UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS – SEDE ARAGUA
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LARVAS Y ADULTOS DE *Aedes aegypti* EN EL SECTOR MATA SECA, MUNICIPIO MARIO BRICEÑO IRAGORRY, ESTADO ARAGUA

Trabajo de Investigación presentado como requisito para aprobar la asignatura por:

Br. Arianys Román
Br. María Sánchez

Maracay, noviembre de 2023

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS – SEDE ARAGUA
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LARVAS Y ADULTOS DE *Aedes aegypti* EN EL SECTOR MATA SECA, MUNICIPIO MARIO BRICEÑO IRAGORRY, ESTADO ARAGUA

Trabajo de Investigación presentado como requisito para aprobar la asignatura por:

Br. Arianys Román
Br. María Sánchez
Tutor (a) científico:
Dr. Jesús Berti
Tutor (a) metodológico:
Prof. Luisa Figueroa

Maracay, noviembre de 2023

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANALISIS SEDE ARAGUA
PROFESORA "OMAIRA FIGUEROA"
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

VEREDICTO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Trabajo de Investigación titulado: **"Hongos entomopatógenos como alternativa para el control de larvas y adultos de *Aedes aegypti* en el sector Mata Seca, Municipio Mario Briceño Iragorry, estado Aragua"** presentado por las bachilleres Arianys Román y María Sánchez con el fin de aprobar la Asignatura Trabajo de Investigación; después de la exposición y discusión pública del citado trabajo, consideramos que el mismo reúne los requisitos para **APROBARLO** como tal. En fe de lo cual se levanta la presente acta, el día martes catorce del mes de noviembre del año dos mil veintitrés, dejando constancia de que, conforme a lo dispuesto por la normativa vigente, actuó como Coordinadora del jurado, la Tutora Metodológica Profesora Luisa Figueroa.

Por otra parte, se hace constar para efectos académicos de convalidación, que el presente trabajo representa el equivalente al Trabajo de Grado reconocido en otras instituciones y el contenido del veredicto es auténtico.

Dr. Jesús Berti
C.I.: 3841677
Tutor Científico

Dra. Oona Delgado
C.I: 14184.489
Jurado Evaluador

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
Facultad de Ciencias de la Salud
Núcleo Aragua
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
Escuela de Bioanálisis

Profa. Luisa Figueroa
C.I.:
Coordinadora del Jurado

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
"PROF. OMAIRA FIGUEROA"
SEDE ARAGUA
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

La Morita, Noviembre de 2023

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DEL TUTOR CIENTÍFICO

En mi carácter de Tutor Científico del Trabajo titulado: HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LARVAS Y ADULTOS DE Aedes aegypti EN EL SECTOR MATA SECA, MUNICIPIO MARIO BRICEÑO IRAGORRY, ESTADO ARAGUA , el cual es presentado por las bachilleres: Arianys Román C.I.: 25.920.495 y María Sánchez , C.I.: 27.036.075, para aprobar la asignatura Trabajo de Investigación, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado designado.

Nombre y Apellido
C.I. 3841677

DEDICATORIA

Para Aurora.

Dedicatoria María Sánchez

A Dios primeramente por darme la fortaleza de seguir y estar ahí en cada adversidad, para enseñarme que puedo levantarme y seguir.

A mis padres Norma y Jayquer por su amor, apoyo comprensión e incentivos, que han hecho posible que llegue hasta aquí, son los que me han dado la fuerza para seguir adelante a través de los años para llegar a la meta, especialmente a mi mamá por ser siempre todo y más de lo que necesito.

A Máximo Mejías, por su apoyo incondicional e ilimitado en cada momento, por su amor y por ser también quien me ha motivado y me ha acompañado a crecer personal y emocionalmente.

A mis amigos y familiares, por siempre estar en los momentos más cruciales e importantes.

Dedico esta tesis a todos ustedes, por creer en nosotros y motivarnos mutuamente para alcanzar nuestros sueños, mi ZLDN quienes fueron pieza clave desde el primer día en la universidad, especialmente a Arianys por todo el apoyo, paciencia y motivación.

Por ultimo a mi princesita Aurora, quien fue mi angelito y compañía este último año y a quién le dedico todos mis logros y metas alcanzadas, siempre te voy a amar…

DEDICATORIA

Dedicatoria Arianys Román

Este trabajo de investigación está dedicado a todas las personas que estuvieron apoyándonos desde el inicio de esta etapa

Dedicado primeramente a Dios por siempre acompañarme y resguardarme.

A mis padres Dora y Bertilio y a mi familia que fueron y son pilar fundamental para incentivarme a continuar este largo camino, sin su apoyo y compresión nada de esto hubiese resultado posible, gracias a sus constantes palabras de fe y apoyo incondicional.

A mis amigos que fueron mi refugio y espacio seguro para sobrellevar todo este camino tan difícil, mil gracias a mi apoyo diario ZLDN, sin importar las quejas de todos los días siempre estuvieron y están para mí.

A mi mafersin que fue mi compañera en este largo camino.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecer a todas las personas que ayudaron a la realización de este proyecto de investigación. Al CEESA (*Centro de Estudio de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental*), por facilitarnos la infraestructura y todos los instrumentos necesarios para llevar a cabo este proyecto. A las personas que allí laboran por prestarnos sus conocimientos y tiempo para orientarnos en todo este proceso, así como también a nuestros tutores quienes fueron guía y apoyo para llevar a cabo esta investigación.

INDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS viii
LISTA DE FIGURAS ix
RESUMEN x
ABSTRACT xi
INTRODUCCION 1
OBJETIVOS 8
Objetivo General: 8
Objetivos específicos: 8
MATERIALES Y METODOS 9
Tipo de investigación 9
Población y muestra 9
Técnicas e instrumentos de recolección de datos 10
Procedimiento experimental 10
Procedimiento para los controles 14
Aplicación del bioinsecticida 14
Análisis de datos 17
RESULTADOS 18
DISCUSION 27
CONCLUSIONES 34
RECOMENDACIONES 35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

LISTA DE TABLAS

N° **PP**

Tabla I. Efecto bioinsecticida de *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti*. Bioensayo N° 1. Cepas de Mario Briceño Iragorry y Rockefeller, 2023 19

Tabla II. Efecto bioinsecticida de *Metarhizium anisopliae* contra adultos de *Aedes aegypti*. Bioensayo N° 1. Cepas de Mario Briceño Iragorry y Rockefeller, 2023 20

LISTA DE FIGURAS

N° PP

Figura 1: Coordenadas de recolección de cepas de *Aedes aegypti* en Mata Seca, Municipio Mario Briceño Iragorry, Estado Aragua (Google Maps, enero 2023) 11

Figura 2. Representación gráfica de estadística descriptiva para mortalidad en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry y cepa de referencia Rockefeller 21

Figura 3. Representación gráfica de estadística descriptiva para el mayor alcance de mortalidad en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry y cepa de referencia Rockefeller a los 3 días de lectura 21

Figura 4. Regresión y correlación lineal para la determinación de concentración letal CL50 para larvas de *Aedes aegypti*, cepa Mario Briceño Iragorry 22

Figura 5. Representación gráfica de estadística descriptiva para mortalidad en adultos de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry y cepa de referencia Rockefeller 22

Figura 6. Representación gráfica de estadística descriptiva para el mayor alcance de mortalidad en adultos de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry y cepa de referencia Rockefeller a los 10 días de lectura 23

Figura 7. Regresión y correlación lineal para la determinación de concentración letal CL50 para adultos de *Aedes aegypti* cepa Mario Briceño Iragorry. 24

Figura 8. Cambios morfológicos en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,1 g/mL. 24

Figura 9. Cambios morfológicos en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,2 g/mL. 24

Figura 10. Cambios morfológicos en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,3 g/mL. 25

Figura 11. Cambios morfológicos en adultos hembras de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,1 g/mL. 25

Figura 12. Cambios morfológicos en adultos hembras de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,2 g/mL. 26

Figura 13. Cambios morfológicos en adultos hembras de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,3 g/mL. 26

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS – SEDE ARAGUA
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

HONGOS ENTOMOPATÓGENOS COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LARVAS Y ADULTOS DE *Aedes aegypti* EN EL SECTOR MATA SECA, MUNICIPIO MARIO BRICEÑO IRAGORRY, ESTADO ARAGUA

Br. Arianys Román
Br. María Sánchez

Tutor (a) científico:
Dr. Jesús Berti
Tutor (a) metodológico:
Prof. Luisa Figueroa
Maracay, noviembre 2023

RESUMEN

El *Aedes aegypti* es un mosquito transmisor de enfermedades ampliamente distribuido a nivel mundial, siendo transmisor de enfermedades como dengue, chikungunya, virus del zika, virus de mayaro y fiebre amarilla. El control biológico resulta ser una alternativa de menor impacto ecológico donde los hongos entomopatógenos son una variedad de especies ampliamente utilizada, debido a esto se plantea evaluar la efectividad de hongos entomopatógenos como inhibidores de crecimiento contra larvas y adultos de Aedes aegypti en el municipio Mario Briceño Iragorry, estado Aragua. La investigación se llevó a cabo mediante la exposición de larvas de II instar y adultos hembras de *A. aegypti* a diferentes concentraciones del bioinsecticida, obteniéndose una CL_{50} de 0,2 g/mL. Los resultados revelaron que, a nivel larval, la cepa es susceptible a las 3 concentraciones del bioinsecticida. La eficacia del *Metarhizium anisopliae* resulta más evidente en la población de larvas que en la de adultos, lo que nos permite predecir que el uso del bioinsecticida en criaderos sería una excelente estrategia de control para el vector, ya que se obtendrían resultados más rápidos interrumpiendo el ciclo de vida del mosquito.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, Hongos entomopatógenos, *Metarhizium anisopliae*, Control biológico, Bioinsecticida.

UNIVERSIDAD DE CARABOB
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS – SEDE ARAGUA
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

ENTOMOPATHOGENOUS FUNGI AS AN ALTERNATIVE FOR THE CONTROL OF LARVAE AND ADULTS OF Aedes aegypti IN THE MATA SECA SECTOR, MARIO BRICEÑO IRAGORRY MUNICIPALITY, ARAGUA STATE.

Br. Arianys Román
Br. María Sánchez

Tutor (a) científico:
Dr. Jesús Berti
Tutor (a) metodológico:
Prof. Luisa Figueroa
Maracay, noviembre 2023

ABSTRACT

Aedes aegypti is a disease-transmitting mosquito widely distributed worldwide, transmitting diseases such as dengue, chikungunya, Zika virus, Mayaro virus and yellow fever. Biological control turns out to be an alternative with a lower ecological impact where entomopathogenic fungi are a widely used variety of species. Due to this, it is proposed to evaluate the effectiveness of entomopathogenic fungi as growth inhibitors against larvae and adults of Aedes aegypti in the Mario Briceño municipality. Iragorry, Aragua state. The research was carried out by exposing II instar larvae and adult females of A. aegypti to different concentrations of the bioinsecticide, obtaining an LC50 of 0.2 g/mL. The results revealed that, at the larval level, the strain is susceptible to all 3 concentrations of the bioinsecticide. The effectiveness of *Metarhizium anisopliae* is more evident in the larval population than in the adult population, which allows us to predict that the use of the bioinsecticide in hatcheries would be an excellent control strategy for the vector, since faster results would be obtained by interrupting the mosquito life cycle.

Keywords: *Aedes aegypti*, Entomopathogenic fungi*, Metarhizium anisopliae*, Biological control, Bioinsecticide.

INTRODUCCION

Los arbovirus son un grupo de enfermedades transmitida por artrópodos, están conformados por más de 500 virus de los cuales solo 150 aproximadamente, producen enfermedad en el hombre, se dividen en familias y según el síndrome que provocan en: Bunyaviridae, Flaviviridae y Togaviridae, de las cuales, las familias Flaviviridae y Togaviridae son las de mayor interés a nivel mundial debido a la alta incidencia de las enfermedades que transmiten. La familia Flaviviridae transmite dengue, fiebre amarilla y virus del zika, mientras que la familia Togaviridae transmite chikungunya y virus de mayaro (Arredondo, *et al.,* 2016).

El vector que transmite los principales tipos de arbovirus de interés médico es conocido como mosquito *Aedes*, el cual es un género de mosquito de amplia distribución mundial, pero que se encuentra con mayor frecuencia en áreas tropicales o subtropicales, este género se divide en múltiples subgéneros entre los cuales resalta el *Stegomyia* cuyos miembros de mayor relevancia son *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762) y *Aedes albopictus*. El *Aedes aegypti* es uno de los vectores de mayor importancia en salud pública a nivel mundial, debido a que es transmisor de enfermedades que además de ser potencialmente mortales, son altamente contagiosas y en la mayoría de los casos dejan efectos secundarios a largo plazo que incluso pueden no ser reversibles. Las enfermedades transmitidas por los pertenecientes a este género son los arbovirus mencionados anteriormente (Dengue, chikungunya, zika, virus de Mayaro y fiebre amarilla) (Gómez, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017), señala que las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas en el mundo, causando 700.000 muertes al año.

En la Región de las Américas, entre la semana epidemiológica (SE) 1 y la SE 21 de 2020, se notificaron 1.645.678 casos de arbovirosis. Del total de casos, 1.600.947 (97,3%) fueron casos de dengue, 37,279 casos de chikungunya y 7,452 casos de Zika (PLISA, OPS/OMS 2020).

Debido a su abundante vegetación, y que a lo largo de su distribución se encuentran distintos cuerpos de agua de extensión importante, el estado Aragua es uno de los principales afectados por la alta presencia de criaderos de mosquitos y el consecuente contagio no solo de dengue, sino también de las distintas enfermedades que el vector puede transmitir, viéndose mayormente afectados los municipios Mario Briceño Iragorry y Girardot (Marrufo, *et al.,* 2019).

En vista del poco control que existe en torno a la reproducción del *Aedes aegypti*, hace tiempo se ha hecho énfasis en el desarrollo de un insecticida de bajo volumen sin impacto ecológico, pero debido a que los cambios no han sido particularmente notorios, ha sido un método que se ha tomado como coadyuvante de compuestos químicos, más no como principal método de control de insectos. Además, ha habido cambios demográficos referente al crecimiento de la población y la urbanización no planificada en condiciones de vida por debajo del nivel estándar, con inadecuado suministro

de agua, factores que incrementan la facilidad de diseminación del mosquito *Aedes aegypti* prolongando sus criaderos (Barrera, 2015).

El control del *Aedes aegypti* toma cada día más importancia debido a la incidencia cada vez mayor de las enfermedades que el vector transmite, las principales debilidades evidenciadas en el fracaso del control del mosquito abarcan la falta de vigilancia entomológica, la resistencia a los insecticidas químicos, especialmente al larvicida temephos, también es importante resaltar las innumerables fallas en la aplicación del insecticida por falta de personal capacitado, déficit en la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por el vector, en vista de todas estas fallas y debilidades, es necesario el implemento de nuevas medidas y estrategias de control y en la actualidad las mejores estrategias ofrecidas son aquellas amigables con el medio ambiente, es por ello que la propuesta de un control biológico bien planificado y de espectro extendido representa una estrategia fuerte de gran importancia ecológica y que podría representar una solución inminente a la resistencia que están desarrollando cada vez más cepas del mosquito *Aedes aegypti* (OPS/OMS, 2010).

Los programas de control de *Aedes aegypti* en Venezuela se basan en la utilización de insecticidas larvarios como principal método para el control de insectos, en muchas ocasiones son los únicos disponibles, sin embargo, se han reportado casos de resistencia a ese producto, sin mencionar que es altamente nocivo generando un gran impacto biológico en el humano, suelo, vegetación y fauna, motivo por el cual se requiere estudiar los métodos de control biológico más eficientes para así incrementar su uso, logrando una mayor preservación del medio ambiente (Bezerra, 2014).

Basado en lo anterior surge la alternativa del control biológico el cual es un método que se basa en el uso de organismos vivos para reducir o erradicar de forma natural insectos que generalmente causan enfermedades endémicas de gran importancia o daños en cultivos causando estragos en la economía agrícola. En la actualidad se ha demostrado que el uso de agentes químicos resulta bastante dañino para la salud ambiental, así como también, aunque en menor medida, es perjudicial para la salud del ser humano expuesto, es por ello que este método respetuoso con el medio ambiente parece ser la mejor alternativa para el cuidado del mismo.

Este método que básicamente se encarga de disminuir la densidad o distribución de ciertas plagas por medio de organismos vivos, se clasifica en distintas estrategias de aplicación según diversos factores, entre los cuales se consideran: El enemigo natural a utilizar, el ecosistema, o medio ambiente en el que se va a llevar acabo o incluso el tiempo de efectividad de la estrategia empleada (Fischbein, 2012).

Los microorganismos que se destacan principalmente en el control microbiano de insectos son los hongos, bacterias y virus. De los mencionados los hongos tienen mecanismo de invasión únicos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto, siendo esta la opción de investigación más adecuada ya que supone mayor eficacia, mejores resultados en menor tiempo y que además su obtención, cuidado y manutención, puede resultar más sencilla que la de otras especies, y a un menor costo en la mayoría de los casos (Gandarilla *et al.,* 2020).

Los hongos entomopatógenos son una variedad de especies que son utilizadas en control biológico de insectos plaga, esto es debido principalmente a que no es preciso que sean ingeridos por la población problema, sino que, son capaces de actuar por contacto directo con las esporas del hongo, las mismas se adhieren al insecto y mediante distintos mecanismos de acción son capaces de causar enfermedad o incluso la muerte en los agentes expuestos (Pucheta, *et al.,* 2006).

Algunos estudios han confirmado el potencial de los hongos entomopatógenos de manera individual sobre mosquitos vectores, asimismo, se ha reconocido que los hongos entomopatógenos pueden infectar distintas fases del ciclo de vida de *Ae. Aegypti* y que también es posible combinar hongos entomopatógenos con insecticidas a dosis subletales, con lo que se obtiene un mayor efecto en la mortalidad de mosquitos vectores. Estrada, *et al.,* (2019) presenta un trabajo donde se estudió el efecto de la combinación *de Metarhizium anisopliae y Gliocladium virens* sobre la oviposición, eclosión y emergencia de *Aedes aegypti.*

Entre los hongos entomopatógeno usados más frecuentemente como bioinsecticida, destaca *Metarhizium anisopliae* gracias a sus propiedades físicas y de ataque. Posee también la capacidad de infectar al insecto mientras se nutre de él (fase parasitaria) y posterior a la muerte del mismo, el hongo puede seguir aprovechando de los nutrientes de su cadáver (fase saprofítica) (Acuña, *et al.,* 2015).

La capacidad biocontroladora de diferentes cepas nativas de hongos entomopatógenos sobre larvas de tercer estadio de *Ae. aegypti* además de realizar bioensayos para evaluar la toxicidad de los aislados y/o cepas de los hongos entomopatógenos y analizar el efecto subletal post tratamiento sobre el ciclo de vida de los estadios larvarios sobrevivientes con el empleo de conidios de diversos hongos entomopatógenos es efectivo para llevar a cabo el control larvario de *Ae. Aegypti*. Los siete tratamientos causaron una mortalidad promedio de 50 a 80 % para larvas y de 9 a 30 % para pupas. Se encontró que la más alta tasa de mortalidad de larvas *Ae. Aegypti* se logró con los tratamientos de *M. anisopliae.*

En Argentina-La Plata se realizó el estudio sobre la selección de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* como potenciales agentes de control biológico de *Aedes aegypti (Diptera, Culicidae*). Falvo, (2019) afirma: "Integrar al hongo entomopatógenos *M. anisopliae* a los programas de control del mosquito vector *Ae. aegypti* para lograr, dentro de un Manejo Integrado de Plagas, la reducción, en el tiempo, de su densidad y la disminución de los niveles de insecticidas químicos aplicados". Con la demostración de la patogenicidad, virulencia y agresividad de la cepa fúngica, así como la evaluación de diferentes métodos de aplicación, se estableció solo el primer pasó en la evaluación de *M. anisopliae* como agente de control biológico de adultos de *Ae. Aegypti.*

Es evidente qué de mediano a largo plazo, el uso de métodos de control biológico debe reemplazar el uso de sustancias químicas usadas como insecticidas, debido al fuerte impacto que causan al medio ambiente y del cual existe evidencia demostrada, por lo cual, el estudio del método de control microbiano de insectos más eficaz y adecuado, es un factor de

primera necesidad para lograr la preservación del ecosistema y evitar afectaciones de salud, es por ello que esta investigación pretende demostrar las cualidades de los hongos entomopatógenos y sus ventajas por encima del uso de insecticidas químicos.

El objetivo a largo plazo siempre será preservar el bienestar del planeta tierra y por supuesto, sus habitantes, es por ello, que la alternativa de control biológico debe tomar cada vez más fuerza y ser usada como único método de control de insectos, lo cual no solo beneficia el ecosistema en general, sino también da cabida a nuevas investigaciones que nos lleven más allá de lo actualmente conocido sobre las estrategias y especies para el control de insectos con métodos biológicos y poder así alcanzar la erradicación total de los insecticidas químicos.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la efectividad de hongos entomopatógenos como inhibidores de crecimiento contra larvas y adultos de *Aedes aegypti* en el municipio Mario Briceño Iragorry, estado Aragua

Objetivos específicos:

- Determinar la efectividad del hongo contra larvas y adultos de *Aedes aegypti* a diferentes concentraciones.

- Describir los cambios morfológicos que se presentan en larvas y adultos previamente tratados con *Metarhizium anisopliae.*

MATERIALES Y METODOS

Tipo de investigación

Se trata de una investigación de tipo experimental, debido a que se llevó a cabo bajo un ambiente en el cual se manipularon las variables, se evaluó el crecimiento, disminución o permanencia de la población en estudio; de carácter cuantitativo, porque se emplearon datos numéricos obtenidos como fundamentos para probar la hipótesis y de tipo transversal, donde el experimento y la recolección de datos fueron realizados en un momento preciso.

Población y muestra

La población se conformó por una cepa de *Aedes aegypti* que se recolectó del Sector Mata Seca, Municipio Mario Briceño Iragorry estado Aragua. Se realizó la selección y cría en el laboratorio entomológico del Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), del Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios Dr. Arnoldo Gabaldón (SAIAE) ente adscrito al Ministerio del Poder Popular para la salud, ubicado en Maracay, estado Aragua.

La muestra inicial para el pie de cría consistió en 100 larvas de 4to instar de *Aedes aegypti*, a partir de ella se amplió la cantidad mediante la cría y mantenimiento hasta la obtención de un aproximado de 2000 larvas de 4to instar de *Aedes aegypti* y 2000 adultos hembras de *Aedes aegypti*, esto con el fin de contar con una muestra de cantidad adecuada para garantizar el correcto estudio del ensayo a realizar.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Los datos se recolectaron por medio de la observación directa de los cambios ocurridos en las larvas y adultos hembras de *Aedes aegypti*, y los resultados obtenidos se depositaron en formatos de registro.

Procedimiento experimental

- Cría de larvas de *Aedes aegypti* de forma directa y mantenimiento de la colonia.

En primera instancia se recolectó la muestra en el Sector de Mata Seca bajo el siguiente procedimiento: Recogida de criaderos de larvas en aguas estancadas en el sector, se colocaron en bolsas plásticas con una cámara de aire, para garantizar condiciones de oxigeno óptimas para su traslado, luego se llevó al laboratorio donde se procedió a la cría de las larvas y posterior selección del mosquito a ser estudiado. Los huevos se depositaron en tiras de papel y se resguardaron.

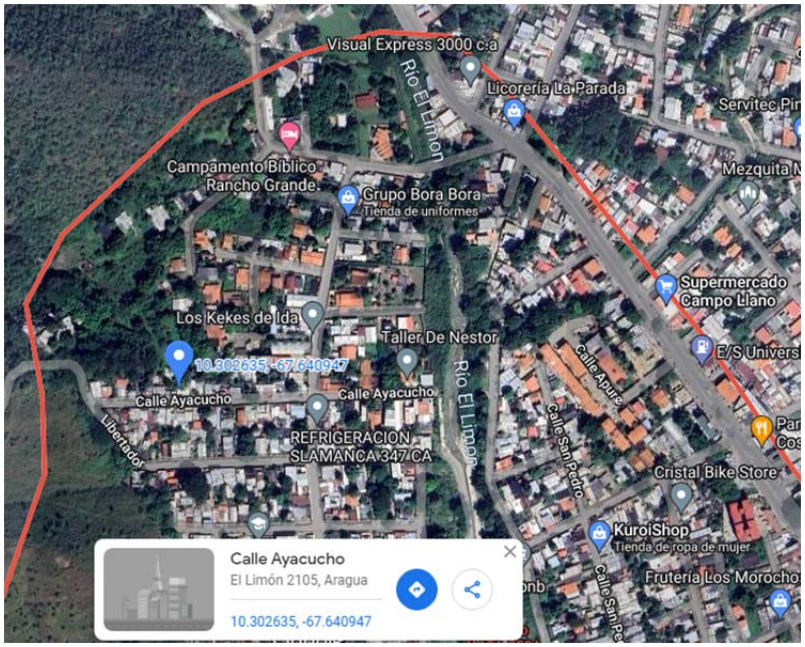

Figura 1: Coordenadas de recolección de cepas de *Aedes aegypti* en Mata Seca, Municipio Mario Briceño Iragorry, Estado Aragua (Google Maps, enero 2023)

Se seleccionaron las tiras de papel con los huevos de las cepas de *Aedes* a eclosionar (preservados con anterioridad). Luego se toman 10 cubetas rectangulares de un litro de capacidad y se le agregan 500ml de agua de chorro previamente filtrada mediante el uso de un colador con un tul muy fino, garantizando la ausencia de contaminación. Se colocaron las tiras contenidas de los huevos de *Aedes aegypti* en iguales proporciones a cada cubeta y se agregaron dos pizcas de alimentos a las mismas (contenido: alimento para peces y alimento para cachorros) así como también se agregó una pizca de levadura para garantizar un ambiente óptimo de crecimiento y desarrollo. Se procedió a cubrir las cubetas con tapas que contengan centro de tul muy fino (Tercero y Medrano, 2019).

Al siguiente día se retiraron las tiras con los huevos que no eclosionaron; los que eclosionaron se alimentaron diariamente hasta obtener larvas de 4to instar, al cambiar de cuarto estadio a pupas, se colocaron en un envase pequeño y se llevaron a una jaula de tul muy fino cuyas medidas son 20x20cm. Dentro de la jaula, se colocó un envase oscuro de aproximadamente 250 ml, revestido con tiras de servilletas para que las hembras procedan a oviponer (para volver a repetir los pasos anteriormente mencionados con los huevos obtenidos) además se colocó una fiola contenida con un algodón empapado con solución glucosada al 5%, que será el alimento de los machos y hembras; el mismo será sustituido por un nuevo envase cada vez que la cantidad de solución disminuyan en exceso.

Una vez que las pupas cambien de fase a adultos, las hembras se aparean con los machos con la finalidad de que las mismas puedan desarrollar los huevos y oviponer en las tiras de servilleta, cada cierto tiempo se les ofreció una paloma con la parte ventral desnuda y expuesta para que las hembras de *Aedes aegypti* se alimenten, puesto que las mismas son hematófagas y a pesar de que pueden sobrevivir con la solución glucosada, se requiere que la población este alimentada para garantizar que el ensayo funciona y que la mortalidad no está dada por la mala alimentación del ejemplar.

Con este procedimiento se recolectaron los adultos y los huevos para luego ser eclosionados y convertirse en larvas para los experimentos que posteriormente se llevarán a cabo, es importante recalcar, que el procedimiento se repitió en varias ocasiones, debido que se requiere para la realización de ensayos clínicos que la muestra no sea parental, es decir, no sea completamente salvaje, ya que no se garantiza que la muestra obtenida

no haya sido expuesta a insecticidas químicos lo cual puede interferir con los resultados de los ensayos, es por ello que se repite el procedimiento hasta obtener mínimo un 2do filial, sin embargo, no se debe exceder la obtención prologada de crías puesto que se corre el riego de que pierdan genes de resistencia y el ejemplar se convierta en uno en condiciones de laboratorio pudiendo dar falsos positivos a susceptibilidad .

- Preparación de los hongos entomopatógenos

Se utilizó una cepa de *Metarhizium anisopliae* donada por el Dr. Blas Dorta, la cual se obtuvo por aislamientos hechos en condiciones de laboratorio en la Universidad Central de Venezuela. Se pesó 1.5 gr del hongo entomopatógeno en estudio 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 destilada, obteniendo así la dilución 0.2 gr/ml (concentración media), finalmente se pesan 0.5 gr del hongo para 5 ml de agua destilada, obteniendo así la dilución 0.1 gr/ml (concentración baja) (Tercero y Medrano, 2019).

Se realizan bioinsecticidas a distintas concentraciones con el fin de determinar la concentración mínima a la cual este tiene su mejor y mayor efectividad, con lo que se pretende dar cumplimiento al primer objetivo planteado para el presente proyecto de investigación.

Las cantidades pesadas de los hongos entomopatógenos y agua destilada se depositan en los matraces, sé les agregó 1ml de solución teewn al 0,1% a cada concentración, luego homogenizamos con ayuda de la

espátula y cubriéndose con un trozo de parafilm se transporta a la nevera para su refrigeración y posterior uso.

- Bioensayo para evaluar la efectividad de *M. anisopliae*

Procedimiento para los controles

Se utilizaron cuatro vasos de control con aproximadamente 20 ejemplares por vaso, en caso de los adultos y 10 ejemplares en caso de las larvas, cada uno de los cuales fueron rotulados como control y enumerados para su correcta lectura. En el control de las larvas, se usaron 9ml de agua destilada se colocó un total de 10 larvas de estadio 2do instar, posteriormente se cubrió el vaso con una pieza de tul muy fino y se dejó a distancia de los tratados con bioinsecticida para evitar la contaminación. La lectura del vaso control se realizó cada 24 horas, por 5 días, igualmente, para adultos se mantuvo en observación una muestra sin tratamiento para evaluar las diferencias ocasionadas por el uso del hongo, esto se realizó con una cepa de *Aedes* control de modo que se puedan comparar los cambios morfológicos observados en las larvas y adultos de *Aedes* tratados con el bioinsecticida, además esta cepa se usa para evaluar y demostrar que la mortalidad se da por el bioinsecticida en estudio y no por condiciones ambientales o alimenticias adversas .

Aplicación del bioinsecticida

Un total de seis vasos se etiquetan según las concentraciones y numeraciones que correspondan; dividiéndose de la siguiente manera: Dos vasos para la concentración mayor, dos vasos para la concentración media,

dos vasos para la concentración menor, cuyo contenido era de 10 individuos por vaso, esto para el ensayo de adultos, para las larvas se utilizó el doble del material con la misma cantidad de individuos por vaso.

Se colocaron 9 ml de agua destilada en cada uno de los vasos rotulados, se añadió 1 ml del bioinsecticida, homogeneizamos, y luego se dejó reposar entre 10-15 minutos; posteriormente se añadieron 10 larvas de 2do instar en cada vaso, se cubrió el ensayo con piezas de tul muy fino para evitar alguna contaminación. La lectura de cada una de las réplicas se efectuó cada 24 horas, por 5 días; esta consistió en extraer con un gotero las larvas muertas en el día, y se depositan en los platos petri rotulados con la concentración y número de vaso correspondiente.

Para el adulto hembra de *Aedes aegypti*, se aplicó el bioinsecticida preparado previamente a diversas concentraciones en superficies lisas. Se colocaron los especímenes en 8 botellas de vidrio, cada una de las cuales fueron impregnadas con el bioinsecticida, empleándose 2 botellas por cada concentración conocida para un total de seis y dos botellas se impregnaron con agua destilada y fueron usadas para exponer a la cepa control, el bioinsecticida se agregó en la boca de la botella y posteriormente con suaves movimientos giratorios se impregno todo el interior de la botella para así garantizar que toda la superficie de la misma en la cual pueda posarse el espécimen esté totalmente tratada, el mismo procedimiento se realizó para las botellas con agua destilada, se dejaron secar durante 4 días, luego de los cuales se efectuó el ensayo, los mosquitos fueron expuestos durante una hora adentro de las botellas y luego fueron transferidos a vasos de cartón parafinados en el interior a los cuales se les colocó un tul fino en la superficie para conservar a los individuos, de igual forma se siguieron colocando fuentes de alimentos, esto mediante algodones impregnados de solución

glucosada, los vasos se colocaron dentro de cavas y encima de ellos una servilleta humedecida para garantizar humedad y ambiente fresco para los individuos en estudio, los controles se colocaron en cavas a parte para evitar contaminación con las esporas del hongo. Se revisaron igualmente cada 24 horas por 10 días, para observar los cambios en el comportamiento de la colonia y posteriormente a todos los mosquitos enfermos o muertos, se procedió a recolectarlos en una capsula de petri para la evaluación, observación y documentación fotográfica de los cambios morfológicos.

- Metodología utilizada para la observación de cambios morfológicos de pupas y adultos hembras

En cada uno de los platos petri se colocaron piezas de papel filtro, las cuales se humedecieron con agua destilada. Con ayuda de un gotero se extraerán cada una de las larvas muertas, estas fueron depositadas en los platos petri según la concentración y el número de beaker al que correspondan. Se incubo por 24 horas a temperatura ambiente y al igual que con el adulto se procedió a realizar la observación, evaluación y documentación fotográfica de las larvas y adultos muertos (Tercero y Medrano, 2019).

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 del ejemplar afectado, 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 y la cutícula del adulto. Se coloca la placa petri que contiene los individuos bajo el lente de 10x del microscopio estereoscópico en el cual puede observarse completamente las estructuras mencionadas cubiertas por el micelio.

En las colonias de adultos, se observará la cantidad de adultos hembras muertos o caídos al día, luego serán recolectados para su visualización y descripción de los cambios externos.

Se tomaron fotos como evidencia del daño causado en las larvas y adultos muertos por los hongos entomopatógenos.

Análisis de datos

Se realizaron pruebas estadísticas básicas usando el programa de Excel y análisis de regresión lineal simple, con la finalidad de recaudar los datos requeridos para las posteriores conclusiones del ensayo, los datos recaudados son el porcentaje de mortalidad al tiempo máximo de lectura, así como también la mortalidad por día expresada en porcentaje, todo esto con el fin de calcular mediante regresión lineal la concentración letal media, orientando sobre el comportamiento de cada concentración y sobre la más efectiva de las concentraciones usadas.

RESULTADOS

Se realizaron 2 bioensayos para evaluar el efecto de *Metarhizium anisopliae* en larvas de 2do instar y en adultos hembras de *Aedes aegypti*

En ambos estadios, tanto larvas como adultos, se empleó la formulación del hongo, previamente preparada a partir del granulado y diluyendo con 5 mL de agua destilada. Se prepararon 3 diluciones de *Metarhizium anisopliae*, cuyas concentraciones finales fueron 0.3gr/ml; 0.2gr/ml y 0.1gr/ml. La concentración mayor demostró tener una excelente efectividad en larvas ocasionando el 100% de mortalidad en cepas Mario Briceño Iragorry y Rockefeller dentro de las primeras 72 horas (Tabla I) , por otro lado, en los adultos se observó mejor mortalidad en la cepa de Mario Briceño Iragorry en comparación con los datos obtenidos para la cepa Rockefeller, manifestando una mortalidad del 100% antes de los 10 días en la cepa de Mario Briceño Iragorry mientras en la cepa Rockefeller transcurrido el mismo tiempo se obtuvo una mortalidad máxima de 45% (Tabla II).

La concentración letal obtenida para las larvas de *Aedes aegypti* fue de aproximadamente de 0,2gr/ml esto debido a que se observó la mejor mortalidad en el menor tiempo con una dosis baja.

Los cambios morfológicos observados en larvas y adultos, eran los esperados según el método de acción del hongo, en el caso de las larvas se evidenció deshidratación lo que consecuentemente causa flacidez del cuerpo, así como también encorvamiento y reducción de la larva (Figura 9) también se observó la separación de la cabeza del tórax, en los adultos también ocurre una deshidratación y pérdida de peso, ya que al enfermarse se debilita y disminuye su ingesta de alimentos, sin embargo el cambio

morfológico que resulta más evidente es el crecimiento y esporulación del hongo en el cuerpo del mosquito, presentando mayor densidad del mismo en el abdomen, esto debido a que luego de la penetración del hongo, este se disemina por todo el intestino del mosquito y por ende hacia afuera del mismo.

Tabla I. Efecto bioinsecticida de *Metarhizium anisopliae* contra larvas de *Aedes aegypti*. Bioensayo N° 1. Cepas de Mario Briceño Iragorry y Rockefeller, 2023

Cepa	**Concentraciones**	**24 horas**	**48 horas**	**72 horas**
Mario Briceño Irragorry	0,1g/ml	37,5 %	20%	42,5%
	0,2g/ml	72,5%	25%	2,5%
	0,3g/ml	80%	20%	0%
Cepa	Concentraciones	24horas	48horas	72horas
Rockefeller	0,1g/ml	45%	35%	20%
	0,2g/ml	70%	25%	5%
	0,3g/ml	47.5%	37,5%	15%
Control no tratado	Mario Briceño Iragorry	0%	0%	0%
	Rockefeller	0%	0%	0%

Tabla II. Efecto bioinsecticida de *Metarhizium anisopliae* contra adultos de *Aedes aegypti*. Bioensayo N° 1. Cepas de Mario Briceño Iragorry y Rockefeller, 2023

Cepa	**Concentración**	**Día 1**	**Día 2**	**Día 3**	**Día 4**	**Día 5**	**Día 6**	**Día 7**	**Día 8**	**Día 9**	**Día 10**
Mario Briceño Irragorry	0,1g/ml	0%	0%	0%	15%	10%	10%	15%	20%	5%	5%
	0,2g/ml	0%	0%	0%	20%	0%	5%	10%	0%	40%	10%
	0,3g/ml	0%	10%	10%	10%	5%	20%	20%	10%	15%	0%
Cepa	Concentración	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
Rockefeller	0,1g/ml	0%	0%	0%	0%	0%	0%	5%	5%	0%	5%
	0,2g/ml	0%	0%	0%	5%	5%	0%	5%	10%	10%	5%
	0,3g/ml	0%	0%	0%	0%	5%	5%	10%	5%	10%	10%
Control no tratado	Cepa	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10
	Mario Briceño Iragorry	0%	0%	0%	0%	0%	2.5%	0%	0%	0%	0%
	Rockefeller	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2.5%	0%	0%	0%

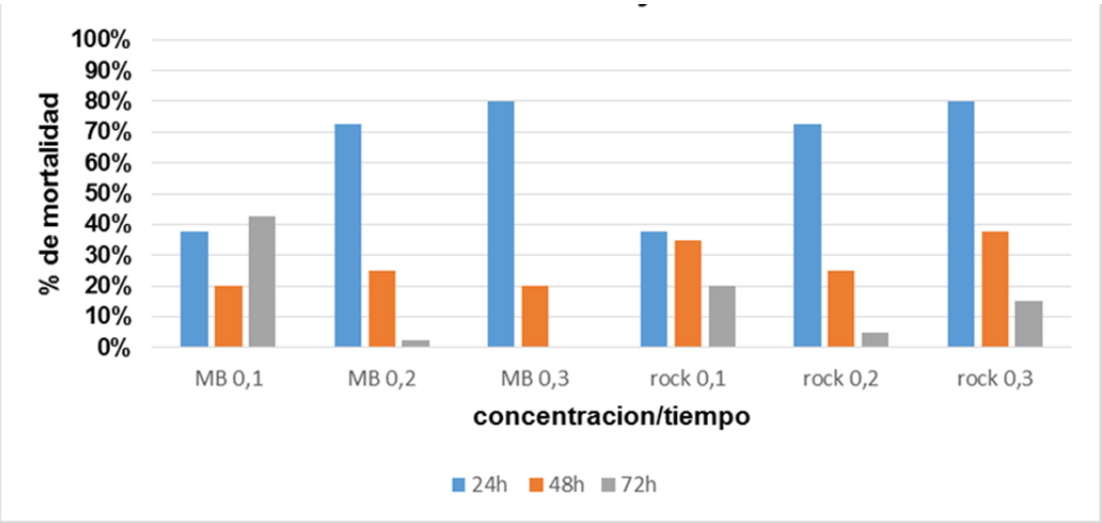

Figura 2. Representación gráfica de estadística descriptiva para mortalidad en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry y cepa de referencia Rockefeller

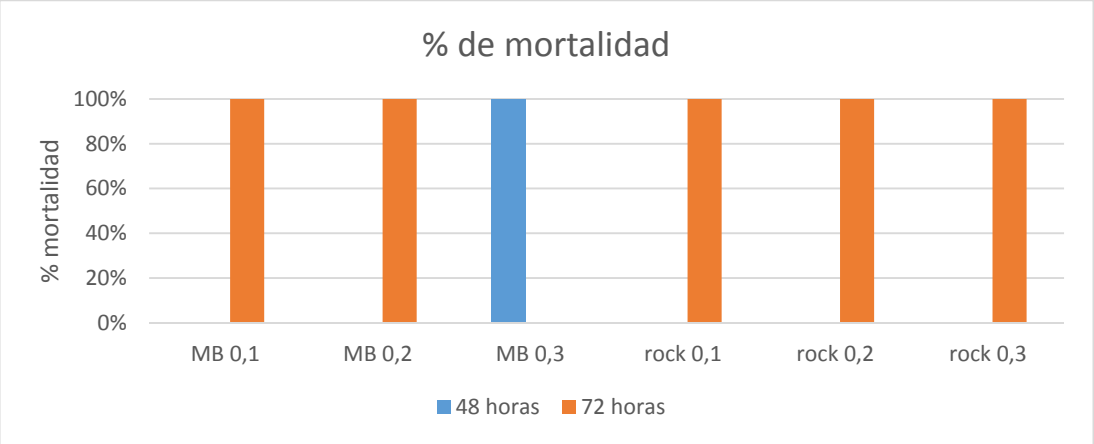

Figura 3. Representación gráfica de estadística descriptiva para el mayor alcance de mortalidad en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry y cepa de referencia Rockefeller a los 3 días de lectura

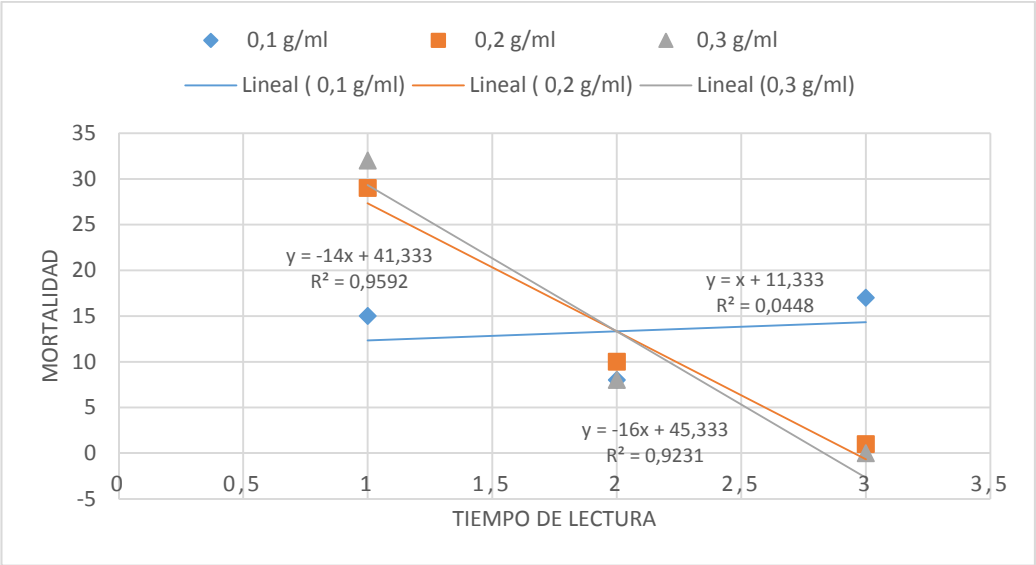

Figura 4. Regresión y correlación lineal para la determinación de concentración letal CL50 para larvas de *Aedes aegypti*, cepa Mario Briceño Iragorry

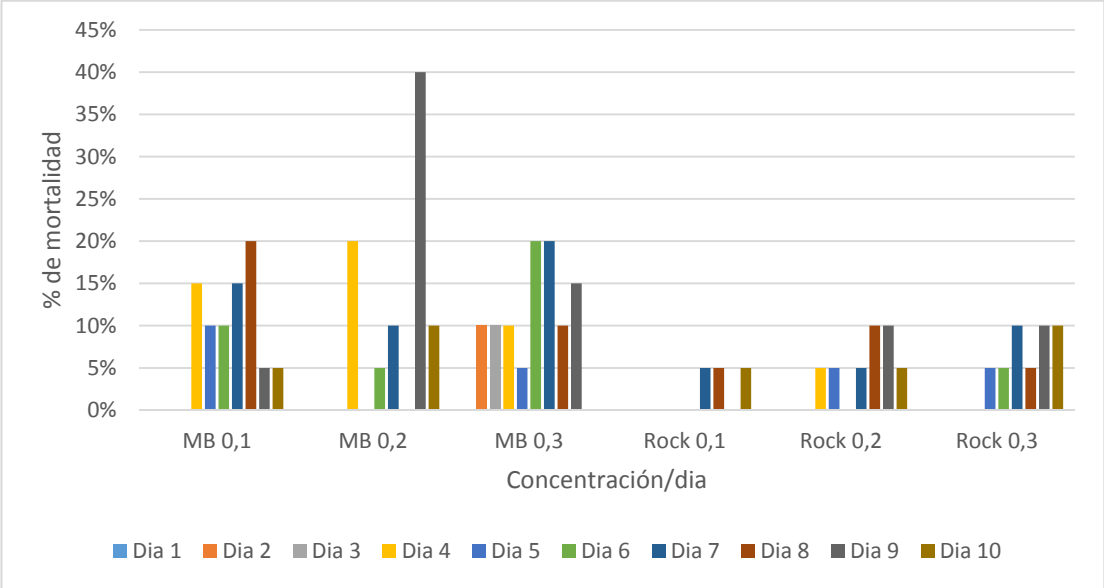

Figura 5. Representación gráfica de estadística descriptiva para mortalidad en adultos de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry y cepa de referencia Rockefeller

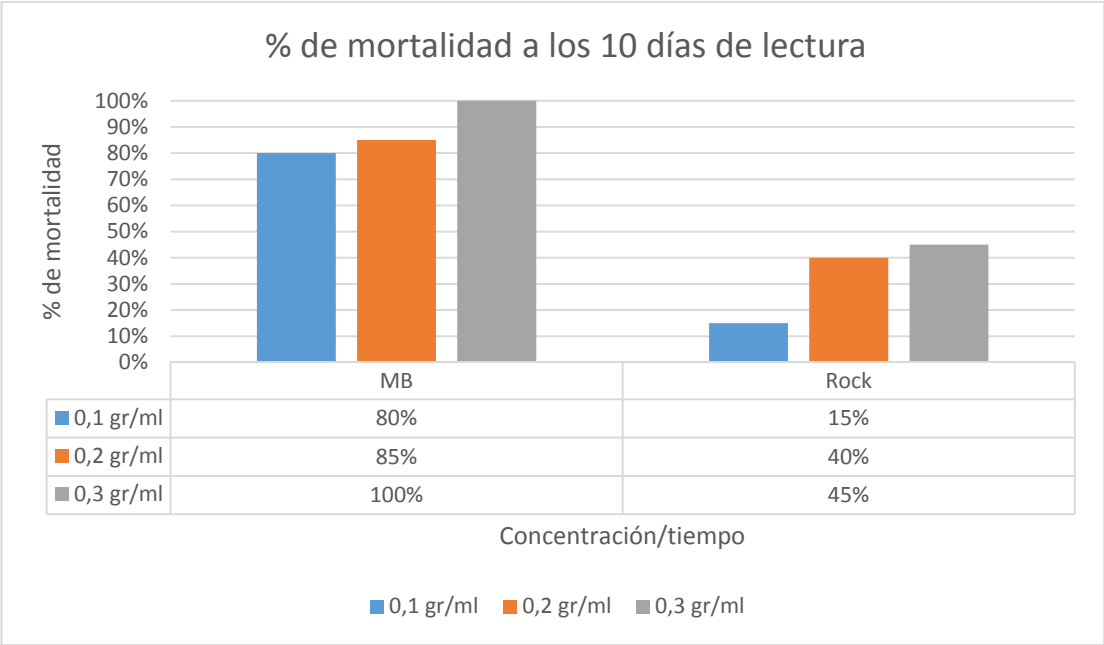

Figura 6. Representación gráfica de estadística descriptiva para el mayor alcance de mortalidad en adultos de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry y cepa de referencia Rockefeller a los 10 días de lectura

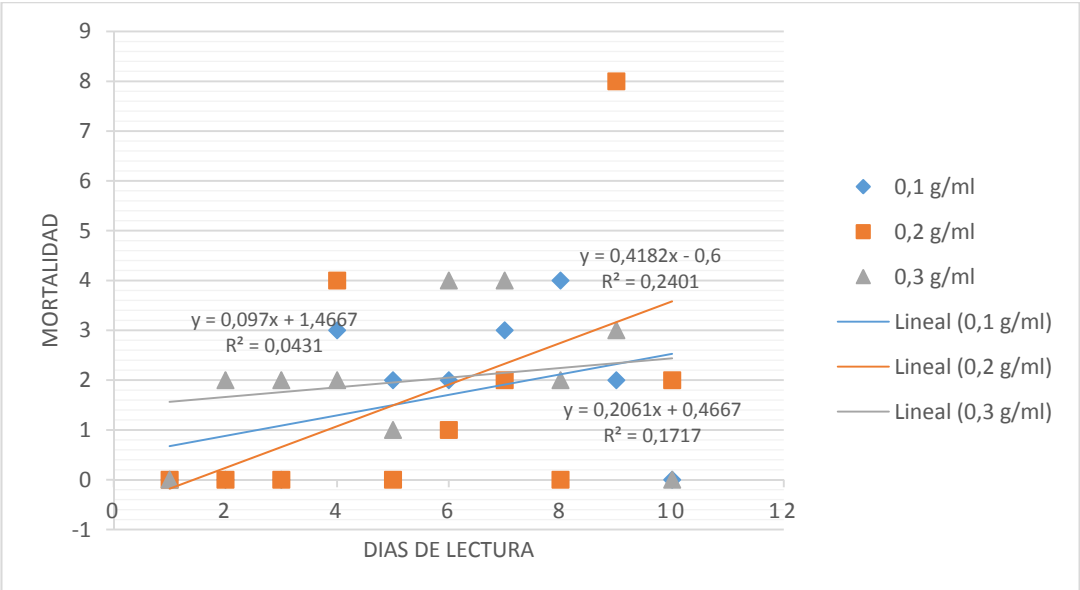

Figura 7. Regresión y correlación lineal para la determinación de concentración letal CL50 para adultos de *Aedes aegypti* cepa Mario Briceño Iragorry.

Figura 8. Cambios morfológicos en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,1 g/mL.

Figura 9. Cambios morfológicos en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,2 g/mL.

Figura 10. Cambios morfológicos en larvas de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,3 g/mL.

Figura 11. Cambios morfológicos en adultos hembras de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,1 g/mL.

Figura 12. Cambios morfológicos en adultos hembras de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,2 g/mL.

Figura 13. Cambios morfológicos en adultos hembras de *Aedes aegypti* de cepa Mario Briceño Iragorry tratadas con *Metarhizium anisopliae* a concentración de 0,3 g/mL.

DISCUSION

En el proceso de evaluación para la determinación de la eficacia de *Metarhizium anisopliae* para el control del vector de larvas y adultos de *Aedes aegypti*, se encontró que las concentraciones al que el bioinsecticida es efectivo es el rango 0,1g/ml a 0,3g/ml, variando tasa de mortalidad en cada concentración establecida ocasionando mortalidad de la población. Donde el control obtuvo 0% de mortalidad en los 3 días de lectura para las larvas de *A. aegypti* tanto la cepa de campo Mario Briceño Iragorry y cepa obtenida del laboratorio Rockefeller, evidenciando la estabilidad y viabilidad de la cepa en estudio.

Tanto en la tabla I como en la gráfica 1 se muestran las concentraciones de 0,1gr/ml, 0,2gr/ml y 0,3gr/ml de *M. anisopliae* contra larvas de II instar de *A. aegypti* las cuales tuvieron mortalidad desde el día 1, donde a las 24horas se obtuvo un 37,7%, 72,7% y el 80% respectivamente para cada concentración. La efectividad máxima que se obtuvo fue a las 24 horas de la aplicación del producto a una concentración de 0,3gr/ml obteniendo mortalidad total a las 48 horas, no obstante, a las 72 horas de aplicación las 2 concentraciones restantes lograron un 100% de mortalidad.

De esta manera, las larvas de *Aedes aegypti* son susceptible frente al bioinsecticida *M. anisopliae,* dichos resultados son discutidos en base a otros estudios realizados como son:

Tercero y Medrano (2019) en su bioensayo sobre Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti* donde evaluaron la eficacia de *B.bassiana, M.anisopliae* y un

conjugado entre ambos, obteniendo una concentración letal media (CL50) para *B. bassiana* de 0.27 gr/ml, *M. anisopliae* es 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 (R2) 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 se obtiene.

La alta tasa de mortalidad larval se ve explicada por el mecanismo de patogenicidad del hongo, que acorde con los resultados obtenidos por Alcalde *et al* (2014) presentaron características anormales indicando la acción de toxinas, además mostraron cambio de color en el tegumento, generando así una cubierta blanquecina que envolvía a todo el cuerpo de la larva, también filamentos blancos que salían del cuerpo de la misma. Se evidenciaron daños físicos como deshidratación por perdida de fluidos, causando la flacidez del cuerpo de la larva, así como la separación de la cabeza del tórax, reducción del tamaño y encorvamiento del cuerpo.

La aplicación del bioinsecticida *Metarhizium anisopliae* empleados sobre larvas de II instar del vector *A.aegypti* ensayadas en el laboratorio, bajo condiciones ambientales de temperaturas y una humedad relativa, demostraron tener capacidad biocida sobre las mismas. No obstante, como se fundamenta en Mosqueira *et at* (2014), aún no hay evidencias suficientes que indique la dependencia de las condiciones ambientales y la biología de los hongos, puesto que la capacidad bioinsecticidad depende principalmente

de la interacción insecto patógeno y la adecuada elección, formulación a utilizar y oportuna aplicación.

Las larvas de II instar de *A. aegypti* se vieron afectadas por las tres concentraciones del hongo entomopatógeno aplicadas; como lo explica Tercero y Medrano (2019) en su investigación donde 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%, seguido de este está 0.2 gr/ml el cual alcanzó 50% en el 2° día y finalmente 0.1 gr/ml quien logró un poco más de la mitad hasta el 6° día con un 65%, esto concuerda con los estudios obtenidos en el estudio donde la concentración 0,3gr/ml obtuvo en su primer día 80% de mortalidad, seguida muy de cerca por la concentración de 0,2gr/ml que obtuvo un 72,5%, y finalmente la concentración de 0,1gr/ml que alcanzó más de 50% a partir del 2° día.

En la eficacia de los bioinsecticidas se debe de tomar en cuenta la CL50 de cada bioensayo para así obtener que tan susceptibles han sido las larvas de II instar de *A. aegypti* frente a las concentraciones aplicadas de la formulación del bioinsecticida. Cuanto menor sea la cantidad requerida, más tóxico es el material del bioinsecticida y la CL50 letal media tiene mayor eficacia o susceptibilidad.

La CL50 para *Metarhizium anisopliae* es aproximadamente 0.2 gr/ml su coeficiente de determinación es R2 = 0.9592, esto quiere decir que, en promedio, el 50 % de las larvas morirán si se exponen a una concentración de 0,23 g/ml del bioinsecticida. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que las tres concentraciones tienen muy buena eficacia o susceptibilidad, ya que

los tres tienen CL50 menos de 1gr/ml, donde se considera que la CL50 es una estándar utilizado para estandarizar la eficacia de un insecticida donde se dice que mientas sea menor, mayor susceptibilidad tendrá el bioinsecticida.

Para establecer mayor seguridad en los resultados obtenidos se establece otro parámetro de confianza complementario que es el coeficiente de determinación que se representa como R2, esto lo que nos indica es la relación entre las variables Y (es la mortalidad del vector), X (dosis aplicada) como se observa en las gráficas. Los coeficientes de determinación para cada concentración del hongo ensayado contra las larvas son: concentración de 0,1gr/ml es R2 del 4% (0.0448) , para 0,2gr/ml R2 es de 95%(0.9592) y el de 0,3gr/ml R2 es de 92% (0.9241), aseverando que el modelo lineal es adecuado, ya que el coeficiente de determinación siendo sus límites $0 \leq R2 \leq 1$, lo cual refleja el 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 Tercero y Medrano (2019).

La gráfica para los adultos respecto a la regresión lineal obtenida para la cepa de campo en estudio indica que hubo linealidad positiva en relación a la concentración del bioinsecticida y la mortalidad de los adultos de *Aedes aegypti*. La correlación y regresión sugieren que la concentración letal CL50 es de aproximadamente 0,2 gr/ml, este parámetro es de importancia para evaluar la toxicidad y efectividad de la sustancia en estudio, así como también para desarrollar estrategias de control en base a la concentración sugerida.

Los bioensayos para los adultos evidencian su efectividad mayor en la concentración más alta obteniéndose una mortalidad superior al 50% de la cepa en estudio en el 6° día mientras que en las concentraciones restantes se observó mortalidad del 50% entre el 7° y 8° día en las concentraciones menor y media respectivamente.

La reducción de la densidad de la población en comparación con la cepa control no tratada es indicativo de la efectividad del hongo, fue posible observar diferencias significativas en la supervivencia del control en contraste con las cepas con tratamiento fúngico, lo cual indica con base que la mortalidad de los individuos viene dada por los efectos patógenos del hongo en ensayo y no por condiciones desfavorables ya sea ambientales o alimenticias, además fue posible evaluar y comparar el tiempo de mortalidad para cada una de las concentraciones estudiadas consiguiendo así datos de utilidad para obtener la concentración letal media.

En la concentración mayor se obtuvo el 100% de mortalidad en el noveno día, siendo esta la más efectiva como se mencionó anteriormente, mientras que en la concentración media y la baja se obtuvieron 85% y 80% de mortalidad respectivamente durante la lectura del décimo día, sin embargo, la mortalidad en caso de las 3 concentraciones inicio entre las 48 y 96 horas de exposición lo que habla sobre el periodo aproximado que requiere el patógeno para causar la enfermedad del individuo.

Los resultados obtenidos en el presente ensayo son comparables a los obtenidos en el trabajo de Falvo, (2019) quien basó su estudio en la selección de aislamientos nativos de *M. anisopliae* como potenciales agentes de control biológico de *Ae. aegypti* en donde evidenció que tras la exposición

de los ejemplares a los aislamientos fúngicos se ve afectada considerablemente la supervivencia de los mismos en comparación con la cepa control y tras una media de 5 a 7 días posterior a la infección de los adultos en estudio. Asimismo, la autora del mencionado trabajo de investigación indica que el vector en estudio es capaz de transmitir el virus del dengue entre 5 y 19 días después adquirirlo y a una temperatura aproximada de 30°C, sin embargo, en la presente investigación se obtuvieron resultados a partir de las primeras 48 horas lo que sugiere que *Metarhizium anisopliae* podría ser un método eficaz para controlar la población de *Aedes aegypti* ya que el hongo es efectivo para reducir la mortalidad de los mosquitos en un período de tiempo relativamente corto, lo que podría ayudar a prevenir la transmisión de enfermedades transmitidas por mosquitos.

Además de los resultados cuantitativos, es importante considerar los resultados cualitativos del estudio. Los mosquitos expuestos al hongo mostraron signos de enfermedad, como pérdida de peso, deshidratación y coloración anormal, conjuntamente antes de morir hubo cambios en el patrón de comportamiento como desorientación o vuelo desorganizado, lo cual es indicativo de que a pesar de no fallecer ya estaban afectadas sus conductas como consecuencia de la enfermedad presente lo cual en situación externa a las condiciones de laboratorio también afecta la viabilidad del mosquito sugiriendo disminución de la supervivencia. Debido a que Metarhizium anisopliae presenta un alto contenido de aminopeptidasas e hidrofobina, las cuales favorecen la acción de enzimas extracelulares sobre la cutícula del insecto.

Al entrar en contacto con el mosquito el tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la localización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula. El hongo excreta una gran cantidad de enzimas entre las que se incluyen proteasas, quitinasas,

quitobiasas, lipasas, lipooxigenasas y otras enzimas hidrolíticas, que van degradando la cutícula y proporcionan a su vez nutrientes al hongo generando daño celular. Una vez dentro del insecto, el hongo prolifera formando cuerpos hifales secundario, complementando el daño tisular. Al agotarse los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento miceliar invadiendo todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie por el intestino del vector

CONCLUSIONES

- Las larvas de II instar *Aedes aegypti* son susceptibles a *Metarhizium anisopliae* obteniendo su máxima concentración efectiva de 0,3gr/ml, pero siendo susceptibles a las tres concentraciones establecidas y ensayadas.
- La eficacia fue medida como la Concentración Letal Media que fue aproximadamente de 0,2gr/ml, lo cual sugiere que a partir de esta concentración el 50% de la población larval y de adultos del vector *A. aegypti* es susceptible al bioinsecticida.
- El método de aplicación directo de las concentraciones de bioinsecticida preparado a diversas concentraciones dio resultados promisorios ya que la agresividad de las cepas fúngicas se corresponde con el método de contagio del hongo y se evidenció en las modificaciones de las características morfológicas de las larvas**.**
- La eficacia del hongo en estudio resulta más evidente en la población de larvas que en la de adultos, lo que nos permite predecir que el uso del bioinsecticida en criaderos sería una excelente estrategia de control para el vector, ya que se obtendrían resultados más rápidos interrumpiendo el ciclo de vida del mosquito.
- A pesar de que la concentración mayor arrojó mejores resultados, las concentraciones media y baja, no se alejaron del nivel de excelencia que ofrece el uso del hongo en ambos estadios estudiados.

RECOMENDACIONES

- En base a los resultados obtenidos en la investigación, se recomienda utilizar el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en concentraciones de 0.3 gr/ml y en concentraciones elevadas para resultados en menor tiempo al obtenido en este ensayo
- Se recomienda ampliar la línea de vectores sobre los que ensayan las formulaciones de bioinsecticidas a partir, incluyendo así vectores como *Culex* y *Anopheles*, los cuales representan un riesgo de salud pública.
- Se debe comprobar la efectividad del ensayo realizado en el laboratorio, con las mismas concentraciones, pero en condiciones de campo, esto con el fin de confirmar los resultados obtenidos. Esta resulta una recomendación fundamental e importante para garantizar que los resultados obtenidos pueden ser usados más adelante para estrategias de control vectorial.
- Siguiendo el mismo orden de ideas, se debe evaluar la eficacia del producto haciendo ligeros cambios en las condiciones ambientales para evaluar la variabilidad de los resultados.
- En base a lo antes expuesto, se recomienda hacer un análisis de los factores que pueden haber afectado los resultados, como por ejemplo la temperatura, humedad e incluso calidad de las diluciones del hongo, esto con el fin de evaluar la posibilidad de mejoras en los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña, M., García, C., Rosas, N., López, M., & Saínz, J. (2015). Formulación de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *Heliothis virescens* (Fabricius). Revista internacional de contaminación ambiental, vol 31, p 219-226. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992015000300001

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.

Arredondo-García, JL, Méndez-Herrera, A, & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. Acta pediátrica de México, 37, 111-131. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-23912016000200111&lng=es&tlng=es.

Barrera R. (2015). Control de los mosquitos vectores del dengue y de chikunguña. Biomédica Inst. Nac. Salud. 35

Bezerra H. (2014). Otras tecnologías en el control de *aedes aegypti*. OPS/OMS.CENTRO NACIONAL DE TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DENGUE/ CHIKUNGUNYA/ VIRUS ZIKA. SECRETARIA DE SALUD GOBIERNO DE MÉXICO. 1-3 Recuperado de: http://cnts.salud.gob.mx/interior/DIAGNOSTICO_DIFERENCIAL_DENGUE_CHIKUNGUNYA_ZIKA.pdf

Falvo Marianel Lucía. (2019). Selección de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* como potenciales agentes de control biológico de *Aedes aegypti* (Diptera,Culicidae). Recuperado de: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/81873/CONICET_Digital_Nro.b23ad5c4-1f9f-4d18-a10b-ce4befe1fae8_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y

Fischbein, D. (2012). *Introducción a la teoría del control biológico de plagas*. Laboratorio de Ecología de Insectos, INTA EEA Bariloche, p 6-8. Recuperado de: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-control_biolgico_de_plagas.pdf

Gandarilla-Pacheco Fatima Lizeth, Pérez Garza Carolina Elizabeth, De Luna Erick De Jesús, Santillana, alemán-Huerta María Elizabeth y Quintero-Zapata Isela. (2020). EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ESTADIOS LARVARIOS DE *Aedes aegypti.* ISSN: 2448-475X. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/344168987

Gómez Garcia, G. (2017). *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: Culicidae) y su importancia en salud humana. Revista Cubana de Medicina Tropical, 70. Recuperado de: http://www.revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/214/193

Marruffo Marco, Guevara Milady, Cornieles Ricardo, Castillo Ángel, Flores Karen, Mazzarri Milena & Guerrero Heldomira. Conocimientos, actitudes y prácticas sobre Dengue, y control de *Aedes aegypti*, municipio Mario Briceño Iragorry. (2017). *BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL ISSN*: 1690 - 4648 Enero-Julio 2019, Vol. LIX (1): 19-32

OPS/OMS. (2010, 29 noviembre). *Aedes Aegypti: medidas para el control del vector*. Organización Panamericana de la Salud. Recuperado de: https://www.paho.org/es/noticias/29-11-2010-aedes-aegypti-medidas-para-control-vector

OPS/OMS. (2010, 29 noviembre). *Aedes Aegypti: medidas para el control del vector*. Organización Panamericana de la Salud. Recuperado de: https://www.paho.org/es/noticias/29-11-2010-aedes-aegypti-medidas-para-control-vector

Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & de la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia, 31, p 856-860. Recuperado de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006

Tercero Padilla Nubia Gabriela y Medrano Guerrero Soylen Xiomara (2019). Hongos entomopatógenos como bioinsecticidas para el control del vector *Aedes aegypti*, UNA, CNDR y POLISAL-UNAN-MANAGUA, octubre 2017-abril 2018(tesis de pregrado). Instituto Politécnico de la Salud “Luis Felipe Moncada. Managua

Torres-Estrada JL, Mendoza-Ledesma MN, Gálvez-Coutiño OR. (2020). Efecto de la combinación de *Metarhizium anisopliae y Gliocladium virens* sobre la oviposición, eclosión y emergencia de Aedes aegypti. *Salud Pública Mex.* 62:410-416. Recuperado de: https://doi.org/10.21149/11035