupas que se encontraban diariamente en las palanganas eran extraídas con pipetas plásticas de boca ancha y se introducían en los vasos de oviposura en las jaulas de crianza. El periodo de pupa no requiere alimentación, sólo se describe como un periodo de reposo en el cual la pupa se mantiene respirando y con movimientos en forma de saltos.

- **Adulto**

Para que emerjan los adultos, los vasos de oviposición que contienen las pupas deben ser colocadas dentro de esta jaula. Las jaulas de crianza pueden ser fabricadas por diferentes materiales tales como madera, metal galvanizado o plástico. En este estudio utilizamos una de plástico recubierta con una malla del mismo material con medidas de 15.5 cm³, en la parte frontal poseía un orificio con una manga de seda de 20 cm de largo por donde se realiza el manejo interno de la colonia. Debe destacarse que la población de mosquitos

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



debe ser proporcional al tamaño de las jaulas para asegurar una adecuada reproducción y una buena producción de huevos con el propósito de perpetuar la especie (Fig. 8).

Para satisfacer la demanda alimenticia de los machos se colocaban soluciones azucaradas al 10% en algodón húmedo los cuales eran reemplazados una vez por semana (Fig.8) debido a que las hembras grávidas depositan huevos en las mismas, además de constituir una fuente de contaminación si se dejan por más tiempo, por el contrario las hembras son alimentadas con ratones, los cuales se inmovilizan poniéndolos en pequeñas jaulas sobre trozos de algodón, ya que los ratones pueden defecar u orinar (Fig.8). Esta rutina debe realizarse día por medio o bien diariamente según la cantidad de hembras que contenga la colonia en ese momento o bien con el objetivo de acelerar la producción de generaciones/huevos, por un lapso de tiempo de 2 horas.

• **Viabilidad**

❖ **Materiales**

Platos petri, láminas cubre y portaobjetos, APD (Agar Papa Dextrosa), balanza, papel para pesar, cucharas, mechero, erlenmeyer, microscopio, hot-plate, magnetos, papel toalla, piseta con agua destilada, tubo de ensayo (para hacer los trozos de agar), micropipetas (100µl-500µl) y puntas.

• **Preparación de Agar Papa Dextrosa (APD)**

Se pesó 7.8 gr APD para 200 ml de agua destilada en un erlenmeyer y se situó en el hot-plate, con el fin de homogenizar la mezcla se colocaron magnetos en el interior del erlenmeyer, posteriormente este se introdujo en autoclave por 15 minutos para esterilizar el APD y se dejó atemperar hasta que alcanzo una temperatura adecuada evitando que se solidificase.

• **Preparación de las diluciones**

Las diluciones de los hongos entomopatógenos se prepararon agregando 9ml de agua destilada y 1g de los hongos (M.a y B.b). Estas se realizaron desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , sin

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



embargo fueron las tres últimas diluciones las que se utilizaron (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), para las siguientes técnicas:

- **Microcultivo**

En un plato petri se colocó un trozo de papel toalla y sobre este dos láminas portaobjeto colocadas en forma de cruz, se ubicó el trozo APD, y se inoculó con 100 μ l de la dilución 10^{-3} ; de igual manera se realizaron los demás cultivos con sus respectivas diluciones (10^{-4} y 10^{-5}); posteriormente sobre el agar se situó la lámina cubreobjeto, y con sumo cuidado con ayuda de una piseta con agua destilada se humedeció el papel, creando así un ambiente de cámara húmeda, para finalmente incubar a temperatura ambiente por 24 hrs; transcurrido el tiempo se tomó el cubreobjetos y colocándolo sobre un portaobjeto con una gota Azul de lactofenol fue observado al microscopio.

- **Gota de agar**

En un plato petri se colocó un trozo de papel toalla y sobre este dos láminas portaobjeto colocadas en forma de cruz, se dispuso 100 μ l de APD esperando se solidificara, a continuación se inoculó 100 μ l de la dilución 10^{-3} , de igual manera se procedió a realizar con las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} , se situó un cubreobjetos sobre el agar, posteriormente con una piseta se humedeció el papel toalla y se incubó por 24 hrs a temperatura ambiente. Finalmente se realizó la lectura situando el cubreobjeto sobre una lámina portaobjetos con Azul de lactofenol, y se observó al microscopio.

- **Procedimiento de aplicación bioinsecticida**

- ❖ **Materiales**

Agua destilada, Tween 80 al 0.1%, balanza, papel para pesar, espátulas, parafilm, probetas y beakers de 50ml y 40ml.

- **Formulación de los bioinsecticidas**

Se pesó 1.5 gr de hongo entomopatógeno para 5 ml de agua destilada, obteniendo así la dilución 0.3 gr/ml (concentración mayor), luego 1 gr de hongo para 5 ml de agua

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



destilada, obteniendo así la dilución 0.2 gr/ml (concentración media), finalmente se pesó 0.5 gr del hongo para 5 ml de agua destilada, obteniendo así la dilución 0.1 gr/ml (concentración baja).

Las cantidades pesadas de los hongos entomopatógenos y agua destilada se depositaron en los erlenmeyer, agregándose 1 gota de Tween 80 al 0.1% en cada una de las diluciones, homogenizamos con ayuda de la espátula y cubriéndose con un trozo de parafilm se transportó en cada de frío cadena de frío para su aplicación. Este procedimiento se realizó para cada hongo entomopatógeno estudiado y el Conjugado de los mismos.

• **Ensayo de susceptibilidad**

❖ **Materiales**

Micropipeta de 1000 μ l, beakers de 250 ml y 40 ml, larveros, probetas, papel aluminio, espátulas, hidrógrafo, agua destilada y etanol.

• **Aplicación del bioinsecticida**

Se prepararon un total de 15 beakers, divididos en 3 beakers para control y 12 beakers para las larvas tratadas con los bioinsecticidas.

• **Procedimiento para los controles**

Se etiqueto cada beaker control según la concentración que correspondía. En 174 ml de agua destilada depositados en el beaker se agregó 1 ml de etanol, homogenizamos y posteriormente en un beaker más pequeño se colocó en 25 ml de agua destilada 20 larvas de estadio III, para ser transferidas al beaker que contenía los 174 ml de agua destilada. Finalmente cubrimos el beaker con una pieza de papel aluminio y se deja a distancia de los tratados con bioinsecticida para evitar la contaminación. La lectura de los beaker controles se realizó cada 24 horas.

• **Procedimiento de larvas tratadas con bioinsecticida**

Un total de 12 beakers fueron etiquetados según las concentraciones y numeraciones que correspondían; dividiéndose de la siguiente manera: 4 Beaker para la concentración

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



mayor, 4 Beaker para la concentración media, 4 Beaker para la concentración menor. (Este proceso se realizó para cada uno de los hongos entomopatógenos y el Conjugado de los mismos).

174 ml de agua destilada se colocaron en los beakers rotulados, se añadió 1 ml del bioinsecticida, homogenizamos, y luego se dejó reposar entre 10-15 minutos; posteriormente se añadieron 20 larvas de III estadio en 25 ml de agua destilada, se cubrió el ensayo con piezas de papel aluminio para evitar alguna contaminación. La lectura de cada una de las réplicas se efectuó cada 24 hrs; esta consistía en extraer con un larvero las larvas muertas en el día, y se depositaban en los platos petri rotulados con la concentración y número de beaker correspondiente (Cámara húmeda).

- **Cámara húmeda**

- ❖ **Materiales**

Platos petri de 35x10 mm, papel toalla, larveros, y piseta con agua destilada.

- **Procedimiento**

En cada uno de los platos petri se colocaron piezas de papel toalla, las cuales se humedecieron con agua destilada. Con ayuda de un larvero se extrajeron cada una de las larvas muertas, estas fueron depositadas en los platos petri según la concentración y el número de beaker al que correspondían. Se incubó por 24 horas a temperatura ambiente y se procedió a realizar la observación al estereoscopio.

El propósito de realizar el método de cámara húmeda es crear el ambiente adecuado tanto de humedad como de temperatura, para que el hongo entomopatógeno pueda desarrollarse de tal manera que al momento de realizar la observación de la larva, el hongo no solo se perciba en el intestino de esta, sino que también el micelio con el color característico de los hongos ensayados sea observado cubriendo el cuerpo larval.

- **Observación o lectura al estereoscopio**

Se colocó la placa petri con las larvas bajo el lente de 10x en el cual puede observarse completamente la estructura larval, sin embargo para observar a detalle las características

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



y daños sufridos en la larva, se enfocó con el lente objetivo 40x. Se tomaron fotos como evidencia del daño causado en las larvas muertas por los hongos entomopatógenos y el conjugado, así mismo de las larvas controles.

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes*

***aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA**



			germinativo	<p>Raquis: hasta de 20μ de longitud y 1μ de diámetro, denticulado sostiene una conidia en cada denticula.</p> <p><i>M. anisopliae</i> Conidióforo 1.5 a 2.5 μ de dm. Fiálides cilíndricas en forma de clava, de 6 a 13 μ de longitud y 2 a 4 μ de dm. Conidia unicelular, cilíndrica y truncada.</p>
Concentración de las conidias para la formulación del Bioinsecticida Fúngico	<i>Beauveria bassiana-114</i> y <i>Metarhizium anisopliae monterosa</i>	Concentración Mayor Concentración media Concentración Menor	Recuento de conidias /g Recuento de conidias/ml	Diluciones seriadas Conteo en cámara de Neubauer
Comparación de Efectividad de los hongos como bioinsecticida fúngico.	<i>Beauveria bassiana-114</i> <i>Metarhizium anisopliae monterosa</i> Conjugado de <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i>	No de Larvas muertas de <i>Aedes aegypti</i> por : Concentración Mayor Concentración media Concentración Menor del bioinsecticida	98-100% susceptibles 80-98% valores de vigilancia <80% resistentes	Mortalidad del vector frente al bioinsecticida fúngico a diferentes concentraciones

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes*

***aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA**



		No de larvas muertas de <i>Aedes aegypti</i> según tiempo de exposición días 1, 2, 3, 4,5 días 6, 7, 8, 9,10	98-100% susceptibles 80-98% valores de vigilancia <80% resistente	
Determinación de parámetros de eficacia	Bioinsecticida fúngico	Concentración letal media Coeficiente de determinación	Mayor susceptibilidad o menor susceptibilidad $0 \leq R^2 \leq 1$	Cantidad de <i>Aedes aegypti</i> colonizados

7.6 Procedimiento para la recolección de la información

Se elaboraron 2 fichas de registro para la recolección de los datos. La ficha 1 para la formulación de bioinsecticida, está compuesta por 9 ítems, los que estaban conformados por: identificación del hongo entomopatógeno, cepa fúngica del hongo, la fuente, condiciones de crecimiento, almacenamiento y conservación, así como las características macroscópicas y microscópicas, las cuales fueron evidenciadas a través de la descripción teórica e imágenes de las cepas.

La ficha 2 está basada en la efectividad de la formulación del bioinsecticida, está conformada por un total de 12 ítems los que incluyen: el número de ensayo, el área de estudio, la fecha de inicio y terminación del ensayo, número de día, fecha y hora de lectura, la cantidad de larvas expuestas al control y al bioensayo, así como la cantidad de larvas muertas por día y el porcentaje de mortalidad.

7.7 Plan de tabulación y análisis

Para la recopilación de la información se utilizó Microsoft Office Word 2013, así mismo se hizo uso del programa Microsoft Office Excel 2013 para el procesamiento de los datos, elaboración de tablas y gráficas, y con el uso de la tabla PROBIT en este procesador se calculó la concentración letal media (CL50), por último Microsoft Office PowerPoint 2013 para la exposición de los resultados encontrados en la investigación.

8. Análisis y Discusión de los resultados

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* para la formulación de los bioinsecticida, Managua, Octubre 2017-Abril 2018.

Hongos entomopatógenos	Porcentaje de Viabilidad		
	Diluciones		
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
<i>Metarhizium anisopliae</i>	95.5%	98.8%	96.5%
<i>Beauveria bassiana</i>	98.2%	96.3%	97.7%

Fuente: Laboratorio de hongos entomopatógenos, UNA

Para elaborar la formulación de los bioinsecticida se debe tomar en cuenta el rendimiento del hongo entomopatógeno, para lo cual debe obtenerse la viabilidad, pureza, estabilidad morfológica y concentración (número de conidias). En este caso el porcentaje de viabilidad que se obtuvo fue de 95% - 98% en ambos hongos entomopatógenos, lo que concuerda con (Monzón, 2001) quien afirma que para que un hongo pueda ser formulado, la viabilidad de este no debe ser menor de 95%. En la pureza se obtuvo de un 95 a 98% en los cultivos, los hongos entomopatógenos que se utilizaron fueron obtenidos de cultivos monospóricos lo cual garantiza su autenticidad y pureza de los mismos, por lo cual coincidimos con que las formulaciones comerciales deben tener un porcentaje de pureza superior al 90% según (Castro Alfaro, 2014).

En la estabilidad morfológica se obtuvieron las siguientes características en los hongos entomopatógenos: en *B. bassiana* su colonia fue algodonosa y polvorienta de color blanco, microscópicamente se observó conidias hialinas, redondas y ovaladas e hifas septadas (Ficha 2) lo que coincide con (Chirigaba, Gómez, & Garces, 2015); para *M. anisopliae* su colonia es pegada al medio de cultivo, redonda y de color oliváceo, al observarla al microscopio es ramificado de 2 a 3 ramas en los septos, sus conidias son cilíndricas, en forma de cadenas largas y de color oliváceo (Ficha 1) ajustándose a las descripciones por (Galán Franco, 2012).

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

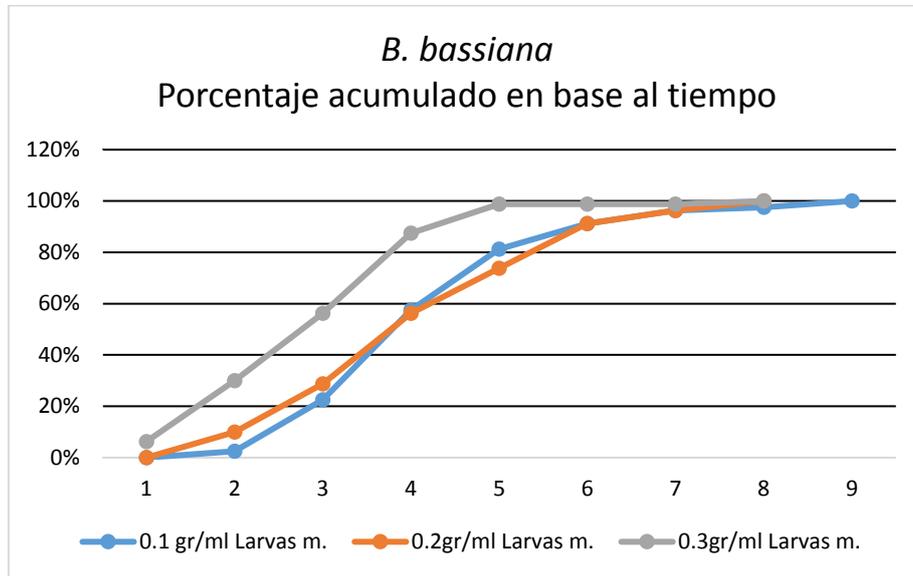


Con respecto a la concentración para la formulación del bioinsecticida se determinó la cantidad de conidias/gr para conocer el rendimiento del hongo; *B. bassiana* obtuvo las siguientes lecturas: 3.45×10^{10} conidias/gr, 2.1×10^{11} conidias/gr y 3.46×10^{12} conidias/gr, por su parte *M. anisopliae* obtuvo: 4.4×10^{10} conidias/gr, 6×10^{10} conidias/gr y 2.9×10^{10} conidias/gr, esto coincide con (Monzón, 2001) quien manifiesta que el rendimiento está determinado por la cepa y por el estado de la misma, la cual varía desde 5×10^3 hasta 2.5×10^{11} conidias/gr.

A partir de estas concentraciones calculadas, las que se encontraban en las unidades conidias/ gr, se pasaron a gr/ml para la aplicación final sobre las larvas de estadio III del vector, dando como resultado las siguiente dosis para ambos hongos más el conjugado de los mismos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*): 0.1gr/ml (concentración baja), 0.2gr/ml (concentración media), 0.3gr/ml (concentración alta) (Tabla 2).

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

Gráfica 2. Efectividad de *Beauveria bassiana* como bioinsecticida formulado para el control del vector.



Fuente: Tabla 3

Esta gráfica muestra el comportamiento de la densidad poblacional, conteniendo las tres concentraciones de *B. bassiana* utilizadas contra larvas de *Aedes aegypti*. La concentración 0.1 gr/ml comienza a mostrar mortalidad al 2º día con un 3%, al igual que esta la concentración 0.2 gr/ml presenta mortalidad al 2º día con un 10%, en cambio la concentración 0.3 gr/ml inicia con un 6% al 1º día y alcanza un 30% al 2º día. En un periodo total de 9 días las concentraciones 0.2 gr/ml y 0.3 gr/ml alcanzaron el 100% de mortalidad al 8º día, por el contrario 0.1 gr/ml alcanzó el 100% en el 9º día.

La presencia del hongo en la larva hizo evidente la aparición de algunos síntomas (Figura 9) tales como: separación de la cabeza del tórax debido a la flacidez del cuerpo, deshidratación, crecimiento del micelio de color blanquecino y cambio a color rosa en el tegumento, síntomas que coinciden con los obtenidos por (Alcalde Mosqueira, Roldán Rodríguez, Saravia Cueva, & Collantes Silva, 2014). Estos síntomas fisiológicos y posterior muerte de la larva se atribuyen a la toxicosis que enfrenta, donde los puntos de infección que se reportan son los lóbulos perispiraculares en el ápice del sifón y la ingestión por vía oral, ya que se observaron en el intestino larval conidias a las 24 hrs

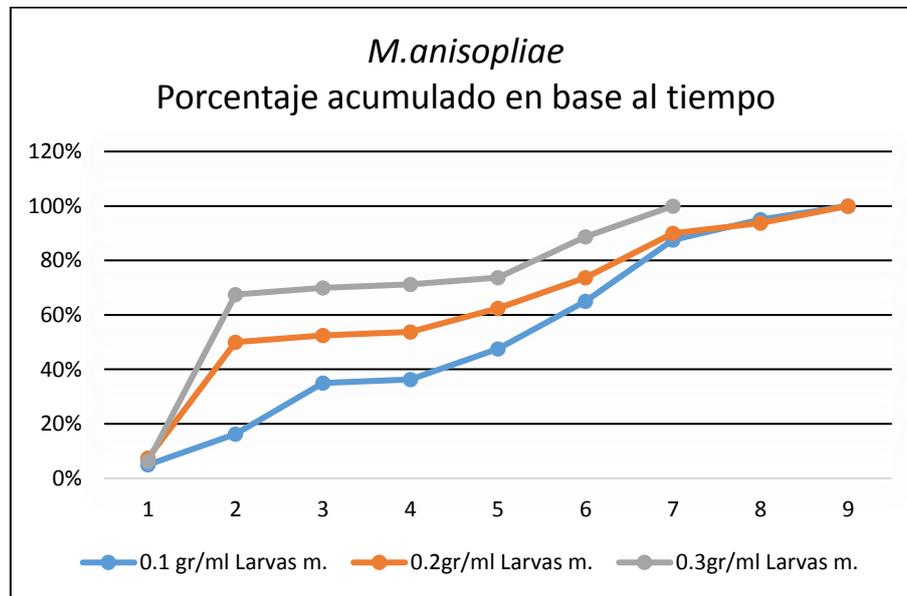
Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



posteriores a la exposición (Fig.9-10) lo que coincide con lo observado por (Miranpuri & Khachatourians, 1990).

Se encontró que todas las concentraciones tuvieron actividad tóxica contra las larvas del vector *A. aegypti* aunque dicha virulencia en las 2 últimas concentraciones empleadas, 0.2 gr/ml y 0.3 gr/ml no fue significativa. (Miranpuri & Khachatourians, 1990) emplearon contra diferentes grupos de edad de *A. aegypti*, conidias y blastoconidias de *B. bassiana* donde la actividad larvicida de estas fue del 85 y 50% respectivamente después de las 96 hrs (4° día) de exposición; lo cual se asemeja a los resultados del presente ensayo donde la concentración media (0.2 gr/ml) redujo la población a un 56% en el 4° día, siendo similar a 0.1 gr/ml quien redujo a un nivel medio en el 4° día con un 58%, no obstante la concentración alta (0.3 gr/ml) obtuvo los valores medios en el 3° día con 56%. Cabe destacar que la concentración baja (0.1 gr/ml) siempre mostró un comportamiento más bajo hasta el 3° día, sin embargo a partir del 4° día los valores son iguales o mayores que 0.2 gr/ml (Tabla nº3); lo cual nos permite afirmar que la mortalidad de las larvas no depende del tiempo sino de la cantidad de conidias que infecten a la larva.

Gráfica 3. Efectividad de *Metarhizium anisopliae* como bioinsecticida formulado para el control del vector.



Fuente: Tabla 4

Esta gráfica muestra las concentraciones 0.1 gr/ml, 0.2 gr/ml y 0.3 gr/ml de *M. anisopliae* en el cual todas muestran mortalidad en el 1° día del ensayo con 5%, 8% y 6% respectivamente. Los tratamientos 0.1 gr/ml y 0.2 gr/ml obtuvieron mortalidad de un 100% al 9° día en cambio 0.3 gr/ml lo obtuvo al 7° día.

Acorde con los resultados obtenidos por (Alcalde Mosqueira, Roldán Rodríguez, Saravia Cueva, & Collantes Silva, 2014) y (Mateus Gomez, 2013) la presencia del hongo hizo visible cambios físicos en la larvas como la deshidratación, incoordinación del movimiento, desprendimiento de la cabeza del tórax por flacidez del cuerpo larval, cambio del color del tegumento a negro debido a la desintegración de tejidos y una vez colocadas en cámara húmeda se observó el crecimiento del micelio de color verde oliváceo (Figura n°12).

Las larvas de estadio III de *A. aegypti* se vieron afectadas por las 3 concentraciones del hongo entomopatógeno aplicadas; la concentración 0.3 gr/ml fue la que mejor resultados obtuvo quien redujo a más de la mitad de la población larval en su 2° día con un 68%,

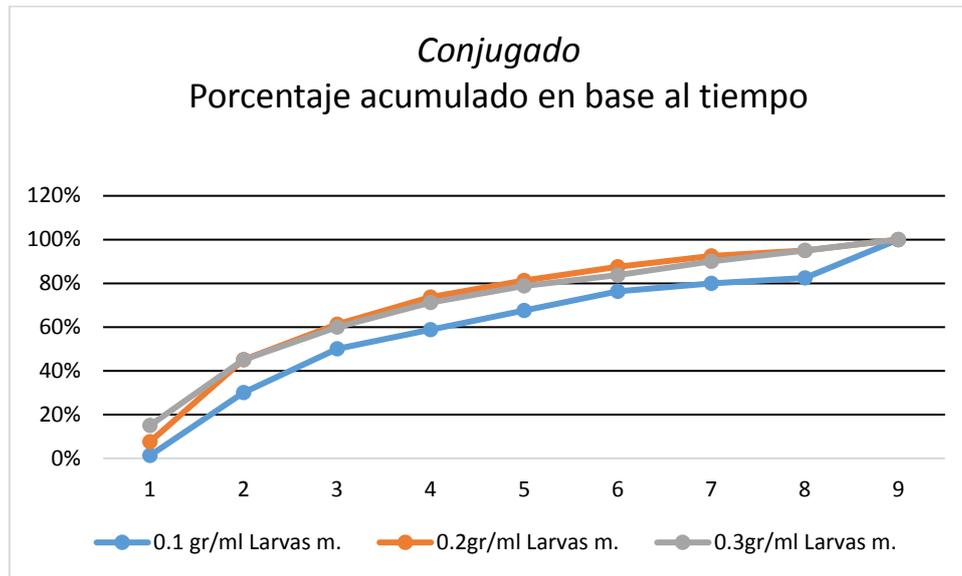
Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



seguido de este está 0.2 gr/ml el cual alcanzo 50% en el 2º día y finalmente 0.1 gr/ml quien logro un poco más de la mitad hasta el 6º día con un 65%, esto concuerda con los estudios realizados por (Silva, Silva, & Luz, 2004) donde el 55% y el 58.8% de todos los aislamientos mataron mayor o igual del 80% de las larvas dentro de los cinco y diez días después del tratamiento, además observaron que las mortalidades larvales de culícidos se producen entre las 24 y 48 horas, sin embargo nuestro estudio se extendió hasta el 9º día.

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

Gráfica 4. Efectividad de *Conjugado* (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) como bioinsecticida formulado para el control del vector.



Fuente: Tabla 5

Según la gráfica 4 se muestra la efectividad de las diferentes concentraciones del *Conjugado* de hongos entomopatógenos donde 0.1 gr/ml, 0.2 gr/ml y 0.3 gr/ml muestran porcentaje de mortalidad del 1%, 8% y 15% respectivamente, desde el 1° día del ensayo. Cabe señalar que tanto la 0.2 gr/ml y 0.3 gr/ml concentración tuvieron una similitud en su comportamiento biocida en las larvas de *A. aegypti*, no obstante las tres concentraciones alcanzaron el 100% de mortalidad al 9° día.

Los síntomas que se evidenciaron en las larvas fueron diversos entre ellas, pero con la misma similitud de síntomas obtenidos de los ensayos independientes de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, por lo cual la manifestación de los mismos se dio acorde a la alimentación de la larva; se observó crecimiento de micelio blanquecino y verde oliváceo, desprendimiento de la cabeza del tórax a causa de la flacidez del cuerpo, deshidratación y cambio de color del tegumento larval.

En el caso del ensayo del *Conjugado* de *B. bassiana* y *M. anisopliae* no se obtuvo una diferencia significativa en la tasa de mortalidad de las larvas ya que, 0.2 gr/ml y 0.3 gr/ml

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



iniciaron una decreción poblacional similar con un 45% en el 2° día, manteniendo así valores similares con respecto al tiempo, mientras que 0.1 gr/ml actuó un poco más tardía reduciendo hasta el 50% en el 3° día. (Jaramillo, Montoya, & Benavides, 2015) en su estudio mezclo 3 cepas de *B. bassiana* y 1 de *M. anisopliae* sobre brocas de café resultando un porcentaje de mortalidad superior al 90% entre los 4.54 y los 6.36 días sobre los insectos, esto coincidiendo con los resultados obtenidos con las concentraciones más altas ensayadas.

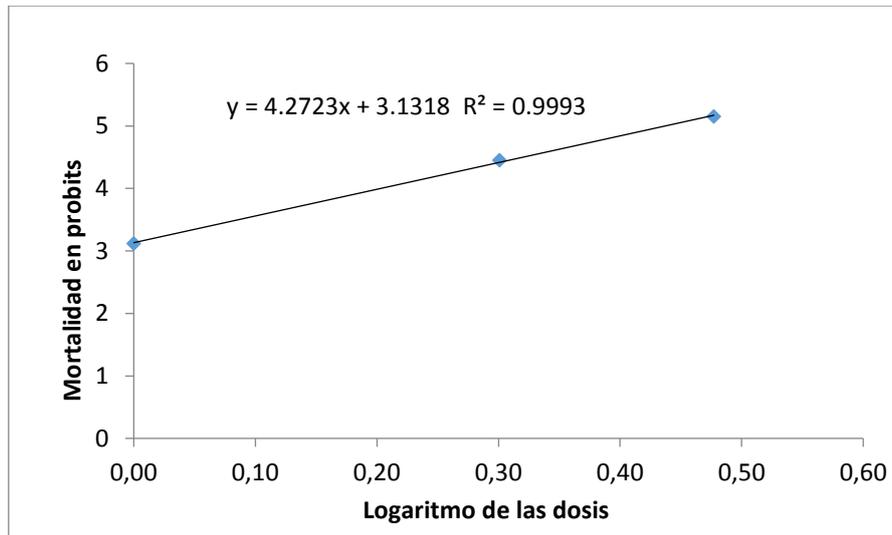
La aplicación de los bioinsecticidas *B. bassiana*, *M. anisopliae* y el Conjugado de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre las larvas de III estadio de *A. aegypti* ensayados en laboratorio, bajo condiciones ambientales de temperatura entre los 26-30 °C y una humedad relativa entre los 50-60 °C, demostraron tener capacidad biocida sobre las mismas.

Relacionando la tendencia de mortalidad de los tres bioinsecticidas empleados el más efectivo fue *M. anisopliae* con la mayor concentración, 0.3gr/ml, la cual al 7° día del ensayo obtuvo 100% de mortalidad, al igual *B. bassiana* con la mayor concentración, 0.3gr/ml, alcanzó el 100% pero al 8° día, a diferencia del Conjugado de los mismos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) donde las concentraciones más altas alcanzaron el pico máximo de mortalidad hasta el 9° día. (Clark, Kellen, Fukuda, & Lindegren, 1968) ensayaron la capacidad de *B. bassiana* sobre tres estadio (huevo, larva y adulto) de los mosquitos *Culex pipiens*, *C. tarsalis*, *Anopheles albimanus*, *Aedes aegypti*, *A. sierrensis* y *A. nigromaculis*, donde larvas de *Culex* y *Anopheles* puestas a prueba resultaron ser susceptibles al hongo mientras que las de *Aedes* no lo eran.

Los resultados del presente estudio coinciden con los de (Alcalde Mosqueira, Roldán Rodríguez, Saravia Cueva, & Collantes Silva, 2014) y (Montoya, Maldonado, Galán, Myriam, & Espinoza, s.a) los cuales concluyeron que de los 2 hongos entomopatógenos ensayados *M. anisopliae* fue quien demostró ser más efectivo sobre larvas de *A. aegypti*.

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

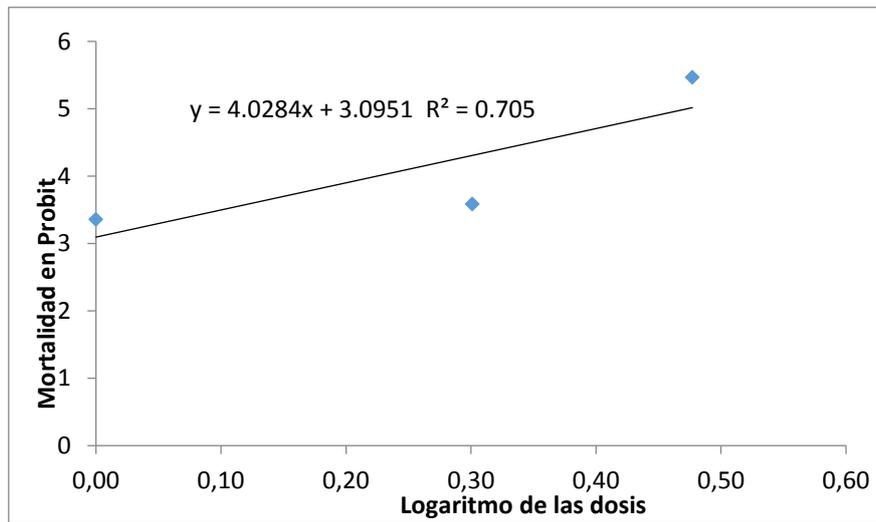
Gráfica 5. Concentración letal media (CL₅₀) del hongo entomopatógeno *B.bassiana* para su eficacia como bioinsecticida en el control del vector.



Fuente: Tabla 3

Al determinar los parámetros de eficacia del bioinsecticida fúngico se obtuvo que la concentración letal media (CL₅₀) para *B. bassiana* es 0.27gr/ml, con coeficiente de determinación $R^2=0.99$ y su ecuación de la recta es $y= 4.2723x + 3.1318$. Como se observa en la gráfica con la CL₅₀ indica que mató la mitad de la densidad poblacional de las larvas en su estadio III del vector *A. aegypti* y que éste tiene mayor eficacia en su efecto biocida. Además predice que entre más muerte hay de las larvas mayor será la eficacia del bioinsecticida.

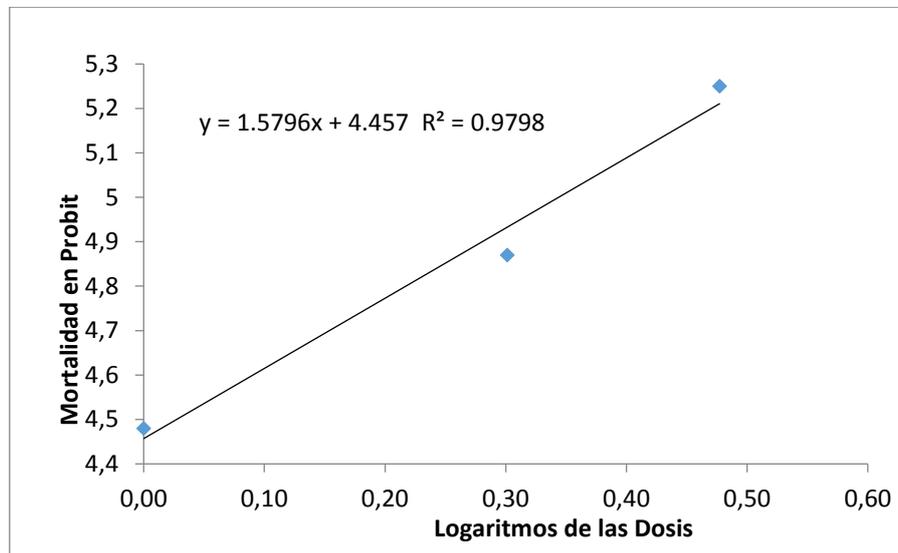
Gráfica 6. Concentración letal media (CL50) del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* para la eficacia del bioinsecticida en el control del vector.



Fuente: Tabla 4

La CL_{50} para *M. anisopliae* es 0.3 gr/ml siendo ésta la mayor concentración de la formulación del bioinsecticida su coeficiente de determinación es $R^2 = 0.70$ y su ecuación de la recta es $y = 4.0284x + 3.0951$. Se observa en la gráfica que hay un poco más de dispersión de los puntos pero es debido a los datos obtenidos del porcentaje de muerte de larvas en su estadio III, estos tienen una gran diferencia de porcentaje de mortalidad en base al tiempo de exposición, ya que a las 48 horas o a los 2 días del ensayo, murió el 68% de las larvas, en la mayor concentración, como se observa en la tabla 4.

Gráfica 7. Concentración letal media (CL50) del Conjugado (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) para la eficacia del bioinsecticida en el control del vector.



Fuente: Tabla 5

La CL₅₀ del Conjugado de los hongos entomopatógenos *B.bassiana* y *M. anisopliae* es de 0.22gr/ml, siendo la concentración media del bioinsecticida, su coeficiente de determinación es de $R^2 = 0.97$ y su recta de la ecuación es $y = 1.5796x + 4.457$. Se observa en la gráfica con la CL₅₀ que en esta concentración mató la mitad de la densidad poblacional de las larvas en su estadio III del vector *A. aegypti* y obtenemos su mayor eficacia de su efecto biocida. Por lo que entre más muerte hay de las larvas mayor será la eficacia del bioinsecticida.

En la eficacia de los bioinsecticidas tenemos que tomar en cuenta la CL₅₀ de los bioensayos es para obtener que tan susceptibles han sido las larvas de estadio III de *A. aegypti* frente a las concentraciones aplicadas de la formulación del bioinsecticida, Cuanto menor sea la cantidad, más tóxico es el material del bioinsecticida y la CL₅₀ letal media tiene mayor eficacia o susceptibilidad. Analizando la CL₅₀ de *B.bassiana* es de 0.27gr/ml, *M. anisopliae* es de 0.3gr/ml y el Conjugado de los mismo es de 0.22gr/ml, donde el que ha obtenido la CL₅₀ más baja ha sido el Conjugado por lo cual indicando su mayor eficacia, sin embargo hay que tomar en cuenta que los tres tienen muy buena

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



eficacia o susceptibilidad, ya que los tres tienen CL50 menos de 1gr/ml y va de acuerdo a lo que dice (Delgado Puchi, 2014) donde él considera que la CL50 o DL50 es un parámetro usado para criterio de eficacia de un insecticida y entre menor sea ésta mayor eficacia o susceptibilidad tendrá.

Otro parámetro complementario para su nivel de confianza es el coeficiente de determinación siendo representado como R^2 , la que nos indica la relación entre las variables Y (es la mortalidad del vector en PROBIT), X (logaritmo de las dosis aplicada) como se observa en las gráficas, indicando la variabilidad que pueda tener Y conforme a la variable X. Los coeficientes de determinación de los hongos entomopatógenos son: *B. bassiana* es R^2 del 99% (0.99), para *M. anisopliae* R^2 es de 70% (0.70) y el Conjugado de (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) R^2 es de 99% (0.99), nos confirma que el modelo lineal es adecuado, ya que el coeficiente de determinación siendo sus límites $0 \leq R^2 \leq 1$, lo cual refleja la bondad de ajuste lineal donde si es mayor de 0.8 se muestra la fuerte relación que hay entre X,Y, por lo cual los ensayos están en los límites establecidos, según el estudio de (Martínez Rodríguez, 2005) donde dice que para la interpretación de la R^2 es bueno considerar el número de repeticiones de la muestra del bioensayo, en relación a la aplicación de las diferentes concentraciones del bioinsecticida formulado por lo cual se agrega un poco más de confianza al estudio.

9. Conclusiones

1) La calidad de las cepas de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, fue verificada a través de la viabilidad y la pureza, obteniendo un porcentaje entre el 95% y 98% para ambas. Así mismo, mantuvieron su estabilidad morfológica observándose sus características macroscópicas y microscópicas sin alteración. Las cepas mostraron buen rendimiento para la formulación del bioinsecticida y uso en el bioensayo.

2) Se determinó las concentraciones para la formulación del bioinsecticida, las cuales fueron 0.1gr/ml, 0.2gr/ml y 0.3gr/ml para los dos hongos entomopatógenos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* y el Conjugado.

3) Al comparar la aplicación del bioinsecticida *B. bassiana*, *M. anisopliae* y el Conjugado frente al vector presentaron capacidad biocida sobre larvas de estadio III de *A. aegypti*, sin embargo, el más efectivo fue *M. anisopliae* con la mayor concentración (0.3 gr/ml) y en el menor tiempo en comparación a los otros bioinsecticidas.

4) La eficacia fue medida como la Concentración letal media (CL50) para *B. bassiana* es de 0.27 gr/ml, *M. anisopliae* es de 0.3 gr/ml y el Conjugado es de 0.22 gr/ml; las cuales indican que a partir de estas concentraciones el 50% de la población del vector *A. aegypti* es susceptible al bioinsecticida. El coeficiente de determinación (R^2) para *B. bassiana* es de 0.9993, *M. anisopliae* es de 0.705 y el Conjugado es de 0.9798; lo cual demuestra fiabilidad a la investigación al encontrarse en el rango establecido indicando que entre mayor sea la cantidad de conidia mayor mortalidad del vector obtenemos.

10. Recomendaciones

- 1) Según los resultados obtenidos en la investigación, recomendamos utilizar el hongo entomopatógeno *M. anisopliae* en concentraciones mayores de 0.3 gr/ml para resultados en menor tiempo al obtenido en este ensayo, sin embargo esto está sujeto al área en el que sea aplicado dicho bioinsecticida.

- 2) Al Departamento de Bioanálisis Clínico, promover en los estudiantes de la carrera de Microbiología más investigaciones en el campo de la Micología, como línea de investigación sobre el uso de los hongos entomopatógenos como alternativa para el control de insectos-plagas en general.

- 3) Al Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR), área de Entomología médica, continuar con este bioensayo en la fase de adulto del vector *A. aegypti*, para conocer nuevos métodos de aplicación, dosis y susceptibilidad en esta fase del vector hacia el bioinsecticida, así como su costo-beneficio para mayor provecho de los mismos en el control de vectores.

- 4) A la Universidad Nacional Agraria (UNA), área de Hongos entomopatógenos, en ampliar la línea de insectos sobre los que ensayan las formulaciones de bioinsecticidas a partir de microorganismos, incluyendo así vectores como Aedes, Culex y Anopheles, los cuales representan un riesgo de salud pública y en control de plagas en la agricultura.

11. Referencias bibliográficas

- Alas Marroquin, G. A. (2000). Evaluación de la efectividad de cuatro insecticidas biológicos para el control de ninfas de moscas blanca *Bemisia fabaci*, en el cultivo de melón *Cucumis melo*; Finca de LOS YAJES, del Municipio de Estanzuela, departamento de Zacapa. Chiquimula, Guatemala: s.e.
- Alcalde Mosqueira, J., Roldán Rodríguez, J., Saravia Cueva, V., & Collantes Silva, L. (2014). Efecto Biocida de diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* ccb-le302 y *Beauveria bassiana* CCB-LE265 sobre larvas III de *Aedes aegypti*. *UCV-Scientia*, 33-44.
- Alean Carreño, I. (2003). Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de mosca blanca de la yuca *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. *Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C, Colombia* .
- Ardila Ríos, Y. (2013). Patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre *Eurhizococcus colombianus* Jakubski.
- Bisset, J., Moncayo, Á., Blanco, S., Nathan, M., Braga, I., & Orellano, P. (2005). Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. *RELCOV, Red Latinoamericana de Control de Vectores* .
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP) .
- Castro Alfaro, L. M. (2014). Control de calidad en los procesos de producción de hongos entomopatógenos y.
- CEIP, S. E. (2016). AEDES AEGYPTI y AEDES ALBOPICTUS. *Ceip.Edu*.
- Chirigaba, H., Gómez, G., & Garces, K. (2015). *Beauveria Bassiana*, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras (YSA). *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA*, 8-23.
- Cisnero, L., Rodriguez, D., Penilla, P., & Vázquez, M. (2014). COMPATIBILIDAD DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS E INSECTICIDAS.
- Clark, T., Kellen, W., Fukuda, T., & Lindegren, J. (1968). Field and Laboratory Studies on the Pathogenicity of the Fungus *Beauveria bassiana* to Three Genera of Mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology* , 1-7.

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

- Delgado Puchi, N. (2014). Evaluación de la Eficacia de un insecticida biológico mediante análisis PROBIT. *Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía*, 1-6.
- Delgado-Motta, P., & Ordoñez-Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *An interdisciplinary Journal of Applied Science*, 77-90.
- Elosegui, O. (2006). Métodos artesanales de producción de bioinsecticidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. *Instituto de investigaciones de Sanidad vegetal (INISAV)*, 4-43.
- Etimologías. (18 de Noviembre de 2017). *etimologias. de chile* . Recuperado el 18 de Noviembre de 2017, de <http://etimologias.dechile.net/?bioinsecticida>
- Galán Franco, L. A. (2012). AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS DE LAS DIFERENTES ZONAS CITRÍCOLAS DE MÉXICO . *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, MEXICO*, 20-21.
- Gamez Rojas, C. M., & Ramirez Riveros, E. J. (2008). Determinación de la Concentración Letal Media (CL50-48) del herbicida ROUNDUP 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. *Universidad de La Salle, Bogotá D.C*, 23.
- García G., M., Cappello García, S., Leshner Gordillo, J. M., & Molina M., R. (2008). 4 Billones de Árboles Desaparecen por día en el Planeta. *KUXULBAK' Revista de Divulgación-División Académica de Ciencias Biológicas*, 25-28.
- García, C., Gomez, R., Lopez, C., & Leon, A. (2012). INSECTICIDAS BIORRACIONALES PARA EL CONTROL DE MOSQUITOS Y. *Ra Ximhai*.
- Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). *Manual de Producción y Uso de Hongos Entomopatógenos*. Perú : SCB-SENASA.
- Góngora, C., Patricia, M., & Benavides, P. (2009). Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. *Avances Técnicos CENICAFE* .
- Gutierrez Huamán, J., & col., &. (2017). Evaluación in vitro de los diferentes estadios del ciclo biológico de *Aedes aegypti* frente a la inoculación del concentrado de esporas. *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*.
- Hernández Sampieri, R., & Fernández Collado, C. (2010). *METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN*. México, D.F: Mc Graw Hill.

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



- Ibarra, L., Gamboa, L., Lopez, K., Medina, I., & Espejo, L. S. (2016). *Hongos entomopatogenos*. Colombia.
- Jaramillo, J., Montoya, E., & Benavides, P. y. (2015). *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo. *Revista Colombiana de Entomología*, 95-104.
- Larrea Fernández, O. (2002). Control de calidad de los insecticidas microbianos. *Avances en el fomento de productos fitosanitarios no-sintéticos*, 120-122.
- Lecuona, R. D. (s.a). Institucionalidad para el desarrollo, regulación y comercialización de bioinsumos en Argentina y experiencia relacionadas en países de ALC. *IMyZA-INTA Castelar*, 1-33.
- López, J. F. (2017). Coeficiente de determinación. *Economipedia*.
- Martínez Rodríguez, E. (2005). Errores de interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Anuario jurídico y económico escurialense*.
- Mateus Gomez, C. M. (2013). *Elaboración de un Bioinsecticida a partir de hongos entomopatogenos (Metarhizium anisopliae y Trichoderma lignorum) para el control de la Mosca blanca (Bemisia tabaci) en el cultivo del tomate (Lycopersicon esculentum)*. Santiago de Cali.
- Miranda Hernández, J. F. (2014). *Producción de conidios de hongos entomopatógenos en estado oxidante y su respuesta a distintos tipos de estrés*. México D.F: s.e.
- Miranpuri, G., & Khachatourians, G. (1990). Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegypti*. *Veterinary Parasitology, Elsevier Science Publisher B.V.*, 155-162.
- Montoya, S., Maldonado, M. G., Galán, L., Myriam, E., & Espinoza, A. (s.a). *Evaluación de Metarhizium anisopliae y Beauveria bassiana para el control de larvas de Aedes aegypti en laboratorio*. Nuevo León: s.e.
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos, Manejo Integrado de Plagas*, 95-103.
- Motta, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science: v. 6, n. 2, 2011.* .

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



Pérez, O., Rodríguez, J. B., Leyva, M., Díaz, M., Fuentes, O., Ramos, F., . . . García, I. (2004). *Manual de Indicaciones Técnicas para Insectarios*. La Habana, Cuba: Ciencias Médicas.

Rojas, M., Jaimés, L., & Valencia, M. (2018). Efectividad, eficacia y eficiencia en. *ESPACIOS*, 11.

SANIPRO, S. P. (2016). *Beauveria bassiana* sp., Insecticida Biológico . *SANIPRO, sanidad profesional*, 1-3.

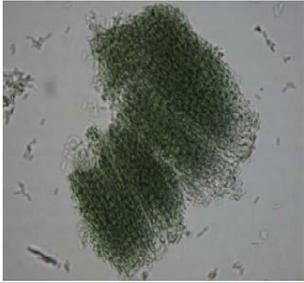
Silva, R., Silva, H., & Luz, C. (2004). Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the Central Brazilian Cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. *Revista de Patología Tropical*, 207-216.

Tellez Jurado, A., Cruz Ramirez, M., Mercado, Y., Asaff, A., & Arana, A. (2009). Mecanismo de acción y repuesta en la relacion hongos entomopatogenos e insectos.

Vaquedano Gamez, L. C. (2006). Efecto de la Aplicación de Hongos Entomopatógenos para el Control de Plagas en el cultivo de pepino, en el Valle de Comayagua, Honduras.

12. ANEXOS

1. Ficha de registro 1 de cepa fúngica entomopatógeno para formulación del Bioinsecticida, Managua, Octubre 2017- Abril 2018.

Colección de Hongo Entomopatógeno del laboratorio de Hongos Entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria, Managua	
Responsable	
Identificación del Hongo entomopatógeno	M.a
Cepa fúngica entomopatógena	<i>Metarhizium anisopliae</i> , monterosa
Fuente	Laboratorio de hongos entomopatógenos, UNA
Almacenamiento y conservación	Se almacenan en frascos oscuros para proteger de los rayos UV, se conservan en forma de polvo en refrigeración a 4°C.
Condiciones de crecimiento	
<p style="text-align: center;">Características macroscópicas</p> <p>Colonia pegada al medio, completamente redondas, de colores oliváceo, amarillento, verdoso o marrón oscuro dependiendo del proceso de aislamiento y su reverso es color marrón o verdoso.</p>	<p style="text-align: center;">Características microscópicas</p> <p>El conidióforo nace del micelio y es ramificado irregularmente con dos a tres ramas en cada septo, Sus fiálides cilíndricas en forma de clava, y las conidias son unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo.</p>
	
Observación	

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

2. Ficha de registro 2 de cepa fúngica entomopatógeno para la formulación del Bioinsecticida, Managua, Octubre 2017- Abril 2018

Colección de Hongo Entomopatógeno del laboratorio de Hongos Entomopatógenos de la Universidad Nacional Agraria, Managua	
Responsable	
Identificación del Hongo entomopatógeno	B.b
Cepa fúngica entomopatógena	<i>Beauveria bassiana</i> , cepa 114
Fuente	Laboratorio de hongos entomopatógenos, UNA
Almacenamiento y conservación	Se almacenan en frascos oscuros para proteger de los rayos UV, se conservan en forma de polvo en refrigeración a 4°C.
Condiciones de crecimiento	
<p style="text-align: center;">Características macroscópicas</p> <p>Estructura algodonosa y polvosa de color blanco, si la colonia envejece se vuelve amarillenta, y al reverso es color rojizo con orillas amarillentas cuando está en crecimiento.</p>	<p style="text-align: center;">Características microscópicas</p> <p>Micelio septado, conidióforos de 1 a 2 micras de diámetro, esporas hialinas redondas y ovaladas de 2 a 3 micras de diámetro.</p>
	
Observación	

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



3. Ficha de registro 3 de Efectividad de la formulación para control del vector *A. aegypti*, Octubre 2017- Abril 2018.

PRUEBA DE EFECTIVIDAD DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS

N° de ensayo _____

Departamento: _____ Área de estudio: _____ Fecha de Inicio: _____ Fecha de término: _____

N° de día	Fecha de Lectura	Larvas expuestas			Larvas Expuestas en el Bioensayos									Total de larvas muertas	Porcentaje de Mortalidad	Hora de lectura
		Horas	Control	Porcentaje de Mortalidad	Horas	Beaker 1	Larvas Muertas	Beaker 2	Larvas Muertas	Beaker 3	Larvas Muertas	Beaker 4	Larvas Muertas			
		24			24											
		48			48											
		72			72											
		96			96											
		120			120											
		144			144											
		168			168											
		192			192											
		216			216											

4. Tabla 1 Porcentaje de viabilidad de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* para la formulación del bioinsecticida, Managua, Octubre 2017-Abril 2018.

Hongos entomopatógenos	Porcentaje de Viabilidad		
	Diluciones		
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
<i>Metarhizium anisopliae</i>	95.5%	98.8%	96.5%
<i>Beauveria bassiana</i>	98.2%	96.3%	97.7%

Fuente: Laboratorio de hongos entomopatógenos, UNA

5. Tabla 2 Concentraciones para la formulación del bioinsecticida de los hongos entomopatógenos para el control del vector *A. aegypti*, Octubre 2017- Abril 2018.

	Concentraciones								
	Metarhizium anisopliae			Beauveria bassiana			Conjugado (B.b y M.a)		
	Baja	Media	Mayor	Baja	Media	Mayor	Baja	Media	Mayor
Concentración inicial	4.4×10^{10}	6×10^{10}	2.9×10^{10}	3.45×10^{10}	2.5×10^{11}	3.46×10^{12}	6.7×10^{10}	3.5×10^{11}	2.9×10^{12}
Concentración final	0.1gr/ml	0.2gr/ml	0.3gr/ml	0.1gr/ml	0.2gr/ml	0.3gr/ml	0.1gr/ml	0.2gr/ml	0.3gr/ml

Fuente: Laboratorio de hongos entomopatógenos, UNA

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

6. Tabla 3 Porcentaje acumulado de mortalidad de las larvas de *A. aegypti* en base al tiempo frente al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*

Días	0.1 gr/ml	0.2gr/ml	0.3gr/ml
	Larvas m.	Larvas m.	Larvas m.
1	0%	0%	6%
2	3%	10%	30%
3	23%	29%	56%
4	58%	56%	88%
5	81%	74%	99%
6	91%	91%	99%
7	96%	96%	99%
8	98%	100%	100%
9	100%		

Fuente: Laboratorio de entomología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencias (CNDR)

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

7. Tabla 4 Porcentaje acumulado de mortalidad de las larvas de *A. aegypti* en base al tiempo frente al hongo entomopatógeno en base al tiempo, *Metarhizium anisopliae*

Días	0.1 gr/ml	0.2gr/ml	0.3gr/ml
	Larvas m.	Larvas m.	Larvas m.
1	5%	8%	6%
2	16%	50%	68%
3	35%	53%	70%
4	36%	54%	71%
5	48%	63%	74%
6	65%	74%	89%
7	88%	90%	100%
8	95%	94%	
9	100%	100%	

Fuente: Laboratorio de Entomología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR)

Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



8. Tabla 4. Porcentaje acumulado de mortalidad de las larvas de *A. aegypti* en base al tiempo, Conjugado de hongos entomopatógenos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*).

Días	0.1 gr/ml	0.2gr/ml	0.3gr/ml
	Larvas m.	Larvas m.	Larvas m.
1	1%	8%	15%
2	30%	45%	45%
3	50%	61%	60%
4	59%	74%	71%
5	68%	81%	79%
6	76%	88%	84%
7	80%	93%	90%
8	83%	95%	95%
9	100%	100%	100%

Fuente: Laboratorio de Entomología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencias (CNDR)

Formación de la colonia

Figura 1. Recolección de las larvas en el Cementerio General



Figura 2. Recolección de las larvas en recipientes domésticos



Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

Figura 3. Separación de pupas y larvas



Figura 4. Larvas y pupas de *A. aegypti* por separado



Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

Figura 5. Filtros dejados a temperatura ambiente para almacenarlos y filtros con huevos para su eclosión en agua



Figura 6. Alimentación de las hembras *A. aegypti* y almacenamiento de los filtros provenientes de la colonia

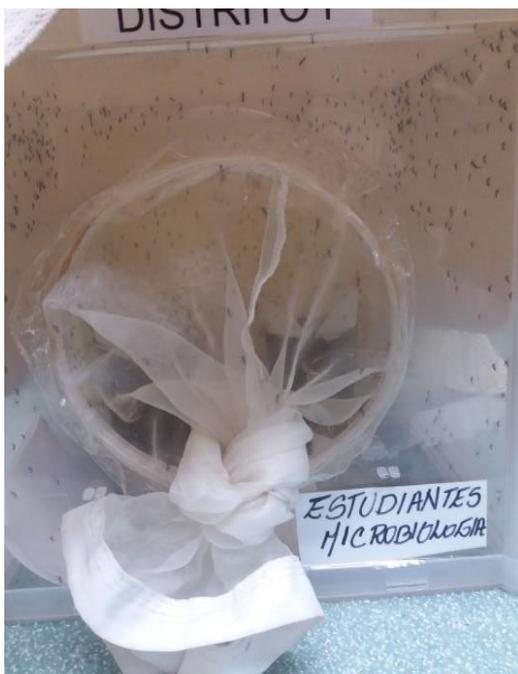


Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

Figura 7. Palanganas, depósito de larvas de *A. aegypti*



Figura 8. Colonia de crianza con vasos de ovipostura de las hembras del vector *A. aegypti*



Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

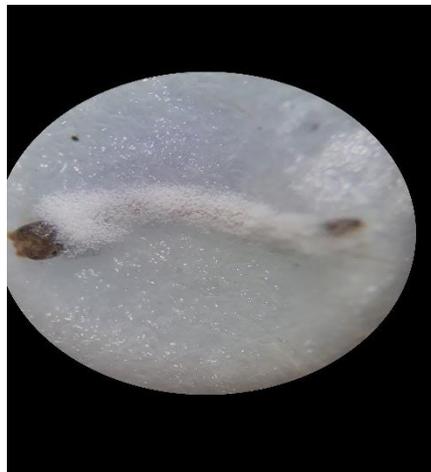
Síntomas que presentaron las larvas de *A. aegypti* después de la aplicación de los Bioinsecticidas.

B.bassiana

Figura 9. Cambio de color del tegumento de la larva y crecimiento micelial blanco en el cuerpo larval.



Figura 10. Larvas deshidratadas y colonizadas por el efecto biocida del hongo



M. anisopliae

Figura 11. Deshidratación y cambio de color del intestino de la larva por efecto del hongo



Figura 12. Larvas de *A. aegypti* cubiertas con el micelio de color verde oliváceo característico del hongo



Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

Proceso de aplicación del Bioinsecticida



Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



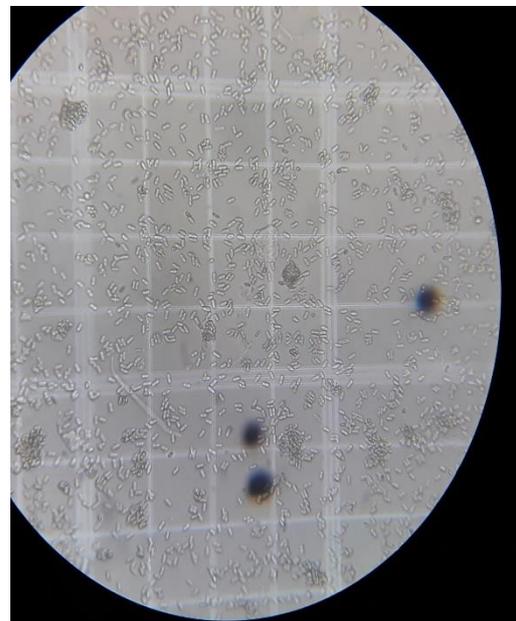
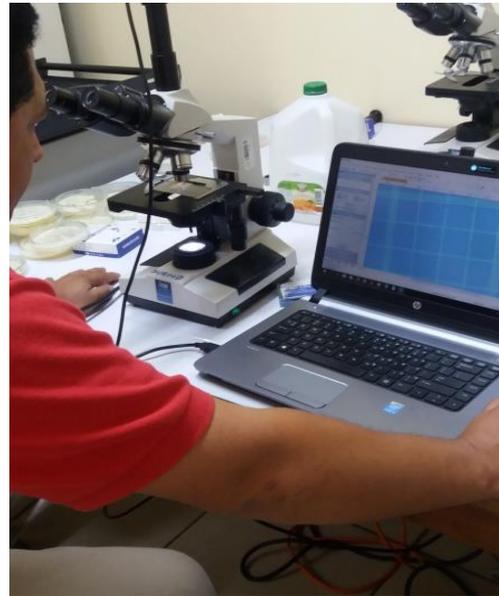
Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA



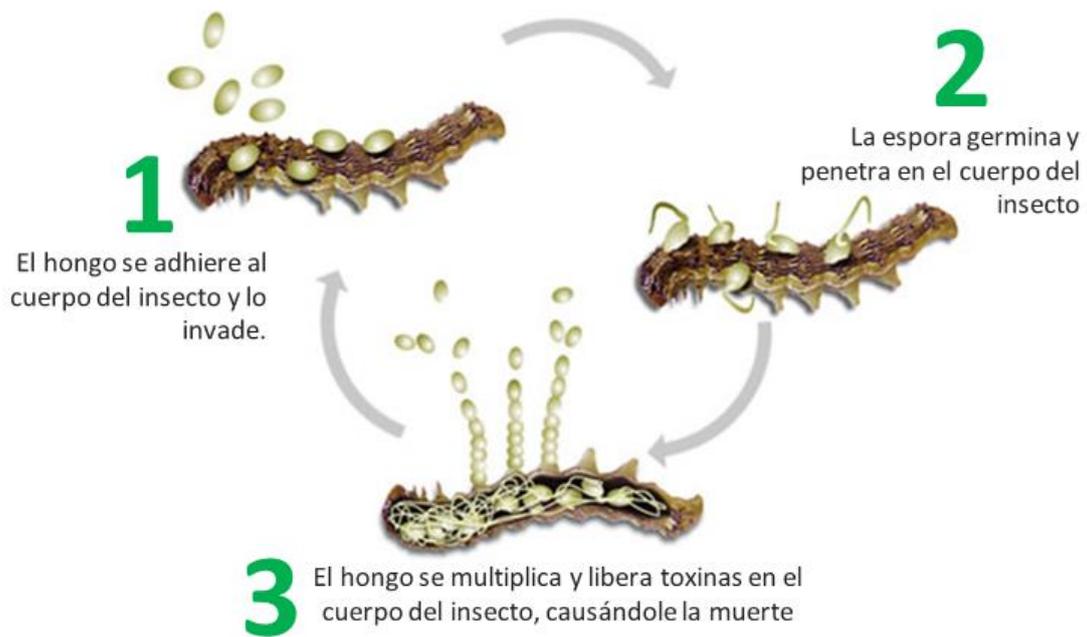
Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA

Procedimiento de Viabilidad

Pesaje de los hongos entomopatógenos y observación al microscopio de sus conidias



Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos



Fuente : Inia Quilamapu