



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de Química

Trabajo de Tesis Doctoral:

Aporte en el desarrollo de insecticidas biológicos basados en el entomopatógeno *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes) para el control de mosquitos vectores.

Tesista: Pedrazzi, María Celeste

Director/a: Cavalitto, Sebastian

Codirector/a: López Lastra, Claudia C.

Año: 2024

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas UNLP



Tesis Doctoral

Aporte en el desarrollo de insecticidas biológicos basados en el entomopatógeno *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes) para el control de mosquitos vectores.

2024

Tesista: Lic. María Celeste Pedrazzi

Directores: Claudia López Lastra y Sebastián Cavalitto

Agradecimientos

El primer agradecimiento especial es para mi hermoso hijo Gael, él fue la fuerza que me saco adelante en mis momentos de mayor incertidumbre e inseguridades. Su hermosa sonrisa me hizo sacar lo mejor de mí, y con su mirada de amor me dijo todo lo que no pudo en palabras.

A mi familia, por acompañarme, aconsejarme y alentarme en momentos de frustración, angustia, emoción y felicidad, que siempre me dieron una mano para salir hacia adelante. Mi madre, Cecilia Elena Bernardelli que siendo del ámbito científico no solo me asesoro como mamá sino también como una colega de trabajo. Ella es un gran ejemplo a seguir y la admiro mucho. A mis hermanos, Julián P. Pedrazzi, Máximo G. Pedrazzi y M. Victoria Pedrazzi los amo con todo mi ser. A mi hermosa cuñada, M Fernanda Cortez que compartimos muchos momentos y consejos. A mi pareja, Javier A. Rodríguez, que siempre esta con los abrazos que más me contuvieron. A mi padre que a pesar de las diferencias que podamos tener estuvo ayudando con lo más importante en mi vida, mi hijo.

Les agradezco a mis directores de tesis, el Dr. Sebastián Cavalitto y la Dra. Claudia C. López Lastra sin ellos no podría haber realizado mi trabajo, siempre estaban cuando los necesitaba.

Al Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) dirigido por M Victoria Micieli y al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) dirigido por Sebastian Cavallito, que brindaron con las instalaciones y equipos necesarios para realizar los ensayos de mi trabajo.

Al CONICET por brindarme la oportunidad de trabajo, capacitando en diversos temas y equipamientos.

A mis amigos, que son parte fundamental en esta vida. Del colegio una mención especial a M Eugenia Juárez, la madrina de mi hijo y una amiga invaluable. Podemos vernos poco pero siempre está cuando más la necesito, prestando una

oreja para escucharme. Mis amigos de la facultad, Javier A. Lamarra, Gisela M. Gaddi, Nereida Quesada, Lujan Basal, Vanesa Giangreco, Cintia Cabrera los quiero mucho, gracias por estar en mi vida.

Por último y no menos importante a mis compañeros de trabajo tanto del CEPAVE, Eliana Orodqui, Anahí Musso, Mariana Mendiburu, Marianel Falvo, Romina Manfrino, Alejandra Gutierrez, Manuel Rueda Paramo, Flavia Diez del Valle, Natalia Scelsio y Francisco Lozano como a los del CINDEFI que siempre me ayudaron y aconsejaron cuando era posible, así que se los agradezco de todo corazón.

Índice

Resumen	1
Introducción	5
Hipótesis	7
Objetivos	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos	8
Antecedentes	9
<i>Aedes aegypti</i>	9
Distribución geográfica.....	10
Ciclo de vida	11
Huevos.....	12
Larvas	13
Estado de pupa.....	15
Adulto	16
Importancia sanitaria de <i>Aedes aegypti</i>	17
Dengue	18
Fiebre amarilla.....	20
Chikungunya	22
Zika.....	23
Control del vector <i>Aedes aegypti</i> . Importancia	24
Control cultural.....	24
Control químico	25
Control biológico	27
Enemigos naturales usados en el control biológico.....	28
Hongos entomopatógenos	31
<i>Leptolegnia chapmanii</i>	34
Taxonomía y características estructurales	34
Ciclo biológico	36
Infección de larvas de mosquito	37
Efecto de <i>Leptolegnia chapmanii</i> en organismos blanco y no blanco.....	38
<i>Leptolegnia chapmanii</i> y su tolerancia a diferentes condiciones	39
Importancia del escalado, producción masiva y formulaciones	41
Capítulo I: Cultivo en frascos Erlenmeyer: Caracterización del crecimiento de <i>Leptolegnia chapmanii</i> Seymour (Straminipila: Peronosporomycetes) en diferentes medios de cultivo y condiciones de agitación.	44
Introducción.....	44
Cinética de crecimiento	46
Materiales y Métodos.....	50
Determinación del K_{La} en escala frascos agitados.....	50
Cultivo de <i>Leptolegnia chapmanii</i> con diferentes medios de cultivo y condiciones de agitación.....	52
Resultados y discusión.....	55
Determinación del k_{La} en escala frascos agitados.....	55
Cultivo de <i>Leptolegnia chapmanii</i> con diferentes medios y condiciones de cultivo	58
Descripción de la biomasa obtenida	58

<i>Análisis de los rangos de diámetros</i>	60
<i>Análisis de las áreas de extensión</i>	68
Conclusiones	81
Capítulo II: Cultivo en Biorreactores	82
Introducción.....	82
Biorreactores.....	82
<i>Tanques agitados</i>	83
<i>Columna de burbujeo</i>	85
<i>Reactor de corriente de aire (Airlift)</i>	88
Influencia de la agitación en cultivo	89
Materiales y Métodos.....	90
<i>Preparación del inóculo</i>	90
<i>Tanque agitado</i>	91
<i>Columna de burbujeo</i>	92
<i>Análisis de las muestras</i>	94
Resultados y discusión.....	94
<i>Tanque agitado</i>	95
<i>Columna de burbujeo</i>	99
Conclusión.....	101
Capítulo III: Formulaciones para el almacenamiento de las zoosporas de <i>Leptolegnia chapmanii</i>	103
Introducción.....	103
Formulación	105
Componentes de un formulado	105
Clasificación de los coadyuvantes.....	107
Tipos de formulación.....	107
<i>Formadoras de soluciones</i>	108
<i>Formadoras de emulsiones</i>	108
<i>Formadoras de suspensiones</i>	109
Inmovilización celular	111
<i>Inmovilización por aprisionamiento en gel</i>	111
Materiales y métodos	113
<i>Preparación del formulado de suspensión: mezcla de goma xántica, PVP y glicerol</i>	113
<i>Formación de perlas de alginato: evaluación de la relación de concentración y estabilidad en el tiempo</i>	113
<i>Toxicidad de los formulados sobre las larvas de mosquitos sin principio activo</i>	114
Resultados y discusión.....	115
<i>Toxicidad entre el formulado y las larvas de mosquito sin principio activo</i>	115
<i>Formación de perlas de alginato: relación de concentración y estabilidad en el tiempo</i>	117
Conclusión.....	119
Capítulo IV: Mortalidad sobre las larvas de mosquito	121
Introducción.....	121
Materiales y Métodos.....	122
<i>Estandarización de la relación biomasa-agua para la producción de zoosporas</i>	122

<i>Efecto del medio de cultivo y la agitación sobre la virulencia de las zoosporas de L. chapmanii</i>	123
<i>Efecto de los iones Ca⁺² y Mg⁺² en la producción y virulencia de las zoosporas de L. chapmanii</i>	124
<i>Virulencia de las zoosporas de L. chapmanii producidas en biorreactores</i>	125
<i>Efecto del formulado en alginato de calcio sobre la viabilidad y virulencia de las zoosporas de L. chapmanii</i>	126
Resultados y discusión.....	127
<i>Estandarización de la relación biomasa-agua para la producción de zoosporas</i>	127
<i>Efecto del medio de cultivo y la agitación sobre la virulencia de las zoosporas de L. chapmanii</i>	134
<i>Efecto de los iones Ca⁺² y Mg⁺² en la producción y virulencia de las zoosporas de L. chapmanii</i>	137
<i>Virulencia de las zoosporas de L. chapmanii producidas en biorreactores</i>	138
<i>Efecto del formulado en alginato de calcio sobre la viabilidad y virulencia de las zoosporas de L. chapmanii</i>	139
Conclusiones	140
Anexo	143
Bibliografía	149

Resumen

El control biológico es una estrategia utilizada en la agricultura y en la gestión de plagas para reducir o eliminar poblaciones de organismos dañinos (perjudiciales a cultivos o vectores de enfermedades), utilizando microorganismos u otro agente biológico en lugar de agentes químicos. Los diferentes microorganismos utilizados en el control biológico pueden ser bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoos. En este trabajo de investigación se utilizó *Leptolegnia chapmanii*, un pseudo-hongo entomopatógeno de diferentes especies de mosquitos, dentro de las cuales encontramos *Aedes aegypti*, un vector de enfermedades de interés sanitario. La capacidad de este microorganismo de afectar específicamente a larvas de mosquitos y no perjudicar a otros organismos “no blanco”, generó interés en profundizar su estudio como agente de control biológico, planteando el objetivo de desarrollar una metodología para la producción y almacenamientos de productos basados en *L. chapmanii*.

En primera instancia se analizó la formación de pellets y la cinética de crecimiento de *L. chapmanii* a escala de laboratorio, utilizando tres medios de cultivo (Peptona-Extracto de levadura-Glucosa (PYG), Semilla de Girasol (SG) y Harina de Soja (HS)) bajo tres condiciones de agitación diferentes (en agitador orbital a 150 rpm, en agitación y frascos Erlenmeyer con baffles y sin agitación). Los pellets obtenidos en estos ensayos tuvieron diferentes zonas, independientemente del tipo de medio de cultivo y la agitación. Se hallaron tres zonas: un núcleo, el cual permitió el crecimiento radial, una zona donde se genera autólisis para el mantenimiento, y la tercera zona denominada pilosa, donde las hifas están viables. El tipo de agitación influyó en las características de los pellets y en su cantidad. Los dos sistemas con agitación permitieron una cantidad mayor de pellets con rango de diámetros variables, creciendo en el seno del líquido y siendo más compactos; en cambio, el sistema sin agitación solo formó un pellet en la interfase aire-agua siendo más flexibles.

Además, se realizó la cinética de crecimiento para los tres medios de cultivo en las tres condiciones de agitación. Para el medio PYG se obtuvieron los siguientes resultados: con agitación fue 40 ± 7 g/L de peso húmedo y de 1.6 ± 0.2 g/L de peso seco (5 días), para el sistema con baffles fueron de 51 ± 28 g/L de peso húmedo y de 2 ± 1 g/L de peso seco (5 días) y para el sistema sin agitación el peso húmedo fue de 45 ± 8 g/L y el peso seco fue de 1.2 ± 0.2 g/L (12 días). Para el medio SG en las dos condiciones de agitación la biomasa máxima se detectó en el quinto día, en cambio, sin agitación ocurrió en el séptimo día; para el sistema con agitación se obtuvo 67 ± 27 g/L de peso húmedo y 6 ± 2 g/L de peso seco, para el sistema con baffles se obtuvo 81 ± 7 g/L de peso húmedo y 5 ± 1 g/L de peso seco y para el sistema sin agitación se obtuvo 33 ± 6 g/L de peso húmedo y 4 ± 1 g/L de peso seco. Para el medio HS, los dos sistemas con agitación alcanzaron la biomasa máxima a los 5 días, donde el sistema con agitación obtuvo un peso húmedo de 29 ± 8 g/L y 1.3 ± 0.2 g/L de peso seco y para el sistema con baffles se consiguió 24 ± 6 g/L de peso húmedo y 1.0 ± 0.2 g/L de peso seco. En cambio, la biomasa del sistema sin agitación se alcanzó a los 7 días con una biomasa de 13 ± 7 g/L de peso húmedo y 1.1 ± 0.4 g/L de peso seco.

Por otra parte, se comparó el crecimiento de *L. chapmanii* en dos tipos de biorreactores: uno agitado y uno de burbujeo, utilizando los medios de cultivo PYG y SG. En el biorreactor agitado, se observó que el hongo solo crecía en las paredes del reactor cuando se utilizaba el medio PYG, resultando en una biomasa pobre en 10 días. En contraste, al utilizar el medio SG en el mismo biorreactor, se obtuvo una biomasa de 49 g/L de peso húmedo y 2.8 g/L de peso seco en 6 días. Este medio promovió un crecimiento mayoritario en el seno del líquido, aunque también se observó adherencia en las paletas y baffles del reactor.

Cuando se utilizó el biorreactor de columna de burbujeo con el medio PYG, no se observó crecimiento del hongo hasta los 10 días de cultivo. En cambio, al emplear el medio SG en el mismo tipo de biorreactor, se obtuvo una biomasa de 50 g/L de peso húmedo y 3 g/L de peso seco en solo 24 horas. El biorreactor con el medio SG demostró un rendimiento superior en comparación con el tanque agitado, ya que produjo una biomasa comparable en un tiempo significativamente más corto.

Establecido el tipo de biorreactor y el medio de cultivo, lo siguiente fue analizar un tipo de formulado adecuado que permita almacenar las zoosporas, sin ser perjudicial a las larvas. Para ello se evaluó la toxicidad de dos formulados: el primero consistió en una mezcla de PVP, Glicerol y Goma Xántica (mezcla GX) y el segundo consistió en la encapsulación con alginato de sodio. Cuando se realizó la mezcla GX, se observó que las larvas de mosquito murieron en un tiempo menor al de *L. chapmanii*, es decir, que de alguna manera este formulado resultó tóxico. A continuación, se evaluó la toxicidad del alginato de calcio con las larvas de mosquitos, este resultado dio el esperable, el cual no resultó tóxico; por lo tanto, se decidió evaluar diferentes concentraciones de alginato y calcio, para disminuir costos en producción de las perlas. Se evaluaron las siguientes concentraciones: alginato al 3% con 1% de CaCl_2 , alginato al 2% con 2% de CaCl_2 , alginato al 2% con 1% de CaCl_2 , alginato al 2% con 0.5% de CaCl_2 , alginato al 2% con 0.25% de CaCl_2 , alginato al 1.5 con 0.5 % de CaCl_2 , alginato al 1.5% con 0.25% de CaCl_2 , alginato al 1% con 1% de CaCl_2 y alginato al 1% con 0.5% de CaCl_2 . De todas las concentraciones ensayadas la que permitió una buena formación de perlas fue la de 2% de alginato y 0.5% de calcio, por lo que los siguientes ensayos se realizaron con dicha relación.

Por último, se evaluó la mortalidad de las larvas de mosquitos para los tres medios de cultivo en las diferentes condiciones de agitación, para los biorreactores y para el formulado de alginato de calcio, ya que este tipo de ensayos pueden afectar a la virulencia de las larvas de mosquitos. Cuando se evaluó la mortalidad en los tres medios de cultivo en las tres condiciones de agitación diferente, se encontró que en el caso del medio PYG el sistema sin agitación presentó una mortalidad del 83.8% en 8 horas, para el medio SG ambos sistemas con agitación tuvieron una mortalidad de 86.5% en 24 horas, y para el medio HS el mejor sistema fue con baffles logrando una mortalidad del 89.6% a las 24 horas. Al compararse estos tres sistemas se concluyó que, si bien en el medio PYG se observó una mortalidad alta a un menor tiempo, los otros sistemas no tardaron mucho más tiempo en obtener un porcentaje elevado de muerte. Considerando otros factores como la biomasa máxima y su tiempo de obtención (mostradas en el Capítulo I), el mejor sistema es con agitación y baffles utilizando el medio de SG.

La mortalidad evaluada en los biorreactores fue utilizando el tanque agitado y columna de burbujeo con el medio SG. Se halló que el tanque columna de burbujeo presentó una mortalidad del 100% mientras que el tanque agitado fue cerca del 33%.

Con respecto a la formulación, se evaluó la mortalidad de las larvas de mosquitos a diferentes tempos (0, 10, 20 y 30 días) con la encapsulación. En ningún caso se evidenció mortalidad, llegando a la conclusión que algún factor durante el proceso de encapsulado perjudicó a las zoosporas. Una justificación de estos resultados, pudo deberse a que la agitación durante el procedimiento de encapsulación y/o la presencia de Ca hayan modificado la virulencia de las zoosporas. Además, la encapsulación impide el contacto entre las zoosporas y las larvas evitando la infección por contacto, y a su vez, las larvas no pudieron ingerir a las zoosporas evitando la infección por ingestión.

En conclusión, los resultados de este estudio resaltan el potencial de *L. chapmanii* como una herramienta eficaz en el control biológico de mosquitos, ofreciendo una alternativa prometedora a los métodos químicos tradicionales. Los hallazgos proporcionan una base sólida para futuros estudios y aplicaciones prácticas, con el objetivo de desarrollar estrategias de manejo integrado de plagas más sostenibles y eficientes.

Introducción

Existen numerosas enfermedades virales que se transmiten por mosquitos, siendo muchas de ellas letales debido a la falta de vacunación. *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), es un mosquito capaz de transmitir enfermedades como la fiebre amarilla, dengue, chikungunya, entre otras. Como dichas enfermedades no cuentan con vacunas (excepto para la fiebre amarilla) para disminuir la letalidad, el gobierno consta de campañas de fumigaciones para reducir el número de la población de los mosquitos. Para el año 2016, se logró una disminución en la cantidad de mosquitos. Sin embargo, con el paso del tiempo, la población volvió a aumentar su número, causando un aumento en los casos de las enfermedades sobre todo por el dengue, zika y chikungunya. Para el año 2022, en la Región de las Américas, se encontró con 2,812,155 casos de dengue de los cuales 1,290 fueron decesos, 273,685 casos de chikungunya de los cuales 87 fueron decesos y 40,249 casos de Zika fueron 2 decesos (Organización Mundial de la Salud, 2022).

El gobierno trató de implementar diferentes estrategias para el control poblacional de los mosquitos, sobre todo en zonas tropicales y subtropicales donde es habitual encontrar a esta especie. Las estrategias que implementaron fueron culturales (realizando campañas para evitar la formación de criaderos de mosquitos) y químicas (el uso de insecticidas). Sin embargo, el uso abusivo de los compuestos químicos permitió que los mosquitos desarrollen resistencia a los mismos, aumentando el número poblacional de la especie. Por lo tanto, se busca una nueva estrategia que evite el desarrollo de especies resistentes. La nueva estrategia que se intenta introducir se llama control biológico y consiste en el uso de microorganismos patógenos al vector estudiado. Estos microorganismos pueden ser bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoos.

El presente trabajo consiste en el uso de un microorganismo identificado como *Leptolegnia chapmanii*. Es un pseudo-hongo capaz de infectar a larvas de *Aedes aegypti*. Se encuentra dentro del orden Saprolegniales en la familia

Saprolegniaceae. Además de infectar larvas de mosquitos, también se sabe que tolera amplio rango de temperatura, pH y salinidad, y no afectan a algunos organismos no blancos, otorgándole potencialidad a la hora de usarlo como controlador biológico. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue en estudiar una metodología para la producción y almacenamiento de productos biológicos basados en *L. chapmanii*.

En el capítulo I, se analizará el crecimiento de *L. chapmanii* para tres condiciones de agitación diferentes en tres medios de cultivo diferentes. Realizando una descripción morfológica macroscópica y realizando una cinética de crecimiento de peso húmedo y seco.

En el capítulo II, se evaluará el crecimiento de *L. chapmanii* con dos tipos de biorreactores: Tanque agitado y columna de burbujeo y se determinará cuál de los dos será el más apropiado para la producción de biomasa.

En el capítulo III, se evaluarán dos tipos de formulaciones para el almacenamiento de las zoosporas de *L. chapmanii*

En el capítulo IV, se evaluará la mortalidad para los medios de cultivo probados en el capítulo I, para los biorreactores del capítulo II, para la formulación elegida del capítulo III y, por último, se probarán si la presencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} ayuda o perjudica a la virulencia de *L. chapmanii*.

Hipótesis

El uso de *Leptolegnia chapmanii* puede llegar a ser un método infeccioso para el control de *Aedes aegypti* y así reducir las poblaciones de esta especie.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo consistió en desarrollar una metodología para la producción y almacenamiento de bioinsecticidas basados en *Leptolegnia chapmanii* contra el vector de enfermedades *Aedes aegypti*.

Objetivos específicos

- ❖ Seleccionar un medio de cultivo y una condición de agitación apropiada para el crecimiento de *L. chapmanii* a nivel de laboratorio.
- ❖ Seleccionar un biorreactor que permita el crecimiento de *L. chapmanii* con la mayor producción de biomasa posible.
- ❖ Evaluar dos formulaciones para el almacenamiento de las zoosporas de *L. chapmanii*.
- ❖ Evaluar la virulencia de *L. chapmanii* cultivado en diferentes medios de cultivo y condiciones de agitación en larvas de estadio L2/L3.
- ❖ Evaluar la virulencia de *L. chapmanii* cultivado en biorreactores en larvas de estadio L2/L3.
- ❖ Evaluar la virulencia de *L. chapmanii* a lo largo del tiempo utilizando una formulación en larvas de estadio L2/L3.
- ❖ Evaluar la viabilidad y la virulencia de *L. chapmanii* con la intervención de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} durante la formación de zoosporas en larvas de estadio L2/L3.

Antecedentes

Aedes aegypti

Los Culícidos son una familia de aproximadamente 3500 especies en el mundo. Las enfermedades infecciosas transmitidas por Culícidos continúan jugando un papel muy importante en la modulación de la historia de la humanidad. Numerosas enfermedades infecciosas transmitidas por vectores tienen un efecto colosal sobre la vida diaria de millones de personas (Mis Ávila, Canul Amaro y Domínguez Galera, 2013).

Los mosquitos constituyen el grupo de insectos más importante a nivel mundial desde el punto de vista médico y veterinario. Dentro de las especies de mosquito se encuentra *Ae. aegypti* Linnaeus. Pertenece a la familia Culicidae, dentro del género *Aedes* y subgénero *Stegomyia*.

La taxonomía del *Ae. aegypti* fue ampliamente discutida. En 1998, Harbach y Stone establecieron que el género *Aedes* es un grupo polifilético (grupo que no incluye al antepasado en común). Según la clasificación de Knigth y Stone en 1977, el grupo está compuesto por 74 subgéneros, incluyendo al subgénero *Stegomyia* (Theobald, 1991). Aunque en el año 2009, Reinter elevó muchos subgéneros a géneros (analizando características morfológicas de todos los estados) incluido el *Stegomyia*. Por lo cual, entre los años 2004 y 2014 *Stegomyia* fue aprobado como género. Sin embargo, en 2015, Wilkerson retomó el análisis de los grupos, encontrando más grupos polifiléticos, y se propuso preservar la clasificación tradicional. Las diferencias halladas por estos autores se debieron a la metodología utilizada en el análisis filogenético. En la actualidad el Catálogo de Sistemática de Culicidae (Gaffiganet *et al.* 2017), utiliza la clasificación de Wilkerson *et al.* 2015, validando *Aedes* en categoría de género y *Stegomyia* como subgénero.

Aedes aegypti es un vector de enfermedades tales como la fiebre amarilla, el chikungunya, el zika, el dengue, entre otras. Considerando la elevada tasa de

mortalidad de las numerosas enfermedades transmitidas por este vector resulta de vital importancia el control de la densidad poblacional de esta especie de mosquito (Uribe, 1983, Márquez *et al.* 2017).

Distribución geográfica

Aedes aegypti es originario de África y se encuentra distribuido mayoritariamente en áreas tropicales y subtropicales, donde la temperatura anual media es de 20°C. Sin embargo, la expansión de esta distribución ha sido consecuencia de la continua movilidad de las personas, que proporcionan alimento sanguíneo de fácil acceso para las hembras, además de sitios de ovoposición y cría de las larvas. Asimismo, el cambio climático generó condiciones propicias para la colonización de nuevos hábitats (Kraemer *et al.* 2015).

Por otra parte, a lo largo del tiempo el hombre diseñó estrategias de control y de radicación para controlar el número de individuos en la población de la especie (Gubler y Clark, 1996). Para la década del 60, en Argentina se logró erradicar al vector gracias a campañas organizadas por la Organización Panamericana de la Salud (Beramejo, 1979). Sin embargo, debido a discontinuidades en los programas de vigilancia y control del vector en el año 1986 reapareció la especie. La reaparición tuvo lugar en Misiones y Formosa (Anónimo, 1990), encontrándose en Buenos Aires en el año 1992 (Campos, 1993). Para el año 2016, la distribución de *Ae. Aegypti* abarcaba las regiones del Noreste, Noroeste y Centro del país (Stein *et al.* 2016).

En la **Figura A.1** se muestra la probabilidad de ocurrencia de *Ae. aegypti* en el mundo.

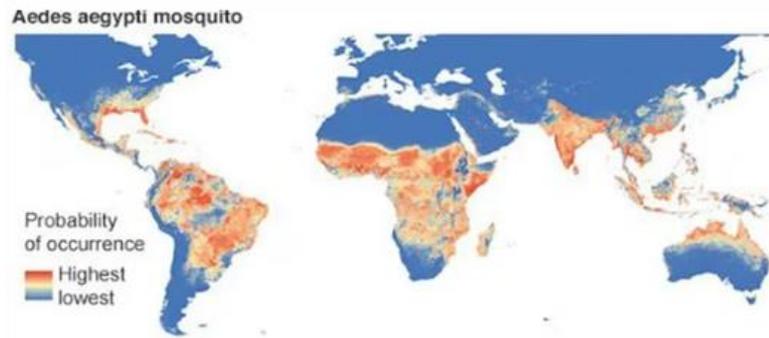


Figura A.1: Mapa de la distribución de *Ae. aegypti*. El mapa representa la probabilidad de ocurrencia (desde 0 azul, hasta 1 rojo; extraído de <https://blog.sedici.unlp.edu.ar/2016/02/15/que-sabemos-del-aedes-aegypti/>)

Ciclo de vida

Los mosquitos de la especie de *Ae. aegypti* son insectos holometábolos que tienen un ciclo de vida que consta de dos etapas: una acuática y una terrestre. En la fase acuática, se encuentran los huevos, que eclosionan dando larvas. Las larvas poseen 4 estadios (L1, L2, L3 y L4) que difieren entre otras características por su tamaño, haciéndose cada vez más grandes. Luego del estadio L4 se transforman en pupa, para terminar, convirtiéndose en mosquitos adultos, iniciando la etapa terrestre. Los adultos buscarán zonas acuáticas apropiadas para depositar más huevos e iniciar un nuevo ciclo de vida.

En la **Figura A.2** se muestran las dos etapas del ciclo de vida y los respectivos estados del mosquito.

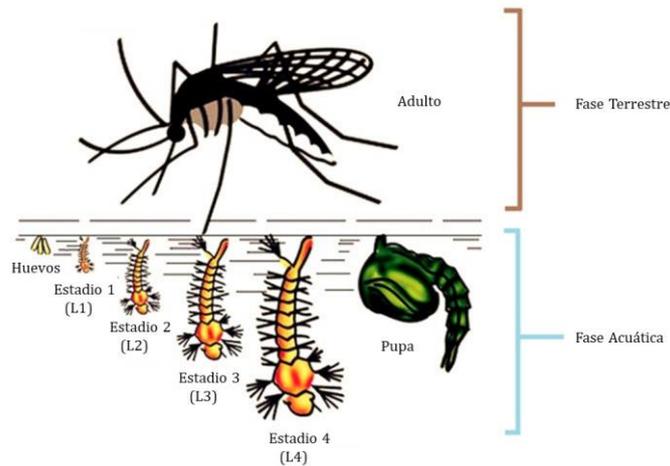


Figura A.2: Ciclo biológico de *Aedes aegypti*, se observan las fases acuáticas y terrestre con sus respectivos estados. Extraída y modificada de: <https://deleonscarlett.wordpress.com/2012/11/25/ciclo-de-vida-del-aedes-aegypti-2/editado3-4/>

Huevos

Las hembras escogen horas del día de baja luminosidad o por la noche para oviponer. La cubierta del huevo se denomina corion, y es generalmente de color claro al momento de la puesta, aunque se oscurece después de algunas horas. El tamaño de los huevos varía según la especie y también dentro de ellas (Rosi y Almirón, 2004).

Los huevos de *Ae. aegypti* son colocados en lugares húmedos fuera del alcance del agua. Cuando el agua los alcanza, permite que eclosionen (ruptura del corion y de la cutícula cerosa) dando origen a las larvas que se dirigen a la superficie del agua. Una característica muy llamativa, es que los huevos resisten la desecación, pudiendo permanecer por meses en criaderos secos. Numerosos tipos de recipientes localizados tanto en zonas domiciliarias como peri-domiciliarias pueden actuar como criaderos.

El período de desarrollo embrionario varía de acuerdo con la especie y a ciertos factores externos, entre los cuales la temperatura tiene gran importancia. En

épocas cálidas, el período de incubación de *Ae. aegypti*, o desarrollo del embrión es corto, tardando generalmente entre 2 a 3 días (Rosi y Almirón, 2004).

Larvas

Las larvas poseen gran movilidad y se desarrollan en medios acuáticos. Se pueden distinguir tres regiones: la cabeza, el tórax y el abdomen. En la parte posterior del abdomen se encuentran los espiráculos, que son orificios que permiten la respiración.

En la región anterior cefálica se destaca la presencia de un par de ojos, un par de antenas y el aparato bucal-filtrador. La función visual es limitada, pero son sensibles y responden a estímulos o cambios de intensidad de luz. Las antenas cumplen funciones sensoriales, perciben la dirección de las corrientes de agua y cambios en los elementos químicos en ella. Las partes bucales presentan cerdas con las que atraen las partículas nutritivas a la boca por medio de corrientes generadas por su movimiento.

Posee un tórax ovoide y sin apéndices, donde puede distinguirse la presencia de cerdas cuya función puede ser táctil, para detectar la dirección de las corrientes. El abdomen consta de ocho segmentos abdominales, un sifón ventilador y un segmento anal con las papilas.

Su alimentación consiste en microorganismos (bacterias, hongos y protozoos) y de detritos orgánicos (animales y vegetales) que se encuentran en el agua (Rosi, 2004).

El crecimiento de las larvas se ve afectado por varios factores, algunos de ellos inherentes a la propia especie y otras determinadas por las condiciones ambientales (temperatura, disponibilidad de alimento, densidad larval y presencia de depredadores). Como se mencionó anteriormente, durante el desarrollo se evidencian cuatro estadios larvales (L1 a L4). Los primeros estadios en general se

desarrollan más rápido, mientras que el cuarto demora más tiempo durante el cual la larva aumenta de tamaño y peso. En condiciones rigurosas, de baja temperatura o escasez de alimento, el cuarto estadio larval puede prolongarse por varias semanas antes de transformarse en pupa. Las larvas y las pupas de los machos se desarrollan más rápidamente que las de las hembras. Por lo general, el tiempo de desarrollo de la etapa larval es de una semana, aunque puede prolongarse por varias semanas (CENAPRECE, 2015).

El estadio L1 puede identificarse principalmente por la presencia del “diente de eclosión” en la parte dorsal de la cabeza, que, junto con el sifón, son característicamente blandos y transparentes.

Cuando L2 se expande para permitir el subsecuente desarrollo, la cápsula cefálica y el sifón se endurecen y oscurecen, y la larva se desarrolla de uno a cinco milímetros en longitud.

Después del segundo estadio, la cápsula cefálica y el sifón no cambian de tamaño, mientras el tórax y abdomen crecen considerablemente durante cada fase. Los estadios L3 y L4 son muy parecidos. Sin embargo, una larva L3 completamente desarrollada puede distinguirse de una larva en estadio L4, ya que en esta última la cabeza nunca se oscurece por completo y presenta rudimentos de las trompetas ventiladoras.

Los diferentes estadios se pueden diferenciar en las **Figuras A.3** y **A.4**, las cuales fueron extraídas del CENAPRECE, año 2015.

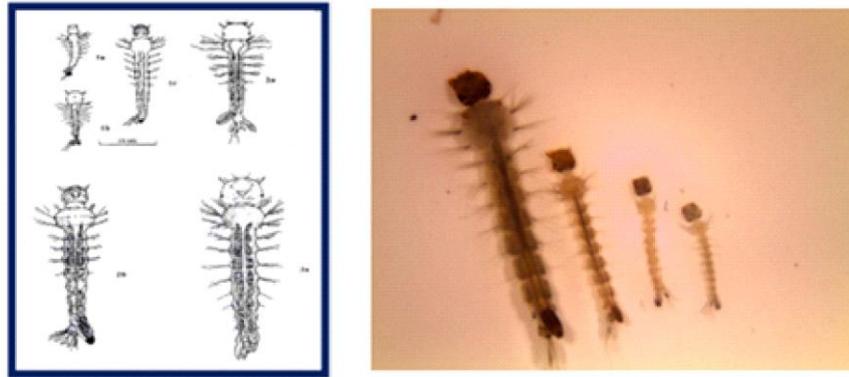


Figura A.3: Características de los primeros tres estadios larvales de *Ae. aegypti*: 1a) larva recién eclosionada, 1b) en condiciones normales, 1c) larva a punto de mudar, 2a) larva del L2 inmediata, 2b) L2 a punto de mudar a L3, 3a) larva L3 inmediata (modificado de Christophers, 1960)

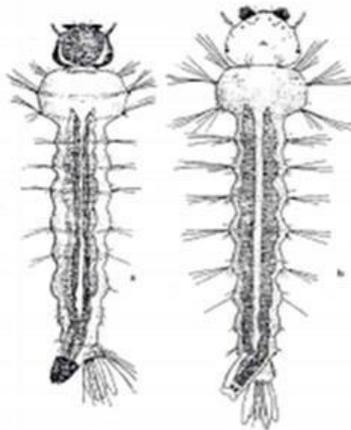


Figura A.4: Características del tercer y cuarto estadio respectivamente

Estado de pupa

A diferencia de las larvas, las pupas (**Figura A.5**) no se alimentan y su función es exclusivamente la metamorfosis hacia el adulto. Poseen forma de coma, pudiéndose observar dos proyecciones que surgen del tórax denominadas trompetas ventiladoras, que permiten la obtención de oxígeno de la atmósfera permitiendo la respiración. En la porción terminal se presentan unas placas que permiten el desplazamiento. Las pupas se desplazan activamente en el medio acuático, debido a reacciones inmediatas a estímulos como las vibraciones o cambios en la intensidad de luz. Cuando están inactivas, se mantienen en la

superficie debido a su flotabilidad, propiedad que también posee el imago. La fase pupal dura aproximadamente entre 2 o 3 días (CENAPRECE, 2015).



Figura A.5: Pupa de mosquito (foto extraída del libro “Insectos de importancia sanitaria Argentina” de Raúl A. Alzogaray)

Adulto

El mosquito adulto es la parte final del ciclo (fase terrestre) y reproductiva, estando adaptado para el vuelo y la dispersión. El mosquito adulto recién emergido pasa sus primeras 24 horas en reposo, posado sobre las superficies verticales más cercanas al criadero, para permitir el endurecimiento del exoesqueleto y de las alas. A continuación, se inicia un período de vuelos cortos en busca del sexo opuesto para copular y, en el caso de las hembras, de un hospedero para alimentarse.

Se caracteriza por tener 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. Las patas están conspicuamente bandeadas y el último artejo de las patas posteriores es blanco (ver **Figura A.6**).

Después de cada alimentación sanguínea (2-3 μ g de sangre) se desarrolla un lote de huevos. Sin embargo, *Ae. aegypti* con frecuencia se alimenta con sangre más de una vez entre cada postura, especialmente si es perturbado antes de estar completamente lleno de sangre. Una vez que la hembra ingiere sangre y en un

periodo entre las 48-72 horas, está lista para oviponer. Finalizada la ovoposición, la hembra reanuda la búsqueda de otro hospedero para iniciar un nuevo ciclo gonotrófico (CENAPRECE, 2015).

Con respecto a la alimentación, para el caso de los machos se basa en carbohidratos azucarados del néctar de las flores y las resinas, en cambio, las hembras en la naturaleza raramente se alimentan de azúcares, prefiriendo alimentarse de sangre humana, debido a que ésta le confiere los nutrientes necesarios para sobrevivir y reproducirse.

Los mosquitos adultos pueden vivir hasta 4 semanas, pero en condiciones de laboratorio se puede extender a meses.



Figura A.6: Adulto de *Ae. aegypti* (imagen extraída de <http://www.elpucara.com/tema/mosquito-aedes-aegypti/>)

Importancia sanitaria de Aedes aegypti

Las hembras de los mosquitos se alimentan de sangre de animales o personas, y es a raíz de esta capacidad que puede transmitir enfermedades producidas por virus o parásitos. *Ae. aegypti* es transmisor de varias enfermedades como el virus del dengue, fiebre amarilla, chikungunya y zika, entre otras.

La transmisión de las enfermedades ocurre cuando la hembra adquiere sangre de una persona o animal virémico (que presenta el virus ensamblado en su sistema). El virus se replica en el intestino del mosquito y a través de la hemolinfa migra a las glándulas salivales donde son almacenados. Este almacenamiento no representa peligro para el mosquito y puede durar entre 8 a 12 días. Cuando el mosquito infectado se alimenta de otra persona, este puede transmitir el virus antes de que inicie la extracción de sangre, debido a que inyecta saliva (donde se almacenan los virus) como anticoagulante y para facilitar la salida de la sangre.

Dengue

El dengue es una enfermedad transmitida por mosquitos, clasificado dentro de los flavivirus. Estos virus son envueltos, sensibles a la destrucción por agentes físicos y químicos, con 40-50 nm de diámetro, poseen cápside icosaédrica y un genoma de ARN monocatenario, con polaridad positiva (Vignoli *et al.* 2002).

Existen 4 serotipos del virus del dengue (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4). La respuesta inmune es serotipo específico, por lo cual la enfermedad puede reincidir en un mismo paciente. La segunda infección, por otro serotipo determina mayor gravedad de la enfermedad. Los síntomas de esta enfermedad son: fiebre alta, dolor detrás de los ojos, dolor muscular y de articulaciones, náuseas, vómitos, cansancio y erupción en la piel. En casos donde la enfermedad se agrava pueden ocurrir hemorragias y hasta provocar la muerte.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el dengue afecta a más de 100 países dentro de África, las Américas, el Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental. En el 2008, se registraron más de 1,2 millones de casos en regiones de América, Asia Sudoriental y Pacífico Occidental, y para el año 2015 el número aumentó a más de 3,2 millones de casos en las mismas regiones.

El problema principal de este tipo de enfermedad no es solo el incremento del número de casos sino la propagación hacia nuevas zonas generando brotes repentinos y grandes. En el 2010, se reportaron por primera vez brotes de dengue

en Francia y Croacia. En el mismo año, se detectaron brotes en otros países europeos. En el 2015 se produjo el peor brote en India (Delhi) con más de 15,000 casos. En ese mismo año, se vio afectado Hawái por un brote de 181 casos y su transmisión continuó para el 2016.

En el 2016, el dengue se propagó por todo el mundo, dentro de las Américas se reportaron más de 2,380,000 millones de casos, siendo en Brasil alrededor de 1,500,000 de casos, de los cuales se produjo 1032 muertes. En este mismo año se reportaron 375,000 casos en Pacífico Occidental, 176,411 en Filipinas y 100,028 en Malasia.

A pesar del descenso del número de infectados entre el 2017-2018, para el 2019, se generó un gran incremento en el número de casos de dengue. Dentro del Pacífico Occidental se registró un aumento de casos de dengue en Australia, Camboya, China, República Democrática Popular Lao, Malasia, Filipinas, Singapur y Vietnam. En Nueva Caledonia se registraron nuevos casos de DEN-2 y en Polinesia Francesa de DEN-1. En África se registraron brotes en el Congo, Costa de Marfil y Tanzania. Dentro de América también hubo incremento de casos, se reportan 500.000 personas con enfermedad grave de dengue y tasa de letalidad de 2,5% aproximadamente.

Al inicio del 2019, en Argentina se encontraron tres áreas con transmisión localizada del serotipo DEN-1 en Salta (Orán y Tartagal) y en Santa Fe. También se reportaron casos aislados del virus en Puerto Iguazú, CABA y Formosa.

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el año 2020, entre la semana epidemiológica (SE) 1 y 53, se notificaron 2,333,508 casos en la Región de las Américas, siendo la SE 7 donde se produjo el pico más alto de la enfermedad. Posteriormente a esta semana, el número de casos desciende, cuando los países empezaron a imponer el distanciamiento social debido al SARS-CoV-2. A la SE 53, el mayor número de casos de dengue reportado fueron en Brasil (1,467,142), Paraguay (223,782 casos), México (120,639 casos), Bolivia (111,347 casos) y

Colombia (78,979 casos) (OPS: Actualización epidemiológica para dengue, chikungunya y zika, 2020).

Durante la SE 1 y 52 del año 2021, se reportaron 1,267,151 casos de dengue, en la Región de las Américas. El pico máximo se alcanzó para la SE 14 que luego disminuyó debido a imponer las medidas de distanciamiento social debido al COVID 19. A la SE 51, se reportaron el mayor número de casos en la región de Brasil (975,474 casos), Colombia (53,334 casos), Perú (49,274 casos), México (36,742 casos) y Nicaragua (36,741 casos) (OPS: Actualización epidemiológica para dengue, chikungunya y zika, 2021).

Para el año 2022, entre la SE 1 y 52 se reportaron 2,812,155 casos de dengue en la Región de las Américas. El 2022 inició con una transmisión intensa, alcanzándose su punto máximo en la SE 17. A la SE 52 de este año, el mayor número de casos de dengue en la Región de las Américas lo han reportado Brasil (2,363,490 casos), Nicaragua (97,541 casos), Perú (72,851 casos) (OPS: Actualización epidemiológica para dengue, chikungunya y zika, 2022).

Fiebre amarilla

La fiebre amarilla es provocada por los flavivirus (virus endémico en las zonas tropicales de África y América Latina). Posee dos ciclos diferentes, denominados fiebre amarilla urbana y selvática. En zonas urbanas el vector transmisor es *Ae. aegypti*. Los síntomas de esta enfermedad son: fiebre, cefalea, ictericia, dolores musculares, náuseas, vómitos y cansancio. También puede causar hemorragias y muerte. Existe actualmente una vacuna efectiva contra la fiebre amarilla que actúa de manera preventiva contra la enfermedad, pero no se cuenta aún con un tratamiento curativo.

Si bien en zonas endémicas la tasa de mortalidad por fiebre amarilla es menor al 5%, en situaciones epidémicas los niveles de mortalidad pueden superar 50% (Benenson, 1995). Durante el siglo XIX su control y prevención en el continente americano estuvo sujeto a programas establecidos y liderados en su mayoría por la

Organización Mundial de la Salud (OMS). De esta manera, a inicios del siglo XX, las poblaciones del vector en el continente americano se redujeron considerablemente, siendo erradicada prácticamente mediante el uso de insecticidas químicos. Posteriormente durante los años 30, el desarrollo de una vacuna contra esta dolencia generó cambios en las estrategias de control, descuidándose el manejo poblacional del vector (Rogers *et al.* 2006).

Según la OMS en el año 2016 se registraron dos brotes de fiebre amarilla relacionados entre sí. Un caso se dio en Luanda (Angola) y el otro en Kinshasa (República Democrática del Congo), que se logró exportar a otros países como por ejemplo China.

Entre enero de 2016 y enero de 2018, se confirmaron casos de esta enfermedad en siete países de la región latinoamericana: Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Perú y Surinam. Debido a la reciente epidemia notificada en Brasil se detectaron dos casos importados en la ciudad de Buenos Aires (Ministerio de Salud, 2018).

Entre el 2018-2019, se han confirmado 12 casos de fiebre amarilla en humanos de los cuales 6 incluyen defunciones, en la zona de Eldorado, Jacupiranga, Iporanga y Cananeia (zona sur del estado de San Pablo, Brasil). Según la OPS, Brasil se encuentra con el periodo de mayor transmisión de fiebre amarilla en el año 2019.

La OPS registró nuevos brotes de fiebre amarilla, debido a que la proporción de la población vacunada disminuyó considerablemente. Este desafío se desató debido al COVID 19. Según la OMS y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) entre el 2020 y 2021, la cobertura de vacunación contra la fiebre amarilla disminuyó en 6 de los 13 países y territorios con áreas endémicas de esta enfermedad (OPS: Fiebre amarilla 2022 b).

Chikungunya

Se descubrió por primera vez durante un brote ocurrido en el sur de Tanzania en 1952. La enfermedad consiste en un virus de ARN perteneciente al género Alphavirus, dentro de la familia Togaviridae. El virus se transmite de persona a persona por la picadura de un mosquito infectado. Dicha enfermedad suele aparecer entre los 4 y los 8 días después de ser picado por el mosquito. Los síntomas de la enfermedad consisten en: una aparición súbita de fiebre elevada, acompañada de dolores articulares, dolor muscular, dolor de cabeza, náuseas, cansancio, erupciones cutáneas (OMS: chikungunya).

Según la OPS el primer caso de chikungunya en América se registró el 13 de diciembre del 2013. Entre las SE 1 y 53 del año 2020, se notificaron un total de 103,023 casos de chikungunya en 15 de los 52 países y territorios de las Américas, de los cuales 39,657 casos fueron confirmados. Los picos de transmisión de esta enfermedad se dieron en la SE 20. Para la SE 53, Brasil ha reportado 98,177 casos, siendo la mayor cantidad de casos registrada. Le sigue Bolivia con 1913 casos, Belize presentó 1079 casos, Guatemala 819 casos y Paraguay 316 casos (OPS: Actualización epidemiológica para dengue, chikungunya y zika, 2020).

Según la OPS, durante el 2021 entre la SE 1 y 53 se notificaron 137,025 casos de chikungunya en 15 de los 52 países y territorios de las Américas, de los cuales 65,542 casos fueron confirmados. Los picos de transmisión en este año fueron para la SE 22. A la SE 52 de este año, Brasil reportó la mayor cantidad siendo 132,587 casos. Guatemala reportó 2196 casos, Belize 737 casos, Perú 475 casos y Bolivia con 404 casos (OPS: Actualización epidemiológica para dengue, chikungunya y zika, 2021).

Durante el 2022, entre la SE 1 y 52 se notificaron 273,685 casos de chikungunya en 14 de los 52 países y territorios de las Américas, de los cuales 138,438 casos fueron confirmados. La transmisión máxima fue para la SE 18 en este año. El mayor número fue reportado en Brasil con 265,289 casos de chikungunya. Belize reportó 2509 casos, Paraguay 2443 casos, Guatemala reportó 2086 casos y Perú

presentó 595 casos (OPS: Actualización epidemiológica para dengue, chikungunya y zika, 2022).

Zika

El virus del zika es un flavivirus transmitido por mosquitos del género *Aedes*. Los síntomas tardan en aparecer entre 3 a 14 días después de la infección. La mayoría de las personas infectadas son asintomáticas. Cuando se da el caso, los síntomas consisten en fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolores musculares y articulares, malestar y cefalea. La infección durante el embarazo causa microcefalia y otras malformaciones congénitas. Además de provocar complicaciones en el trabajo de parto, puede producir aborto espontáneo e incluso la muerte intrauterina (OMS: Zika).

En 1952, se identificaron en el ser humano en Uganda y la República Unida de Tanzania. Aunque, el primer brote se registró en la Isla de Yap (Estados Federados de Micronesia) en el 2007. En el 2013 ocurrió otro gran brote en Polinesia Francesa y otros países y territorios del Pacífico. En Brasil se identificó numerosos casos en el año 2014. A fines del 2015, Brasil identificó una asociación entre la infección del zika con las microcefalias (OMS: Zika). En el 2016, hubo por primera vez un caso en Argentina, detectándose brotes en Formosa, Salta y Chaco en el año 2017 (Ministerio de Salud, 2017).

En el año 2020, entre las SE 1 y SE 53, se notificaron 22,924 casos de zika dentro de las regiones de las Américas, de los cuales 2695 casos fueron confirmados. El pico de transmisión en el año 2020 fue en la SE 10. El mayor número de casos se registró en Brasil con 18,941 casos, Belize con 939 casos, Guatemala con 904 casos, Bolivia con 728 casos y Paraguay con 593 casos (OPS: Actualización epidemiológica para dengue, chikungunya y zika, 2020).

Para el año 2021, en 13 de 52 países se notificaron 21,045 casos de zika en la Región de las Américas, de los cuales 3665 casos fueron confirmados por laboratorio. La mayor cantidad de casos de zika se reportaron en Brasil con 17,496

casos, Guatemala 2500 casos, Paraguay con 483 casos, Bolivia con 125 casos y El Salvador con 121 casos (OPS: Actualización epidemiológica para dengue, chikungunya y zika, 2021).

Durante la SE 1 y SE 52 del año 2022, se notificaron 40,249 casos de zika en la Región de las Américas, de los cuales 3268 casos fueron comprobados por laboratorio. Desde su primera aparición en Brasil, en marzo del 2014, se ha confirmado la transmisión local del zika en todos los países y territorio de las Américas, excepto en Chile, Uruguay y Canadá. El mayor número de casos de zika fue en Brasil con 34,176 casos, Belize con 2508 casos, Guatemala con 1815 casos, Paraguay con 1094 casos y Bolivia con 190 casos (OPS: Actualización epidemiológica para dengue, chikungunya y zika, 2022).

Control del vector *Aedes aegypti*. Importancia

Como se ha mencionado anteriormente, los mosquitos actúan como vectores de enfermedades muy graves. Mantener bajo control el número de la población es de suma importancia a nivel mundial.

Los tratamientos se pueden clasificar en tres categorías: el control cultural, el control químico y el control biológico.

Control cultural

La mayoría de los mosquitos habitan zonas domiciliarias y peri-domiciliarias, porque existen diversos puntos clave donde se produce la ovoposición por parte de las hembras. En la **Figura A.7** se mencionan algunos ejemplos de criaderos de mosquitos más habituales en los hogares. En estos sitios, las hembras depositan los huevos, algunos de ellos eclosionan mientras que otros quedan en estado de latencia, resistiendo largos periodos de tiempo, hasta que, por contacto con agua, eclosionan.

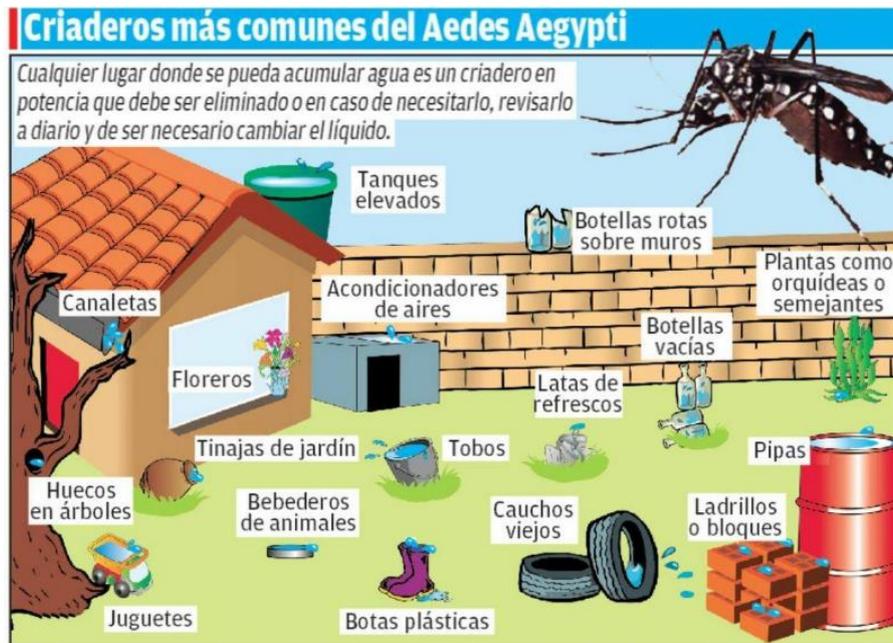


Figura A.7: Ejemplos de principales criaderos domiciliarios de mosquitos (imagen extraída de la página del hospital Regional San Juan Bautista de Misiones fecha: 22/07/2024)

El control cultural consiste en el uso de aquellas herramientas sociales que previenen la reproducción del mosquito, eliminando los principales focos de cría de mosquitos, dentro o en las cercanías de las viviendas. El método de prevención consiste en no arrojar recipientes que puedan almacenar agua en caso de lluvias en lugares abiertos (patios o calles), eliminar o cambiar periódicamente en su totalidad el agua contenida, (bebederos de animales, floreros, etc.), mantener tapados los tanques de agua, mantener limpias, cloradas o vacías las piletas de natación, etc.

Todas estas medidas preventivas, deben ser difundidas ya que debe realizarse de manera constante y en toda la población, por ello es de suma importancia crear campañas de prevención y de divulgación (Burrioni *et al.* 2016; Tejerina *et al.* 2016).

Control químico

Se puede definir al control químico como el uso de sustancias químicas (naturales o sintéticas) que previenen o disminuyen la población de un insecto plaga. Existen

diversos tipos y se pueden clasificar según el modo de acción de las sustancias aplicadas. Cada sustancia química presenta diferentes grados de toxicidad. En la **Figura A.8** se observan diferentes métodos de aplicación de productos químicos como controladores de plagas (pulverización, fumigación, cebos, trampas, etc).



Figura A.8: Diferentes métodos de control químico (Imágenes extraídas de <https://www.diariocordoba.com/noticias/sociedad/empresas-control-plagas-reforzar-control-mosquito-tigre-1256431.html>)

En una primera campaña contra *Ae. Aegypti* además de aplicar los controles de limpieza (Control cultural), los criaderos fueron rociados con petróleo y las casas con piretrina en polvo (OPS, 1998). Posteriormente se descubrió (1940) que el diclorodifeniltricloroetano (DDT) posee propiedades insecticidas. Rápidamente el DDT se constituye en el método principal para la erradicación de *Ae. aegypti*. Para el año 1960 se empezó a emplear otras sustancias como etión, malatión y fenitrotión (compuestos organofosforados) debido a que los mosquitos presentaron resistencia al DDT (OPS, 1998).

Los problemas que surgen debido al uso excesivo de estas sustancias son (Devine *et al.* 2008):

- ❖ **Efecto en los organismos benéficos:** Por lo general los organismos benéficos son más susceptibles a estas sustancias químicas y la disminución

de dichos organismos puede tener dos consecuencias severas: **resurgen plagas** que estaban siendo controladas por organismos benéficos y **aparecen nuevas plagas** en el ambiente.

- ❖ **Desarrollo de resistencia:** En las primeras aplicaciones de las sustancias químicas como control biológico, se elimina la mayoría de los individuos. Sin embargo, el uso excesivo de las sustancias hace que queden los individuos resistentes y con el tiempo vuelva a aumentar el número de la población siendo, además, no sensible al agente de control (Georghiou y Saito, 1983).
- ❖ **Residuos y contaminación ambiental:** el uso de sustancias químicas contribuye a la contaminación del ambiente con el agravante de tratarse de productos de gran actividad biológica. Las mayores dosis y los menores intervalos de tiempo entre aplicaciones pueden provocar residuos tóxicos. El incremento de estos residuos hace que haya un aumento en el riesgo de intoxicación directa y eleva el costo del control fitosanitario.

Gracias a estas problemáticas causadas al uso indebido de los insecticidas, es necesario el estudio de alternativas para el control de plagas.

Control biológico

Es una técnica que se basa en la utilización de organismos que son enemigos naturales de las plagas a controlar, reduciendo su número por debajo de un umbral de daño económico y/o de una enfermedad transmitida por el vector.

La utilización de enemigos naturales en el control biológico de una plaga posee una serie de ventajas y desventajas mostradas en la **Tabla A.1**.

Tabla A.1: Ventajas y desventajas del control biológico

Ventajas	Desventajas
No contaminan	Elevado costo
Son muy específicos al organismo blanco	Dificultad en la utilización en el campo
Persisten por un largo periodo de tiempo	Existe limitación en el uso debido a factores ambientales (Temperatura, pH, contaminación orgánica, etc.)
La auto dispersión permite alcanzar lugares difíciles de penetrar	
No se ha visto resistencia por parte del objetivo blanco.	

Enemigos naturales usados en el control biológico

La mayoría de las plagas tienen varios enemigos naturales, los cuales se pueden clasificar en tres grandes grupos: parásitos, depredadores y patógenos (Belda, 2000; Aparicio *et al.* 1995 a, b, 2000).

Entre los insectos existe un tipo especial de parasitismo que produce la muerte del hospedero, el cual se denomina parasitoide. Los parasitoides son aquellos insectos que necesitan de otros insectos para poder desarrollarse (Carnero *et al.* 1988; Pérez, 2000).

Los depredadores son otros insectos que capturan y se alimentan de otros insectos plagas sin causar daños al cultivo. Se diferencian de los parasitoides, ya que pueden atacar a varias presas durante su vida (Malais y Ravensberg, 1995).

Los entomopatógenos son agentes que producen enfermedades en los insectos. Penetran en el hospedador a través del tubo digestivo o del tegumento dando lugar a la expresión de la enfermedad que provoca la muerte del hospedante. Dentro de este grupo podemos hallar virus, bacterias, protozoos, nematodos y hongos,

(Jenkins, 1964; Robert y Strand, 1977; Roberts y Castillo, 1980; Roberts *et al.* 1983; Weiser, 1991; Becnel y White, 2007; Federici *et al.* 2007; Kerwin, 2007; Tseng, 2007; Platzer, 2007; Mogi, 2007).

Dentro de los virus entomopatógenos la familia Baculoviridae es la más estudiada. Son virus de ADN de doble cadena, contenidos en un cuerpo de inclusión. Los Baculovirus son ideales para el control de plagas ya que son muy específicos, siendo seguros para los humanos, ambiente, plantas y enemigos naturales (Yasushida, 2007; Ahmad *et al.* 2011). También hay registro del uso de otro virus para el control de insectos vectores, entre ellos: Reovirus (Cypovirus), Entomopoxvirus, Chloriridovirus (RMIV y TMIV), Densovirus, pequeños virus RNA semejantes a Picornavirus (Anderson, 1970; Hall y Fish, 1974, Fukuda y Clark, 1975; Schuler *et al.* 1995; Lacey, 1997; Humter-Fujita *et al.* 1998; Becnel; White, 2007 y Adams, 2017). También se reportaron infecciones en larvas de *Culex pipiens* con virus de la familia Iridovirae (Muttis *et al.* 2012 y 2013) que fueron encontradas en la ciudad de La Plata- Buenos Aires.

En los últimos años se desarrollaron bioplaguicidas a base de bacterias entomopatógenas (Demir *et al.* 2012). Los hospederos son infectados cuando ingieren las bacterias. Dentro del huésped, las bacterias se multiplican, producen algunas enzimas (lecitinasas, proteinasas) y, en algunos casos, producen toxinas, que ayudan a la infección. A continuación, invaden el hemocele y en términos generales, matan al hospedero por septicemia, por acción de toxinas o por ambos efectos en conjunto.

Bacillus thuringiensis (Bti) es una de las bacterias entomopatógenas más utilizada como controlador biológico. Existe una gran variedad de formulaciones a base de cristales complejos de esporas. Las empresas de biotecnología tratan de proporcionar formulaciones adaptadas a ciertos cultivos y plagas de insectos, además buscan y tratan de producir bioinsecticidas basados en nuevas cepas originarias del sitio de aplicación. Se espera que los nuevos productos proporcionen una mayor actividad y que impacten en un número mayor de plagas en otros cultivos (Rosas, 2009). La especificidad estricta de Bti, para ciertas

especies de insectos se considera como una gran ventaja para su uso agrícola, ya que los efectos sobre los insectos no blanco, incluidos los depredadores y parasitoides, son mínimos (García-Gutiérrez *et al.* 2006; Avisar *et al.* 2009).

Los protozoos son microorganismos capaces de matar a insectos de forma directa o asociados a virus. Algunos poseen ciclos de vida complicados. Sin embargo, no son recurridos en una primera estancia como agente de control biológico, ya que, por un lado, requieren mucho tiempo para matar al hospedero y por otro, la mayoría de las especies no son tan específicas (Bandii y Abreu, 2006). A pesar de estos inconvenientes se han usado protozoos ciliados, flagelados, gregarinas y microsporidios como agentes control biológico. Entre ellos se puede mencionar a *Lambornella* y *Tetrahymena*, capaces de parasitar larvas de culícidos (Grassmick y Rowley, 1973; Clark y Brandl, 1976; Corliss y Coats, 1976; Dzerhinskii y Dubitskii, 1977). Entre las especies de gregarinas más comunes se pueden citar *Ascogregarina barretti* (Vavra), *A. culicis* (Ross) y *A. taiwanensis* (Lien y Levine) (Munstermann y Werson, 1990; Siegel *et al.* 1992; García y Becnel, 1994; Reyes-Villanueva *et al.* 2001).

Los nemátodos son diversos y se encuentran en casi todos los hábitats. Las interacciones de los nemátodos con los insectos van desde la forensis hasta el parasitismo. Es otro grupo importante con capacidad para afectar a los culícidos. Los nemátodos que son usados comercialmente para el control biológico tienen ciclo de vida simple. Sólo especies pertenecientes a *Steinernematidae* y *Heterorhabditidae* pueden ser criadas en forma económica para uso comercial. Estas familias pueden ser criadas fácilmente si se les proporcionan las bacterias simbióticas y el medio de cultivo apropiados. Los nematodos pertenecientes a estas familias matan a sus hospederos en dos o tres días debido a que tienen bacterias simbióticas en su intestino (*Xenorhabdus spp.*, *Photorhabdis spp.*) que infectan a los hospederos causándoles septicemia (Burnell y Stock, 2000). Con respecto a la familia Mermithidae, solo se ha usado la especie *Romanomermis culicivorax* Ross & Smith, (Petersen, 1985; Platzer, 2007) como controlador biológico. El uso de estos organismos está sustentado por la capacidad de adaptación a nuevos ambientes y a nuevas condiciones adversas, por su resistencia

a productos químicos, la alta especificidad al organismo blanco y, por último, a la capacidad de sinergismo con otros grupos entomopatógenos (Stock y Camino, 1996).

El grupo de hongos entomopatógenos es capaz de infectar tanto insectos terrestres como acuáticos (Humber, 1997). Su uso para control biológico toma cada vez más fuerza debido a que pueden eliminar o mantener las plagas en niveles que no ocasionan daños a los cultivos (Azevedo y Melo, 1998). Nos centraremos en estos microorganismos debido a que es el utilizado en nuestra investigación.

Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son un grupo de hongos que son patógenos para los insectos, es decir, que pueden causar enfermedades o infecciones en los insectos y, en última instancia, llevar a su muerte. Estos hongos son un componente importante de la biología y ecología de los insectos, ya que desempeñan un papel crucial en la regulación de las poblaciones de insectos en la naturaleza. Los hongos entomopatógenos son utilizados en la agricultura y la jardinería como agentes de control biológico para combatir plagas de insectos, en lugar de depender de pesticidas químicos.

La infección por hongos entomopatógenos se da principalmente por dos vías, una de ellas es por contacto, es decir, se unen a la cutícula del insecto y por diversos mecanismos logran ingresar; la segunda vía es por ingestión, el insecto ingiere a la espora del hongo.

La infección por parte de los hongos entomopatógenos en los insectos sigue un patrón generalizado que involucra varias etapas:

- ❖ **Adhesión de la espora:** La espora del hongo entra en contacto con la cutícula del insecto. El proceso se divide en tres etapas: adsorción de la

espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y la epicutícula y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (Tanada y Kaya, 1993; Pedrini *et al.* 2007).

- ❖ **Penetración en el homocelo:** la penetración es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico. El primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada apresorio, la cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Monzón, 2001).

- ❖ **Replicación en el homocelo:** El hongo se multiplica y coloniza el interior del insecto. Durante este proceso, el hongo puede secretar toxinas y enzimas que degradan los tejidos del insecto. Esto conduce a la muerte del insecto a medida que sus órganos internos se ven afectados y consumidos por el hongo.

- ❖ **Formación de estructuras reproductivas:** Una vez que el hongo ha colonizado completamente al insecto y ha consumido sus tejidos, comienza a formar estructuras reproductivas, como conidióforos (estructuras que producen conidios, que son las esporas asexuales de los hongos) o estructuras de tipo esporangio. Estas estructuras permiten que el hongo produzca esporas que eventualmente se liberarán para infectar a otros insectos.

- ❖ **Liberación de esporas:** Cuando las estructuras reproductivas están maduras, el hongo libera esporas al ambiente. Estas esporas pueden ser transportadas por el viento o por otros insectos y, cuando entran en

contacto con nuevos insectos huéspedes, el ciclo de infección puede comenzar de nuevo.

Es importante destacar que el proceso de infección puede variar ligeramente según el tipo de hongo entomopatógeno y el insecto hospedador específico. Algunos hongos entomopatógenos son muy especializados y solo infectan ciertas especies de insectos, mientras que otros tienen una gama más amplia de hospedadores potenciales. Además, la velocidad a la que ocurren estas etapas puede variar según las condiciones ambientales y la salud del insecto huésped.

Existen diversos hongos entomopatógenos utilizados para el control biológico; dentro del Reino Straminipila se pueden encontrar dos especies muy utilizadas *Lagenidium giganteum* Couch ex Readhead (ex Oomycetes) y *Leptolegnia chapmanii* Seymour. Ambas especies son acuáticas y patógenas facultativas de larvas de mosquitos.

Del género *Lagenidium* se han registrado tres formulaciones en la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). Este microorganismo puede mantenerse en larvas de mosquitos persistiendo en el tiempo, y sumado al hecho de que es compatible tanto con Bti como con *Bacillus sphaericus* (Orduz y Axtell, 1991) lo hace interesante como controlador de plagas. Sin embargo, posee ciertas desventajas como la fragilidad de las zoosporas, su vida media limitada y la necesidad de conservar las zoosporas en agua produce un incremento en los costos de producción y envío (Kerwin, 2007).

Otro oomycete que se ha estudiado con utilidad para el control biológico pertenece al género de *Leptolegnia*, siendo *L. caudata* de Bary (Bisht *et al.* 1996) y *L. chapmanii* Seymour (McInnis y Zattau, 1982) los únicos aislados de insectos. De estos dos últimos, se hablará en detalle solamente de *L. chapmanii*.

Leptolegnia chapmanii

Taxonomía y características estructurales

Desde hace mucho tiempo, el reino Straminipila se diferencia del Reino Fungi por poseer diferentes características estructurales y bioquímicas (Powell y Letcher, 2014; James *et al.* 2014). Dentro de estas características podemos mencionar que el reino Straminipila posee celulosa en la pared celular como principal polisacárido; también posee diferentes rutas de biosíntesis para la producción de lisina, mitocondrias con crestas vesiculadas tubulares, talos vegetativos diploides y a menudo almacenan β 1-3 glucanos como principal carbohidrato (Dick, 2001a).

Los oomycetes (uno de los Phylum del Reino Straminipila) poseen zoosporas biflageladas heterocontas; donde un flagelo es tipo pincel y el segundo sin mastigonemas. Poseen reproducción sexual mediante contacto gametangial produciendo estructuras de paredes gruesas denominadas oosporas (Dick, 2001a, b). Sin embargo, a pesar de tener diferencias con los hongos “verdaderos” los oomycetes también poseen similitudes, como por ejemplo los modos de nutrición, las funciones ecológicas y su crecimiento típico en forma de hifas miceliares ramificadas (Richards *et al.* 2006).

Tradicionalmente los oomycetes se dividen en cuatro órdenes: Saprolegniales, Peronosporales, Lagenidiales y Leptomitales (Sparrow, 1960; 1973b; 1976). Sparrow, en su sinopsis final separó otros dos órdenes adicionales: Rhipidiales (que fueron separados de Leptomitales) y Eurychasmales (que fueron separados de Saprolegniales) (Sparrow, 1976).

Leptolegnia chapmanii es un pseudo hongo que se encuentra dentro del orden Saprolegniales en la familia Saprolegnieceae (Beakes *et al.* 2014). Es una especie monoica, con micelio extenso. Sus hifas son delgadas y parcialmente ramificadas. En la reproducción se generan, esporangios filamentosos y alargados (**Figura A.9** y **A.10**). Dentro de los esporangios se encuentran las zoosporas, su comportamiento y descarga son típicos de *Leptolegnia sp.* Hay dos tipos de zoosporas: las primarias,

las cuales surgen instantáneamente del esporangio y las secundarias, que surgen después de un enquistamiento de las primarias. Las zoosporas primarias poseen una forma cilíndrica volviéndose redondeada cuando se enquistan, con un diámetro entre 13 a 15 μm . Las zoosporas secundarias poseen un diámetro de 10 a 14 μm . La gameta femenina, oogonio, generalmente se desarrolla en la zona lateral. Son esféricas con ornamentaciones en su pared. De hallarse los anteridios (gameta masculina) suelen ser diclinas, monoclinas o andróginas, delgadas, ramificadas o sin ramificar. Usualmente, se encuentra un anteridio por oogonio (Saymour, 1984).

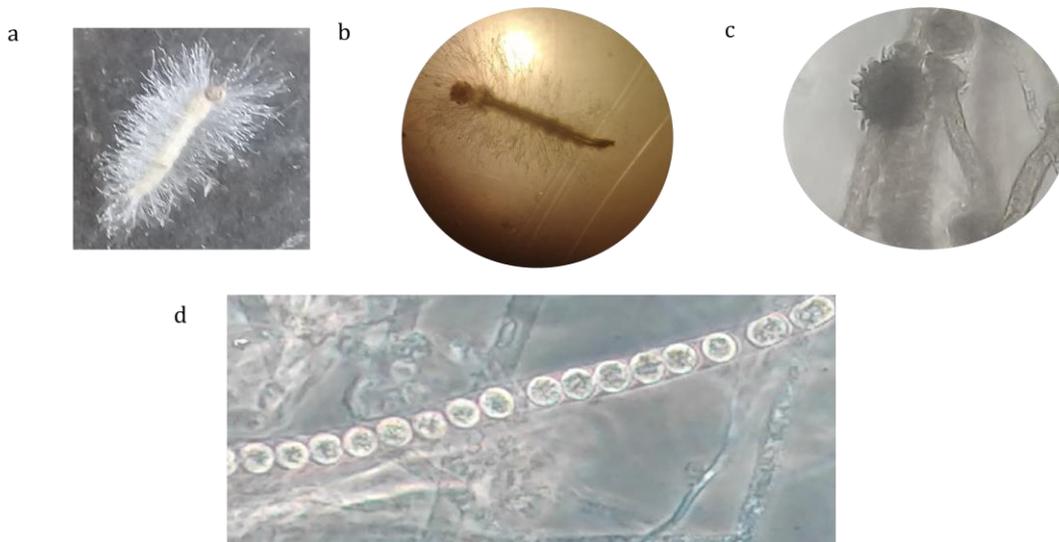


Figura A.9: a y b Crecimiento micelial de *L. chapmanii* bajo lupa y microscopio óptico 40x respectivamente. c) Oogonio (gameta femenina) d) Estructura del esporangio con las zoosporas en su interior

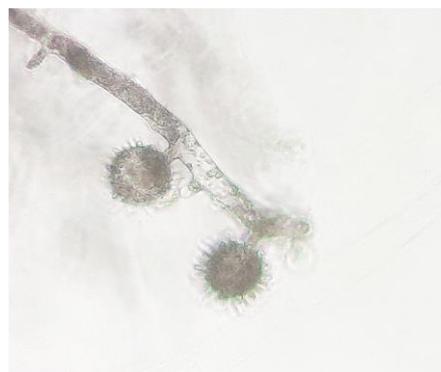


Figura A.10: En la imagen se observan las gametas femeninas, oogonios 40x.

Ciclo biológico

Leptolegnia chapmanii posee dos formas de reproducción según las condiciones ambientales en las que se encuentra: sexual y asexual (**Figura A.11**).

En la fase **asexual**, las hifas generan los esporangios. Estas estructuras están llenas de un protoplasma denso; a medida que se van desarrollando, numerosos núcleos migran desde las hifas somáticas hacia el esporangio. Cuando esto ocurre, el esporangio comienza a dividirse en diferentes porciones, que concuerda con la cantidad de núcleos que migraron hacia él. Con el tiempo el protoplasma se va consumiendo y cada fracción se transforma en una zoospora (Alexopoulos *et al.* 1996).

Para la reproducción **sexual**, se deben dar ciertas condiciones ambientales. Cuando aparecen estas condiciones, se generan las dos gametas: la gameta femenina, conocida como oogonios y la gameta masculina llamada anteridio. Cada gameta sufre una meiosis generándose oosferas haploides y gametas haploides respectivamente. Los oogonios una vez maduros, contienen de una a varias oosferas libres y cada oosfera contiene un núcleo. A diferencia de los oogonios, los anteridios son de menor tamaño, plurinucleados y alargados. Se puede formar en la misma hifa que el oogonio o en hifa diferente. Llegada a la madurez, el anteridio se une al oogonio. El anteridio penetra al oogonio usando un tubo de fecundación que logra llegar hasta las oosferas (Alexopoulos *et al.* 1996). El tubo fecundativo se ramifica según la cantidad de oosferas que hay dentro del oogonio (cada oosfera le corresponde una rama). Esta unión permite que el núcleo proveniente del anteridio llegue al núcleo de la oosfera para lograr la fusión y generar un cigoto diploide. A continuación, la oosfera desarrolla una pared más gruesa produciendo las oosporas. Después de un periodo de reposo, se produce la germinación por disgregación de la pared del oogonio, liberándose la oospora. Rápidamente se forma un esporangio en el ápice de la hifa completando el ciclo biológico (Alexopoulos *et al.* 1996).

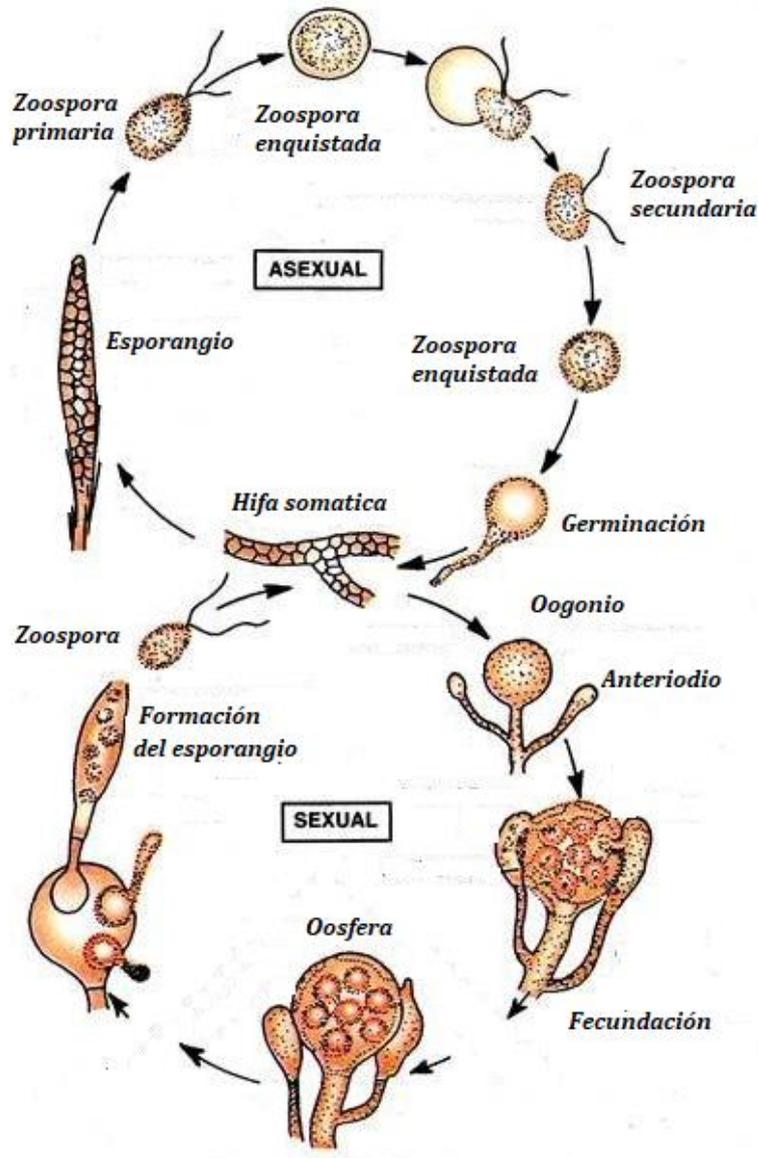


Figura A.11: Reproducción asexual y sexual de *L. chapmanii*, (imagen extraída y modificada de <https://www.biologydiscussion.com/fungi/life-cycle-of-saprolegnia-with-diagram-oomycetes/63299> fecha 02/07/2024)

Infeción de larvas de mosquito

Existen dos mecanismos por el cual las zoosporas de *L. chapmanii* logra infectar a las larvas de mosquitos (Zattau e Innis *et al.* 1987). Uno de los mecanismos consiste en que las zoosporas secundarias se enquistan en la cutícula larval. Una vez enquistada, se genera un tubo germinativo que posee enzimas (como quitinasas, proteasas y lipasas) capaces de penetrar la cutícula.

La primera respuesta que posee la larva en defensa de la infección consiste en producir melanización alrededor del punto donde hizo contacto la zoospora. La melanización consta en la producción de melanina alrededor de la zoospora para evitar la infección (Tanada y Kaya, 1993). De ser necesario se extenderá alrededor de toda la trayectoria producida por la hifa dentro del homocete. La invasión por parte de *L. chapmanii* prosigue por todo el aparato circulatorio y respiratorio. Al morir la larva, los nutrientes disminuyen y por lo tanto las hifas desvían su crecimiento hacia el exterior a través de la cutícula. A continuación, la hifa emergente genera zoosporangios terminales que generan y liberan zoosporas primarias al medio circundante. Estas circulan por un periodo corto de tiempo, hasta que se enquistan perdiendo los flagelos y generando las zoosporas secundarias nuevamente móviles. Estas se movilizan hasta encontrar una nueva larva donde se enquistan y repiten el ciclo de infección.

El segundo mecanismo ocurre cuando la zoospora enquistada es ingerida por la larva de mosquito, atravesando la boca, el esófago e intestino. Una vez dentro del intestino, el quiste germina, produce un tubo germinativo que logra expandirse generando la hifa. Esta hifa penetra la membrana peritrófica, ingresando al homocete y logrando una ramificación a lo largo del todo el cuerpo de la larva, causando su muerte (Zattau e Innis *et al.* 1987).

Independientemente del método de infección, una vez que la larva ha sido infectada por *L. chapmanii* muere al cabo de algunas horas.

Efecto de Leptolegnia chapmanii en organismos blanco y no blanco

En el año 1985, Schimmel y Noblet, estudiaron la susceptibilidad de la infección por parte de *L. chapmanii* sobre artrópodos acuáticos no blanco y la susceptibilidad de 5 especies de larvas de mosquitos.

Los organismos acuáticos no blanco estudiados pertenecen a los órdenes Díptera, Onodata, Trichoptera, Plecoptera, Coleoptera y Cladocera. En ninguno de dichos órdenes se vio infección por parte de *L. chapmanii*. Cuando analizaron las 5

especies de larvas de mosquitos (*Culex pipiens*, *Cx. salinarius*, *Culiseta inornata*, *Aedes taeniorhynchus* y *Ae. triseriatus*) se encontró que la mortalidad supera el 80%. Este trabajo nos indica que *L. chapmanii* es específico para organismo blanco y no para otros. Asimismo, dentro de los organismos blanco no hay una especificidad.

Otro trabajo que verificó la especificidad para organismos blanco sin afectar a otros fue el realizado por López Lástra *et al.* 2004. Utilizaron una cepa argentina para analizar el efecto sobre 12 especies de larvas de mosquitos y en algunos organismos invertebrados (Crustáceos, insectos y nematodos) y vertebrados (peces y anfibios) no blanco. Se demostró en este trabajo, que *L. chapmanii* es muy específico para las larvas de mosquito presentando poco riesgo para los organismos acuáticos no blanco.

***Leptolegnia chapmanii* y su tolerancia a diferentes condiciones**

Leptolegnia chapmanii es un hongo acuático con gran potencial para su uso como controlador biológico de vectores. Para ello, debemos ser conscientes que el uso de microorganismos en un ambiente determinado tiene efectos en la eficiencia como controlador. En la actualidad existen trabajos a nivel de laboratorio que analizan cómo influyen factores ambientales como por ejemplo la temperatura, el pH, la salinidad del agua, la calidad del agua de los criaderos de mosquitos y la radiación ultravioleta (UV). Estos factores son variables en el ambiente por lo cual podrían modificar la eficiencia de *L. chapmanii*.

Leptolegnia chapmanii demostró ser infeccioso para larvas de *Ae. aegypti* y larvas de *Culex pipiens* en un amplio rango de temperaturas, pH y concentraciones de NaCl, siendo los estadios tempranos los más susceptibles a la infección. Cuando analizaron el pH observaron que el aislado toleró un amplio rango de concentración de protones (rango de pH de 4 a 10), produciendo mortalidades superiores al 60% para ambas especies. En cambio, la presencia de sales afectó la mortalidad, siendo diferente para las dos especies de mosquitos. La salinidad no afectó la tasa de infección por *L. chapmanii* para las larvas de *Ae. aegypti*; en

cambio, para las larvas de *Cx. pipiens* se vio que la mortalidad fue afectada de manera significativa por la concentración de NaCl (Pelizza *et al.* 2007).

Otro factor que se analizó fue el efecto de la calidad de agua de criaderos de mosquitos en la infectividad y patogenicidad de zoosporas de *L. chapmanii* (Pelizza *et al.* 2009). En este trabajo analizaron cuatro criaderos diferentes (1. Charco de lluvia, 2. Una zanja de desagüe pluvial y domiciliario, 3. Desbordes del Río de La Plata en Punta Lara y 4. Agua de recipiente artificial en el Cementerio de La Plata). Sus resultados permitieron concluir que *L. chapmanii* fue patogénico y virulento en un amplio rango de contenido de materia orgánica y de contaminantes del agua. La mortalidad producida por las zoosporas tampoco se vio afectada por las condiciones del agua (natural o artificial). Estos resultados nos indicarían que la utilización de *L. chapmanii* como control biológico se puede aplicar a diversos criaderos de mosquitos ya que las condiciones de cada criadero no tienen un efecto significativo en la mortalidad.

La radiación solar es otro factor importante a la hora de considerar el uso de *L. chapmanii* como controlador biológico. Rueda Páramo y colaboradores en el año 2015 analizaron el efecto de la luz UV-A (longitud de onda de entre 315 a 400 nm) sobre la producción de zoosporas y su mortalidad sobre larvas de mosquitos de *Ae. aegypti*. En este trabajo se demostró que la virulencia de las zoosporas libres se vio afectada después de una exposición de 10 minutos a la radiación UV-A; en cambio, la producción de zoosporas en larvas muertas y su virulencia no fue afectada por más que se expusieron a 8 horas de dicha radiación, indicando que los esporangios le otorgan cierta protección en comparación con las zoosporas libres.

Más allá de que algunos factores ambientales como la radiación UV son perjudiciales, el pseudo hongo no es afectado (en crecimiento y mortalidad) significativamente por otros factores como lo son el pH, la salinidad y la temperatura. Esto le otorga una gran ventaja a este pseudo hongo entomopatógeno frente a otros. Por lo que puede ser seleccionado para un escalado y formulación adecuados para su aplicación a campo y lograr controlar la densidad poblacional de *Ae. aegypti*.

Importancia del escalado, producción masiva y formulaciones

El desarrollo de una formulación biológica para el control de vectores conlleva a la búsqueda de patógenos eficaces, los cuales puedan producirse masivamente junto con coadyuvantes que les permiten una mayor tolerancia a las condiciones ambientales perdurando en el tiempo y reduciendo la densidad poblacional del vector (Méndez *et al.* 2007).

Independientemente de la especie de hongo seleccionado como controlador biológico, se debe cumplir una serie de requisitos. Por un lado, el ingreso del hongo entomopatógeno al ambiente debe ser mediante metodologías y equipamientos ya existentes o en caso de desarrollar una nueva herramienta o tecnología debe ser de fácil acceso y bajo costo. Además, la producción del hongo entomopatógeno a gran escala debe ser económica, con formulaciones que le confieran resistencia a las condiciones climáticas adversas y alta eficacia, asegurando también un almacenamiento sencillo (Soper y Ward, 1981; Jenkins *et al.* 1998; Wraight *et al.* 2001; Montesinos, 2003). Si estas condiciones no se cumplen, el uso del biocontrolador puede dejar de utilizarse y se seguirá con el uso de controladores químicos, persistiendo el deterioro del ambiente y sus habitantes.

Dentro de las estrategias para la producción masiva de un micoinsecticida, se encuentra el medio de cultivo líquido o cultivo sumergido. Este tipo de desarrollo biotecnológico posee ventajas, algunas de ellas son la mayor facilidad para el escalado, ya que las condiciones como aireación, temperatura y pH son de fácil regulación. Estos tipos de sistemas se llevan a cabo en biorreactores, que presentan diferentes formas y tamaños. Algunos de ellos poseen agitación mecánica y otros poseen neumáticas (López Lastra y Leucona, 2019). El uso de estos equipos puede incrementar el rendimiento y la calidad en el crecimiento microbiano mediante sistemas de oxigenación, pH y temperaturas adecuadas.

Cuando se planea la utilización de estos biorreactores en la producción masiva de un microorganismo, se deben tener en cuenta tanto los costos de los insumos

biológicos, tecnológicos y humanos como la distribución de la planta para diagramar el flujo de procesos y operaciones, las cuales inician con la entrada del material, procesamiento, almacenamiento y finalmente la entrega al cliente (Jenkins y Goettel, 1997).

Una vez finalizada la producción masiva se debe realizar la formulación final del producto de interés. En general el objetivo de la formulación debe, por un lado, proporcionar una forma económica y fácilmente utilizable, y, por otro lado, contribuir a su efectividad (Auld, 1992).

Generalmente no se recomienda el uso de productos fúngicos no formulados, aunque muchos micoinsecticidas en el mercado pertenecen a esta categoría. Las cantidades a escala de material fúngico no formulado pueden ser extremadamente difíciles de manejar, especialmente los polvos basados en conidios hidrofóbicos. El rendimiento de los productos no formulados también puede verse afectado negativamente por condiciones ambientales desfavorables, como baja humedad relativa y alta radiación UV. Los productos formulados, que contienen materiales como aceites, humectantes, protectores UV y nutrientes para estimular la germinación y el crecimiento, tienen un gran potencial para brindar resultados mejores y más consistentes (Wraight *et al.* 2001; Burges, 2012). Los aceites, por ejemplo, mejoran la adhesión y la propagación de las esporas en la cutícula hidrofóbica de los insectos (Prior *et al.* 1988); las esporas pueden ser transportadas por el aceite a los microhábitats del insecto huésped o de la planta huésped, donde están protegidas del viento, la lluvia, la radiación solar y otras tensiones ambientales (Jenkins y Thomas, 1996; Ibrahim *et al.* 1999). Se afirma que los conidios de hongos entomopatógenos formulados en aceite vegetal puro y aceites adyuvantes son más resistentes a la radiación UV que los conidios no formulados (Moore *et al.* 1993; Alves *et al.* 1998).

Debemos tener en cuenta que la economía de los productos biotecnológicos, dependen en gran medida de la formulación (Leahy y Cols, 2014), de tal manera que la correcta selección del material adyuvante tiene impacto en la comercialización del producto (Jaronski y Jackson, 2012), es decir que la

formulación del ingrediente activo incide sobre la calidad del producto y el costo total de producción (Ummidi y Vladamani, 2014). En consecuencia, se deben elegir insumos amigables con el ambiente, que mejore la eficiencia del bioinsecticida y que sean de bajo costo económico.

Capítulo I: Cultivo en frascos Erlenmeyer: Caracterización del crecimiento de *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Straminipila: Peronosporomycetes) en diferentes medios de cultivo y condiciones de agitación.

Introducción

Se denomina crecimiento a la capacidad potencial que tienen todos los seres vivos de aumentar su número o su masa mediante el proceso de división celular. El crecimiento de los microorganismos implica el aumento en la concentración de ellos mismos. La caracterización del crecimiento y de los factores que lo afectan es importante para comprender la fisiología de cualquier microorganismo y con ello conocer condiciones favorables para su producción.

En el laboratorio, cuando los microorganismos son inoculados en un medio de cultivo adecuado, empiezan a multiplicarse o crecer debido al consumo de los nutrientes presentes en las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, CO₂, etc.) que posee el sistema. El crecimiento proseguirá hasta que se encuentre con alguna condición limitante, como por ejemplo falta de algún nutriente esencial o presencia de algún inhibidor. En esta situación el crecimiento se detiene, alcanzando la biomasa máxima para esas condiciones.

Los microorganismos pueden crecer en diferentes medios de cultivo. Estos se pueden clasificar según su composición química, su estado físico o si persigue alguna finalidad.

Moore y Landecker (2015) clasifica los medios de cultivo según su composición:

- ❖ **Medios de cultivo no definidos:** contienen materiales derivados de fuentes de animales, vegetales o microbianas. Promueven el crecimiento

por el aporte de una gran variedad de azúcares, proteínas y vitaminas. No se conoce con exactitud su composición. En esta clasificación se incluyen los medios de cultivo naturales. Estos medios de cultivo son importantes debido a que son más económicos, fáciles de preparar y suelen generar un crecimiento excelente, sin embargo, su composición es variable y difícil de reproducir de manera exacta.

- ❖ **Medios de cultivo definidos:** son aquellos medios que están constituidos por químicos de composición definida. Estos medios son los más adecuados para estudios fisiológicos.

Según el estado físico los medios de cultivo se dividen en (Moore y Landecker 2015):

- ❖ **Medios líquidos:** los componentes que lo forman dependen exclusivamente de los requerimientos nutricionales del tipo de microorganismo a inocular. Contienen disueltos aquellos elementos esenciales para el crecimiento, por eso, generalmente contienen una fuente de carbono, energía y una de nitrógeno. Otros macronutrientes que se pueden mencionar son P, S, Ca, y muchos otros elementos. Por otra parte, muchos microorganismos también necesitan factores de crecimiento como vitaminas y/o minerales ya que sin ellos no pueden crecer, y deben ser adicionados al medio de cultivo.
- ❖ **Medios sólidos:** se diferencian de los líquidos porque además de los componentes nutricionales requeridos por los microorganismos se adiciona un agente solidificante. El más comúnmente utilizado es el agar-agar, polisacárido de origen natural que tiene la propiedad de pasar a fase sólida cuando la temperatura se encuentra por debajo de los 45°C.
- ❖ **Medios semisólidos:** estos medios poseen agar en menor concentración por lo cual no tiene un estado líquido, pero tampoco un estado sólido.

Por otro lado, observando la finalidad del medio de cultivo se los clasifica en (Prescott, 2002):

- ❖ **Medios selectivos:** estos medios favorecen el crecimiento de algunos microorganismos para lo cual se utilizan componentes que inhiben el crecimiento de determinado grupo de microorganismos. Por ejemplo, el agregado de sales biliares o colorantes como la fucsina básica o cristal violeta, que permiten seleccionar a las bacterias Gram-negativas inhibiendo el crecimiento de las Gram-positivas.

- ❖ **Medios diferenciales:** son medios que permiten la identificación de grupos diferentes de microorganismos. Incluyen componentes que hacen visible alguna característica típica del crecimiento de este grupo. Por ejemplo, el agar sangre es tanto un medio diferencial como un medio enriquecido; permite distinguir bacterias hemolíticas (muchos estreptococos y estafilococos aislados de garganta) de las no hemolíticas.

Una vez seleccionado y preparado el medio de cultivo adecuado para el fin que se requiere, debe ser esterilizado. Este paso puede realizarse por calor húmedo (121°C) utilizando un autoclave. Existen casos particulares de componentes termolábiles (como, por ejemplo, antibióticos, vitaminas, entre otros). Estos componentes son sensibles al calor, con lo cual, el método de esterilización mencionado no se puede realizar y se reemplaza por filtración. Este es un método físico que utiliza un filtro llamado absoluto es decir de 0.22 μm de tamaño de poro (tamaño por el cual una bacteria no logra atravesar el filtro).

Cinética de crecimiento

El crecimiento microbiano se define como un aumento en el número de células de la población. Este crecimiento se puede estudiar mediante una curva, la cual se denomina cinética de crecimiento. En ella se evalúa la tasa de crecimiento del microorganismo desde el momento de la inoculación hasta su estancamiento o

declive de la producción de biomasa. Generalmente, la curva típica de crecimiento en sistema de cultivo batch o lote para organismos unicelulares, se puede describir en 4 fases con diferentes características (Prescott, 2002):

- ❖ **Fase I** (fase de latencia): ocurre inmediatamente después a la inoculación del microorganismo en el medio de cultivo líquido. En esta etapa no se produce un aumento inmediato en el número de células o de biomasa, pero se están generando nuevos componentes, los microorganismos se adaptan a la nueva condición preparándose para iniciar la etapa de división celular. La duración de esta etapa depende del microorganismo, su condición y la naturaleza del medio de cultivo y condiciones fisicoquímicas del mismo.
- ❖ **Fase II** (fase exponencial): es una etapa donde la velocidad específica de crecimiento es constante, es decir, que los microorganismos se dividen y duplican a intervalos regulares. La pendiente de la recta que representa el logaritmo natural biomasa vs tiempo en esta etapa representa dicha velocidad específica de crecimiento.
- ❖ **Fase III** (fase estacionaria): en esta zona la velocidad de crecimiento cesa y la curva alcanza una meseta. El número de microorganismos permanece constante debido al equilibrio que se genera entre la división y la muerte celular. El ingreso a esta etapa puede darse por varios factores, como la limitación por un nutriente esencial, o también puede darse porque se acumulan productos residuales tóxicos.
- ❖ **Fase IV** (fase de muerte): es una fase donde la concentración de biomasa disminuye con el tiempo debido a la autólisis celular.

En la **Figura 1.1** se muestra la forma típica de la variación de la concentración de biomasa (en su forma semilogarítmica) en las 4 fases descriptas.

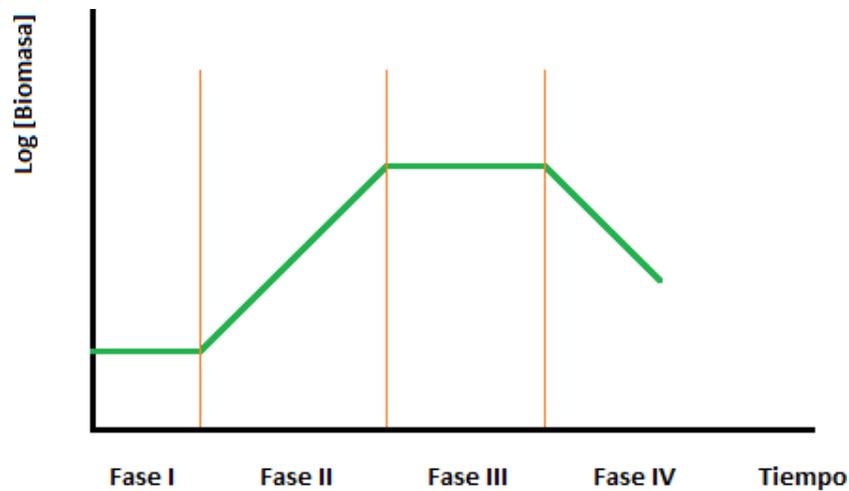


Figura 1.1: Cinética de crecimiento homogéneo de los microorganismos. Fase I: fase de latencia. Fase II: fase exponencial. Fase III: fase estacionaria. Fase IV: muerte celular.

En el caso de los hongos (o pseudo hongos) miceliales, el crecimiento se produce por una combinación de agrandamiento celular y producción de nuevas células. Estos hongos crecen a medida que se extiende la punta de las hifas, sin embargo, las hifas más antiguas son incapaces de elongar: durante las últimas etapas de desarrollo, la tasa de crecimiento en el centro del pellet o colonia disminuye, mientras que las hifas marginales mantienen la misma tasa. La disminución de crecimiento en el centro de los pellets o colonias es debido a la falta de nutrientes. Como consecuencia, se observa el crecimiento radial de las colonias o pellets con una tasa lineal.

El crecimiento micelial puede ser dividido en 3 etapas (Moore y Landecker, 2015):

- ❖ **Fase I** (fase de latencia)
- ❖ **Fase II** (fase exponencial)
- ❖ **Fase III** (fase de declinación o de muerte celular)

En la **Figura 1.2** se muestra el comportamiento de una cinética que presenta estas 3 fases de crecimiento.

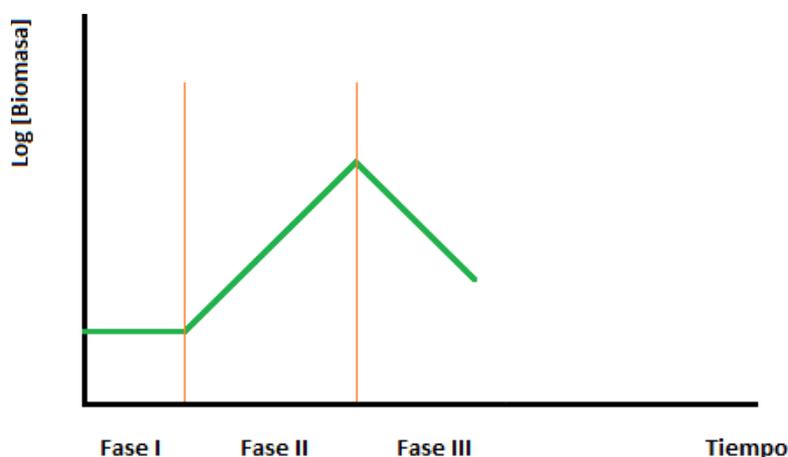


Figura 1.2: Cinética de crecimiento heterogéneo de los microorganismos. Fase I: fase de latencia. Fase II: fase exponencial. Fase III: muerte celular

La morfología de los hongos no solo depende de factores biológicos, sino que también está fuertemente relacionada con los parámetros fisicoquímicos que caracterizan las condiciones del crecimiento. Algunos ejemplos de estos factores son la agitación (esfuerzo de corte), la composición del medio de cultivo, la viscosidad, la presencia de surfactantes, el pH, etc. En esta investigación nos centraremos en dos variables: el medio de cultivo y el tipo de agitación.

Gibbs *et al.* 2000, menciona investigaciones que relacionan el crecimiento fúngico con respecto a la agitación. El autor muestra que, para algunas especies de hongos, al aumentar la velocidad de agitación disminuye la longitud de las hifas y aumenta la frecuencia de ramificación, mientras que, para otras especies su reacción era opuesta o incluso no se observaron diferencias.

Por otro lado, el tipo de medio de cultivo también afecta la formación de pellets. En 1959, Pirt y Callow demostraron que se generaba un cambio en las longitudes de las hifas cuando se modifica la composición del medio de cultivo. Prosser en 1991 mencionó los diferentes y contradictorios resultados encontrados en diversas investigaciones, realizadas con diferentes especies de hongos miceliales en diferentes medios y condiciones de cultivo. La amplia variedad de resultados

encontrados nos indica la suma importancia de conocer el tipo de comportamiento que tiene una especie frente a la variación de la composición del medio y condiciones de cultivo.

Todas estas variables deberán ser tenidas en cuenta al momento de realizar la caracterización de la curva de crecimiento de hongos de este tipo.

El objetivo de este capítulo es seleccionar un medio de cultivo y una condición de agitación propicia para el crecimiento de *L. chapmanii* a nivel de laboratorio. Para ello se estudia la cinética de crecimiento frente a diferentes condiciones de agitación y diferentes medios de cultivo líquido, permitiendo realizar la descripción morfológica macroscópica de los mismos, analizar cómo se ve afectada la producción de los pellets y en qué tiempo se producen.

Materiales y Métodos

Determinación del kLa en escala de frascos agitados

Los dos agitadores orbitales (Dragon Lab SKO330-Pro SEMEDI, Beiji-China) utilizados en el CEPAVE presentaron diferentes velocidades a pesar de estar seteados de la misma manera. Para asegurarnos que estuvieran con la misma velocidad de agitación, se buscó un parámetro que nos permita identificar si hay diferencias en la forma de la agitación. El parámetro utilizado en este estudio fue uno que relaciona la velocidad de agitación con la entrega de oxígeno al medio líquido. Este parámetro fue el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (kLa) y nos permitió tener una idea de la capacidad del shaker para suministrar oxígeno al medio. La agitación junto con la geometría y diseño del Erlenmeyer, determina el valor del kLa , y esto a su vez, es indicativo del nivel de oxigenación del cultivo.

El método que se utilizó para la determinación del kLa fue el Iodométrico, que consistió en titular un exceso de I_2 con $Na_2S_2O_3$. Para ello, se utilizaron las

siguientes soluciones: Na_2SO_3 0.5 N (Merk), CuSO_4 1 M (Merk), I_2 0.15 N (que se formó mezclando I_2 con KI (Anedra)), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.06 N (Merk) y almidón (Peules).

En frascos Erlenmeyer de 500 mL se agregaron 100 mL de la solución de Na_2SO_3 0.5 N, a la cual se le adicionó 100 μL del catalizador de cobre (CuSO_4 1 M). A continuación, se inició la agitación seteadada a 150 rpm.

Cada media hora, se tomaron 2 mL de muestra, y se adicionaron 3 mL de I_2 que está en la forma de I_3^- . Como el I_2 se agrega en exceso el resto se tituló con el $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, utilizando almidón como indicador del punto final de la valoración (**Figura 1.3** se muestran la titulación de I_2 en exceso).

Reacciones



Figura 1.3: Titulación del I_2 : a) inicio de la titulación b) cerca del punto final c) punto final de la titulación

Con los datos obtenidos se graficó el volumen de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gastado en función del tiempo. De este gráfico hallamos la pendiente, y al conocer la concentración del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y la solubilidad del oxígeno en el líquido se determinó el $k_L a$ con la siguiente formula:

$$k_L a = 1/C^* \times (m \times N) / (4 \times V_m)$$

Donde: m = pendiente del gráfico, N = Normalidad del $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, V_m = Volumen de la muestra, C^* = Concentración de oxígeno disuelto.

Cultivo de *Leptolegnia chapmanii* con diferentes medios de cultivo y condiciones de agitación

Se analizaron tres medios de cultivo diferentes y tres condiciones de agitación. Los medios de cultivo líquidos utilizados fueron: Peptona de carne, Extracto de levadura y Glucosa (PYG), Semilla de Girasol (SG), y Harina de Soja (HS), descritos en el anexo. Estos medios de cultivo pueden clasificarse como medios naturales (SG y HS) y medios complejos (PYG). A su vez, cada medio se colocó en tres condiciones de agitación diferentes. Para cada combinación medio de cultivo-agitación se realizaron 3 repeticiones por duplicado en cada repetición.

En todos los casos se utilizaron frascos de Erlenmeyer de 500 mL (mostrados en la **Figura 1.4**) conteniendo 100 mL del medio de cultivo líquido elegido. Para su esterilización se los llevó a la autoclave tipo Chamberland a 120°C y 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

Bajo flujo laminar (Mach1i), cada frasco Erlenmeyer se inoculó con un corte realizado con un sacabocado de 0.5 cm² de área sobre PYG sólido con crecimiento de *L. chapmanii* (entre 5 a 7 días de incubación). A continuación, se colocaron los frascos a una temperatura entre 20 y 25°C en las siguientes condiciones:

- ❖ **Condición I:** con agitación orbital a 150 rpm

- ❖ **Condición II:** con agitación orbital a 150 rpm en frascos de Erlenmeyer con baffles (cortacorriente).

- ❖ **Condición III:** sin agitación.

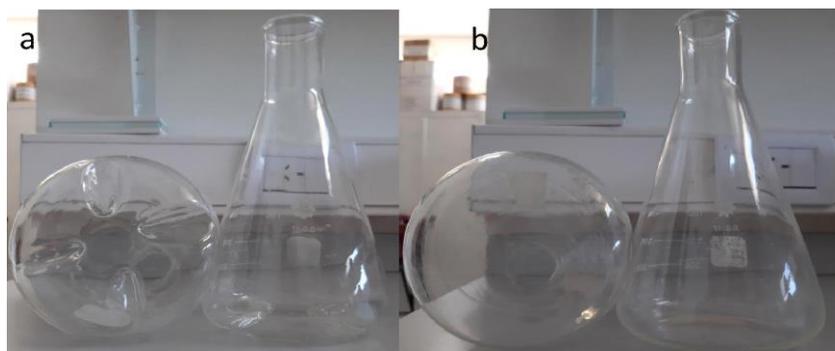


Figura 1.4: Tipos de Erlenmeyes utilizados a) Erlenmeyer con baffles y b) Erlenmeyer comunes

Periódicamente se extrajo el micelio de los frascos (los tiempos en los que se realizó la cosecha de las muestras se detallan en la **Tabla 1.1**) y, se analizó el contenido de todos los frascos caracterizando la biomasa obtenida según su distribución de tamaños (diámetro y área de extensión), peso húmedo y peso seco.

Tabla 1.1: Periodicidad en la toma de muestra de los cultivos. *Los tiempos no fueron iguales debido a que se notaba diferencia en la formación de la biomasa. El tiempo esta medido en días

Condición \ Cultivo	Con agitación	Con baffles	Sin agitación
PYG	1, 2, 3, 5, 7 y 12	1, 2, 3, 5, 7 y 12	3, 5, 7 y 12
SG	2, 3, 5, 7	1, 2, 3, 5 y 7	2, 3, 5, y 7
HS	2, 4, 5, 7	2, 4, 5 y 7	2, 4, 5 y 7

A cada tiempo se cosechó un frasco y se tomaron uno por uno los pellets obtenidos. Estos pellets se pasaron por tamices tipo embudo de diferente diámetro, que se obtuvieron mediante el corte de botellas plásticas, permitiendo caracterizar la distribución de tamaños de los pellets en cada muestra. En la **Figura 1.5** se muestra una imagen de las herramientas utilizadas para realizar esta clasificación. De esta manera se logró cuantificar el número de pellets formados dentro de los siguientes 6 rangos de diámetro: menor a 1.00 cm; entre 1.00-1.80 cm; entre 1.80-2.10cm; entre 2.10-2.80 cm y entre 2.80-3.00 cm.



Figura 1.5: Botellas plásticas de diferentes diámetros

Para evaluar la distribución del área de extensión, cada pellet fue colocado entre dos placas de vidrio de 3 mm de espesor (**Figura 1.6**). A continuación, se ejerció presión manual hasta lograr su máxima extensión. La resultante de cada pellet fue registrada fotográficamente y su área fue determinada mediante el programa Imagen J versión 1.48V.



Figura 1.6: Placas de vidrio

Por otra parte, se determinó el peso húmedo y seco de la biomasa contenida en cada frasco. La biomasa total (conjunto de todos los pellets para cada tiempo) se colocó en frascos de vidrio previamente tarados y se pesó en balanza analítica (UnjBlock Tx323L SHIMADZU). Por diferencia entre estos pesos se calculó el peso húmedo. Para la determinación del peso seco, los frascos de vidrio se colocaron en

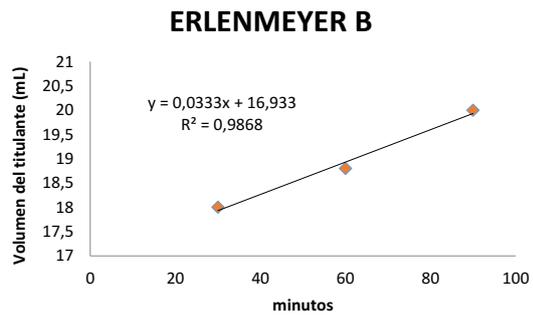
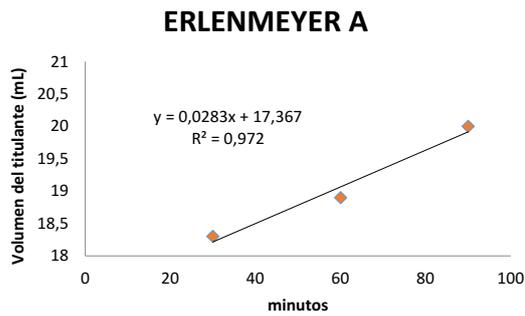
estufa a 105°C hasta que dos medidas de la biomasa fueron iguales (alcanzado en 3 días). Por diferencia de peso se obtuvo el peso seco. Con estos datos se realizaron las curvas de crecimiento de *L. chapmanii* tanto para el peso húmedo como para el peso seco.

Resultados y discusión

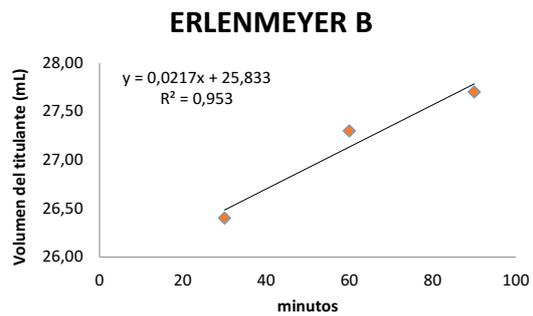
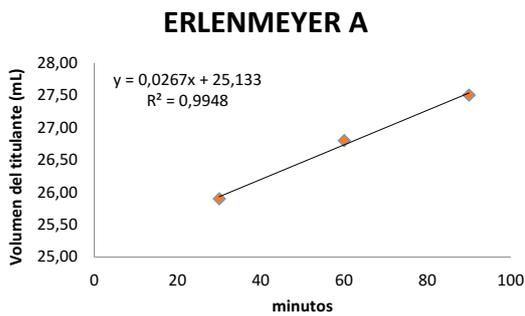
Determinación del kLa en escala de frascos agitados

En la **Figura 1.7** y **Figura 1.8** se muestran los gráficos del volumen del titulante vs tiempo para el agitador I y para el agitador II respectivamente. En cada caso, se realizó una regresión lineal y se determinó la ecuación de la recta con su R^2 correspondiente. De cada recta se calculó una pendiente, que es el parámetro que se necesitó para la determinación del kLa.

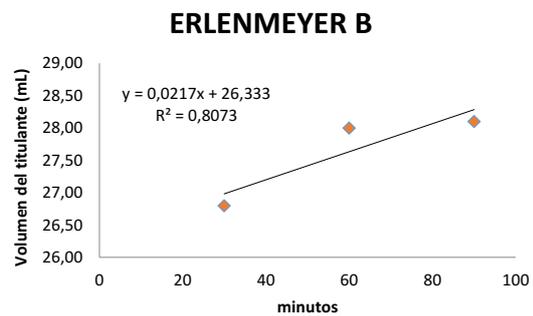
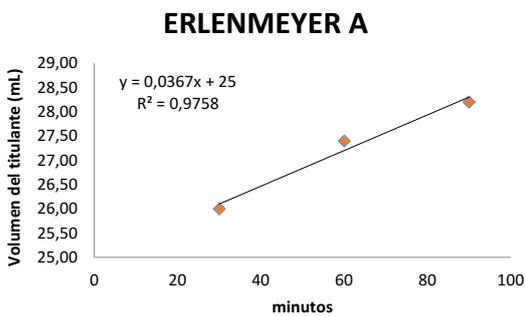
Rep 1



Rep 2



Rep 3



Rep 4

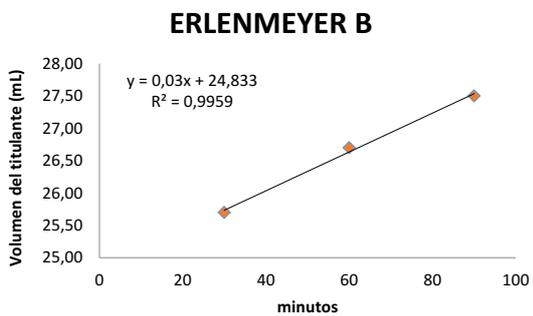
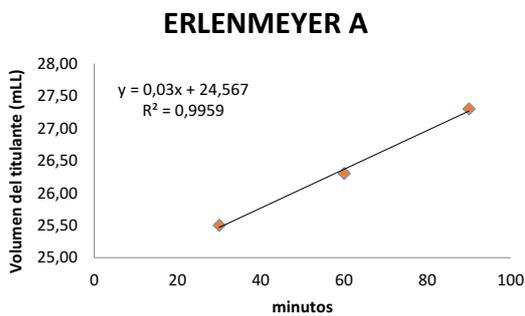
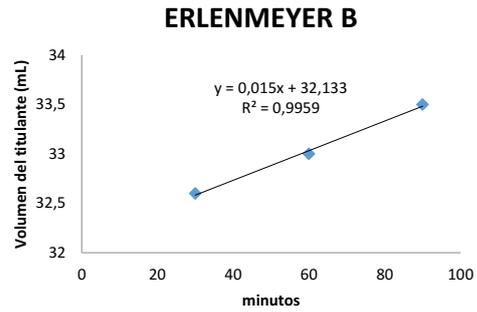
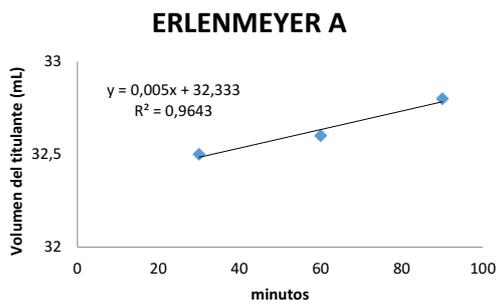


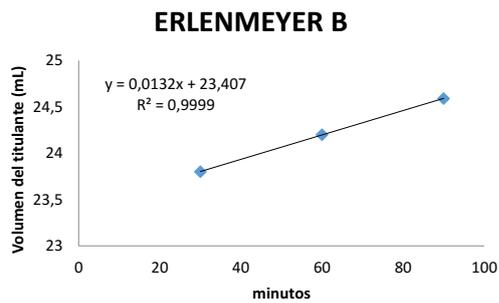
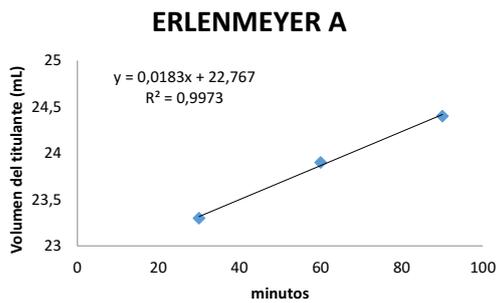
Figura 1.7: Gráficos utilizados en la determinación del kLa para los frascos Erlenmeyer en el agitador I

Utilizando los valores de cada pendiente se determinó el kLa por repetición, con esos valores se realizó un promedio y se calculó el desvío estándar (kLa 55 h⁻¹ con desvío de 10).

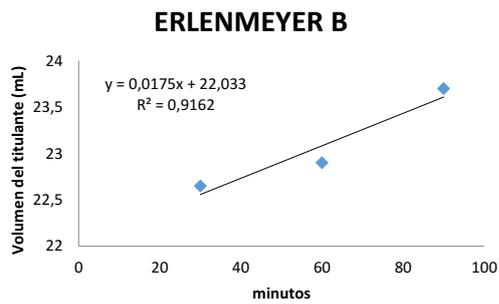
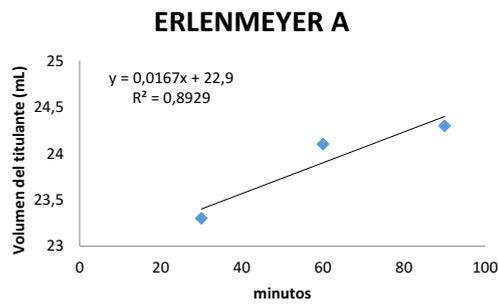
Rep 1



Rep 2



Rep 3



Rep 4

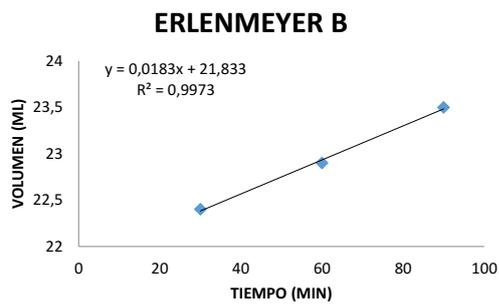
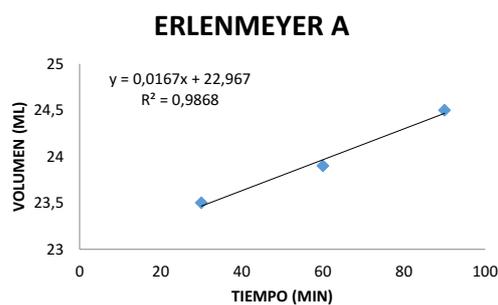


Figura 1.8: Gráficos utilizados en la determinación del k_La para los frascos Erlenmeyer en el agitador II

Utilizando los valores de cada pendiente se determinó un k_La por repetición, con esos valores se realizó un promedio y se calculó un desvío estándar (k_La 29 h^{-1} desvío de 8).

Tabla 1.2: Valores de kLa para los frascos Erlenmeyer en los dos agitadores con su desvío estándar

Agitador	kLa (h ⁻¹)	Desvío Estándar
I	55	10
II	29	8

El agitador I resultó con un mayor kLa por lo cual la velocidad fue mayor que para el agitador II.

Como hubo diferencias se procedió a realizar el mismo ensayo con el agitador II seteado al doble que en el ensayo anterior. El kLa obtenido fue de 47 con un desvío estándar de 3, observándose que el kLa aumentó casi al doble frente a la situación inicial. En conclusión, se utilizaron el agitador I a 150 rpm, mientras que el agitador II se utilizó a 300 rpm para realizar los ensayos siguientes.

Cultivo de *Leptolegnia chapmanii* con diferentes medios y condiciones de cultivo

Descripción de la biomasa obtenida

Cuando se inoculó a *L. chapmanii* en los tres medios de cultivo en las tres condiciones de agitación, se logró obtener pellets en todos los sistemas planteados. Los pellets obtenidos fueron agregados de hifas con diversas formas y tamaños. Independientemente del tipo de medio de cultivo y agitación, se encontraron diferentes zonas en los pellets (**Figura 1.9**). En la primera región se encontró el núcleo, en la segunda región se observaron hifas que tuvieron autólisis y en la tercera región se encontraron hifas viables denominada zona pilosa o peluda (García Reyes *et al.* 2017).

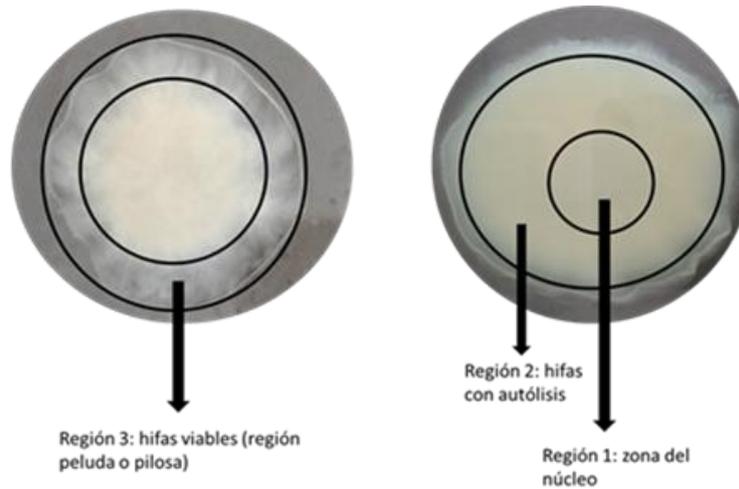


Figura 1.9: Zonas características de los pellets de *L. chapmanii*: región 1: zona del núcleo, región 2: hifas con autólisis y región 3: hifas viables

Por otro lado, las diferencias en las características de los pellets dependen exclusivamente si hubo agitación o no (**Figura 1.10**). En las dos condiciones de agitación, se hallaron pellets de forma regular, y cuando se ejerció presión mecánica con las dos placas de vidrios, se evidenció una dificultad para extenderlos, por lo cual decimos que este tipo de pellets fue compacto (**Figura 1.10 a**). En cambio, en los cultivos sin agitación se hallaron pellets de formas más irregulares, al presionarlos con las placas de vidrio se extendieron más fácilmente, siendo más flexibles (**Figura 1.10 b**). Además, en los cultivos realizados con agitación se encontraron mayor cantidad de pellets, mientras que, en aquellos sin agitación, solo se formó un pellet que creció en la interface aire-líquido (Mentz y Kosen, 1977; Carlile 2001).

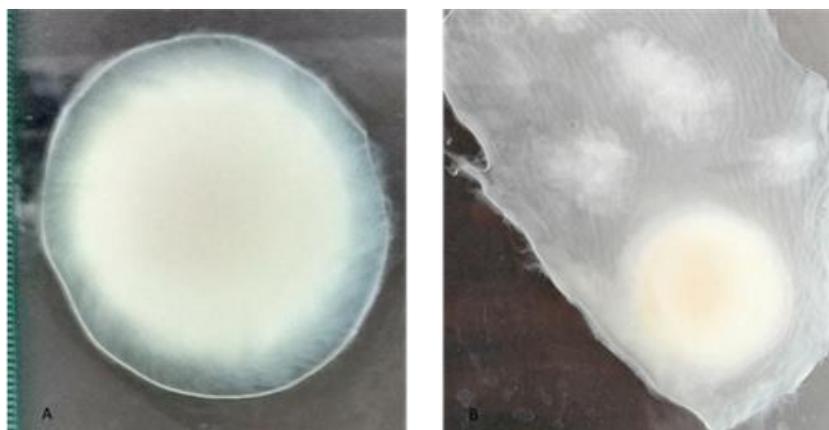


Figura 1.10: Pellets de *L. chapmanii* característicos de cultivos realizados a) con agitación b) sin agitación

En el año 1981, Van Suijdam y Mentz, describieron la influencia de las variables de ingeniería sobre la morfología de los hongos filamentosos. Explicaron que según la fuerza de cizalla a la cual se sometió al microorganismo, se pudieron encontrar dos tipos de micelios: micelio **Tipo I** (hifas bastante largas y pocas ramificaciones) y los de **Tipo II** (hifas cortas, más ramificadas y gruesas).

Un mismo microorganismo puede tener ambos micelios, según el tipo de cizalla al que es sometido. Si la fuerza de cizalla es menor que la fuerza de la pared celular, se generan los micelios del **Tipo I**, en cambio, si la fuerza de cizalla es mayor que la fuerza de resistencia de la pared de celular, se generan los micelios **Tipo II**. Van Suijdam y Mentz, explicaron que al generarse los micelios **Tipo II**, estos se entrelazan más fácilmente generando pellets más compactos que los de **Tipo I**. Estos análisis podrían justificar el comportamiento de *L. chapmanii*, que al crecer en un medio sin agitación los micelios son del **Tipo I**, en cambio, en los dos sistemas agitados los micelios formados son del **Tipo II** y por eso son compactos. Se debería completar este análisis con un estudio de las hifas para una condición con agitación y otra sin agitación, observando su largo y su grosor.

Análisis de los rangos de diámetros

Se analizó la totalidad de los pellets obtenidos en todos los medios de cultivo, condiciones de agitación y tiempo de cosecha. Se contabilizó el número de pellets y su rango de diámetro y su porcentaje respecto al total de pellets para cada situación. En las **Tablas 1.3, 1.4 y 1.5** se observan los porcentajes para cada medio de cultivo para cada condición y tiempo de cosecha. Por otro lado, se realizaron gráficos en 3D para un mejor estudio mostrados en las **Figuras 1.11, 1.12 y 1.13**.

Determinación del rango de diámetro de los pellets obtenidos en medio PYG

Los porcentajes se mostraron en la **Tabla 1.3** y el gráfico de la **Figura 1.11** mostró la variación del rango de diámetro a lo largo del tiempo para cada condición.

Tabla 1.3: Porcentaje de los rangos de diámetro (centímetro) de los pellets de *L. chapmanii* para el medio PYG:

a) Con agitación, b) Con agitación y baffles y c) Sin agitación

a)

Días Diámetro	1	2	3	5	7	12
Menor a 1.00	100	60	58.53	52.94	56.49	66.67
1.00-1.80	0	26.67	12.2	11.76	23.26	20
1.80-2.10	0	13.33	21.95	23.54	18.60	13.33
2.10-2.80	0	0	7.32	8.82	4.65	0
2.80-3.30	0	0	0	2.94	0	0

b)

Días diámetro	1	2	3	5	7	12
Menor a 1.00	100	80	77.42	45.45	70.97	65.23
1.00-1.80	0	17.50	19.35	27.27	22.58	34.77
1.80-2.10	0	2.50	3.23	22.73	3.23	0
2.10-2.80	0	0	0	4.54	3.23	0
2.80-3.30	0	0	0	0	0	0

c)

Días Diámetro	1	2	3	5	7	12
Menor a 1.00	0	0	95	64.71	12.5	33.33
1.00-1.80	0	0	5	35.29	75	33.33
1.80-2.10	0	0	0	0	12.5	16.67
2.10-2.80	0	0	0	0	0	0
2.80-3.30	0	0	0	0	0	0

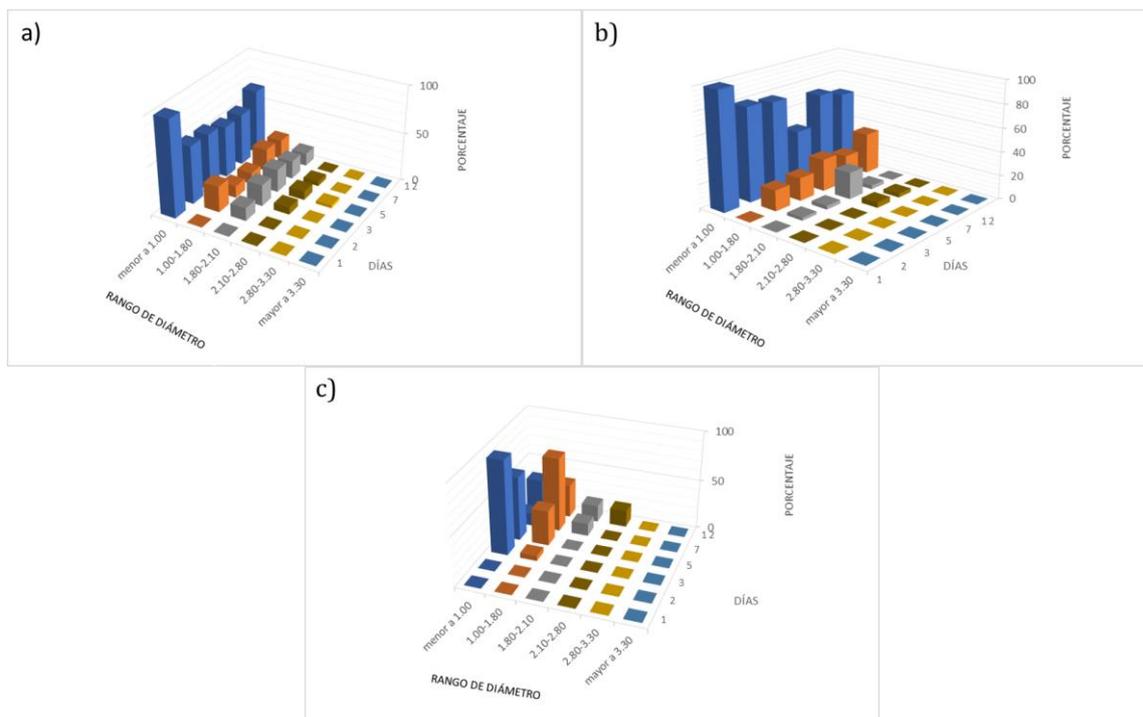


Figura 1.11: Rango de diámetro de los pellets de *L. chapmanii* a lo largo del tiempo para las tres condiciones de agitación en medio PYG: a) con agitación, b) con agitación y baffles y c) sin agitación. El eje X representa los diferentes rangos de diámetro en centímetro, el eje Y el tiempo de cosecha de cultivo en días y el eje Z representa el porcentaje total de la cantidad total de pellets encontrados para ese rango de diámetro para ese día específico.

En general, se observó que la condición con baffles presentó un mayor porcentaje de pellets formados que tuvieron un rango de diámetro menor a 1.00 cm, a partir del primer día de cosecha. Al incrementar el tiempo de cosecha hasta el día 5, aparecieron menor cantidad de pellets de un diámetro menor a 1.00 cm y aparecieron tamaños mayores (desde 1.80 hasta 2.80 cm), demostrando que la biomasa creció a lo largo del tiempo. Posteriormente al día 5 de cosecha, se observó un incremento en cantidad de pellets para un rango menor a 1.00 cm (disminuyendo la cantidad de pellets grandes), debido a que ocurrieron procesos de muerte celular y autólisis.

Si bien el mayor porcentaje de pellets de menor tamaño se encontró cuando la agitación se produjo con baffles, las otras dos condiciones tienen un punto en común con la condición mencionada. Inicialmente se encontraron pellets de diámetros menores a 1.00 cm, que con el tiempo fueron aumentando su diámetro

hasta un punto máximo, que a continuación volvieron a disminuir su tamaño. Este comportamiento nos dio una idea de que la biomasa se encontraba en la fase de muerte, pero para corroborar esto se realizó el gráfico de la cinética de crecimiento (descrito más abajo).

Determinación del rango de diámetro de los pellets obtenidos en medio SG

Los porcentajes se mostraron en la **Tabla 1.4** y el gráfico de la **Figura 1.12** mostró la variación del rango de diámetro a lo largo del tiempo para cada condición.

Tabla 1.4: Porcentaje de los rangos de diámetro (centímetro) de los pellets de *L. chapmanii* para el medio SG: a) Con agitación, b) Con agitación y baffles y c) Sin agitación

a)

Días \ Diámetro	1	2	3	5	7
Menor a 1.00	0	33.33	55.17	33.72	30.56
1.00-1.80	0	66.67	48.83	54.65	50
1.80-2.10	0	0	0	10.47	11.11
2.10-2.80	0	0	0	1.16	8.33
2.80-3.30	0	0	0	0	0

b)

Días \ Diámetro	1	2	3	5	7
Menor a 1.00	66.67	82.76	77.27	70.91	20
1.00-1.80	33.33	17.24	22.73	36.36	60
1.80-2.10	0	0	0	1.82	20
2.10-2.80	0	0	0	0	0
2.80-3.30	0	0	0	0	0

c)

Días \ Diámetro	1	2	3	5	7
Menor a 1.00	0	100	66.67	28.57	14.29
1.00-1.80	0	0	33.33	42.86	71.42
1.80-2.10	0	0	0	28.57	14.29
2.10-2.80	0	0	0	0	0
2.80-3.30	0	0	0	0	0

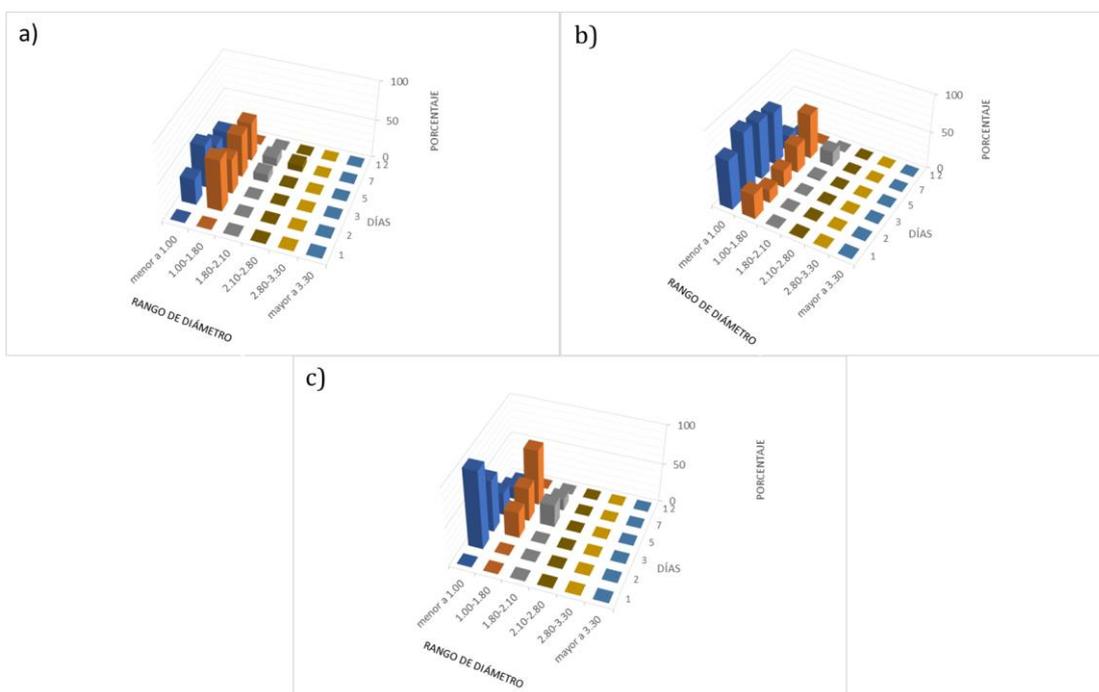


Figura 1.12: Rango de diámetro de los pellets de *L. chapmanii* a lo largo del tiempo para las tres condiciones de agitación en medio SG: a) con agitación, b) con agitación y baffles c) sin agitación. El eje X representa los diferentes rangos de diámetro en centímetros, el eje Y el tiempo de cosecha de cultivo en días y el eje Z representa el porcentaje total de la cantidad de pellets encontrados para ese rango de diámetro para ese día específico

Para este medio de cultivo también se logró observar que a medida que avanzó el tiempo, el rango de diámetro aumentó hasta un tiempo crítico, sin embargo, al no continuar el estudio hasta el día 12 no se observó un aumento en la cantidad de

pellets con diámetros menores a 1.00 cm, pero si se observó que hubo una disminución en la cantidad de pellets con diámetros mayores.

Determinación del rango de diámetro de los pellets obtenidos en medio HS

Los porcentajes se mostraron en la **Tabla 1.5** y el gráfico de la **Figura 1.13** mostró la variación del rango de diámetro lo largo del tiempo para cada condición.

Tabla 1.5: Porcentaje de los rangos de diámetro (centímetro) de los pellets de *L. chapmanii* para el medio HS: a) Con agitación, b) Con agitación y baffles y c) Sin agitación

a)

Días \ Diámetro	1	2	4	5	7
Menor a 1.00	0	73.53	52.38	58.49	66
1.00-1.80	0	23.53	42.86	35.85	26
1.80-2.10	0	9.94	4.76	5.66	8
2.10-2.80	0	0	0	0	0
2.80-3.30	0	0	0	0	0

b)

Días \ Diámetro	1	2	4	5	7
Menor a 1.00	0	92.60	95.38	83.33	88.46
1.00-1.80	0	3.70	4.62	16.67	11.54
1.80-2.10	0	3.70	0	0	0
2.10-2.80	0	0	0	0	0
2.80-3.30	0	0	0	0	0

c)

Días \ Diámetro	1	2	4	5	7
Menor a 1.00	0	100	100	46.15	55.54
1.00-1.80	0	0	0	53.85	44.46
1.80-2.10	0	0	0	0	0
2.10-2.80	0	0	0	0	0
2.80-3.30	0	0	0	0	0

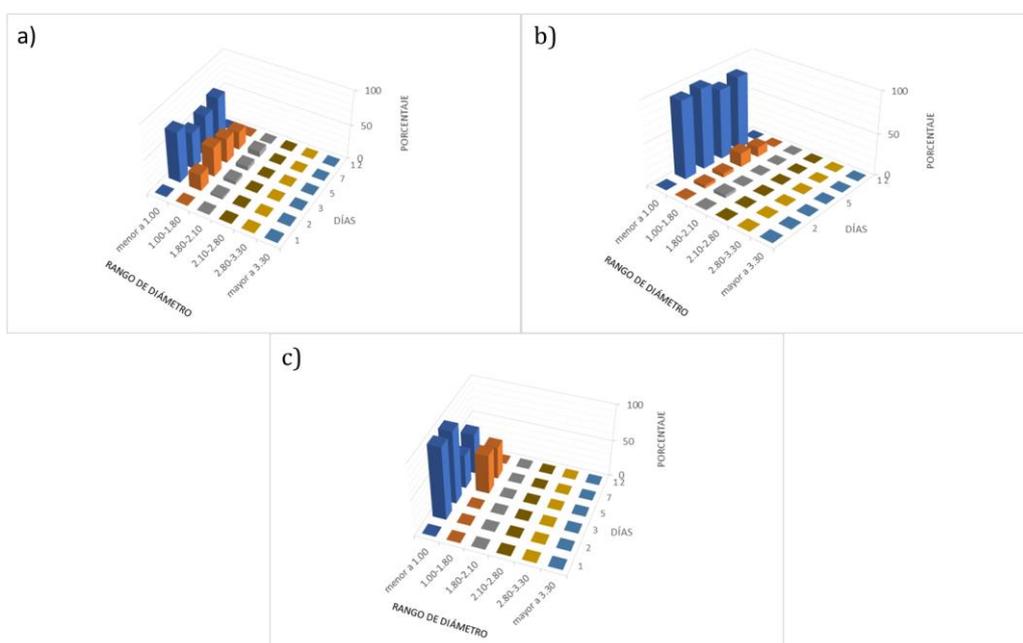


Figura 1.13: Rango de diámetro de los pellets de *L. chapmanii* a lo largo del tiempo para las tres condiciones de agitación en medio HS: a) con agitación, b) con agitación y baffles y c) sin agitación. El eje X representa los diferentes rangos de diámetro en centímetros, el eje Y el tiempo de cosecha de cultivo en días y el eje Z representa el porcentaje total de la cantidad de pellets encontrados para ese rango de diámetro para ese día específico

Se encontró que, a lo largo del tiempo, los rangos de diámetro aumentaron desde menores a un 1.00 cm hasta 2.80 cm, hasta un tiempo que empezaron a disminuir el rango de diámetro. Este comportamiento se observó para los tres medios de cultivo y en general, para las 3 condiciones de agitación.

Para la comparación de todas las condiciones estudiadas se eligió el tiempo en el cual se produjo una mayor cantidad de biomasa (el cual se determinó mediante la cinética de crecimiento analizada posteriormente).

Para el medio de cultivo PYG se eligió el día 5 para las dos condiciones de agitación y el día 12 para la condición sin agitación. Para la condición I (con agitación) se encontraron que el 52.94% los diámetros fueron menores a 1.00 cm, el 11.76% estuvieron entre 1.00-1.80, el 23.54% estuvieron entre 1.80-2.10, el 8.82% entre 2.10-2.80 y, por último, el 2.94% entre 2.80-3.30 cm de diámetro (una cantidad de 21 pellets en total). Para la condición II (con agitación y baffles) se encontró que el 45.45% tuvieron diámetros menores a 1.00 cm, el 27.27% entre 1.00-1.80, el 22.73% entre 1.80-2.10 y, por último, el 4.54% tuvieron 2.10-2.80 cm de diámetro (con una cantidad de 22 pellets en total). Para la condición III (sin agitación) se encontraron que el 33.33% tuvieron diámetros menores a 1.00 cm, otros 33.33% estuvieron entre 1.00-1.80, unos 16.67% entre 1.80-2.10 y los últimos 16.67% entre 2.10-2.80 cm de diámetro (con una cantidad de 6 pellets en total). En ninguno de los casos se hallaron diámetros mayores a 3.30 cm.

Para el medio SG se eligió analizar el día 5 para la condición I y para la II, en cambio para la III se analizó el día 7. Para la condición I se encontró que el 33.72% tuvieron un diámetro menor a 1.00 cm, el 54.65% entre 1.00-1.80, el 10.47% entre 1.80-2.10 y por último el 1.16% tuvieron un diámetro entre 2.10-2.80 cm (con una cantidad de 86 pellets en total). Para la condición II se halló que el 70.91% tuvieron un diámetro menor a 1.00 cm, el 36.36% tuvieron un diámetro entre 1.00-1.80 cm y el 1.82% un diámetro de 1.80-2.10 cm (con una cantidad de 106 pellets en total). Para la condición III, se halló que el 14.29% tuvieron un diámetro menor a 1.00 cm, el 71.42% entre 1.00-1.80 cm y el otro 14.29% entre 1.80-2.10 cm de diámetro (con una cantidad de 7 pellets en total).

Para el medio HS se eligió el día 5 para las dos condiciones con agitación y el día 7 para la condición sin agitación. Cuando se analizó la condición I se encontraron que el 58.49% tuvieron un diámetro menor a 1.00 cm, el 35.85% estuvieron entre 1.00-1.80 y el 5.66% tuvieron un diámetro de 1.80-2.10 (con una cantidad de 54 pellets

en total). Para la condición II se encontró que el 83.33% tuvieron un diámetro menor a 1.00 cm y el 16.67% tuvieron un diámetro entre 1.00-1.80 cm (con una cantidad de 65 pellets en total). Para la condición III se encontró que el 55.54% tuvieron un diámetro menor a 1.00 cm y el 44.44% estuvieron entre 1.00-1.80 cm (con una cantidad de 17 pellets en total).

Análisis de las áreas de extensión

Los resultados de las áreas de extensión se graficaron en una gráfica de barras, para cada condición y medio de cultivo.

Determinación del área de extensión para el medio de cultivo PYG

En la **Figura 1.14** y en la **Tabla 1.6** se muestran las proporciones de las diferentes áreas de extensión para las tres condiciones de agitación para el medio de cultivo PYG.

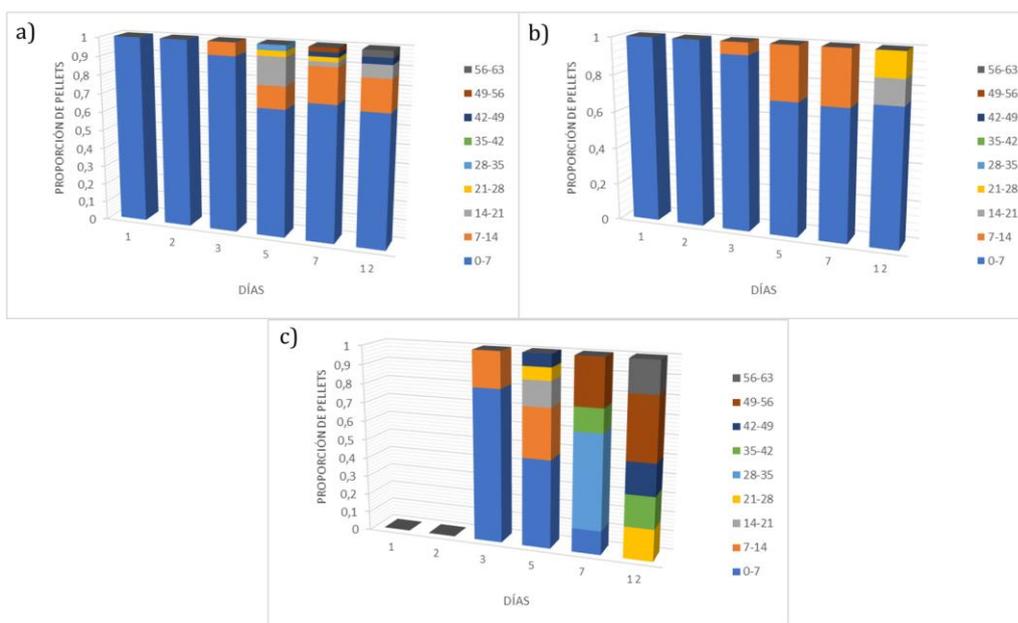


Figura 1.14: Áreas de extensión (cm²) de los pellets de *L. chapmanii* para el medio PYG en las tres condiciones de agitación; a) con agitación, b) con agitación y baffles y c) sin agitación. Los rangos de las áreas fueron de 0-7, 7-14, 14-21, 21-28, 28-35, 35-42, 42-49, 49-56 y 56-63 cm²

Tabla 1.6: Frecuencia relativa para los diferentes rangos de área de extensión (cm²) de los pellets de *L. chapmanii* en el medio PYG, a) con agitación, b) con agitación y baffles y c) Sin agitación

a)

Rango de área \ Días	Días					
	1	2	3	5	7	12
0-7	1	1	0.93	0.68	0.72	0.70
7-14	0	0	0.07	0.12	0.19	0.17
14-21	0	0	0	0.15	0.02	0.07
21-28	0	0	0	0.03	0.02	0
28-35	0	0	0	0.03	0	0
35-42	0	0	0	0	0	0
42-49	0	0	0	0	0.02	0.03
49-56	0	0	0	0	0.02	0
56-63	0	0	0	0	0	0.03

b)

Rango de área \ Días	Días					
	1	2	3	5	7	12
0-7	1	1	0.94	0.71	0.71	0.73
7-14	0	0	0.06	0.29	0.29	0
14-21	0	0	0	0	0	0.13
21-28	0	0	0	0	0	0
28-35	0	0	0	0	0	0
35-42	0	0	0	0	0	0
42-49	0	0	0	0	0	0
49-56	0	0	0	0	0	0
56-63	0	0	0	0	0	0

c)

Rango de área	Días					
	1	2	3	5	7	12
0-7	0	0	0.81	0.47	0.13	0
7-14	0	0	0.19	0.27	0	0
14-21	0	0	0	0.13	0	0
21-28	0	0	0	0.07	0	0.17
28-35	0	0	0	0	0.50	0
35-42	0	0	0	0	0.13	0.17
42-49	0	0	0	0.07	0	0.17
49-56	0	0	0	0	0.25	0.33
56-63	0	0	0	0	0	0.17

Las gráficas nos permitieron observar que las dos condiciones de agitación presentaron pellets con áreas comprendidas entre 0-7 cm² en mayor proporción a comparación de la condición sin agitación (que hubo áreas comprendidas entre 56-63 cm²).

Al comparar los dos sistemas agitados, se observó que inicialmente las áreas fueron similares, pero a medida que pasó el tiempo el sistema con baffles logró una mayor proporción entre áreas de 0-7 y 7-14 cm², en cambio, el sistema sin baffles se obtuvo áreas mayores (algunas llegaron a medir entre 56-63 cm²).

Determinación del área de extensión para el medio de cultivo SG

En la **Figura 1.15** y en la **Tabla 1.7** se muestran las proporciones de las diferentes áreas de extensión para las tres condiciones de agitación en el medio SG.

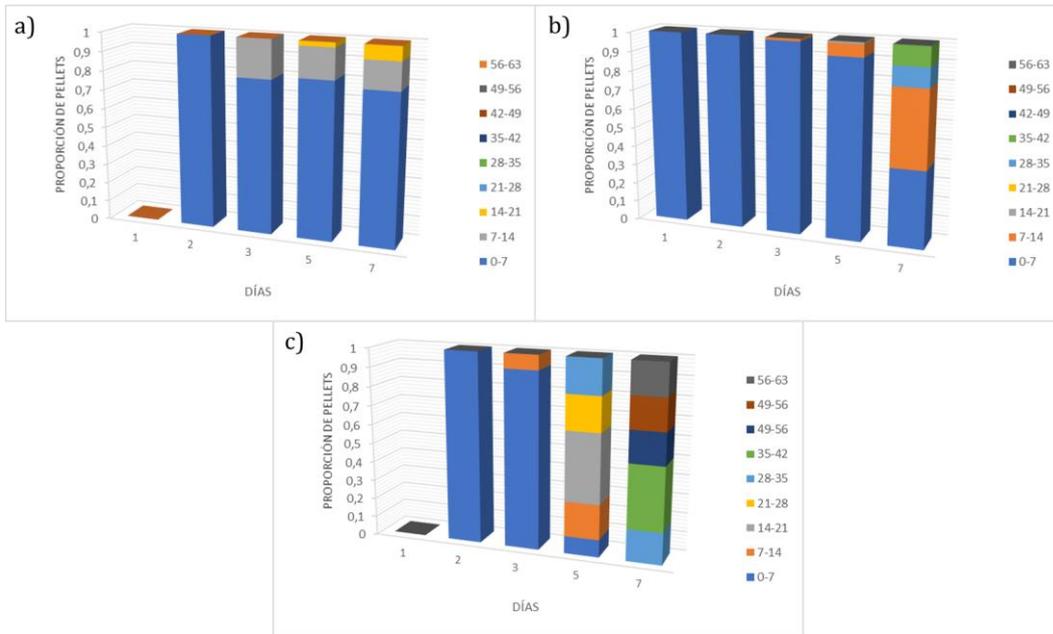


Figura 1.15: Áreas de extensión (cm²) de los pellets de *L. chapmanii* para el medio SG en las tres condiciones de agitación: a) con agitación, b) con agitación y baffles y c) sin agitación. Los rangos de las áreas fueron de 0-7, 7-14, 14-21, 21-28, 28-35, 35-42, 42-49, 49-56 y 56-63 cm²

Tabla 1.7: Frecuencia relativa para los diferentes rangos de área de extensión (cm²) de los pellets de *L. chapmanii* de los pellets de *L. chapmanii* en el medio SG: a) Con agitación, b) Con agitación y baffles y c) Sin agitación

a)

Rango de área \ Días	Días				
	1	2	3	5	7
0-7	0	1	0.80	0.82	0.79
7-14	0	0	0.20	0.16	0.14
14-21	0	0	0	0.02	0.07
21-28	0	0	0	0	0
28-35	0	0	0	0	0
35-42	0	0	0	0	0
42-49	0	0	0	0	0
49-56	0	0	0	0	0
56-63	0	0	0	0	0

b)

Rango de área \ Días	Días				
	1	2	3	5	7
0-7	1	1	0.99	0.93	0.40
7-14	0	0	0.01	0.06	0.4
14-21	0	0	0	0.01	0
21-28	0	0	0	0	0
28-35	0	0	0	0	0
35-42	0	0	0	0	0.1
42-49	0	0	0	0	0.1
49-56	0	0	0	0	0
56-63	0	0	0	0	0

c)

Rango de área \ Días	1	2	3	5	7
0-7	0	1	0.92	0.09	0
7-14	0	0	0.08	0.18	0
14-21	0	0	0	0.36	0
21-28	0	0	0	0.18	0
28-35	0	0	0	0.18	0.17
35-42	0	0	0	0	0.33
42-49	0	0	0	0	0.17
49-56	0	0	0	0	0.17
56-63	0	0	0	0	0.17

Se observó nuevamente que los sistemas con agitación lograron áreas de menor tamaño que el sistema sin agitación, manteniendo áreas entre 0-7 cm² hasta el día 5 de cosecha. A partir de ese día, aparecieron áreas mayores.

Determinación del área de extensión para el medio de cultivo HS

En la **Figura 1.16** y en la **Tabla 1.8** se muestran las proporciones de las diferentes áreas de extensión para las tres condiciones de agitación en el medio HS.

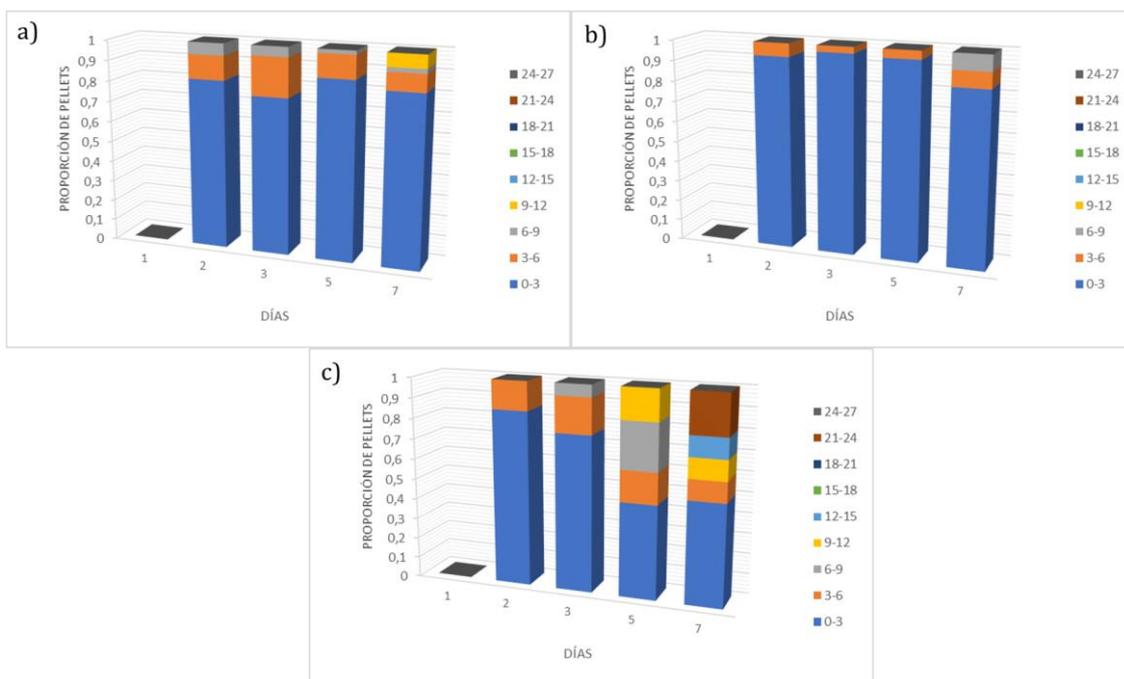


Figura 1.16: Áreas de extensión (cm²) de los pellets de *L. chapmanii* para el medio HS en las tres condiciones de agitación: a) con agitación, b) con agitación y baffles y c) sin agitación. Los rangos de las áreas fueron de 0-3, 3-6, 6-9, 9-12, 12-15, 15-18, 18-21, 21-24 y 24-27 cm²

Tabla 1.8: Frecuencia relativa para los diferentes rangos de área de extensión (cm²) de los pellets de *L. chapmanii* en el medio HS: a) con agitación, b) con agitación y baffles y c) sin agitación

a)

Rango de área \ Días	Días				
	1	2	4	5	7
0-3	0	0.82	0.76	0.87	0.83
3-6	0	0.12	0.19	0.11	0.09
6-9	0	0.06	0.05	0.02	0.02
9-12	0	0	0	0	0.06
12-15	0	0	0	0	0
15-18	0	0	0	0	0
18-21	0	0	0	0	0
21-24	0	0	0	0	0
24-27	0	0	0	0	0

b)

Rango de área \ Días	Días				
	1	2	4	5	7
0-3	0	0.94	0.97	0.96	0.85
3-6	0	0.06	0.03	0.04	0.08
6-9	0	0	0	0	0.08
9-12	0	0	0	0	0
12-15	0	0	0	0	0
15-18	0	0	0	0	0
18-21	0	0	0	0	0
21-24	0	0	0	0	0
24-27	0	0	0	0	0

c)

Rango de área \ Días	Días				
	1	2	4	5	7
0-3	0	0.86	0.76	0.46	0.50
3-6	0	0.14	0.18	0.15	0.10
6-9	0	0	0.06	0.23	0
9-12	0	0	0	0.15	0.10
12-15	0	0	0	0	0.10
15-18	0	0	0	0	0
18-21	0	0	0	0	0
21-24	0	0	0	0	0.20
24-27	0	0	0	0	0

En el medio HS, los dos sistemas con agitación obtuvieron mayor proporción de pellets de área entre 0.00 a 3.00 cm², en cambio, el sistema sin agitación se encontraron áreas de mayor tamaño de hasta 24.00 cm².

El sistema con baffles, logró mantener la mayor proporción en áreas entre 0.00-3.00 cm² a lo largo del tiempo, en comparación al sistema con agitación.

Cinética de crecimiento

Se analizó el crecimiento de *Leptolegnia chapmanii* para los tres medios de cultivo y para las tres condiciones de agitación. Se realizó una cinética de crecimiento que se muestran en las **Figuras 1.17, 1.18 y 1.19**.

Cinética de crecimiento para el medio de cultivo PYG

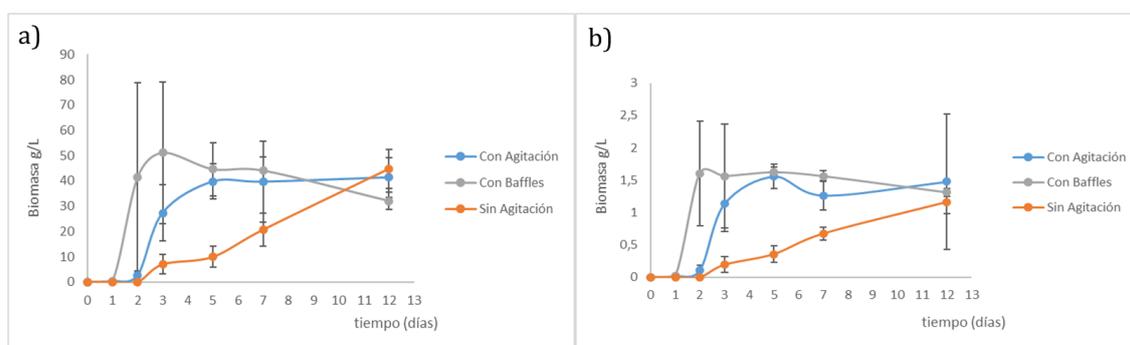


Figura 1.17: Cinética de crecimiento de *L. chapmanii* en peso húmedo (a) y peso seco (b) para el medio PYG y las tres condiciones de agitación. El eje x representa el tiempo en días y el eje y representa la concentración g/L

En este medio se observó que los dos sistemas con agitación lograron obtener una mayor producción de biomasa en un menor tiempo (5 días tanto para el sistema con baffles como para el sistema con agitación), en cambio, el sistema sin agitación tardó 12 días en llegar a una biomasa igual o menor que los otros sistemas.

En ambos sistemas agitados se observan claramente las fases ya mencionadas en la introducción, mientras que el sistema sin agitación tiene un comportamiento lineal; una posible explicación de este comportamiento puede ser que exista una limitación de oxígeno, en el sistema sin agitación.

Las biomásas máximas que se obtuvieron fueron: para el sistema con agitación 40 ± 7 g/L de peso húmedo y 1.6 ± 0.2 g/L de peso seco (5 días), para el sistema con baffles fueron de 51 ± 28 g/L de peso húmedo y 2 ± 1 g/L de peso seco (5 días) y para el sistema sin agitación el peso húmedo fue de 45 ± 8 g/L y el peso seco fue de 1.2 ± 0.2 g/L (12 días).

Cinética de crecimiento para el medio de cultivo SG

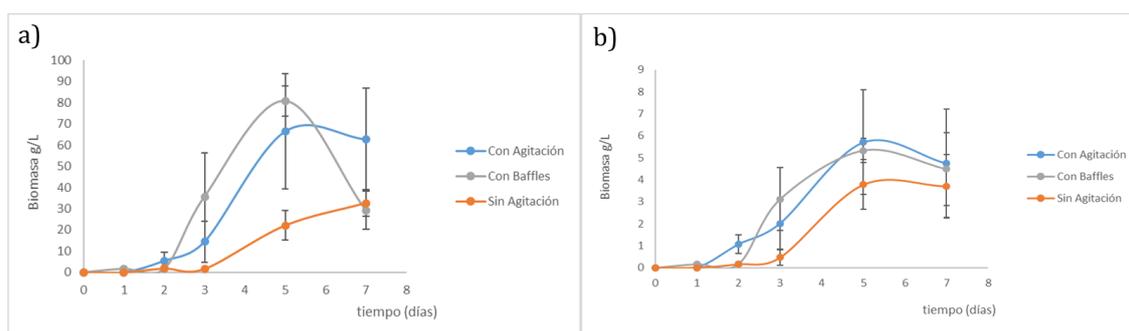


Figura 1.18: Cinética de crecimiento *L. chapmanii* en peso húmedo (a) y peso seco (b) para el medio SG y las tres condiciones de agitación. El eje x representa el tiempo en días y el eje y representa la concentración g/L

En este caso, en las 3 condiciones se observan las fases de la cinética de crecimiento. Sin embargo, en el sistema sin agitación, la biomasa máxima es menor que en los dos sistemas agitados. En las dos condiciones de agitación se logró alcanzar la biomasa máxima a los 5 días de cosecha; para el sistema con agitación se obtuvo 67 ± 27 g/L de peso húmedo y 6 ± 2 g/L de peso seco, el sistema con baffles se obtuvo 81 ± 7 g/L de peso húmedo y 5 ± 1 g/L de peso seco, en cambio, para el sistema sin agitación se obtuvo 33 ± 6 g/L de peso húmedo y 4 ± 1 g/L de peso seco a los 7 días de cosecha.

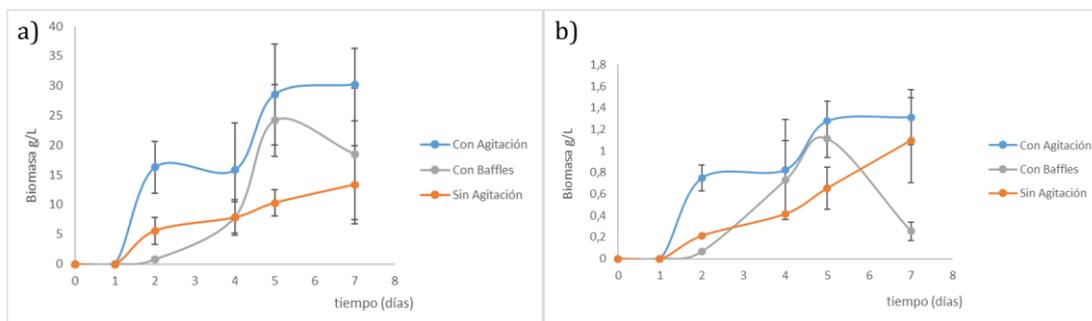
Cinética de crecimiento para el medio de cultivo HS

Figura 1.19: Cinética de crecimiento de *L. chapmanii* en peso húmedo (a) y peso seco (b) para el medio HS y las tres condiciones de agitación. El eje x representa el tiempo en días y el eje y representa la concentración g/L

En este medio se observó en los dos sistemas agitados las fases de la cinética de crecimiento microbiano, en cambio, el sistema sin agitación se encontró un comportamiento lineal probablemente por la limitación del oxígeno.

Los dos sistemas con agitación se alcanzó la biomasa máxima a los 5 días (para el sistema con agitación 29 ± 8 g/L de peso húmedo y 1.3 ± 0.2 g/L de peso seco y para el sistema con baffles 24 ± 6 g/L de peso húmedo y 1.0 ± 0.2 g/L peso seco), en cambio el sistema sin agitación a los 7 días (13 ± 7 g/L peso húmedo y 1.1 ± 0.4 g/L de peso seco).

En la **Tabla 1.9** se describe las características de las diferentes cinéticas de crecimiento para los tres medios de cultivo, determinando la fase lag y la productividad de cada condición en peso seco.

Tabla 1.9: Características de las diferentes cinéticas de crecimiento para los diferentes medios de cultivo, donde: la condición a) representa la condición con agitación, la condición b) representa la condición con agitación y baffles y la condición c) representa la condición sin agitación

cultivo	Sistema	Fase Lag (días)	Biomasa max (g/L)	Tiempo (días)	Productividad (g biomasa seca/(L*días))
PYG	Cond I	2	1,6	5	0.32
	Cond II	1	1,6	5	0.32
	Cond III	3	1,2	12	0.10
SG	Cond I	2	6	5	1.20
	Cond II	1	5	5	1.00
	Cond III	3	4	7	0.57
HS	Cond I	2	1,3	5	0.26
	Cond II	2	1	5	0.20
	Cond III	2	1,1	7	0.16

Se observó una fase lag para todos los casos, en el medio PYG y el SG el que presentó una menor fase lag fue el sistema con baffles. El medio de cultivo SG presentó un mayor peso seco por lo tanto realizó una mayor productividad en comparación a los otros medios de cultivo. Entre PYG y HS tuvieron una productividad similar.

El tiempo necesario para obtener la biomasa máxima fue similar en las dos condiciones de agitación, mientras que la condición sin agitación necesitó un tiempo mayor (May *et al.* 2006, Garza Pérez, 2014).

Garza Pérez en el año 2014, describió que, en líneas generales, los hongos entomopatógenos cuando crecen en medios de cultivo líquidos poseían una cinética de crecimiento entre 3 a 7 días, que dependerá del microorganismo analizado. Analizaron *Bauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea*, hallando que ambas especies tuvieron una fase lag, pero tuvieron diferencia en la duración de la fase estacionaria: mientras que *B. bassiana* al sexto día se encontraba en dicha fase, *I. fumosorosea* ya se encontraba en fase de muerte celular. Nuestro trabajo coincidió

en los tiempos que duro la cinética de crecimiento que fueron entre 2 a 7 días ya que para el día 12 se encontró muerte o incluso esta fase se logró encontrar después del quito día, dependiendo del medio de cultivo en el cual fue crecido el microorganismo.

May *et al.* 2006 estudiaron la cinética de crecimiento para el microorganismo *Lagenidium giganteum*. Utilizó PYGCL (un medio similar al PYG pero le agregó colesterol y lecitina). La biomasa que obtuvo May fue de 0.2 g, llegando a una biomasa constante a partir de las 30 horas de trabajo (fase lag). En este trabajo con el medio PYG se logró una biomasa cercana (0.16 g para el sistema con agitación, 0.2 g para el sistema con baffles y 0.12 g para el sistema sin agitación), sin embargo, para obtener esa biomasa se tardó entre 5 y 12 días según el sistema. Se podría volver a implementar los ensayos agregando colesterol y lecitina para corroborar si esos factores que pueden influir en la producción de biomasa.

Cuando se analizó el crecimiento en SG la biomasa máxima se obtuvo en un tiempo mayor planteado al de May, pero la cantidad de biomasa en el medio SG fue mayor (0.6 g para el sistema con agitación, 0.5 g para el sistema con baffles y 0.4 g para el sistema sin agitación). Con lo cual, en esta situación no es preferible agregar colesterol y lecitina ya que haría que el medio sea más caro, cuando sacrificando un poco más de tiempo se obtiene una mayor cantidad de biomasa con un medio de bajo costo.

Para el caso de HS se encontró similar al PYG, una cantidad de biomasa similar, pero en tiempos de producción mayores (0.19 g para el sistema con agitación, 0.1 g para el sistema con baffles y 0.11 g para el sistema sin agitación).

Conclusiones

Leptolegnia chapmanii logró crecer en los tres medios de cultivo en las tres condiciones de agitación, sin embargo, se observó diferencias en la forma de crecimiento de los pellets. Esta diferencia se debió principalmente por la presencia o ausencia de agitación y no por el tipo de medio de cultivo. La presencia de agitación permitió una mayor cantidad de pellets mucho más rígidos, en cambio, la ausencia de agitación formó un solo pellet más flexible.

Para llegar a una conclusión de los rangos de diámetro y de las áreas de extensión se observó el comportamiento de estos parámetros cuando la biomasa fue máxima, es decir 5 días para los dos sistemas agitados y para el sistema sin agitación medio SG y HS fue de 7 días y para el medio PYG fue de 12 días. Cuando nos centramos en estos días se concluyó que el sistema con baffles fue el de mayor éxito debido a que se obtuvo mayor cantidad de pellets con diámetros menores a 1.00 cm y áreas de extensión entre 0-7 cm² para PYG y SG y de 0-3.00 cm² para el medio HS.

Las diferentes cinéticas de crecimiento mostraron que tanto para los tres medios de cultivo con las dos condiciones de agitación, la biomasa máxima se logró a los 5 días, en cambio para obtener una biomasa aproximadamente similar, el sistema sin agitación necesitó entre 7 y 12 días.

Teniendo en cuenta tanto el diámetro, las áreas y la cinética de crecimiento se llegó a la conclusión que el mejor medio de cultivo fue el SG (debido a que produjo la mayor cantidad de biomasa en comparación con el HS). No se conservó el medio PYG a pesar de que formó una biomasa máxima similar al medio SG, debido a que en el día 5 los pellets tuvieron áreas y rango de diámetro mayores, comparados a los obtenidos con el medio SG.

Capítulo II: Cultivo en Biorreactores

Introducción

Biorreactores

En el Capítulo I se mencionó diferentes tipos de medios de cultivo, siendo los más utilizados el medio sólido y el medio líquido. Independientemente del estado del medio de cultivo, para lograr una producción de un microorganismo o de un producto de interés a escala piloto o industrial, se deben utilizar biorreactores.

Los biorreactores son equipos que permiten realizar diferentes procesos (químicos o biológicos), tanto en estado líquido como en estado sólido. El diseño de los biorreactores es de suma importancia, ya que deben cumplir ciertas características para lograr obtener el microorganismo o el producto de interés. Este diseño debe permitir que el biorreactor funcione durante varios días en condiciones de asepsia (para evitar contaminación). Para el caso de los biorreactores líquidos, también deben proporcionar un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas del microorganismo, que el consumo de energía sea lo más bajo posible, tener una entrada para la adición de nutrientes y control de pH, lograr mantener la temperatura de crecimiento constante, lograr mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen del cultivo, suministrar el oxígeno necesario según la demanda del microorganismo y por último, permitir mantener el cultivo puro, una vez que todo el sistema haya sido esterilizado y posteriormente sembrado con el microorganismo de interés (Ertola, 1994, Ruíz Leza *et al.* 2007).

Este trabajo consistió en utilizar un microorganismo acuático por lo que se entra en detalle en el diseño de los biorreactores utilizados para medios de cultivo líquido, ya que existen otros para medios sólidos.

Los biorreactores para cultivos sumergidos (medios líquidos) por lo general, son cilindros que pueden ser de vidrio o acero inoxidable, con una base curva o plana. Algunos poseen paletas que permiten la agitación mecánica mientras que otros su agitación es por aireación (agitación neumática). Por otro lado, muchos poseen cortacorrientes denominados baffles, que evitan la formación de vórtices y mejoran el mezclado del líquido.

A pesar de las diferentes características físicas que pueden tener los biorreactores, en todos los casos cuentan con varios puertos que poseen diferentes funciones: una permite la entrada y la salida de gases (intercambio gaseoso), otra que se conecta a un filtro que permite la esterilización de aire o nitrógeno (según si se necesita una condición aeróbica o anaeróbica respectivamente) y, por último, una que permita la inoculación del medio con el microorganismo de interés.

Los biorreactores se pueden clasificar en 3 grupos principales (Doran, 1995):

- ❖ Tanques agitados
- ❖ Columna de burbujeo
- ❖ Reactor de corriente de aire (Airlift)

Tanques agitados

Como se puede apreciar en la **Figura 2.1**, los tanques agitados son aquellos que poseen un sistema de paletas que permiten la agitación mecánica promoviendo el mezclado, la homogeneidad de la fase líquida y mejorar la dispersión de burbujas en el medio. Muchos de estos sistemas poseen baffles, estos impiden la generación de vórtices en el medio de cultivo cuando se realiza la agitación y aumentan la fuerza de cizalla.

Del volumen total del biorreactor, solo se puede utilizar entre el 70 y el 80% del mismo (aunque puede modificarse según el diseño), el espacio sobrante sirve para

arrastrar el gas a la salida y, además, si el sistema de agitación genera espuma (**Figura 2.2**) evita que se desborde por arriba impidiendo posibles contaminaciones.

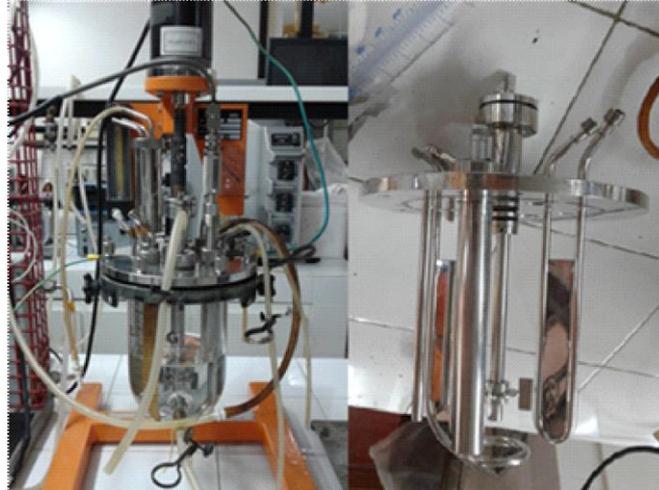


Figura 2.1: Del lado izquierdo se muestra un biorreactor de agitación mecánica, con baffles y del lado derecho muestra el sistema de baffles integrado a la tapa del biorreactor



Figura 2.2: Formación de espuma durante un cultivo en biorreactor tipo tanque agitado

La temperatura del sistema puede regularse añadiendo serpentinas (dentro de las cuales circula agua caliente o fría) o un baño calefaccionante. Pueden calentar o enfriar el sistema de acuerdo a las necesidades del trabajo.

Estos sistemas se utilizan para el cultivo de células en suspensión, reacciones con células inmovilizadas o incluso en reacciones con enzimas libres. El cuidado

especial de estos sistemas está en la fuerza de cizalla producida por la agitación, si es muy elevada puede destruir el material de interés.

Se pueden mencionar algunas **ventajas** del uso de este tipo de biorreactor:

- ❖ El tanque agitado permite un control preciso de la temperatura y del pH del medio de cultivo, debido a que se pueden añadir sistemas de control.
- ❖ La constante agitación del medio de cultivo nos permite asegurar que las células tengan un acceso a los nutrientes y oxígeno de forma eficiente.
- ❖ La facilidad del escalado se puede ajustar según las necesidades de producción.

Dentro de las **desventajas** podemos encontrar:

- ❖ Los biorreactores pueden ser costosos de adquirir y mantener debido a su diseño complejo y la necesidad de equipos adicionales.
- ❖ La agitación constante del medio de cultivo puede requerir grandes cantidades de energía, aumentando los costos operativos.
- ❖ La agitación intensa puede dañar las células y reducir la viabilidad celular afectando la producción del producto de interés.

Columna de burbujeo

Es un sistema donde la agitación no es mecánica, sino que es por aireación, es decir que tanto la mezcla como la aireación se genera por inyección de gas. Por lo general no presentan estructuras adicionales, solo poseen el inyector de aire (**Figura 2.3**).

Estos sistemas consisten en un cilindro, por diseño, generalmente su altura es el doble de su diámetro, aunque dicha relación puede variar. Si la altura es muy elevada las burbujas pueden juntarse formando una única de mayor tamaño, dicho efecto es indeseable. Para evitarlo es posible adicionar placas horizontales con agujeros que modifican el desplazamiento de las burbujas evitando su coalescencia.



Figura 2.3: Biorreactor columna de burbujeo

El sistema presenta **ventajas** (Deckwer y Schumpe, 1993):

- ❖ Requiere escaso mantenimiento debido a la construcción simple y sin problemas de sellado debido a la ausencia de partes móviles.
- ❖ El alto contenido de fase líquida donde se lleva a cabo la reacción.
- ❖ Buenas propiedades de transferencia de calor, y en consecuencia fácil de mantener la temperatura constante.
- ❖ Existe una transferencia de masa razonable entre fases con entrada de energía baja.

- ❖ Los sólidos se pueden manejar fácilmente sin la dificultad de erosión o taponamiento.
- ❖ No necesitan un espacio de piso.
- ❖ Son de bajo costo.

El sistema también presenta **desventajas**

- ❖ Posee una retromezcla considerable tanto en la fase líquida continua (suspensión) como en la fase gaseosa dispersa.
- ❖ Alta caída de presión (cuando se trabaja a temperatura ambiente).
- ❖ Existe coalescencia de las burbujas.

Las desventajas pueden reducirse si se modifica el diseño o si se agregan elementos adecuados.

En este sistema también existe la posibilidad de formación de espuma (en menor proporción que en un tanque agitado), por lo cual en ocasiones es necesario adicionar antiespumante para contrarrestar este efecto.

La hidrodinámica de la columna de burbujas y la transmisión de calor en estos biorreactores, dependen exclusivamente de la columna formada por el difusor (Doran, 1995). El tipo de flujo que existe en el sistema depende no solo del caudal del gas, sino que también del diseño del difusor, del diámetro de la columna y de las propiedades del medio de cultivo. Pueden existir dos tipos de flujos: homogéneo o heterogéneo. El primer caso sólo se produce a bajos caudal de aire y cuando todas las burbujas se distribuyen a lo largo de la columna con la misma velocidad; en cambio, en el segundo caso las burbujas desarrollan un flujo caótico generando la retromezcla del gas (las burbujas ascienden por el centro de la columna y cerca de las paredes desciende).

El sistema de columna de burbujeo es muy utilizado en la producción de levaduras, cerveza, vinagre y en tratamientos de aguas residuales (Doran, 1995).

Reactor de corriente de aire (Airlift)

Estos biorreactores también utilizan agitación neumática, pero la diferencia entre estos biorreactores y los de columna de burbujeo se debe a que las corrientes del flujo del líquido están más definidas, a causa de una separación física de corrientes ascendentes y descendentes.

La **Figura 2.4** muestra el esquema de un reactor tipo airlift: está formado por dos cilindros concéntricos. El gas es inyectado en la sección interior denominada "riser". Dentro de este sector se genera una diferencia de densidades provocando un movimiento ascendente. Cuando las burbujas llegan al extremo superior caen. Este movimiento continuo da origen al mezclado del medio líquido.

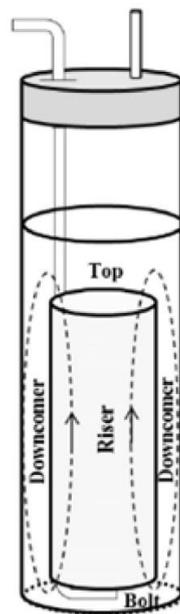


Figura 2.4: Esquema del biorreactor extraída de Medina-Moreno, 2013

Ventajas

- ❖ Proporcionan mejores mezclas que el sistema por columna de burbujeo (excepto a velocidades bajas, las corrientes generadas son similares).
- ❖ Como este sistema le da más estabilidad al flujo de gas pueden usarse caudales más altos a comparación que el biorreactor de columna de burbujeo.

Desventajas

- ❖ Posee limitaciones para el escalado ya que la eficiencia de circulación puede disminuir en biorreactores más grandes.
- ❖ El diseño debe ser cuidadoso y optimizado para garantizar una circulación garantizada evitando problema de mezcla y transferencia de masa.
- ❖ Existe una dificultad para controlar la velocidad de agitación, muchas veces requieren de varios ajustes para lograr una optimización en la agitación.

Este tipo de biorreactores se utilizan en cultivos de células animales y vegetales o en catalizadores inmovilizados, ya que la fuerza de cizalla es menor y evitaría la ruptura de lo que queremos cultivar.

Influencia de la agitación en los cultivos

La influencia de la agitación, es decir la fuerza de cizallamiento de los impulsores sobre la morfología y la productividad de hongos filamentosos es de vital importancia (Gibbs *et al.* 2000). Los hongos tienen la habilidad de crecer de diferentes formas y en diferentes tiempos según el tipo de agitación a la cual se los somete (entre otras variantes). Por lo cual, la determinación de un diseño de

biorreactor en condiciones óptimas para el escalado del hongo de interés biotecnológico es primordial.

El objetivo de este capítulo es seleccionar un biorreactor que permita el crecimiento de *L. chapmanii* con la mayor producción de biomasa posible. Se utilizará un biorreactor con agitación mecánica y un biorreactor de columna de burbujeo, determinando en cual es más favorable el crecimiento y en qué condiciones se logra.

Materiales y Métodos

Se evaluó la formación de biomasa utilizando dos tipos de fermentadores: el primero fue el tanque agitado y el segundo fue columna de burbujeo. Por otra parte, se determinó cual medio fue el apropiado para hacer crecer a *L. chapmanii*: medio Peptona- Extracto de levadura-Glucosa (PYG) y medio Semilla de girasol (SG), detallados en el Anexo.

Preparación del inóculo

Se realizaron ocho cortes con 1 cm² de área de un medio agar PYG con crecimiento de *L. chapmanii*. Los cortes se colocaron en un frasco Erlenmeyer de 1 L con 550 mL de agua destilada estéril. Se almacenó durante tres días a 30°C. A continuación, se tomó dos alícuotas, una de ellas para determinar la concentración de zoosporas con la cámara de Neubauer y la segunda de 25 mL para evaluar la viabilidad de las zoosporas por ensayos de mortalidad. El volumen restante se lo utilizó para la inoculación del biorreactor, donde la cantidad dependió del tipo de biorreactor utilizado.

Tanque agitado

Preparación del biorreactor con medio PYG

En primera instancia se preparó el fermentador de tanque agitado con el medio PYG. Para ello, se colocó 1.170 L del medio PYG. Se le agregó un electrodo de oxígeno, se cerró adecuadamente y se lo llevo al autoclave durante 25 minutos a una atmosfera de sobrepresión (temperatura 121°C). Después de la inoculación, se inició la agitación a 100 rpm y se mantuvo la temperatura a 30°C.

Preparación del biorreactor con medio SG

Se utilizó medio de Semilla de Girasol propuesto por Axtell y Jaronski. El volumen de medio de cultivo utilizado fue de 1.170 mL. A continuación, se colocó el electrodo de oxígeno, se cerró y llevó al autoclave durante 25 minutos a una atmósfera de sobrepresión (temperatura 121°C). Se dejó enfriar el biorreactor y se procedió a la inoculación. Se encendió el equipo con una velocidad de 100 rpm a 30°C.

Inoculación del biorreactor

Se midieron 130 mL de la suspensión de zoosporas (en medio PYG: $3.26 \cdot 10^3$ zoosporas/mL y en medio SG; $3.12 \cdot 10^3$ zoosporas/mL) y se los colocó en un frasco Erlenmeyer de 500 mL con una salida lateral.

A continuación, junto al mechero se destapó la manguera del fermentador y la del frasco con salida lateral, conectándose entre sí. Se levantó el frasco con el inóculo para asegurar que se trasvase todo el líquido. El volumen final del biorreactor fue de 1.300 L. Este paso se realizó de igual manera para los dos medios de cultivo.

Con la disponibilidad de elementos en este tipo de biorreactor se midieron los siguientes parámetros:

- ❖ Porcentaje de O₂ a la entrada del biorreactor.
- ❖ Porcentaje de O₂ a la salida del biorreactor.
- ❖ Porcentaje de CO₂ a la salida del biorreactor.
- ❖ Porcentaje de O₂ disuelto.
- ❖ Flujo de aire.
- ❖ Temperatura del fermentador.
- ❖ Temperatura ambiental.
- ❖ pH.

Columna de burbujeo

Preparación del biorreactor con medio PYG

El biorreactor tuvo tres mangueras, una permitió la salida de gases para evitar el aumento de presión, la segunda manguera fue donde se conectó un filtro de aire (PallLifeSciences 0.22 µm) para airear bajo condiciones de esterilización y la tercera manguera permitió la conexión con el frasco del inóculo. Dentro del biorreactor se colocaron 2.700 L de medio PYG, se lo cerró adecuadamente y se lo colocó en el autoclave durante 30 minutos, a una atmósfera de sobrepresión (121°C). Una vez enfriado el equipo, se inoculó y se encendió la aireación con un flujo de 15.25 mL/seg a una temperatura de 30°C.

Preparación del biorreactor con medio SG

Dentro del biorreactor se colocaron 2.700 L de medio de cultivo Semilla de girasol. Se cerró adecuadamente y se llevó al autoclave durante 30 minutos a una atmósfera de sobre presión (Temperatura 121°C). Una vez que se enfrió el biorreactor se inoculó y se encendió la aireación con un flujo de 15 mL/seg a 30° C.

Inoculación del biorreactor

Bajo flujo laminar, se midieron 300 mL de la suspensión de zoosporas (medio PYG: $2.9 \cdot 10^3$ zoosporas/mL y el medio SG: $3.12 \cdot 10^3$ zoosporas/mL) y se lo trasvasó a un Erlenmeyer de 500 mL con una salida lateral. A continuación, junto al mechero se destapó la manguera del fermentador y la del frasco con salida lateral, conectándose entre sí. Se levantó el frasco con el inóculo para asegurar que se trasvasase todo el líquido. El volumen final del biorreactor fue de 3 L.

En este tipo de biorreactor, se midieron únicamente el flujo de aire y la temperatura. Para determinar el flujo de aire, se empleó un caudalímetro (**Figura 2.5**), como se muestra en la Figura 2.5. Este dispositivo consistía en un tubo cilíndrico de vidrio graduado en ambos extremos. La distancia entre las graduaciones era conocida y se correspondía a un volumen de 198.2 mL. En la parte inferior del tubo, se conectaba una manguera que se bifurcaba: una rama se conectaba a la manguera de salida de gases del biorreactor, y la otra se unía a una jeringa con detergente. Al bombear el detergente, se formaba una burbuja que se desplazaba a lo largo del tubo. El tiempo que tardaba la burbuja en recorrer la distancia conocida se utilizaba para calcular el flujo de aire.



Figura 2.5: Caudalímetro

Análisis de las muestras

En los dos fermentadores se tomaron muestras para realizar análisis microbiológico y verificar si hubo o no contaminación por parte de otro microorganismo.

Se analizó el tipo de crecimiento si fue una suspensión o pellets, en caso de ser pellets se analizó cada uno de ellos y se determinó el rango de diámetro y sus áreas de extensión. La metodología fue la misma que se describió en el Capítulo I.

Por último, se analizó el peso húmedo y seco de los biorreactores. La virulencia de *L. chapmanii*, se estudió en el Capítulo IV.

Resultados y discusión

Las muestras analizadas microscópicamente para la verificación de contaminación dieron negativas y se prosiguió a los análisis de las muestras.

Por otro lado, en todos los casos se obtuvo pellets y no fue un crecimiento en suspensión. Por lo tanto, se analizó individualmente los pellets con sus diámetros y sus áreas de extensión, además de su peso seco y húmedo.

Tanque agitado

Biorreactor con medio PYG

En la **Tabla 2.1** se muestran los resultados de las mediciones de los siguientes parámetros: el Flujo, el porcentaje de oxígeno a la entrada (%O_{2 ent}), porcentaje de oxígeno a la salida (%O_{2 sal}), % CO₂, Temperatura ambiente (T amb), Temperatura del fermentador (T ferm), pH y porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (%O_{2 dis}), durante los 10 días del ensayo.

Tabla 2.1: Parámetros medidos durante el proceso del biorreactor para el medio de cultivo PYG

Día	Flujo	%O₂ ent	%O₂ sal	%CO₂	T amb (C)	T ferm (C)	pH	%O₂ dis
0	15.25	20.94	Ind	Ind	16	29	6.62	8.4
1	24.81	20.94	20.83	0.03	17	29.1	6.62	91.1
2	14.27	20.90	20.93	0.02	16	28	6.63	79.8
3	15.20	20.99	20.90	0.03	16.5	29.5	6.63	44.9
4	15.04	20.96	20.94	Ind	14	27.9	6.65	47.4
5	24	20.88	20.88	Ind	15	25	6.60	47.4
6	25.81	20.91	20.91	0.02	15	25	6.70	47.5
7	24.30	20.92	20.94	0.03	14	26	6.62	47.8
8	25.71	20.96	20.88	0.02	15	26.6	6.85	47.4
9	18.45	20.90	20.91	0.01	15	27	6.62	47.3
10	19.20	20.92	20.83	0.01	14	27	6.64	47.5

El crecimiento de *L. chapmanii* se dio tanto en paredes, tubos y en el aireador, dificultando la aireación del medio de cultivo, debido a esta razón el flujo del aire se fue modificando a lo largo del tiempo para mantener la aireación adecuada.

En la **Figura 2.6** se muestra el crecimiento de este microorganismo en el medio PYG, se corroboró que el crecimiento fue en forma de pellets.



Figura 2.6: Formación de biomasa en el biorreactor tanque agitado medio PYG

Como se muestra en la **Figura 2.6**, el crecimiento de *L. chapmanii* se dio principalmente en las paredes del biorreactor. Lo que dificultó el análisis de cada pellet formado, y, en consecuencia, no se realizó el análisis de las áreas y rango de diámetro. El crecimiento tardó 10 días.

Biorreactor con medio SG

En la **Tabla 2.2** se muestran los resultados de las mediciones de los siguientes parámetros: el Flujo, el porcentaje de oxígeno a la entrada ($\%O_{2\text{ ent}}$), porcentaje de oxígeno a la salida ($\%O_{2\text{ sal}}$), $\% CO_2$, Temperatura ambiente (T_{amb}), Temperatura del fermentador (T_{ferm}), pH y porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo ($\%O_{2\text{ dis}}$), durante los 6 días del ensayo.

Tabla 2.2: Parámetros medidos durante el proceso del biorreactor para el medio de cultivo SG

<i>Día</i>	<i>Flujo</i>	<i>%O₂ ent</i>	<i>%O₂ sal</i>	<i>%CO₂</i>	<i>T amb (C)</i>	<i>T ferm (C)</i>	<i>pH</i>	<i>%O₂ dis</i>
0	25.77	20.96	20.91	1	16	29.9	6.77	83
1	25.28	20.96	20.92	4	16.50	29.9	6.79	82.5
2	25.61	20.98	20.92	1	19	25.1	7.01	82.7
3	25.15	20.98	20.91	Ind	15	25	6.90	80
4	22.94	20.95	20.92	Ind	14	24.8	7.02	80.5
5	24.50	20.97	20.93	Ind	13	25.2	7.01	80
6	32.39	20.99	20.93	2	14	24.8	6.09	81

Con este medio de cultivo el crecimiento del microorganismo nuevamente se dio en las paredes del biorreactor, en el difusor y en las paletas de agitación (**Figura 2.7**). Por este motivo nuevamente se modificó el flujo del aire durante el tiempo del bioensayo para que se mantenga una buena agitación. Sin embargo, a diferencia del medio PYG, la mayoría de la biomasa se creció en el seno del líquido siendo más fácil su recuperación (**Figura 2.8**).

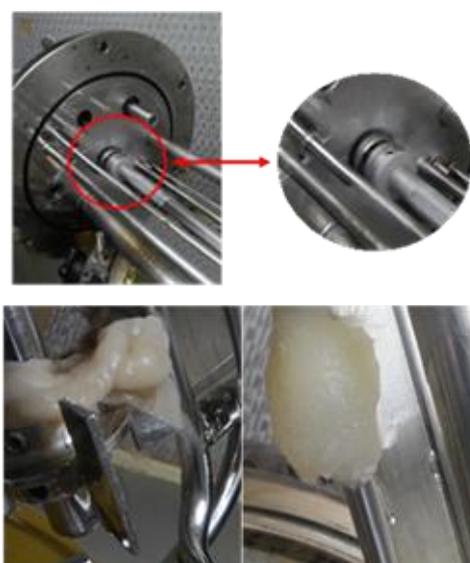


Figura 2.7: Formación de biomasa en el biorreactor tanque agitado con medio SG



Figura 2.8: Crecimiento de *L. chapmanii* en el seno del líquido

Como se logró recuperar los pellets se realizaron los estudios de los rangos de diámetros (mostrados en la **Tabla 2.3**), y de las áreas de extensión. El crecimiento tardó 6 días.

Tabla 2.3: Rango de diámetro (centímetro) de los pellets obtenidos

<i>Cantidad de pellets</i>	<i>Rango de diámetro (cm)</i>
2	1.80-2.10
4	2.10-2.80
1	Mayor a 3.30

Se obtuvieron 7 áreas de extensión, los valores son: 10.811, 11.572, 11.840, 12.943, 20.877, 53.647 y 99.587 cm².

Lo siguiente que se analizó fue la producción de biomasa, realizando peso húmedo y peso seco. El peso húmedo obtenido fue de 49 g/L y el peso seco fue de 2.8 g/L.

En ambos sistemas surgió el inconveniente de que la biomasa de *L. chapmanii* creció no solo en el medio de cultivo, sino también adherido a cualquier superficie del mismo (**Figura 2.6 y 2.7**). Sin embargo, la recuperación de la biomasa con el medio SG fue más fácil que en el medio PYG. Una posible explicación puede deberse a que en el medio SG una vez que fue esterilizado, se observaron partículas en

suspensión, y que posiblemente actuaron como superficie de adhesión para el hongo (núcleo de crecimiento). Por consiguiente, lograron crecer mayoritariamente en el seno del líquido y no necesitaron de otro tipo de superficie para adherirse. Sin embargo, la necesidad de adherirse para el crecimiento en el biorreactor no es recomendable para realizar un escalado, por el esfuerzo que implicó recolectar la biomasa, y la limpieza del mismo biorreactor.

El supuesto de que las partículas actuaron como núcleo de crecimiento para *L. chapmanii* coincide con la publicación de Byrne y Ward en el año 1989. Ellos trabajaron con el microorganismo *Rhizopus arrhizus*, que al crecerlo en biorreactores observaron adherencia tanto en las paredes del biorreactor como en los deflectores y las paletas. Sin embargo, cuando agregaron sólidos de maíz, la adherencia no ocurrió, dando un cultivo disperso. Ellos corroboraron por estudios microscópicos, que *R. arrhizus* utilizó los sólidos como núcleo de crecimiento.

Columna de burbujeo

Biorreactor con medio PYG

En este sistema con el medio de cultivo PYG, tuvimos problemas con el crecimiento. Pasó un tiempo mayor a 10 días y no hubo crecimiento por parte de *L. chapmanii*. Como se intentó dos veces y volvió a suceder lo mismo, se desistió de este medio de cultivo y se prosiguió a utilizar el medio de cultivo SG.

Biorreactor con medio SG

En la **Figura 2.9** se muestra el crecimiento de *L. chapmanii*, para un biorreactor de columna de burbujeo en medio SG.



Figura 2.9: Crecimiento de *L. chapmanii* en columna de burbujeo en medio SG

En 24 horas se consiguió el crecimiento de *L. chapmanii* en casi todo el biorreactor, se supuso que el microorganismo consumió todo el sustrato posible; no obstante, esta aseveración deberá ser confirmada mediante ensayos de determinación de glucosa inicial y final.

Con respecto a los rangos de diámetros se muestran en la **Tabla 2.4**

Tabla 2.4: Rango de diámetros (centímetro) de pellets obtenidos en el biorreactor columna de burbujeo con medio SG

<i>Cantidad de pellets</i>	<i>Rango de diámetro (cm)</i>
3	1.80-2.10
4	2.10-2.80
1	Mayor a 3.30

Se obtuvieron 8 pellets con las siguientes áreas de extensión: 10.243, 10.616, 11.221, 12.234, 17.620, 31.727, 36.055 y 50.435 cm².

Por último, se analizó el peso de la biomasa obtenida. Se obtuvo un peso húmedo de 50 g/L con un peso seco de 3 g/L.

Conclusión

Leptolegnia chapmanii logró crecer en los dos medios de cultivo cuando se usó el tanque agitado, pero al usar el biorreactor columna de burbujeo solo se dio crecimiento en el medio SG. El motivo por el cual no creció en el medio PYG puede ser diverso, se podría sospechar de algún factor operacional descartándose la viabilidad de las zoosporas, ya que se corroboró mediante ensayos de mortalidad.

Utilizar el medio PYG para el tanque agitado en comparación con el SG resultó poco práctico, y existe dos razones que corroboran la dificultad de su uso. En primer lugar, fue el tiempo de crecimiento: en el medio PYG *L. chapmanii* tardó 10 días en formarse, mientras que, en el medio SG tardó 6 días. Y, en segundo lugar, fue la adherencia a las superficies del biorreactor: cuando se utilizó el medio SG hubo partículas propias del medio que sirvieron como núcleo de crecimiento, disminuyendo la adherencia a las superficies del biorreactor por parte de *L. chapmanii*. Esta situación no se observó en el medio PYG, ya que no existieron partículas, causando una mayor adherencia. En consecuencia, la recuperación de la biomasa para la columna de burbujeo fue de mayor facilidad.

Al usar el medio SG en los dos biorreactores se obtuvo una biomasa similar, siendo sus áreas de extensión y rangos de diámetro similares, sin embargo, la diferencia estuvo en el tiempo de obtención de la biomasa. En el tanque agitado tardó 6 días, mientras que en la columna de burbujeo tardó 24 horas. La disminución en el tiempo permite que los gastos sean menores.

En conclusión, la mejor situación planteada en este trabajo fue el biorreactor columna de burbujeo usando el medio SG. El biorreactor es simple, solo se necesita un aireador y el medio de cultivo es fácil de preparar y de bajo costo, obteniéndose la biomasa en 24 horas iniciado el trabajo. Debido a estas características, se

realizarían más estudios para poder lograr un escalado con un mayor volumen de medio de cultivo.

Capítulo III: Formulaciones para el almacenamiento de las zoosporas de *Leptolegnia chapmanii*

Introducción

Es importante tener en cuenta que *Ae. aegypti* es un vector de enfermedades de importancia sanitaria con una elevada tasa de mortalidad. La prevención de dichas enfermedades se puede llevar a cabo controlando la densidad poblacional del vector, ya que, al haber un menor número la probabilidad de contraer algunas de las enfermedades es menor (Uribe, 1983, Márquez *et al.* 2017). La regulación de la población de mosquitos se realiza través de tres estrategias. La primera que se utiliza es un control cultural, que consiste en la eliminación de recipientes de agua estancada y la reducción de criaderos de mosquitos en áreas urbanas. La segunda consiste en el control químico, donde se utilizan sustancias químicas denominadas insecticidas para producir la muerte del mosquito. La última estrategia es el control biológico, que consiste en el uso de microorganismos para controlar especies plagas. Esta estrategia presenta una serie de ventajas frente a los otros métodos mencionados en la Sección de Antecedentes, por lo que existe una tendencia a ir reemplazando los métodos químicos por los biológicos.

Existen numerosas investigaciones que describen el uso de hongos entomopatógenos para esta finalidad, como por ejemplo *Metarhizium anisopliae* (Tanzani *et al.* 2001, Scholte *et al.* 2007, García *et al.* 2011, Ujjan *et al.* 2015, Falvo *et al.* 2018, Falvo *et al.* 2020), *Beauveria bassiana* (Tanzani *et al.* 2001, Mata *et al.* 2010, García *et al.* 2011), *Lagenidium giganteum* (Jaronski y Axttel, 1983, 1984, Vanderghyens *et al.* 2007, Vyas *et al.* 2007, Maldonado *et al.* 2011,) y *Leptolegnia chapmanii* (López Lastra *et al.* 1999, 2004, Pelizza *et al.* 2008, Moltalva *et al.* 2016, Rueda Páramo *et al.* 2019 a y b).

La preparación de formulados en base de micoinsecticidas implica combinar el hongo entomopatógeno con otros ingredientes y aditivos para crear una formulación que resulte fácil de aplicar y efectiva en el control de plagas, en el caso

de este trabajo, la población de mosquitos vector de enfermedades. Es importante señalar que la preparación de formulados de micoinsecticidas puede variar según el tipo de hongo entomopatógeno utilizado, la aplicación prevista y otros factores específicos del producto. Además, estos productos suelen estar sujetos a regulaciones y directrices de seguridad ambiental y toxicológica, por lo que es importante cumplir con las regulaciones locales y consultar a expertos en la materia al preparar y utilizar micoinsecticidas.

A continuación, se describe el proceso general de preparación de formulados de zoosporas de *L. chapmanii* propuesto en esta tesis doctoral:

- ❖ **Cultivo y producción del hongo entomopatógeno:** En primer lugar, se cultivó y produjo el hongo entomopatógeno en laboratorio o en una instalación de producción especializada en la escala necesaria. Esto implica la propagación del hongo en un medio de cultivo adecuado hasta que alcance una masa crítica. El estudio de la metodología apropiada para esta etapa se realizó en el Capítulo I (selección de medio y condiciones de cultivo) y el Capítulo II (escalado).
- ❖ **Recolección y preparación de la suspensión del principio activo (zoosporas de *L. chapmanii*):** una vez que se finalizó el proceso de producción de biomasa, se recolectó y se colocarán en solución estéril adecuada (agua o con iones Ca^{+2} o Mg^{+2}) con el fin de promover la liberación de zoosporas. La evaluación de diferentes metodologías para esta etapa se detallará en el Capítulo IV.
- ❖ **Formulación:** El hongo entomopatógeno se combinó con otros ingredientes y aditivos para crear una formulación específica. Los tipos de coadyuvantes y formulaciones se desarrollarán dentro de este capítulo.

Formulación

La formulación es el proceso en el que varias sustancias diferentes se combinan en proporciones precisas para formar un producto (Sawar, 2015). La formulación mejora las propiedades de un principio activo, para el manejo y almacenamiento de un producto (Bugues, 1998), en este caso la suspensión de zoosporas utilizadas como agente del biocontrol.

Los objetivos de la formulación consisten en: aumentar la actividad de los principios activos, mantener las propiedades del principio activo durante el almacenamiento y transporte, facilitar la manipulación, el mezclado y la agitación en forma ágil, económica y segura, reduciendo al máximo la peligrosidad tanto para el hombre como para el ambiente.

Componentes de un formulado

Los componentes que se pueden incluir en un formulado pueden clasificarse en tres categorías: el principio activo, los inertes y los coadyuvantes (Puricelli y March, 2014).

El **principio activo** es la sustancia biológica que actúa sobre el control de un organismo blanco. Se puede clasificar en: naturales (de origen natural como nicotina, de origen mineral como cobre o azufre o derivados de microorganismos como *Bacillus thuringensis*) y en sintéticos (son sintetizados en el laboratorio y pueden llamarse por el nombre científico o por un nombre común).

El **inerte** es el medio de dilución de los principios activos y coadyuvantes. Cuando realizamos formulaciones líquidas, los inertes son llamados solventes y cuando estamos realizando una formulación sólida son denominados "carriers". Los Inertes sólidos se dividen en minerales (por ejemplo, óxidos) y en orgánicos (por ejemplo, harina). Mientras que los solventes líquidos son elegidos por sus propiedades según el tipo de formulado y características del principio activo.

Si utilizamos un inerte sólido debemos considerar la homogeneidad en la textura, color y tamaño. Además, independientemente del estado del inerte, estos componentes no deben reaccionar químicamente ni con el principio activo ni con alguna otra sustancia del formulado.

Los **coadyuvantes** se pueden definir como compuestos que contribuyen con la actividad del producto, ya sea facilitando el mezclado, la aplicación o mejorando su eficiencia (Puricelli y March, 2014).

Entre los objetivos que se pretenden alcanzar, mediante el agregado de coadyuvantes se pueden mencionar la optimización de la actividad del principio activo y, además, la disminución o eliminación de los problemas de aplicación, modificando las características físicas y química del producto.

A la hora de aplicar algún coadyuvante se debe tener en cuenta la función de cada uno de ellos y sus condiciones, para obtener una correcta aplicación del producto. Sin embargo, al utilizarse algún tipo de coadyuvante, se pueden generar efectos no deseados, tales como:

- ❖ **Toxicidad:** se origina cuando una sustancia es capaz de aumentar la absorción del producto a través de la vía respiratoria o cutánea, provocando un incremento en el riesgo para las personas que utilicen el producto.
- ❖ **Fitotoxicidad:** bajo ciertas condiciones algunas sustancias pueden causar daños a las plantas del cultivo al cual se le está aplicando un producto. Cuando ocurre esto decimos que el producto es fitotóxico. La fitotoxicidad puede deberse a varios factores: la sensibilidad específica de la planta, una dosis excesiva de aplicación, aplicaciones demasiado frecuentes sin respetar el intervalo propuesto por el proveedor, una dilución inadecuada del producto, mezclas inadecuadas del producto y aplicaciones del producto cuando el desarrollo de la planta es inadecuado.

- ❖ **Incompatibilidad:** algunas sustancias no se deben mezclar entre sí, debido a que la mezcla entre ellas causa una distorsión en sus propiedades fisicoquímicas. Cuando se da esta situación hablamos que esas sustancias son incompatibles entre sí. Este efecto puede evaluarse previamente con un ensayo en el laboratorio, observando las características de la mezcla final.

Clasificación de los coadyuvantes

Los coadyuvantes pueden dividirse en tres clases diferentes: Por su función, por su estructura química y por su origen.

Cuando se clasifica los coadyuvantes debido a su función se puede dividir en: **activadores** (mejoran la actividad del principio activo, como, por ejemplo, mojantes, aceites, humectantes y adherentes) y **utilitarios** (alteran las características físicas y químicas del pulverizado mejorando la aplicación del producto, como, por ejemplo, secuestrantes, buffers y antiespumantes).

Existen diversas características que permiten la clasificación de los coadyuvantes tales como su estructura química, su origen o su mecanismo de acción. Las dos primeras resultan difíciles de utilizar ya que, compuestos de igual estructura u origen pueden tener distintos mecanismos de acción por lo que esta última resulta más conveniente.

Tipos de formulación

Una forma muy eficiente de clasificar a las formulaciones es según el estado físico en el cual las encontramos. Podemos encontrar formulaciones sólidas o secas, formulaciones líquidas y formulaciones gaseosas (muy poco usadas). En este trabajo de investigación nos centraremos en las formulaciones líquidas (Puricelli y March, 2014).

Como su nombre lo indica las formulaciones líquidas son aquellas donde el producto se presenta en estado líquido. Muchas de ellas se pueden utilizar directamente como vienen de fábrica o se deben diluir con un solvente adecuado según las indicaciones del fabricante (agua o solvente orgánico).

Según sus propiedades físicas podemos encontrar: soluciones, emulsiones y suspensiones.

Formadoras de soluciones

En este tipo de formulaciones al diluirla en el solvente adecuado, la solución resultante es de una sola fase, es decir que son sistemas homogéneos. Son químicamente estables y en reposo sus componentes no se separan. En general son límpidas y transparentes, incoloras o coloreadas.

Suelen contener el principio activo, solvente y/o humectante, reguladores de pH, biocidas, anticongelantes, entre otros.

Formadoras de emulsiones

Las emulsiones se forman cuando un líquido es dispersado como gotas, en un líquido inmiscible. Son sistemas heterogéneos compuestos por dos fases, donde cada líquido contiene su identidad original.

Los concentrados emulsionables se forman disolviendo el principio activo en un solvente orgánico y un emulsionante. Este tipo de formulados son de los más difundidos, debido a que existen muchos principios activos solubles en solventes orgánicos, generando una solución muy estable.

Formadoras de suspensiones

Las suspensiones son mezclas de partículas sólidas dispersadas en un líquido (fase continua). Es un sistema de dos fases (heterogéneo). Las partículas no se disuelven en el líquido que hace de fase continua. La mezcla debe ser agitada para mantener las partículas distribuidas uniformemente. La mayoría de las suspensiones tienen un color blanquecino (Puricelli y March, 2014).

Específicamente cuando se quiere diseñar un formulado para la producción de un micoinsecticida, se debe tener en cuenta la modificación de las siguientes propiedades:

- ❖ **Viscosidad:** su ajuste facilita la aplicación del micoinsecticida y permite que la cobertura sobre la superficie del insecto sea uniforme.
- ❖ **Adherencia:** permite mejorar la adhesión a la superficie del insecto, es decir, facilita el contacto entre el hongo y la superficie del insecto plaga aumentando la eficacia del tratamiento.
- ❖ **Estabilidad de la formulación:** permite mantener en el tiempo la integridad de la formulación. Evita la sedimentación o separación de ingredientes sólidos o insolubles en la formulación, en nuestro caso, las zoosporas.
- ❖ **Protección contra la desecación (o humectación):** ayuda a mantener la humedad de la formulación, siendo vital para mantener la viabilidad del hongo (Arora *et al.* 2017).
- ❖ **Penetración:** en algunos casos el componente del formulado permite una mejora en la penetración de la cutícula del insecto, aumentando la eficacia del micoinsecticida.

- ❖ **Dispersión y mezclabilidad:** mejora la dispersión de los ingredientes activos y de los microorganismos en la formulación líquida, asegurando que estén bien mezclados y distribuidos de manera uniforme. El componente puede facilitar la mezcla de la formulación.
- ❖ **Protección de la viabilidad:** al mantener un entorno estable y además evitar cambios perjudiciales en las condiciones durante el almacenamiento, la viabilidad del hongo perdura más tiempo.
- ❖ **Reducción de la deriva:** al aumentar la viscosidad, reduce la posibilidad de dispersión del producto a zonas que no deben ser tratadas durante la aplicación, garantizando que el micoinsecticida se adhiera mejor a las superficies de los insectos en lugar de dispersarse en el aire.

En este trabajo se utilizó una mezcla compuesta con glicerol, PVP y goma xántica como formulantes. Algunas de las propiedades que estos compuestos le otorgan al formulado coinciden y otras son diferentes, por ejemplo, el glicerol y el PVP permiten una mejora en la penetración, mientras que el glicerol y la goma xántica promueven la estabilización del formulado, el PVP y la goma xántica reducen la deriva, mejoran la dispersión y ambos actúan como protector de la viabilidad del hongo, mientras que, los tres componentes mejoran la adhesión y aumentan la viscosidad. Entre las propiedades específicas, el glicerol actúa como humectante y permite una buena mezclabilidad mientras que el PVP estabiliza la suspensión.

La concentración de PVP, glicerol y goma xántica en una formulación de micoinsecticida pueden variar según las necesidades específicas del producto y de la aplicación. Además, es importante mencionar que la inclusión de glicerol en una formulación de micoinsecticida debe ser cuidadosamente equilibrada para asegurar que no afecte negativamente la viabilidad y la eficacia de los hongos entomopatógenos. Por esta razón, la concentración de glicerol, así como su interacción con otros ingredientes de la formulación, deben considerarse en función de las necesidades específicas de control de plagas y las características del microorganismo utilizado en el micoinsecticida.

En todos los casos, es importante realizar pruebas de compatibilidad para garantizar que no existan interferencias que alteren la viabilidad y la eficacia de los hongos entomopatógenos en la formulación.

Inmovilización celular

Cuando se utiliza microorganismos para el control biológico, se debe tener en cuenta los factores ambientales (tales como la temperatura, los rayos UV, etc.), debido a que afectan la patogenicidad del microorganismo cuando actúan sobre su blanco. Por este motivo, en este trabajo de tesis se decidió evaluar el diseño de formulaciones que permiten la inmovilización para disminuir los efectos de las condiciones ambientales.

La inmovilización celular puede integrarse en formulaciones líquidas en suspensión. Este método consiste en la restricción de la movilidad del microorganismo, enzima u organelos, que están físicamente confinados a causa de un material específico. El mecanismo de la inmovilización está gobernado por tres componentes: la célula o material a encapsular, el soporte (que puede ser de diferentes materiales) y la solución que establece un microambiente (Manohar *et al.* 2001, Chen y Georgiou 2002).

Existen diversos métodos para la inmovilización celular, dentro de los cuales podemos mencionar: la inmovilización por adhesión superficial, la **inmovilización por aprisionamiento en gel** y la inmovilización por formación de agregados celulares. De las tres mencionadas nos centraremos en la inmovilización por aprisionamiento en gel, ya que es la utilizada en este trabajo.

Inmovilización por aprisionamiento en gel

El producto de interés a inmovilizar se encuentra contenido en el interior de un gel preparado en base de materiales orgánicos naturales o sintéticos. Existen diversas formas para inmovilizar el microorganismo o molécula de interés, entre

las cuales podemos mencionar: gelificación de polímeros, precipitación de polímeros, gelificación por intercambio de iones y policondensación.

El alginato de calcio se utiliza en la formulación de controladores biológicos, específicamente en la encapsulación de microorganismos (como bacterias u hongos), para el control biológico de plagas y enfermedades. Esta técnica se llama "encapsulación de agentes de control biológico" y puede ser una estrategia efectiva para proteger y liberar de manera controlada estos organismos en los cultivos. La técnica se basa en una gelificación por intercambio de iones, ya que durante la preparación de las perlas de alginato se intercambia el ion sodio por el calcio. La gelificación en perlas de alginato ha tenido éxito con ciertos productos químicos, bacterias y hongos (Bashan 1986, Connick 1982, Fravel *et al.* 1985, Walker y Connick 1983). Debido a estos éxitos, en el trabajo de investigación se decidió estudiar el alginato de calcio como una posibilidad de almacenar zoosporas de *L. chapmanii*.

Como se mencionó anteriormente, la elección de los coadyuvantes y/o formulantes a utilizar es muy importante debido a que pueden causar daños tanto en el ambiente como en organismos. A raíz de esto, en el presente capítulo se evaluará dos formulaciones para el almacenamiento de las zoosporas de *L. chapmanii*. La primera formulación se basó en una mezcla de goma xántica (GX), glicerol y polivinilpirrolidona (PVP), perteneciente a la categoría de suspensión. La segunda formulación se basó en el atrampamiento en gel por intercambio iónico (alginato de calcio). En ambos casos se determinó la toxicidad frente a las larvas de mosquitos en ausencia del principio activo. Además, durante la obtención de las perlas de alginato, se evaluaron diversas relaciones de concentración entre el alginato y el calcio, optando por la menor concentración que permitió una formación de perlas estables a lo largo del tiempo.

Materiales y métodos

Preparación del formulado de suspensión: mezcla de goma xántica, PVP y glicerol

Se utilizó un vaso precipitado de 150 mL al cual se agregó 100 mL de agua destilada con 0.1 g de glicerol. Se le colocó un buzo para la agitación magnética a una temperatura de 60°C. A esta solución se le agregó 0.4% de goma xántica (GX) agitando de forma constante. Cuando se disolvió la GX completamente, se le agregó 0.2% PVP y se mezcló hasta obtener una solución homogénea.

Formación de perlas de alginato: evaluación de la relación de concentración y estabilidad en el tiempo

Se prepararon las soluciones de alginato de sodio a 60°C en 100 mL de solución fisiológica (NaCl al 0.8%). A esta solución se le agregó 100 mL de agua destilada llevando a un volumen final de 200 mL (Este volumen de agua será posteriormente reemplazado por 100 ml de una suspensión de los microorganismos que quieran ser inmovilizados). La mezcla fue vertida por goteo sobre una solución de CaCl₂ para que, por reemplazo del sodio por el calcio, se formen las perlas.

El goteo se realizó mediante una bomba peristáltica MasterFlex US easy-load model 07516-10 a través de una manquera Masterflex 1114.

A fin de buscar una relación de concentración óptima entre la solución de alginato y la solución de calcio se utilizaron las concentraciones mostradas en la **Tabla 3.1.**

Tabla 3.1: Relación de concentración de calcio alginato para la formación de perlas de alginato

<i>Alginato de sodio (%)</i>	<i>CaCl₂ (%)</i>
3	2
3	1
2	2
2	1
2	0.5
2	0.25
1.5	0.5
1.5	0.25
1	1
1	0.5

Se determinó la capacidad de formación de perlas mediante la observación a ojos desnudos para las diferentes combinaciones de alginato y calcio.

Para evaluar su estabilidad, una vez que fueron obtenidas las perlas de alginato se tomaron 5 mL de las mismas y se colocaron en 30 mL de agua destilada. Se realizó un control negativo tomando 5 mL de las perlas de alginato con 30 mL de la solución de CaCl₂ de la misma concentración que se utilizó en su formación de las perlas.

Las muestras se colocaron en un agitador a 80 rpm durante 10 días. Se sacaron fotos periódicamente y se registró la cantidad de perlas de alginato, para comparar si hubo o no una disminución en el número de perlas. La disminución en el número de perlas se registra como degradación de las perlas ocasionada en la falta de estabilidad de las mismas.

Toxicidad de los formulados sobre las larvas de mosquitos sin principio activo

La primera evaluación que se realizó fue estimar la toxicidad sobre las larvas de mosquitos de la mezcla GX-PVP-Glicerol. Para ello, se mezclaron 100 mL de la formulación con 100 mL de agua destilada. A continuación, en placas de cultivo

celular de 24 celdas (wells), se agregaron 2 mL de la solución en cada pocillo. A cada pocillo se agregó una larva de estadio L2/L3. Se realizó un control negativo el cual consistió en colocar 2 mL de agua destilada en cada pocillo con una larva de mosquito del mismo estadio. El sistema se mantuvo a temperatura ambiente durante 7 días. Se utilizaron 96 larvas de mosquitos tanto para el control como para el para el bioensayo.

La segunda evaluación consistió en determinar si el alginato de calcio era tóxico para las larvas de mosquitos. Se utilizó una concentración del 3% de alginato de sodio con 2% de CaCl₂ para la obtención de las perlas de alginato. A continuación, se colocaron 1000 mL de agua destilada con las perlas de alginato y 50 larvas en estadio L2/L3. Se realizó un control donde solamente se colocaron las larvas L2/L3 en agua destilada. El tiempo de observación fue de 7 días a temperatura ambiente.

Resultados y discusión

Toxicidad entre el formulado y las larvas de mosquito sin principio activo

La elaboración del formulado de suspensión utilizada en esta investigación fue difícil, debido a que la solución resultante fue muy espesa. En el control negativo, las 96 larvas utilizadas no murieron en el plazo de los 7 días que se evaluó el ensayo.

Cuando se analizó el formulado se observó que las larvas de mosquitos murieron en menos de 8 horas. Se sospecha que la viscosidad de la solución es el causante de este resultado. Al ser muy espesa la solución, pudo provocar que las vías respiratorias de las larvas de mosquito se taparan causando una asfixia y, por lo tanto, ocasionaran la muerte. Por consiguiente, se suspendió el tratamiento con las zoosporas.

Es importante identificar y comprender la selección de los componentes de la formulación. Hay muchas situaciones en las que las formulaciones pueden ser

perjudiciales para el cultivo o el ambiente alrededor, por ende, se debe comprobar que un producto no dañe el cultivo o el ambiente donde se aplica (Leggett *et al.* 2011). Por otro lado, se debe considerar el marco regulatorio, ya que dependen del microorganismo y del tipo de sustancia a utilizar. Diferentes microorganismos y diferentes coadyuvantes si o si tienen diferentes requisitos regulatorios. Muchas veces un mismo formulado es compatible para un microorganismo, sin embargo, cuando el microorganismo es diferente, el mismo formulado puede no ser compatible. Las consideraciones de costos, la compatibilidad de las formulaciones y las consultas con los organismos reguladores deben ocurrir al principio de la planificación experimental. En algunas ocasiones el agregado de nutrientes a una formulación ofrece un beneficio, sin embargo, se requiere cuidado porque estos nutrientes también pueden estimular el patógeno y/o provocar daños en el ambiente (Cook y Baker, 1983).

La goma xántica, el PVP y el glicerol, son tres componentes muy utilizados a la hora de realizar formulaciones líquidas, es decir, que son compuestos seguros para el ambiente. Como, por ejemplo, el trabajo publicado por Arriel-Elias *et al.* 2018, que utiliza glicerol y PVP dentro de sus formulaciones. Estas formulaciones son estabilizadas con sustancias que aumentan la viscosidad como, por ejemplo, la goma xántica.

Si bien los tres componentes utilizados en el ensayo son amigables con el ambiente, ya que son muy utilizados en las formulaciones con otros objetivos, la toxicidad sobre larvas de mosquitos fue evidente, debido a que a esas concentraciones propuestas la solución resultante fue tan viscosa que fue capaz de tapar las vías respiratorias de las larvas provocando asfixia. Hasta el momento este tipo de formulaciones no se aplican directamente en aguas, con lo cual no sabemos si solo afecta a las larvas de mosquitos o existe la posibilidad de que afecte a otro organismo “no blanco” en el ambiente. Este posible hecho debe ser analizado con más profundidad.

Durante la segunda evaluación se observó que, durante los 7 días, las larvas lograron sobrevivir tanto para el sistema con las perlas de alginato como para el

sistema sin alginato. Por lo tanto, se concluye que las perlas de alginato resultaron inocuas para las larvas de mosquitos, dentro del tiempo estipulado en los ensayos.

El alginato es el material polimérico más común para la encapsulación de microorganismos, con diversos usos industriales (Walker y Connick, 1983; Chen y Huang, 1988; Smidsrod y Skjak-Braek, 1990; Pablo y col., 1993; Fenice *et al.* 2000). Esto es debido a que la encapsulación proporciona un microambiente diferente al macroambiente al que se expone al microorganismo, mejorando su supervivencia.

Por lo general, el proceso de encapsulación de alginato es suave y adecuado para diversos microorganismos. Además, prolongan la vida útil en el almacenamiento del microinsecticida y brindan protección contra la abrasión mecánica durante el transporte y la aplicación (Cassidy y col, 1996). Debido a estas características, se decidió utilizar al alginato de calcio como un posible formulante para las zoosporas de *L. chapmanii*.

Formación de perlas de alginato: relación de concentración y estabilidad en el tiempo

Diversos estudios describen la utilización del método de la encapsulación con alginato utilizando hongos entomopatógenos (Axtell y Guzman, 1987; Rueda, 1990; Pereyra y Roberts, 1991; Shan *et al.* 1998), debido a esto se sugirió evaluar otras concentraciones para disminuir costos de producción en las perlas de alginato.

En la **Tabla 3.2** se observan los resultados de la formación de las perlas de alginato al realizar las diferentes combinaciones de alginato de sodio con CaCl_2 .

Tabla 3.2: Formación y estabilidad de perlas de alginato a diferentes relaciones de concentración de alginato-Ca. El * indica que se formaron las perlas de alginato de forma más irregular.

<i>Conc. de Alginato (%)</i>	<i>Conc. de CaCl_2 (%)</i>	<i>Formación de perlas</i>	<i>Estabilidad</i>
3	2	+	+
3	1	+	+
2	2	+	+
2	1	+	+
2	0.5	+	+
2	0.25	+	+
1.5	0.5	+*	+
1.5	0.25	+*	+
1	1	-	Ind
1	0.5	-	Ind

El signo positivo nos indica que las perlas de alginato se formaron adecuadamente (columna 3 de la **Tabla 3.2**) y que fueron estables a lo largo del tiempo (columna 4 de la **Tabla 3.2**), significando que no se registró ninguna pérdida en la cantidad de perlas. El signo negativo significa que no se formaron las perlas, se formó un gel amorfo, por lo tanto, no fue posible evaluar su estabilidad.

Las concentraciones 1.5% de alginato formaron perlas, sin embargo, la forma fue irregular entre ellas, algunas de mayor tamaño que otras. A pesar de esta irregularidad, la estabilidad en el tiempo fue igual que las perlas obtenidas en otros casos.

En la **Figura 3.1** se muestran la forma adecuada de las perlas de alginato de calcio.



Figura 3.1: Perlas de alginato formadas durante el bioensayo de encapsulación

Conclusión

Si bien los componentes del formulado de suspensión son compuestos aprobados para ser utilizados en formulados liberados al medio ambiente, no se consideró continuar con su estudio debido a que la solución resultante causó mortalidad de larvas de mosquitos de *Ae. aegypti* en ausencia del principio activo. Esta solución fue lo suficientemente espesa para tapan las vías respiratorias de las larvas causando asfixia. Por otro lado, la dificultad que llevó la preparación de la solución es otro factor a tener en cuenta cuando se quiere realizar un formulado. Se podría plantear en un futuro evaluar otro tipo de concentraciones en la cual la solución resultante sea menos espesa, permitiendo su tolerancia con las larvas de mosquito.

Antes de realizar los ensayos de la formación de perlas de alginato se evaluó la compatibilidad del alginato con las larvas de mosquito. Durante los 7 días que duró el ensayo, las larvas de mosquitos sobrevivieron en presencia de las perlas de alginato, por ende, la solución de alginato se considera compatible con las larvas, por lo que se prosiguió con la investigación.

Lo segundo que se analizó fue la cinética de degradación de las perlas de alginato, para diferentes concentraciones de alginato y diferentes concentraciones de Ca. Las perlas de alginato se formaron perfectamente para casi todas las

combinaciones probadas excepto cuando la concentración de alginato fue 1%. Con el tiempo se observó que no se degradaron las perlas independientemente de la combinación de concentraciones de alginato de sodio-CaCl₂ utilizada. Con estos resultados se llegó a la conclusión que para el análisis de mortalidad se utilizara la combinación menos concentrada que permite formar adecuadamente las perlas (alginato de sodio al 2% con 0.5% de CaCl₂). Si esta concentración es efectiva, nos permitirá mantener las zoosporas en un tiempo adecuado con un menor costo al utilizar menos concentración de reactivos.

Capítulo IV: Mortalidad sobre las larvas de mosquito

Introducción

La Organización Panamericana de la Salud (PAHO) denomina Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) a un grupo diversos de 20 afecciones que se detectan principalmente en zonas tropicales. Si bien se las suele relacionar con zonas rurales o de bajos recursos, existen registros de casos de zonas urbanas afectadas por algunas de estas enfermedades. Dentro de estas enfermedades endémicas podemos mencionar: Lepra, Enfermedad de Chagas, **dengue**, **Chikunguya**, Rabia, Sarna, entre otras. Este tipo de enfermedades están causadas por diferentes patógenos (virus, bacterias, parásitos, hongos y toxinas).

El dengue, el chikungunya y otras enfermedades generadas por un virus, son transmitidas por el vector *Ae. aegypti*. Es un mosquito que habita en la zona peri-domiciliaria con clima subtropical. Las características de este animal esta descripta en la sección de Antecedentes. Entre los años 2021 y 2022 (OPS 2021-2022) el número de casos de las enfermedades más comunes transmitidas por el mosquito aumentaron considerablemente dentro de la región de las Américas, aumentando también los casos de mortalidad y por consiguiente se reforzaron las acciones tendientes al control del vector. En la actualidad, se ha dado mayor importancia a la utilización de control biológico para la regulación del número de la población del vector. Numerosos estudios describen la aplicación de microorganismos, ya sean bacterias, virus, hongos, nematodos y protozoos (Jenkins, 1964; Robert y Strand, 1977; Roberts y Castillo, 1980; Roberts *et al.* 1983; Weiser, 1991; Márquez *et al.* 2005; Becnel y White, 2007; Federici *et al.* 2007; Kerwin, 2007; Tseng, 2007; Platzer, 2007; Mogi, 2007; Achinelly y Miciel, 2010; Muttis *et al.* 2012; Muttis *et al.* 2013; Falvo *et al.* 2019; Rueda Páramo *et al.* 2019), para atenuar el efecto de varias plagas. El control biológico posee diversas ventajas frente a otras formas regulatorias, sin embargo, introducir un microorganismo al ambiente involucra numerosos estudios para confirmar que, al menos, posea una efectividad adecuada

contra el organismo “blanco”, no perjudique al ambiente y a organismos “no blanco”.

En este trabajo de investigación se utilizó a *Leptolegnia chapmanii* como hongo entomopatígeno de larvas de mosquitos de *Ae. aegypti*. En capítulos anteriores, se evaluó el efecto de diferentes condiciones y medios de cultivo sobre el crecimiento y producción de *L. chapmanii*, se optimizaron las condiciones del bioproceso para su escalado a biorreactores de escala de laboratorio y se evaluaron dos posibles formulados para verificar el efecto tóxico sobre las larvas de mosquitos. Estas variables, podrían modificar o alterar la virulencia (grado de patogenicidad) contra las larvas de mosquito, provocando que el microorganismo en cuestión sea más o menos eficiente. Por consiguiente, el presente capítulo tiene diversos objetivos: Evaluar la virulencia de *L. chapmanii* cultivado en diferentes medios de cultivo y condiciones de agitación; evaluar la virulencia de *L. chapmanii* cultivado en biorreactores; evaluar la virulencia de *L. chapmanii* a lo largo del tiempo utilizando una formulación y por último, evaluar la viabilidad y la virulencia de *L. chapmanii* con la intervención de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} durante la formación de zoosporas en larvas de estadio L2/L3.

Materiales y Métodos

Estandarización de la relación biomasa-agua para la producción de zoosporas

El objetivo de este ensayo preliminar consistió en evaluar una relación biomasa/volumen de agua, para poder determinar un tiempo óptimo, es decir un tiempo mínimo que logra un porcentaje de mortalidad elevado. La obtención de zoosporas se describe en el Anexo. Lo primero que se realizó fue la obtención de biomasa, para eso se prepararon 3 frascos Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo PYG. Se esterilizaron en autoclave a 1 atmósfera de sobrepresión (121°C). Bajo flujo laminar, se inocularon los frascos con un corte de medio PYG con crecimiento de *L. chapmanii* realizado por un sacabocados de 0.5 cm². A

continuación, fueron colocados en un shaker a 150 rpm y se dejaron a diferentes tiempos (3, 5 y 7 días).

Para la obtención de las zoosporas, se modificó la técnica utilizada por Pelliza en su tesis doctoral 2007. Los frascos que contuvieron la biomasa fueron filtrados con tela de voile bajo flujo laminar. A continuación, se procedió a cortar la biomasa en fragmentos que pesaron entre 0.20 y 0.27 g. Cada fragmento se colocó en diferentes volúmenes de agua destilada: 45, 100, 250, 500 y 1000 mL. El tratamiento para las diferentes diluciones fueron las mismas: se tomaron 2 ml para llenar los pocillos de una placa de 24 multiwells. A cada pocillo se le agregaron 2 larva de mosquitos L2/L3 y se realizó un control negativo utilizando agua destilada en vez de la suspensión de zoosporas. Se registró periódicamente si se produjo muerte de las larvas, y se corroboró que la muerte se haya producido por las zoosporas mediante observación microscópica. El tiempo que las larvas estuvieron en contacto con la muestra se lo denominó tiempo de contacto.

Se evaluaron tres tiempos de suspensión (tiempo en el cual la biomasa estuvo sumergida en agua destilada). Los tiempos analizados fueron a las 24 horas, a las 48 hora y a las 72 horas de suspensión.

Efecto del medio de cultivo y la agitación sobre la virulencia de las zoosporas de *L. chapmanii*

Se evaluó como afectó el medio de cultivo y la condición de agitación en la virulencia de las zoosporas de *L. chapmanii*. Los medios de cultivo fueron PYG, Semillas de girasol y Harina de soja (descritos en el Anexo), en las condiciones de agitación: con agitación, con agitación y baffles y sin agitación.

Para la preparación de la biomasa se utilizó un Erlenmeyer o Erlenmeyer con baffles (según la condición de agitación) de 500 mL con 100 mL del medio de cultivo. Se lo esterilizó por autoclave a 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos. Posteriormente, estos medios se inocularon con un corte realizado por un sacabocados de 0.5 cm² de área, que contuvo crecimiento de *L. chapmanii* en medio

PYG sólido. Se los incubó en forma estática o en shaker a 150 rpm por 5 días a temperatura ambiente.

A continuación, se filtró con tela de Voile y se separó la biomasa. El pellet se colocó en un Erlenmeyer de 1000 mL con 500 mL de agua destilada no estéril. Se lo dejó durante tres días para la producción de zoosporas. Se determinó la concentración de zoospora con el uso de la cámara de Neubauer.

De la suspensión de zoosporas, se tomaron 2 mL con el recaudo de una buena agitación entre la toma de muestras, y se los colocaron en un well de una placa con 24 pocillos. A cada pocillo se le agregó una larva de estadio L2/L3. Se lo revisó cada 8 horas registrando la mortalidad a lo largo del tiempo. Las larvas muertas se observaron bajo microscopio óptico para corroborar que la muerte fue por *L. chapmanii*.

Efecto de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} en la producción y virulencia de las zoosporas de *L. chapmanii*

Se inoculó 100 mL de medio PYG con un corte de medio PYG sólido con crecimiento de *L. chapmanii*. El corte se realizó con un sacabocado estéril de área de 0.5 cm². Se llevó a shaker durante 5 días a temperatura ambiente con 150 rpm.

Bajo flujo laminar, se utilizó un embudo cubierto por una tela de Voile estéril para filtrar el medio PYG y obtener la biomasa. De la biomasa obtenida 0.20 g de la misma se colocaron en 500 ml de las siguientes soluciones estériles:

- ❖ Solución de CaCl₂ 1mM
- ❖ Solución de CaCl₂ 10 mM
- ❖ Solución de MgCl₂ 1 mM
- ❖ Solución de MgCl₂ 10 mM

❖ Agua destilada con zoosporas (control positivo)

En una placa de 24 wells, se utilizaron 20 de esos pocillos para agregar 2 ml de cada solución con una larva de *Ae. aegypti* de estadio L2/L3. Las muestras se tomaron a las 24, 48 y 72 hs. A continuación, se controló si se produjo la muerte de las larvas.

Se determinó la concentración de zoosporas para las diferentes soluciones y para el control positivo. Las dos soluciones con calcio dieron una concentración de 1.7×10^3 zoosporas/mL, las dos soluciones de magnesio dieron una concentración de 1.4×10^3 zoosporas/mL y el control positivo dio una concentración de 2×10^3 zoosporas/mL.

Como controles negativos se realizaron las siguientes combinaciones:

- ❖ Agua destilada con larvas sin zoosporas
- ❖ Solución de CaCl_2 al 1mM con larvas sin zoosporas
- ❖ Solución de CaCl_2 10 mM con larvas sin zoosporas
- ❖ Solución de MgCl_2 1 mM con larvas sin zoosporas
- ❖ Solución de MgCl_2 10 mM con larvas sin zoosporas

Virulencia de las zoosporas de L. chapmanii producidas en biorreactores

En el Capítulo II, se estudió el crecimiento de *L. chapmanii* se estableció que biorreactor y en que, condiciones fue mejor para obtener la biomasa en mayor producción. En esta sección se evaluó la virulencia de las zoosporas después de haber sido crecido en los dos biorreactores con medio Semilla de Girasol. Para la

producción de biomasa se utilizó un inóculo con 2.9×10^4 zoosporas/mL para el tanque agitado y en el caso de la columna de burbujeo se utilizó un inóculo de 2.3×10^4 zoosporas/mL.

La biomasa obtenida por el biorreactor fue filtrada bajo flujo laminar con un tamiz y tela de Voile. A continuación, se le agregó un volumen de agua para la producción de zoosporas. El volumen de agua dependió del biorreactor: para el tanque agitado se agregaron 1.300 L y en el caso de columna de burbujeo se utilizaron 3.000 L. Se dejó en agua durante 3 días. Se mezcló para homogenizar y se tomaron muestras de 2 mL que se colocaron en un pocillo de unas placas de 24 wells. A cada pocillo se le agregó una larva de estadio L2/L3 y se controló periódicamente.

Efecto del formulado en alginato de calcio sobre la viabilidad y virulencia de las zoosporas de *L. chapmanii*

De los ensayos de alginato, evaluados en el Capítulo III, se eligió la menor concentración de alginato-calcio con las que se observó una adecuada formación de perlas y se evaluó una forma de almacenamiento de las zoosporas de *L. chapmanii*, verificando como fue su mortalidad a lo largo del tiempo.

Bajo flujo laminar, se mezclaron 50 mL de una solución de alginato estéril y se lo mezcló con 50 mL de una suspensión de zoosporas de concentración de 1.2×10^3 zoosporas/mL. En un vaso de precipitado de 500 mL estéril se colocaron 100 mL de una concentración de CaCl_2 0.5% estéril junto con un agitador magnético. A través de una bomba peristáltica se goteó la solución de alginato con las zoosporas a la solución de calcio que estuvo en constante agitación. La manguera que se utilizó para el goteo también fue esterilizada. Los detalles de este ensayo fueron descritos en el Capítulo III.

Cuando finalizó la formación de las perlas de alginato, se fraccionó el volumen tomado 20 mL de la formulación y se colocaron en tubos tipo falcón de 50 mL estériles. Se los almacenó en la heladera a 4°C hasta su uso.

Se realizó un tiempo cero, donde se colocó los 20 mL de la solución de alginato en un envase de plástico con 100 mL de agua destilada y 20 larvas de mosquitos de estadio L2/L3, por duplicado. Se realizó un control negativo donde se colocaron 120 mL de agua destilada con 20 larvas L2/L2 y un control positivo de la suspensión de zoosporas sin encapsular y 20 larvas de mosquitos. Se controló durante 7 días.

La segunda muestra se evaluó a los 10 días guardadas en heladera, la tercera muestra se analizó a los 20 días y la cuarta muestra a los 30 días.

Resultados y discusión

Estandarización de la relación biomasa-agua para la producción de zoosporas

En las **Tablas 4.1, 4.2 y 4.3** se muestra la cantidad de agua destilada utilizada en la producción de zoosporas, utilizando una biomasa entre 0.20 y 0.27 g.

Tabla 4.1: Relaciones masa volumen para 3 días de crecimiento de *L. chapmanii* en medio PYG. La unidad de masa está en gramos, el volumen en mL y la concentración y su promedio está en g/L

<i>Vol</i>	<i>Masa 1</i>	<i>Masa 2</i>	<i>Masa 1/Vol</i>	<i>Masa 2 /Vol</i>	<i>Prom</i>	<i>Desv</i>
45	0.195	0.190	4.33	4.22	4.28	0.08
100	0.213	0.222	2.13	2.22	2.18	0.06
250	0.205	0.193	0.82	0.77	0.80	0.03
500	0.260	0.213	0.52	0.43	0.47	0.07
1000	0.270	0.234	0.27	0.23	0.25	0.03

Tabla 4.2: Diferentes relaciones masa volumen para 5 días de crecimiento de *L. chapmanii* en medio PYG. La unidad de masa está en gramos, el volumen en mL y la concentración y su promedio está en g/L

<i>Vol</i>	<i>Masa 1</i>	<i>Masa 2</i>	<i>Masa 1/Vol</i>	<i>Masa 2/Vol</i>	<i>Prom</i>	<i>Desv</i>
45	0.199	0.197	4.42	4.38	4.40	0.03
100	0.211	0.208	2.11	2.08	2.10	0.02
250	0.260	0.24	1.04	0.96	1.00	0.06
500	0.192	0.179	0.38	0.36	0.37	0.02
1000	0.223	0.24	0.22	0.24	0.23	0.01

Tabla 4.3: Diferentes relaciones masa volumen para 7 días de crecimiento de *L. chapmanii* en medio PYG. La unidad de masa está en gramos, el volumen en mL y la concentración y su promedio está en g/L

<i>Vol</i>	<i>Masa 1</i>	<i>Masa 2</i>	<i>Masa 1/Vol</i>	<i>Masa 2/Vol</i>	<i>Prom</i>	<i>Desv</i>
45	0.193	0.183	4.29	4.07	4.2	0.2
100	0.204	0.210	2.04	2.10	2.07	0.04
250	0.251	0.251	1.00	1.00	1.00	0
500	0.181	0.170	0.36	0.34	0.35	0.02
1000	0.242	0.220	0.24	0.22	0.23	0.02

Los resultados obtenidos se muestran en las **Figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, y 4.6**, los cuales se analizaron los casos que obtuvieron un porcentaje de mortalidad por encima del 60%.

Un día de suspensión

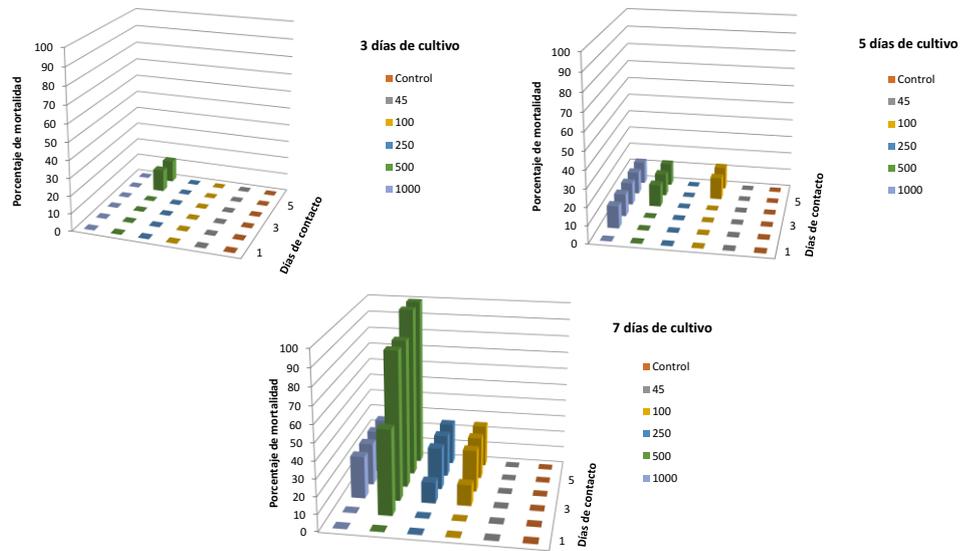


Figura 4.1: Primer día de suspensión para los días 3, 5 y 7 de incubación, el eje x representa los días de contacto, el eje y las diluciones y el eje z el porcentaje de mortalidad

Quando se analizó la muestra a las 24 horas de suspensión para los días 3, 5 y 7 de incubación, se encontró que hubo una alta mortalidad (87.5%) para la dilución de 500 mL a los 7 días; en cambio, para el día 3 y para el día 5 no presentaron un porcentaje de mortalidad relevante.

Dos días de suspensión

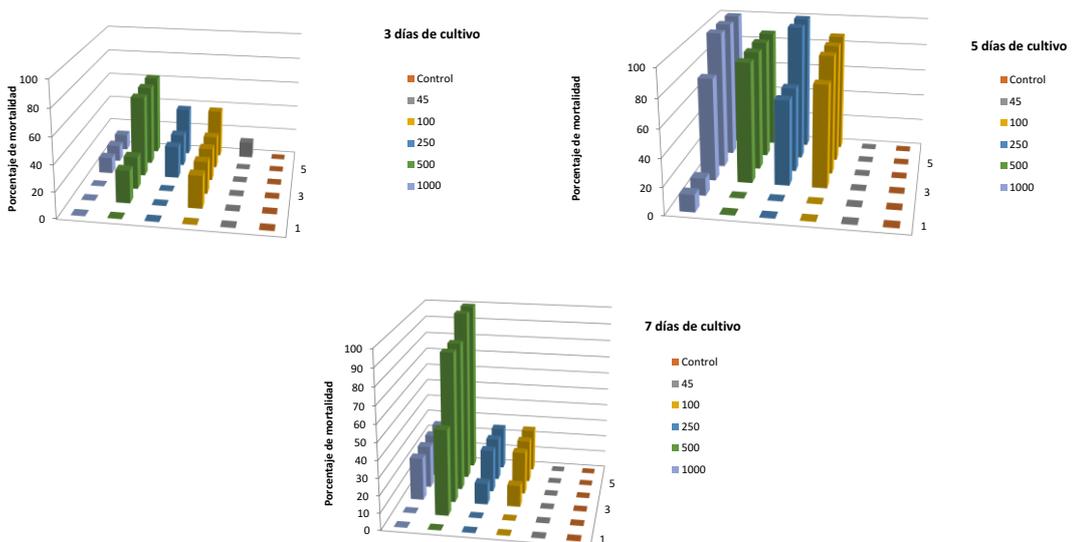


Figura 4.2: Segundo día de suspensión para los días 3, 5 y 7 de incubación, el eje x representa los días de contacto, el eje y las diluciones y el eje z el porcentaje de mortalidad

En este tiempo se encontró que la dilución de 500 mL presentó una mortalidad del 62.5% para los 3 días incubación. Cuando se analizó la muestra con 5 días de incubación, se observó que las diluciones de 100, 250, 500 y 1000 mL presentaron una mortalidad del 87.5%, 100%, 87.5% y 100% respectivamente. Para el caso de 7 días de incubación el resultado obtenido fue el mismo que a las 24 hs.

Tres días de suspensión

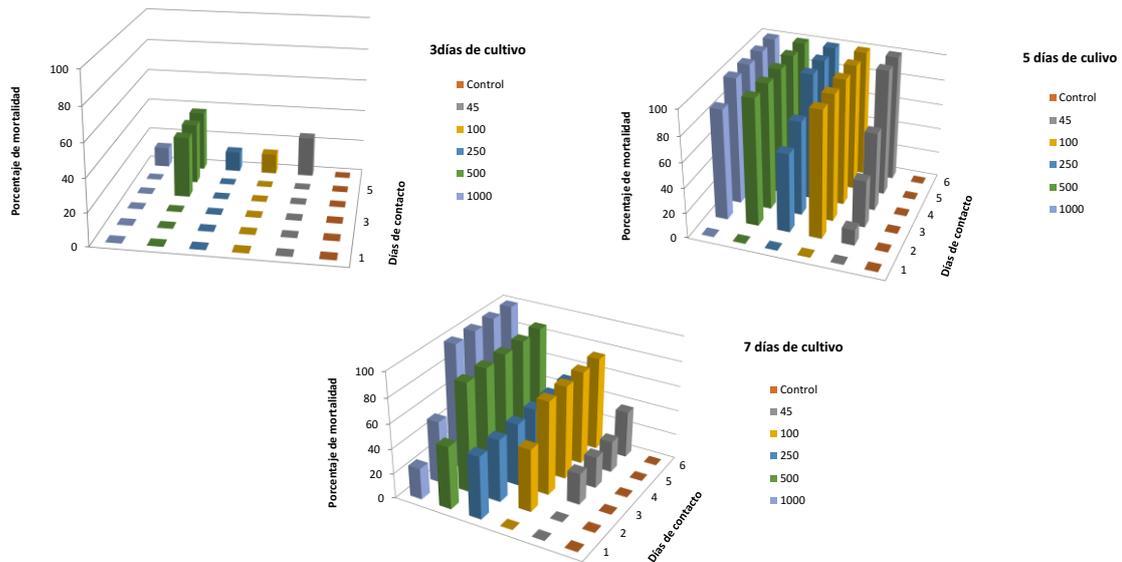


Figura 4.3: Tercer día de suspensión para los días 3,5 y 7 de incubación, el eje x representa los días de contacto, el eje y las diluciones y el eje z el porcentaje de mortalidad

En el caso de los 3 días de incubación, se halló que la mortalidad fue menor en comparación al tiempo anterior. Cuando se analizó los 5 días se encontró que hubo un alto porcentaje de mortalidad en las diluciones de 100, 250, 500 y 1000 mL siendo una mortalidad del 100% para todos los casos. A los 7 días, hubo porcentajes interesantes en las diluciones de 100, 500 y 1000 mL (75, 87.5 y 100% respectivamente).

Cuatro días de suspensión

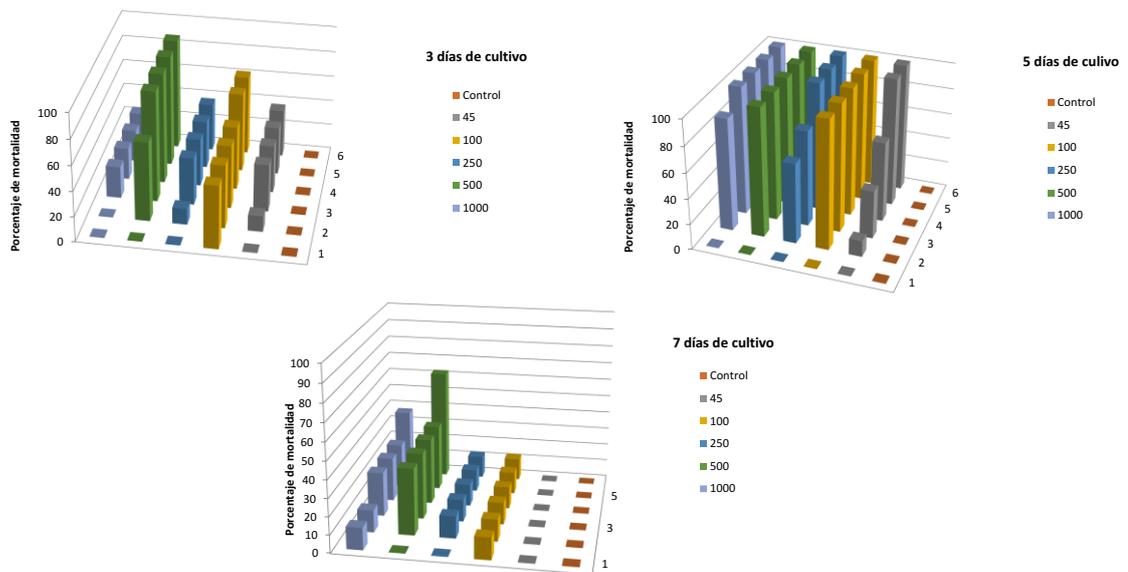


Figura 4.4: Cuarto día de suspensión para los días 3, 5 y 7 de incubación, el eje x representa los días de contacto, el eje y las diluciones y el eje z el porcentaje de mortalidad

Para los 3 días de incubación se encontró que la dilución con una mayor mortalidad (87.5%) fue la de 500 mL. En el caso de 5 días los resultados fueron iguales al tiempo anterior. Para los 7 días, el porcentaje de mortalidad disminuyó comparado al tiempo anterior.

Cinco días de suspensión

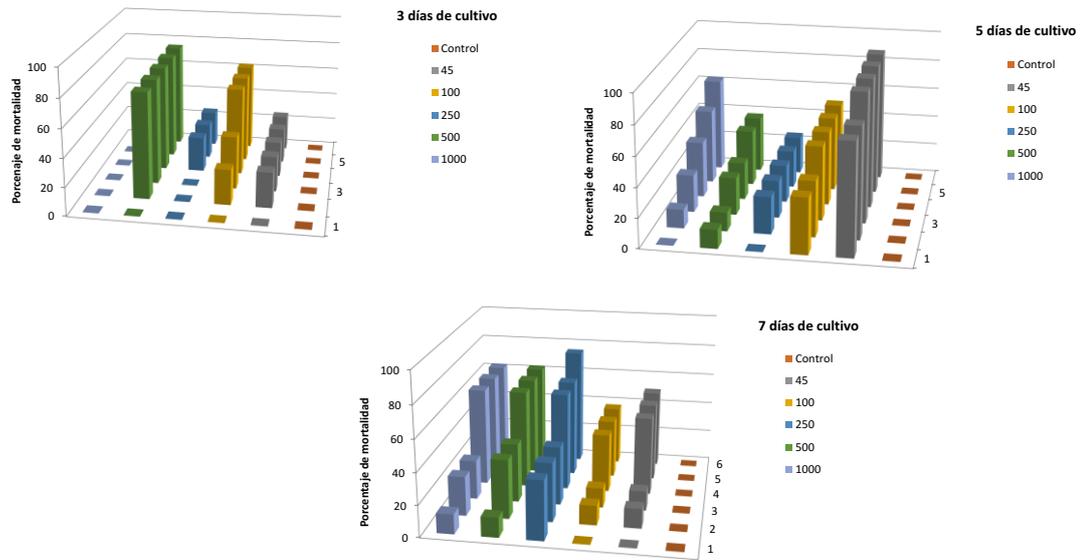


Figura 4.5: Quinto día de suspensión para los días 3, 5 y 7 de incubación, el eje x representa los días de contacto, el eje y las diluciones y el eje z el porcentaje de mortalidad

En el caso de los 3 días de incubación, la dilución de 500 mL fue la que presentó un porcentaje de mortalidad mayor en comparación a las otras diluciones. A los 5 días, se observó un aumento en el porcentaje de la mortalidad para las muestras de menor volumen. A los 7 días, la mortalidad fue entre el 60 y 80% para los volúmenes grandes con un tiempo de contacto de cuatro días, los volúmenes más pequeños presentaron una mortalidad entre el 40 y 60% al cuarto día de contacto.

Seis días de suspensión

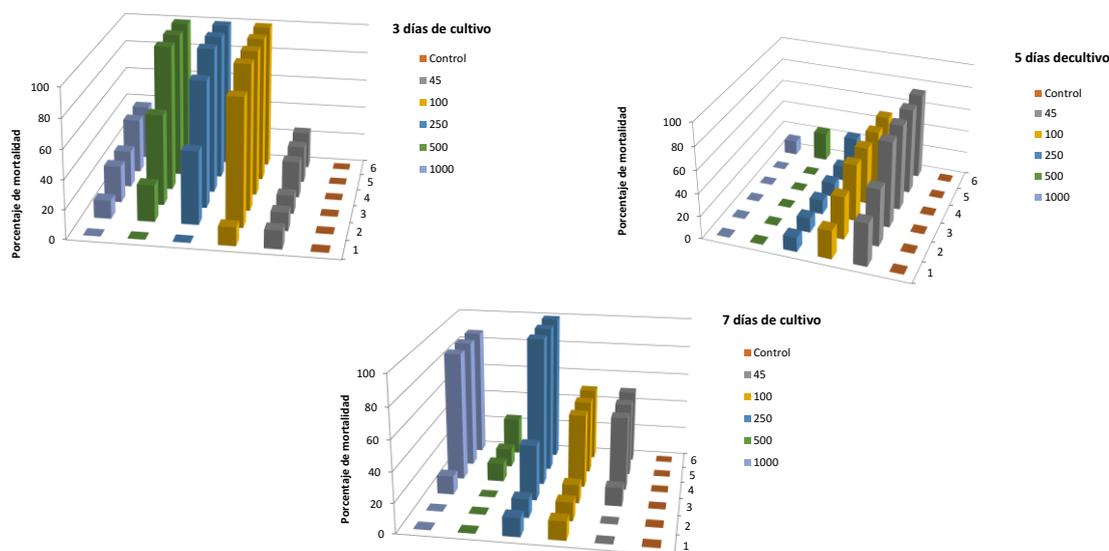


Figura 4.6: Sexto día de suspensión para los días 3, 5 y 7 de incubación, el eje x representa los días de contacto, el eje y las diluciones y el eje z el porcentaje de mortalidad

Para los 3 días de incubación se observó nuevamente un incremento en el porcentaje de mortalidad, para las diluciones de 100, 250 y 500 mL. Para los 5 días se obtuvo un 75% de mortalidad para la muestra de 45 mL. La muestra con 7 días mejoró la mortalidad en las diluciones de 250 y 1000mL.

En resumen, durante este ensayo se analizaron muchas variables, no solo el tiempo de incubación y volumen de agua donde se sumergió la biomasa, sino que también el tiempo de contacto entre la larva y la muestra y el tiempo de suspensión. En la mayoría de los casos estudiados, se encontró que los mejores porcentajes de mortalidad se dieron para diluciones altas con un tiempo de contacto de tres días para un tiempo de suspensión de tres días; mientras que las muestras de pequeños volúmenes como la de 45 mL, no lograron una buena mortalidad en esos tiempos si es que directamente no hubo, en un tiempo corto, sin embargo, para tiempos de suspensión y de contacto más prolongados si se evidenció mortalidad.

Efecto del medio de cultivo y la agitación sobre la virulencia de las zoosporas de *L. chapmanii*

En las **Figuras 4.7, 4.8 y 4.9** se muestran el porcentaje de mortalidad para cada medio de cultivo y para cada condición de agitación.

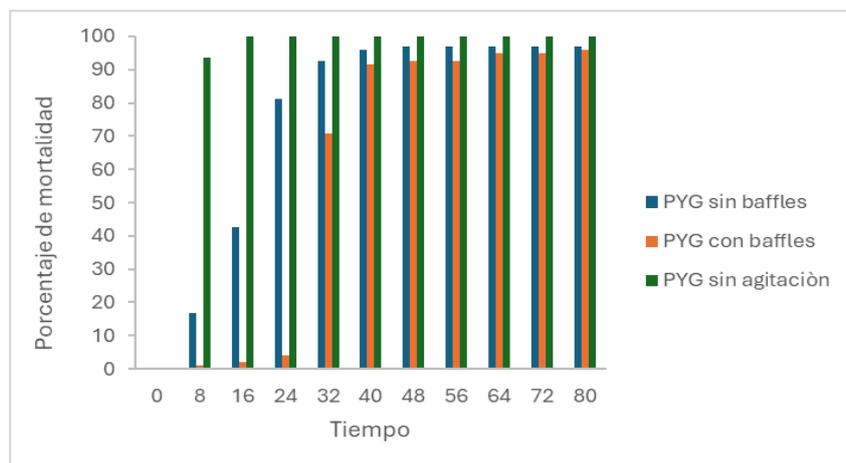


Figura 4.7: Porcentaje de mortalidad de las larvas cuando *L. chapmanii* fue crecido en medio PYG a diferentes condiciones de agitación, el tiempo está en horas

En este medio de cultivo, el sistema que tuvo un mayor porcentaje de mortalidad (93.8%) en un tiempo corto fue el sistema sin agitación. Mientras que los dos sistemas con agitación presentaron una mortalidad elevada recién a las 32 horas.

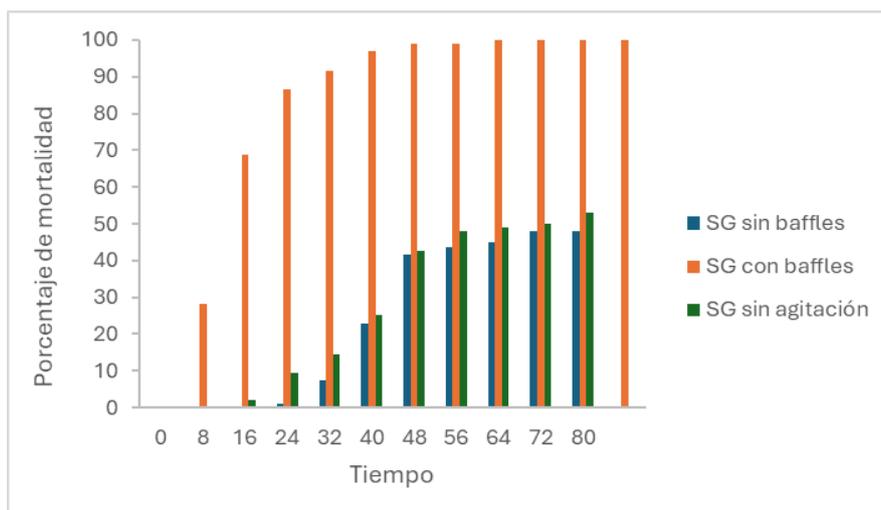


Figura 4.8: Porcentaje de mortalidad de las larvas cuando *L. chapmanii* fue crecido en medio SG a diferentes condiciones de agitación, el tiempo está en horas

En el medio de semilla de girasol el sistema con una mejor mortalidad la presenta el sistema con baffles, en tan solo 24 horas llega al 86.5% de muerte, mientras que el sistema sin baffles y sin agitación su mayor mortalidad la alcanzaron a las 48 horas, siendo de 41.67 y 42.7% respectivamente.

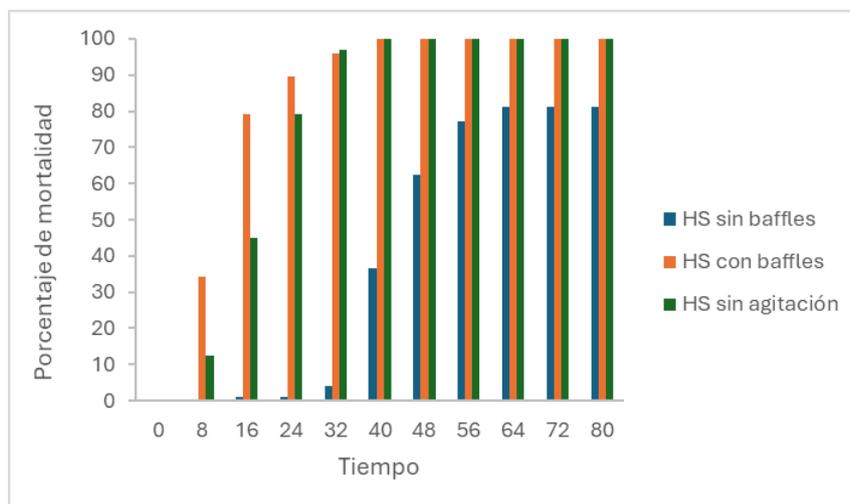


Figura 4.9: Porcentaje de mortalidad de las larvas cuando *L. chapmanii* fue crecido en medio HS a diferentes condiciones de agitación, el tiempo está en horas

En este caso, se muestra que el sistema con baffles fue el mejor con respecto a la mortalidad, debido a que se obtuvo un porcentaje elevado (79.2%) en tan solo 16 horas. El sistema sin agitación logró una buena mortalidad (79%) pero a las 24 horas. El sistema sin baffles logró un 77.1% de muerte a las 56 horas.

A continuación, se seleccionó el sistema más adecuado para cada uno de los tres medios de cultivo y se elaboró un gráfico (ver **Figura 4.10**). Para el medio PYG, se optó por no utilizar agitación, ya que este método resultó en la mayor mortalidad en el menor tiempo. En cambio, para los medios SG y HS, se eligió el sistema con baffles.

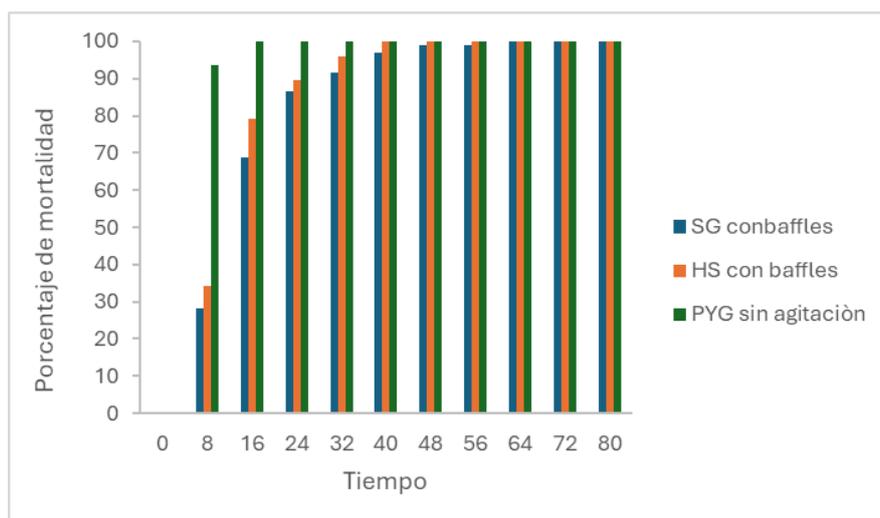


Figura 4.10: Porcentaje de mortalidad para los tres medios de cultivo en su mejor sistema, el tiempo está en horas

El sistema sin agitación mostró una mayor mortalidad en un tiempo corto, aunque los otros medios de cultivo lograron una mortalidad cercana al 90% en pocas horas. Aunque el medio PYG y el sistema sin agitación parecen ser la mejor condición para alcanzar una alta mortalidad, es importante considerar las variables analizadas en capítulos anteriores, como la biomasa máxima y el tiempo requerido para formarla. El sistema sin agitación resultó ser considerablemente más lento en la producción de biomasa, lo cual es una desventaja para la producción a gran escala. En contraste, el sistema con baffles permitió obtener una buena cantidad de biomasa en menos tiempo, lo que es favorable para la producción, ya que unas horas adicionales en la mortalidad pueden reducir los costos de producción.

En cuanto a los medios de cultivo SG y HS con baffles, aunque el tiempo de producción de biomasa fue el mismo, el medio SG produjo una mayor cantidad de biomasa. Por lo tanto, el medio SG con baffles es más eficiente en términos de producción de biomasa.

Efecto de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} en la producción y virulencia de las zoosporas de *L. chapmanii*

Todos los controles negativos realizados, dieron negativos en el tiempo de ensayo analizado que fueron 6 días.

En la **Figura 4.11** se pueden observar los controles positivos y las diferentes soluciones de Ca^{+2} y Mg^{+2} , para las 24, 48 y 72 horas de suspensión durante 6 días.

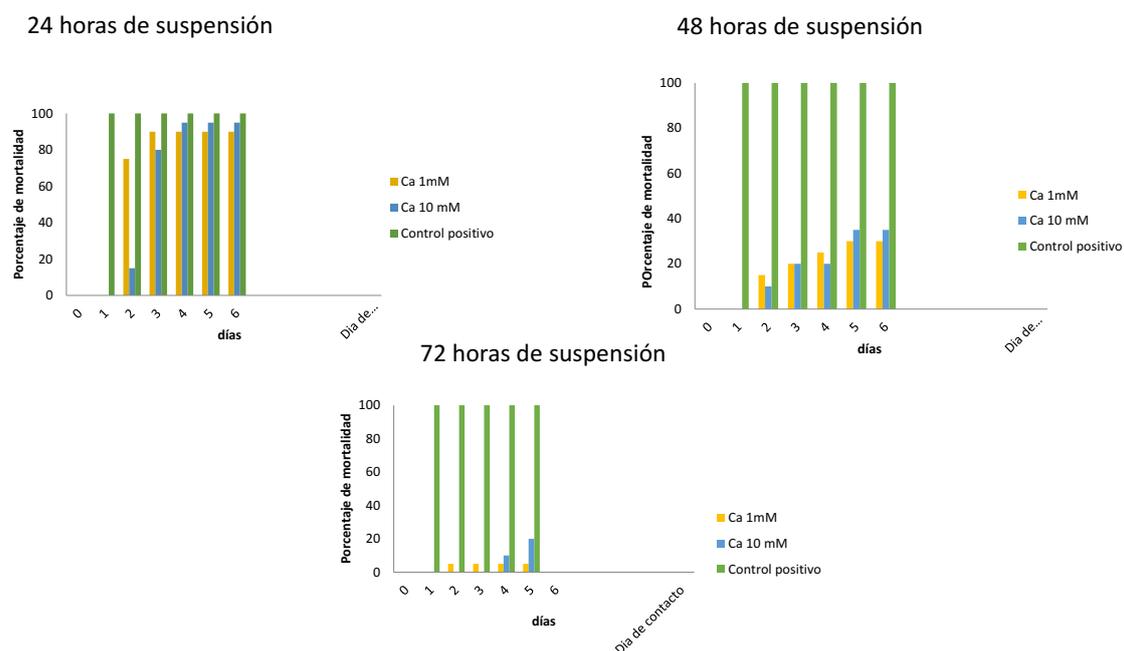


Figura 4.11: Porcentaje de mortalidad para diferentes tiempos de suspensión en presencia y ausencia de los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} . Los resultados de Mg^{+2} no se muestran en las figuras debido a que durante el tiempo del ensayo no produjo mortalidad.

En el caso del Ca^{+2} , si observamos una mortalidad similar al control con agua en el primer día de contacto, sin embargo, al pasar el tiempo, el ion Ca^{+2} debió afectar negativamente a la mortalidad, ya que el porcentaje fue menor al control con agua y zoosporas solas.

En la bibliografía se encontró que para el caso de *Aphanomyce ssp*, un Oomycete al igual que *L. chapmanii*, la presencia del ion Ca^{+2} estimula la producción de zoosporas (Fuller y Jaworski 1987), y que el ion Mg^{+2} es un factor inhibitorio para la producción de zoosporas. A diferencia de ellos, se encontró que el Ca^{+2} y el Mg^{+2}

no tuvieron influencia sobre la producción de zoosporas, ya que la concentración de zoosporas tanto en el control positivo como en las soluciones de Ca^{+2} y Mg^{+2} estuvieron dentro del mismo orden. Por otro lado, si se observó un efecto negativo en la virulencia de las zoosporas comparadas al control positivo. Con respecto al Mg^{+2} , la virulencia se modificó de tal manera que durante el ensayo no se produjo mortalidad. Con respecto al Ca^{+2} , su virulencia fue afectada al compararse con el control, pero en menor medida que el Mg^{+2} ya que si produjo mortalidad. Durante el primer día de suspensión el ion Ca^{+2} necesitó un mayor tiempo comparado al control positivo, pero logro elevados porcentajes. Sin embargo, al aumentar el tiempo de suspensión se ve que la virulencia bajo, ya que los porcentajes de mortalidad disminuyeron.

Virulencia de las zoosporas de *L. chapmanii* producidas en biorreactores

En la **Figura 4.12** se muestra la mortalidad obtenida para los dos fermentadores.

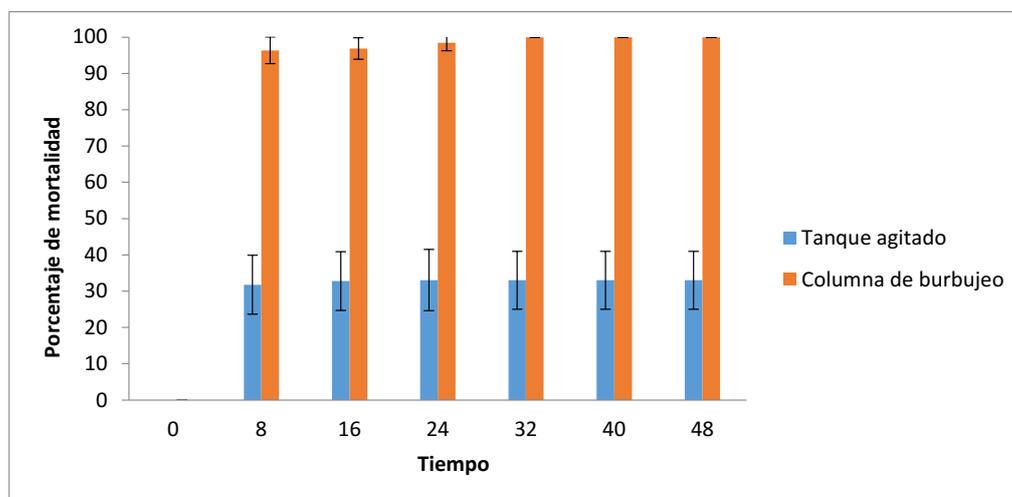


Figura 4.12: Porcentaje de mortalidad cuando las zoosporas fueron producidas en los dos biorreactores, el tiempo esta en unidades de horas

Como se mencionó en el Capítulo II, se determinó la biomasa formada para los dos biorreactores, si bien la cantidad producida fue la misma, se observó una mortalidad mayor en el caso del biorreactor de columna de burbujeo. Esta diferencia podría deberse a que la biomasa estuvo sumergida en diferentes volúmenes de agua; para tanque agitado fue de 1,300 L y para la columna de burbujeo fue de 3 L. Otra posibilidad es que la biomasa obtenida por el tanque

agitado produzca zoosporas viables en menor cantidad a comparación del biorreactor columna de burbujeo.

En este trabajo de investigación no se analizaron muestras a lo largo del tiempo, ni tampoco el sobrenadante, esto es debido a que se tomó como base el ensayo preliminar exployado en la tesis de doctorado de Rueda Paramo. Dentro de esta tesis, hicieron crecer a *L. chapmanii* en biorreactores, y hallaron que las muestras tomadas y su sobrenadante no fueron infectivos, llegando a la conclusión que el crecimiento que presentó este microorganismo fue de forma vegetativa; por lo tanto, para que se generen las zoosporas la biomasa si o si debe pasar un por un proceso de estrés como, por ejemplo, sumergirlo en agua destilada.

Efecto del formulado en alginato de calcio sobre la viabilidad y virulencia de las zoosporas de L. chapmanii

El control positivo que se realizó para verificar que las zoosporas estuvieran viables dio como se esperaba, logró matar a las larvas de mosquitos. Gracias a este resultado se prosigió con los ensayos con las zoosporas encapsuladas.

Cuando se realizaron los ensayos de mortalidad con las zoosporas encapsuladas, ni al tiempo 0 ni a los 30 días hubo mortalidad.

Como se mencionó en la introducción del capítulo III, la inmovilización por alginato de calcio otorga la ventaja de proporcionar un microambiente más seguro en comparación al macroambiente. además de liberar de manera controlada estos organismos en los cultivos al ambiente. Axtell y Gusman en el año 1987 encapsularon micelio y oosporas de *Lagenidium giganteum*. En los bioensayos que realizaron con oosporas encapsuladas mostraron que estas estructuras sobrevivieron al proceso de encapsulación y permanecieron viables después de la encapsulación y el almacenamiento (hasta 35 días probados). Las larvas expuestas a estas cápsulas se infectaron durante el período de inmersión de 48 días, demostrando actividad fúngica.

En 1990 Petel investigó diferentes alginatos de calcio en la encapsulación de *Lagenidium giganteum*. Confirmando nuevamente que la viabilidad del hongo encapsulado fue prolongada, al igual que lo mencionó Axtell y Guzman en 1987. Por otro lado, hallaron que la variación de la viscosidad produce diferentes tamaños de perlas de alginato, junto con diferentes resultados en la mortalidad de las larvas de mosquitos. Los datos sugieren que la viscosidad del alginato afecta la infectividad del hongo encapsulado, y los materiales más gruesos tienden a reducir la infección de las larvas de mosquito expuestas. Sin embargo, los materiales más viscosos producen cápsulas más redondeadas y uniformes que son convenientes para su manipulación y aplicación.

A diferencias de estos resultados, nuestros bioensayos no mostraron mortalidad a lo largo de todo el ensayo, sospechamos que una posibilidad es que, durante el proceso de agitación, el agitador magnético estuvo a una alta velocidad y pudo haber producido un daño a las zoosporas. Por otro lado, teniendo la información de Petel, se puede sospechar que el tipo de perlas que se formaron fueron muy gruesos, dificultando la infección por parte del *L. chapmanii*.

Conclusiones

Se analizaron diversos ensayos de mortalidad cambiando diversas variables, para observar si la virulencia de *L. chapmanii* se modificó. Lo primero que se evaluó fue una relación biomasa agua adecuada para la producción de zoosporas, para ser aplicados a los siguientes ensayos.

El primer ensayo preliminar tuvo como objetivo determinar la relación biomasa y agua en la producción de zoosporas, evaluando tanto el porcentaje de mortalidad como el tiempo requerido para alcanzar dicha mortalidad. Los resultados indicaron que los volúmenes mayores mostraron un mejor desempeño al reducir el tiempo necesario para alcanzar la mortalidad en comparación a con los volúmenes menores. En particular, la dilución de 500 mL demostró ser la más efectiva en múltiples pruebas, por lo que se seleccionó esta dilución para la

producción de zoosporas. En cuanto al tiempo de suspensión, se optó por el tercer intervalo, ya que se logró resultados óptimos en un menor tiempo. El uso de volúmenes más pequeños no es recomendable, ya que para alcanzar un buen porcentaje de mortalidad se requiere un tiempo de suspensión mayor.

Otro ensayo preliminar se centró en evaluar el impacto de los iones divalentes (Ca^{+2} y Mg^{+2}) en la producción y virulencia de las zoosporas. La concentración de zoosporas en el control y en las soluciones que contenían Ca^{+2} y Mg^{+2} se mantuvo en un rango similar, lo que indica que estos iones no afectaron significativamente la producción de zoosporas. Sin embargo, en los ensayos de mortalidad, se observó un efecto notable en comparación con el control positivo. El ion Mg^{+2} no provocó mortalidad en las soluciones evaluadas, sugiriendo que este ion alteró la virulencia de las zoosporas. Por otro lado, el ion Ca^{+2} inicialmente tuvo un efecto similar al del control positivo, pero con el tiempo también mostró una disminución en la mortalidad, indicando que el efecto del Ca^{+2} fue más retardado en comparación con el Mg^{+2} .

La virulencia de las zoosporas también se vio influenciada por el tipo de medio de cultivo y las condiciones de agitación. En el medio PYG, el sistema más efectivo fue sin agitación, logrando una mortalidad del 83.8% en solo 8 horas. En el medio SG, el sistema óptimo fue con agitación y baffles, alcanzando una mortalidad del 86.5% a las 24 horas. Para el medio HS, el mejor rendimiento se observó con baffles, logrando un 89.6% de mortalidad a las 24 horas. Aunque el medio PYG permitió alcanzar una alta mortalidad en menos tiempo, los otros sistemas no requirieron mucho más tiempo para lograr porcentajes elevados de mortalidad. Considerando factores adicionales como la biomasa máxima y el tiempo de obtención (evaluados en el Capítulo I), el sistema más eficiente resulta ser el que utiliza agitación y baffles con el medio SG.

En el Capítulo II se determinó que el medio de cultivo más adecuado para los biorreactores fue el medio SG. Se evaluó la mortalidad en dos tipos de biorreactores y se concluyó que la columna de burbujeo produjo una mayor mortalidad en comparación con el tanque agitado. Una posible explicación es que

el daño mecánico causado por el sistema de agitación influyó en la viabilidad de las zoosporas, siendo este daño mayor en el tanque agitado debido a un esfuerzo de corte más intenso en comparación con la aireación neumática de la columna de burbujeo.

La inmovilización de zoosporas mediante alginato de calcio es una opción favorable para encapsularlas, ya que proporciona protección contra factores ambientales. No obstante, en el ensayo realizado no se obtuvieron resultados satisfactorios. Una posible explicación es que el proceso de encapsulación pudo haber sido demasiado agresivo, debido a factores como una alta agitación u otras condiciones no controladas adecuadamente. Esta hipótesis es plausible dado que las zoosporas utilizadas eran viables, como se verificó mediante el control positivo realizado previamente. Otra posibilidad es que el grosor de las perlas de alginato haya interferido con el contacto entre las zoosporas y el medio de cultivo, impidiendo la infección. Se recomienda realizar nuevos ensayos bajo condiciones más suaves y establecer un control más preciso del grosor de las perlas de alginato.

Anexo

Mantenimiento de la cría de Aedes aegypti

Las larvas de mosquitos de *Ae. aegypti* utilizados en los bioensayos fueron criados en la colonia instalada en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, CEPAVE (CONICET-UNLP). La cría se mantuvo por el método descrito por Gerberg *et al.* 1994. Las condiciones de temperatura y humedad relativa son controladas a través de un termohigrómetro (E9155020, AMARELL, Alemania). Con ayuda de radiadores y estufas eléctricas con termostato, la temperatura fue de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$. La humedad relativa se mantuvo a $75\pm 15\%$ utilizando un humidificador de ambiente eléctrico, programado para la liberación de vapor durante 15 minutos continuos con intervalos de 90 minutos. El fotoperiodo es otro factor controlado, se realizó con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Huevos

Los huevos de *Ae. aegypti* fueron obtenidos de la ovoposición de los adultos. Los huevos son depositados en las ovitrampas que consisten en envases plásticos (8 cm de altura x 10 cm de diámetro) que alrededor de sus paredes contienen cartón corrugado rectangular (32 cm x 10 cm de altura) y 20 ml de agua de cloro (agua corriente expuesta a temperatura ambiente por 24 horas para eliminar el cloro, **Figura A.1**). Las ovitrampas son retiradas 72 horas después de la ovoposición, dejándose secar dentro del bioterio para finalizar el desarrollo del embrión.



Figura A.1: Baldes con agua corriente expuestos al ambiente por 24 horas

Los cartones que no fueron utilizados, se almacenaron en bolsas plásticas a temperatura ambiente. De esta forma se pueden conservar varios meses hasta inclusive un año.

Larvas

Para que los huevos eclosionen, se colocó el cartón corrugado que contienen los huevos de mosquitos en bandejas plásticas (53 cm de largo x 39 cm de ancho x 12 cm de altura) con 15 L de agua declorinada (**Figura A.2**). Esta hidratación, permitió que los huevos eclosionen a larvas. Para la alimentación de las larvas, se agregó al agua alimento balanceado para conejos molido. Las condiciones de HR y temperatura junto con el alimento hicieron que las larvas alcancen el estado de pupa.

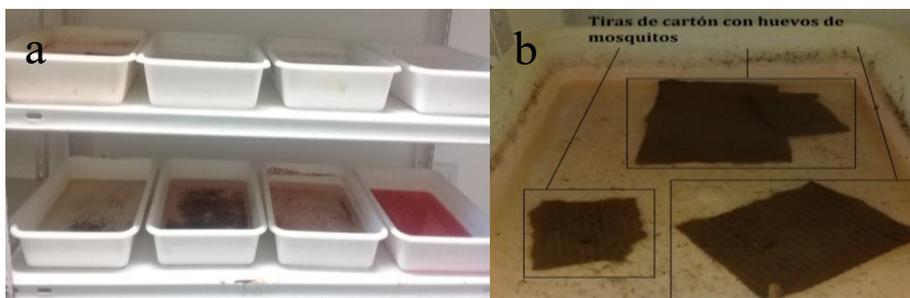


Figura A.2: Bandejas plasticas con agua y los huevos de los mosquitos

Pupas

Las pupas son colectadas en envases plásticos circulares de 16 cm de diámetro que contiene agua de clorinada. Estos envases fueron colocados en la jaula de emersión hasta la obtención de adultos.

Adultos

Los mosquitos adultos se ubicaron en jaulas de acrílico cúbicas con 40 cm de lado que en la cara frontal poseen una manga de tela (**Figura A.3**). Se usaron dos tipos de jaulas, la de emersión y la de cría. En la jaula de emersión se colocaron las pupas obtenidas y se espera a que emerjan los mosquitos. En la jaula de cría ocurre la alimentación con sangre de gallina y se colocan las ovitrampas. La alimentación en ambas jaulas consistió en colocar pasas de uvas como fuentes de hidratos de carbono y agua a través de un recipiente invertido cubierto de tela de voile.

Para la ovoposición es necesario suministrar sangre. Ésta se obtuvo de una gallina que previamente fue inmovilizada (30 a 60 minutos, 2 veces por semana). Cuando se observó que más del 90% de los mosquitos obtuvieron la sangre, se retiró la gallina y se colocaron las ovitrampas.



Figura A.3: Jaulas de mosquitos, la de la izquierda es la jaula de cría y la de la derecha es la jaula de emersión

Mantenimiento de *L. chapmanii*

Para todos los bioensayos se utilizó la cepa CEP 010 de *L. chapmanii* aislamiento nativa. El mantenimiento del pseudo-hongo se realizó mediante dos formas: cultivo in vitro e in vivo.

Cultivo in vitro: se utilizó 100 mL de agua destilada estéril con 2 bloques cúbicos de 1 cm de lado de micelio de *L. chapmanii* colocados en un frasco Erlenmeyer de 250 mL. La suspensión se dejó a temperatura ambiente por 48-72 h para la producción de zoosporas. A continuación, se adicionó 10 larvas de estadio L2/L3 y se las dejó 24 horas a temperatura ambiente para que se produzca la infección. Aquellas larvas muertas dentro de este periodo de tiempo se observaron bajo microscopio óptico 40X (Olympus) para corroborar la infección por *L. chapmanii*. Se seleccionaron las larvas con signos de infección del pseudo-hongo, a las cuales se les realizó baños sucesivos para disminuir la carga microbiana proveniente del cuerpo de la larva. El protocolo del lavado se describe en la **Tabla A.1**. Cada larva procesada por el protocolo de lavado se colocó en una caja de Petri de 60 mm de diámetro que contiene medio PYG sólido (Glucosa, Extracto de levadura y Peptona de carne, descrito más adelante) con la mezcla de antibióticos (estreptomina 5 ppm SIGMA lot 53H0088, Gentamicina 5 ppm Parafarm lot 032085, Ampicilina 5 ppm Parafarm lot 282243 y cloranfenicol 3 ppm Parafarm lot 070182). Se tapó y se selló con Parafilm® (Laboratory Film, 41Nx125 FT. Roll. PM-996) y se llevó a incubadora a 24°C durante 48 hs, permitiendo el aislamiento del pseudo-hongo. Pasadas las 48 hs se realizó el primer repique a otra caja de Petri (90 mm) con PYG sólido sin antibiótico. Los sucesivos repiques fueron hechos cada 7 días. Para todo el procedimiento se utilizó el flujo laminar (mach 1i).

Tabla A.1: Protocolo de lavado de larvas para el aislamiento de *L. chapmanii*

Orden del baño	Baño en	Tiempo de contacto (seg)
1	Agua destilada estéril	30
2	Lavandina 2%	15-20
3	Agua destilada estéril	30
4	Alcohol 70%	30-60
5	Agua destilada estéril	30-60
6	Gentamicina 0.5%, Ampicilina 0.5%, Estreptomicina 0.5% y cloranfenicol 0.3%	30-40
7	Agua destilada estéril	30-60

Cultivo in vivo: se inició de igual forma que el cultivo in vitro, con 100 mL de agua destilada estéril con 2 bloques cúbicos de 1 cm de lado que contiene micelio de *L. chapmanii* en medio PYG sólido. Después de 48-72 hs a temperatura ambiente, se adicionó 10 Larvas de estadio L2/L3, y se las dejó por 24 hs. Se utilizaron 5 larvas muertas por *L. chapmanii* y se las trasvasaron a un tubo Falcon (15 mL) con 10 mL de agua destilada estéril, a la cual se le agregó 5 larvas sanas procedentes de la cría. Entre las 24 y 48 hs de exposición, se corroboró, bajo microscopio optico a 40X, la infección por *L. chapmanii*. Estas larvas infectadas se usaron como inóculo para otras larvas nuevas. El procedimiento fue repetido periódicamente.

Producción de zoosporas

En un frasco Erlenmeyer se colocó agua destilada estéril y se agregó un bloque cúbico de 1 cm de lado de agar PYG con crecimiento de *L. chapmanii* de 5 días de incubación. Se lo dejó reposar por 48-72 horas a temperatura ambiente. La concentración de la suspensión de zoosporas se realizó con cámara de Neubauer bajo microscopio óptico (Olympus Bx41) a 40X.

Medios de cultivo

Medio PYG: se agregaron 3 g/L de glucosa (Biopack), 1,20 g/L de extracto de levadura (Merk) y 1,20 g/L de peptona de carne (Britania) en 1000 mL de agua destilada. Para los medios sólidos PYG además de los 3 componentes mencionado se agregó 10 g/L de agar bacteriológico (Britania).

Medio de semilla de girasol (SG): Se pesaron 10 g de semilla de girasol en balanza (TRAVELER OHAUS). Se colocaron las semillas en una licuadora junto con 100 mL de agua destilada. Se licuaron por 60 segundos y se filtraron con tela de voile. Se exprimió toda la mezcla. El sólido restante se volvió a colocar en la licuadora con otros 100 mL de agua destilada. Se licuó nuevamente por 60 s y se volvió a filtrar. Se juntaron los dos filtrados y se llevaron a un volumen final de 1000 mL (Jaronsky & Axtell, 1984).

Medio de harina de soja (HS): Se agregaron 3 g de harina de soja en 1000 mL agua destilada. Se homogenizó con agitador magnético (Ravimannan y Pathmanathan, 2016).

Antibióticos utilizados

Estreptomina 5 ppm SIGMA lot 53H0088

Gentamicina 5 ppm Parafarm lot 032085

Ampicilina 5 ppm Parafarm lot 282243

Cloranfenicol 3 ppm Parafarm lot 070182

Bibliografía

Achinelly, F. M. y Micieli, V. M. (2011). Optimizing laboratory production of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematodo: Mermithidae) whit a discussion of potential release strategies for mosquito biological control. *Biological Control*, 57(1) pp 31-36.

Adams, J. R. (2017). Introduction and classification of viruses of invertebrates. In *Atlas of invertebrates viruses* pp 1-8. Crc Press.

Ahmad, I., Ahmd, F., y Pichtel, J. (2011). *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*. Springer Scienceey Business Media pp 415-430.

Alexopoulus, C. J., Mims, C. W., y Blackwell, M. (1996). *Introductory micology* (Nº Ed 4). John Wiley and Sons, pp 868.

Alves, R. T., Bateman, R. P., Prior, C., y Leather, S. R. (1998). Effect of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection*, 17(8), pp 675-679.

Alzogaray, R. A. (2018). INSECTOS de importancia sanitaria en Argentina. *Primera Ed Autores de Argentina*.

Anderson, J. F. (1970). An iridescent virus infecting the mosquito *Aedes stimulans*. *Journal Invertebrate Phatology*, 15(2), pp 219-224.

Anónimo. (1990). Las condiciones de la salud en las Américas. O. P. S. Publicación científica Nº 524, 1, pp 503.

Aparicio, V., Casado, E., Lasters, J., Beld, J. E., y Torres, M. M. (2000). Produccion integrada em los cultivos hortícolas bajo abrigo de Almería. In *El sector agrario y agroalimentario de Almería ante el siglo XXI: evolución y perspectiva de nuestra agricultura en el año 2000: producción integrada: incidencias de las nuevas normativas de residuos de plaguicidas sobre la horticultura almariense*, pp 183-191. Instituto de Estudios Almarienses.

Aparicio, V., Rodríguez, M. D., Gómez, V., Sáez, E., Belda, J. E., Casado, E., y Lastres, J. (1995a). Plagas y enfermedades del tomate en la provincia de Almería: control racional. *Consejería de agricultura y pesca. Junta de Andalucía, Sevilla*, 13, pp 182.

Aparicio, V., Rodríguez, M. D., Gómez, V., Sáez, E., Belda, J. E., Casado, E., y Lastres, J. (1995b). Plagas y enfermedades del tomate en la provincia de Almería: control racional. *Consejería de agricultura y pesca. Junta de Andalucía, Sevilla*, 13, pp 260.

Arora, N. K., Verma, M., y Mishar, J. (2017). Rizobial bioformulations: past, present, and future Rizotrops: Plant growth promotion to bioremediation, 69-99.

Arriel Elias, M. T., Olivera, M. I., Silva Lobo, V. L., Filippi, M. C. C., Babana, A. H., Conceicao, E. C., y Cortez, M. D. C. (2018). Sheif life enhancement of plant growth promoting rhizobacteria using a simple formulation screening method.

Auld, B. A. (1992). Mass production, formulation, and application of fungi as biocontrol agents.

Avisar, D., Eilenberg, H., Keller, M., Reznik, N., Segal, M., Sneh, B., y Zilverstein, A. (2009). The *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C as potential bioinsecticide in plants. *Plant Science*, 176(3) pp 315-324.

Axtell, R. C., y Guzman, D. R. (1987). Encapsulation of the mosquito fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) in calcium alginate. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 3(3) pp 450-459.

Azevedo, J. L., y Melo, I. S. (1998). Controle microbiano de insectos Praga e seu melhoramento genético. *Controle biológico*, 1 pp 69-93.

Badii, M. H., y Abreu, J. L. (2006). Control biológico de una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience*, 1(1) pp 82-89.

Bashan, Y. (1986). Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol*, 51 pp 1089-1098.

Beakes, G. W., Honda, D., y Thines, M. (2014). 3 Systematics of the Straminipila: Labyrinthomycota, Hyphochytriomycota and Oomycota. *Systematics and evolution*. Springer, Berlin, Heidelberg, part A pp 39-97.

Becnel, J. J., y White, S. E. (2007). Mosquito pathogenic viruses-the last 20 years. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23 (sp2) pp 36-49.

Bejaramo, J. R. F. (1979). Estudio sobre la fiebre amarilla selvática en la República Argentina. *Buenos Aires: Ministerio de Bienestar social de la Nación/Secretaria de los Estados de la Salud Publica*, pp 38.

Belda, J. E., García, T. C., Vega, P. B., y Alba, M. D. (2000). Lucha integrada en cultivos hortícolas bajo plásticos en Almería. *Vida rural*, 118 pp 51-55.

Beneson, A. S. (1995). Control of communicable diseases manual, 16 th. *The Association*.

Bisht, G. S., Joshi, C., y Khulbe, R. D. (1996). Watermolds: Potential biological control agents of malaria vector *Anopheles culicifae*. *Current Science*, pp 393-395.

Burges, H. D. (2012). Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes, and seed treatments. *Springer Science and Business Media*, pp 131-185.

Burnell, A. M., y Stock, S. P. (2000). Heterorhabditis, Steinernema and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects. *Nematology*, 2 pp 31-42.

Burroni, N. E., Peresan Martínez, M. L., y Ocampo Mallow, C. (2016). *Aedes aegypti* y el dengue: saberes y prácticas para el control. Investigaciones sobre Mosquitos de Argentina, 27 pp 33. Universidad Nacional de Mas del Plata.

Byrne, G. S., y Ward, O. P. (1989). Growth of *Rhizopus arrhizus* in fermentation media. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 4(2) pp 155-161.

Campos, R. E. (1993). Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) en la localidad de Quilmes (Buenos Aires, Argentina). *Revista Sociedad Entomológica Argentina*, 52 pp 4-36.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C., y Gooday, G. W. (2001). The fungi. *Gulf Professional Publishing*.

Carnero Hernandez, A., Espino de Paz, A., Hernandez Garcia, M., y Barroso Espinosa, J. (1998). La lucha integrada, una nueva estrategia para combatir las plagas. *Ministerio de agricultura, Madrid*, pp 20.

Cassidy, M. B., Lee, H., y Travers, J. T. (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 16(2) pp 79-101.

Chen, K. C., y Huan, C. T. (1988). Effects of the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel. *Enzime Microb. Techonol.* 10 pp 284-292.

Christophrs, K. M. (1960). *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics, and structure. *Cambridge University Press*. GB pp 784.

Clark, T. B., y Brandl, D. G. (1976). Observations on the infection of *Aedes sierrensis* by a *Tetrahymenidne ciliate*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 28(3) pp 341-349.

Connick, W. J. Jr. (1982). Controlled released of the herbicides 2,4-D and Dichlobenil from alginate gels. *J. App. Polymer. SCI*, 27 pp 3341-3348.

Cook, R. J., y Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. ST Paul MN: *American Phytophthological Society Pressi*.

Corliss, J. O., y Coast, D. W. (1976). A new cuticular cyst-producing *Tetrahymena ciliate*, *Lambornella clarki* sp, and the current status of ciliates in culicine mosquitoes. *Transactions of the American Microscopical Society*, 95 pp 725-739.

Deckwer, W. D., y Schumpe, A. (1993). Improved tolos for bubble column reactor desing and scale-up. *Chemical Engineering Science*, 48(5) pp 889-911.

Demir, I., Eryüzlü, E. y Demirbağ, Z. (2012). A study on the characterization and pathgenicity of bacteria from *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). *Turkish Journal of Biology*, 36 pp 459-468.

Devine, G. J., Eza, D., Ogusuku, E., y Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 25(1) pp 74-100.

Dick, M. W. (2001a). The peronosporomycetes. *Systematics and Evolution*, part A pp 39-72.

Dick, M. W. (2001b). Straminipilous Fungi. Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine Straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht pp 670.

Dzerzhinskii, V. A., y Dubitskii, A. M. (1977). A new host of *Tetrahymena Stegomyiae*. *Parazitologiya*, 11(2) pp 189.

Ertola, R., Yantorno, O., y Mignone, C. (1994). Crecimiento microbiano. *Microbiología Industrial, OEA. Prog. Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico*.

Falvo, M. L., Albornoz Medina, P., Rodríguez, J., López Lastra, C. C., Garcia, J. J., Fernandez, E. K., y Luz, C. (2018). Effect of UV-B irradiation on water-suspended *Metarhizium anisopliae* sl (Hypocreales: Clavicipitaceae) conidia and their larvicidal activity in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 55(5) pp 1330-1333.

Falvo, M. L., Musso, A., Orodoqui, E., López Lastra, C. C., Luz, C., y Garcia, J. J. (2020). Aducticidal activity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales:

Clavivipitaceae) native strains from Argentina against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 57(2) pp 636-640.

Federici, B. A., Park, H. W., Bideschi, D. K., Wirth, M. C., Johson, J. J., Sakano, Y., y Tang, M. (2007). Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. *Journal the American Mosquito Control Association*, 23(sp2) pp 164-175.

Fenice, M., Selbman, L., Federic, F., y Vassilev, N. (2000). Application of encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization of rock phosphate. *Biores Technol*, 73 pp 157-162.

Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumsden, R. D., y Connick, W. J. Jr. (1985) Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate clay matrix. *Phytopathology*, 75 pp 774-777.

Fukuda, T., Clark, T. B. (1975). Transmission of the mosquito to iridescent virus (RMIV) by adult mosquitoes of *Aedes taeniorhynchus* to their progeny. *Journal of invertebrate pathology*, 25(2) pp 275-276.

Fuller, M. S., y Jaworski, A. (1987). Zoosporic fungi in teaching and research (N 3). *Athens: Southeaster Publishing Corporation*, pp 264-267.

Gaffigan, T. V., Wilkerson, R. C., Pecor, J. E., Stoffer, J. A., y Anderson, T. (2017). Walter reed biosystematics unit, systematics catalog of Culicidae. Smithsonian Institution, Washington, D. C., U.S.A. Recuperado de <http://www.mosquitocatalog.org>. Fecha de acceso 28 de junio de 2017.

García, M. A. G., García, S. C., Gordillo, J. M. L., y Martínez, R. F. M. (2011). Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte Sanitario*, 10(2) pp 21-28.

García Gutiérrez, C., Tamez Guerra, P., Medrano Roldán, H., y González, H. B. (2006). Mercado de bioinsecticidas en México. En: *Biotechnología Financiera Aplicada a Bioplaguicidas*. Maldonado. Cipriano García Gutiérrez e Hiram Medrano Roldán (Eds.) pp 17-40.

García Reyes, M., Béltran-Hernandez, R. I., Vázquez-Rodríguez, G. A., Coronel Olivares, C., Medina-Moreno, S. A., Juárez-Santillán, L. F. y Lucho Constantino, C. A. (2017). Formation, morphology and biotechnological application of filamentous fungal pellets: a review. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3), pp 703-720.

García, J. J., y Becnel, J. J. (1994). Eighth new species of microsporidia (Microspora) from argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of invertebrate Pathology*, 64(3) pp 249-252.

García, J. J., y López Lastra, C. C. (1990). Infecciones por microsporidios y hongos en *Culex dolosus* (Lynch Arribáizaga), 1891 (Diptera: Culicidae) en Argentina y en Uruguay. *Neotropica*, 35(93) pp 9-14.

Georghiou, G. P., y Saito, T. (1983). Pest resistance to pesticides. *Plenumpress, New York and London*.

Gibbs, P. A., Seviour, R. J., y Schmid, F. (2000). Growth of filamentous fungi submerged culture: problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(1) pp 17-48.

Giovacchini, C., Mariscal, M. E., Varela, T. (2016). Epidemiología de las arbovirosis emergentes en las Américas con foco en la Argentina. *Actual en SIDA e Infectología*, 24(93) pp 1-17.

Grassmick, R. A., y Rowley, W. A. (1973). Larval mortality of *Culex tarsalis* and *Aedes aegypti* when reared with different concentrations of *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 22(1) pp 86-93.

Gumbler, D. J., y Clark, G. G. (1996). Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. *Acta tropica*, 61(2) pp 169-179.

Gutiérrez, A. C., Rueda Páramo, M. E., Falvo, M. L., López Lastra, C. C., García, J. J. (2017). *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes) as future biorational tool for the control *Aedes aegypti* L. *Acta tropica*, 169 pp 112-118.

Hall, D. W., y Fish, D. D. (1974). A baculovirus from the mosquito *Wyeomyia smithii*. *Journal of invertebrate Pathology*, 23(3) pp 383-388.

Harbach, R. E., y Kithcing, I. J. (1998). Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology*, 23(4) pp 327-370.

Humber, R. A. (1997). Fungi: Identification. In: Manual of techniques in insect pathology. L. *Academic Press, San Diego*, pp 153-185.

Hunter Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F., y Crook, N. E. (1998). Insect viruses and pest management. *John Wiley and Sons*.

Ibrahim, L., Butt, T. M., Beckett, A., Clark, S. J. (1999). The germination of oil-formulated conidia of the insect pathogen, *Metarhizium anispliae*. *Mycological Research*, 103(7) pp 901-907.

James, T. Y., Porter, T. M., y Martin, W. W. (2014). 7 Blastocladiomycota. Systematics and evolution: part A pp 177-207.

Jaronski, S. T., y Axtell, R. C. (1983). Persistence of the mosquito fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) after introduction into natural habitats. *MOSQ. NEWS.*, 43(3) PP 332-337.

Jaronski, S. T., y Axtell, R. C. (1984). Simplified production system for the fungus. *Lagenidium giganteum* for operational mosquito control. *Mosq. Newa.*, 44 pp 377-381.

Jaronski, S. T., y Jackson, M. A. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. *Manual of techniques in invertebrate pathology*, 2.

Jekins, N. E., Heviefio, G., Langewald, J., Cherry, A. J., y Lomer, C. J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol Newa and Inforation*, 19 pp 21N-32N.

Jekins, N. E., Thomas, M. B. (1996). Effect of formulation and application method on the efficacy of aerial and sumerged conidia of *Metarhizium flavoviride* for locust and grasshopper control. *Pesticide Science*, 46(4) pp 299-306.

Jenkins, D. W. (1964). Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. Bulletin Word Heald Organization 30 pp 150.

Jenkins, N. E., y Goettel, M. S. (1997). Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. *The Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 129 (S171), pp 37-48.

Kerwin, J. L. (2007). Oomycetes: *Lagenidium giganteum*. En: Biorational control of mosquitoes. T. G. Floore (Ed). *American Mosquito Control Association, Inc*, 7 pp 50-58.

Kerwin, J. L., y Washino, R. K. (1983). Sterol induction of sexual reproduction in *Lagenidium giganteum*. *Experimental Mycology*, 7(2) pp 109-115.

Knight, K. L., y Stone, A. (1977). A catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae). Thomas Say Foundation. *Entomological Society of America*, 6 pp 1-611.

Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., y Hendrick, G. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elif* 4.

Laggett, M., Leland, J., Kellar, K., y Epp, B. (2011). Formulation of microbial biocontrol agents an industrial perspective. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 33(2) pp 101-107.

Leahy, J., Mendelsohn, M., Kough, J., Jones, R., y Berckes, N. (2014). Biopesticide oversight and registration at the US Environmental Protection Agency. *Biopesticide: state of the art future opportunities*, pp 3-18.

López Lastra, C. C. (1990). Primera cita de *Smittium morbosum* var. *Rioplataensis* nov. (Trichomycetes: Harpellales) patógeno de 5 especies de mosquito (Diptera: Culicidae) en la República Argentina. *Revista Argentina de Micología*, 12(2) pp 14-18.

López Lastra, C. C., Scorsetti, A. C., Marti, G. A., y García, J. J. (2004). Host range and specificity of an Argentina isolate of the aquatic fungus *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales), a pathogen of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Mycopathologia*, 158(3) pp 311-315.

López Lastra, C. C., Steciow, M. M., y García, J. J. (1999). Registro más austral del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) como patógeno de larvas de mosquito (Diptera: culicidae). *Rev. Iberoam. Micol.*, 16 pp 143-145.

López Lastra, C. C., y Lecuona, R. E. (2019). *Micopatología de artrópodos: hongos entomopatógenos para ser usados como bioinsumos en el control microbiano de plagas*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina) pp 215.

Malais, M., y Ravensberg, W. J. (1995). *Conocer y reconocer. La biología de las plagas de invernadero y sus enemigos naturales*. Koppert BV. Rotterdam, pp 109.

Maldonado Blanco, M. G., Leal López, E. Y., Ochoa Salazar, O. A., Elías Santos, M., Galán Wong, L. J., y Quiroz Martínez, H. (2011). Effects of culture medium formulation on the larvicidal activity of the mosquito pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) against *Aedes aegypti*. *Acta Tropica*, 117(2) pp 114-118.

Márquez, J. M., López, C. y Recinos, L. (2005). Evaluación de la mortalidad provocada por bioinsecticidas en larvas de dos especies del Barredor del tallo bajo condiciones de laboratorio. *Engicaña*, p 73.

Márquez, A. M., Velozo, L. S., Carvalho, M. A., Serdeiro, M. T., Honorio, N. A., Kaplan, M. A. C., y Malek, M. (2017). Larvicidal activity of *Ottonia anisum*

metabolites against *Aedes aegypti*: A potential natural alternative source for mosquito vector control in Brazil.

Mata, M., y Miranda, M. B. (2010). Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno "*Beauveria bassiana*" como parte de un proceso de escalamiento y producción de bioplaguicidas. *Boletín Promecafé*, 122 pp 8-19.

May, B. A., Vanderghenst, J. S., y Rumsey, T. (2006). The kinetic of *Lagenidium giganteum* growth in the liquid and solid cultures. *Journal of applied microbiology*, 101(4) pp 807-814

Mc Innis Jr, T., y Zattau, W. C. (1982). Experimental infection larvae by a species of aquatic fungus *Leptolegnia*. *Journal invertebrate Pathology*, 39(1) pp 98-104.

Medina Moreno, S. A., Jimenez Gonzalez, A., Gutierrez Rojas, M. A., y Lizardi Jimenez, M. A. (2013). Hexadecane aqueous emulsion characterization and uptake by an oil-degrading microbial consortium. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 84 pp 1-7.

Méndez, A., Del pozo, E., y García, I. (2007). Producción de biomasa del aislamiento (Nr-003) de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson en diferentes medios de cultivo líquidos con agitación y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). *Revista de Protección Vegetal*, 22(2) pp 118-123.

Mentez, B., y Kossen, N. W. F. (1977). The growth of molds in the form of pellets a literature review. *Biotechnology and Bioengineering*, 19(6) pp 781-799.

Mis Ávila, P., Canul Amaro, G., y Dominguez Galera, M. A. (2013). Determinación taxonómica de mosquitos (Culicinae: Culicidae) de la zona urbana de Chetumal, Quintana Roo. *Revista Salud Quintana Roo*, 6(23) pp 8-13.

Mogi, M. (2007). Insect and other invertebrate predators. *Journal of the American Mosquito Control*, 23(sp2) pp 93-109.

Montalva, C., Dos Santos, K., Collier, K., Rocha, L. F., Fernandez, É. K., Castrillo, L. A., y Humber, R. A. (2016). First report *Leptolegnia chapmanii* (Peronosporomycetes: Saprolegniales) affecting mosquitoes in central Brazil. *Journal of invertebrate pathology*, 136 pp 109-116.

Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*, 6(4) pp 245-252.

Monzón, A. (2002). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua.

Monzon, A. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo integral de plagas. (CATIE, COSTA RICA), 63 pp 95-103.

Moor, D., Bridge, P. D., Higgins, P. M., Bateman, R. P., y Prior, C. (1993). Ultra violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annals of Applied Biology*, 122(3) pp 605-616.

Moore-Landecker, E. (2015). Fundamentals of the fungi.

Munstermann, L. E., y Wesson, D. W. (1990). First record of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Testudinidae) in North American *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 6(2) pp 235-243.

Muñoz, J., Alfaro, M. D., y Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. Grasa y aceites, 58(1) pp 64-73.

Muttis, E., Miele, S. A., Belaich, M. N., Micieli, M. V., Becnel, J. J., Ghiringhelli, P. D., y García, J. J. (2012). First record of a mosquito iridescent virus in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). *Archives of virology*, 157(8) pp 1569-1571.

Muttis, E., Micieli, M. V., y Garcia, J. J. (2013). *Culex pipiens* affected by joint infection of a mosquito iridescent virus and *Strelkovimermis spiculatus*. *Journal of invertebrate pathology*, 114(3) PP 295-297.

Orduz, S., y Axtell, R. C. (1991). Compatibility of *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus* with the fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales). *Journal of the American Mosquito Control*, 7(2) pp 188-193.

Organización mundial de la salud (O.M.S). (2020). Zika: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>

Organización mundial de la salud (O.M.S): <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>.

Organización Panamericana de la Salud (O.P.S). (1998). Dengue y dengue hemorrágico en las Américas, guías para su prevención y control. Publicación Científica N° 548.

Organización Panamericana de la Salud (O.P.S). (2020). actualización epidemiológica anual para el dengue, chikungunya y zika.

Organización Panamericana de la Salud (O.P.S). (2020). Fiebre amarilla: <https://www.paho.org/es/search/r?keys=fiebre+amarilla#gsc.tab=0&gsc.q=fiebre%20amarilla>.

Organización Panamericana de la Salud (O.P.S). (2021). Actualización epidemiológica anual para el dengue, chikungunya y zika.

Organización Panamericana de la Salud (O.P.S). (2022a). Actualización epidemiológica anual para el dengue, chikungunya y zika. <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/boletin-anual-arbovirosis-2022.html>.

Organización Panamericana de la Salud (O.P.S). (2022b). Actualización epidemiológica anual para el dengue, chikungunya y zika. <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-fiebre-amarilla-31-agosto-2022>.

Organización Panamericana de la Salud (O.P.S). Enfermedades endémicas desatendidas: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-desatendidas-tropicales-transmitidas-por-vectores>.

Paul, E., Fages, I., Blanc, P., Goma, G., y Parailleux, A. (1993). Survival of alginate entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40 pp 34-39.

Pauline, D. (1995). Principios de ingeniería de los bioprocesos. *Editorial Acribia S.A, Madrid* 13 pp 281-285.

Pedrini, N., Crespo, R. y Juárez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology y Pharmacology*, 146 (1-2), pp 124-137.

Pelizza, S. A. (2007). Tesis doctoral. "Estudio y evaluación de *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Oomycetes, Saprolegniales) como agente de control biológico de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)". Universidad Nacional de La Plata.

Pelizza, S. A., López Lastra, C. C., Becnel, J. J., Bisaro, V., y García, J. J. (2007). Effects of temperature, pH and salinity on the infection of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Peronosporomycetes) in mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(2) pp 133-137.

Pelizza, S. A., López Lastra, C. C., Becnel, J. J., Humber, R. A., y García, J. J. (2008). Further research on the production, longevity and infectivity of the zoospores of

Leptolegnia chapmanii Seymour (Oomycota: Peronosporomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3) pp 314-319.

Pelizza, S. A., López Lastra, C. C., Maciá, A., Bisaro, V., y García, J. J. (2009). Efecto de la calidad del agua de criaderos de mosquitos (Diptera: Culicidae) sobre la patogenicidad e infectividad de las zoosporas del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes). *Revista de Biología Tropical*, 57(1-2) pp 371-380.

Pereira, R. M., y Roberts, D., W. (1991). Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi and *Metarhizium anisopliae*. *J. Econ. Entomol.*, 84 pp 1657-1661.

Pérez, E. (2000). La producción integrada en tomate bajo abrigo. I Jornadas sobre Producción Integrada. ED. *Asociación AGRO*. Universidad de Almería. Almería.

Petel, J. K., Rueda, L. M, y Axtell, R. C. (1990). Comparisons of different types and concentrations of alginates encapsulation of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Laganidiales), a fungal pathogenic of mosquito larvae. *J. Am. Mosquito control*, 6 pp 101-105.

Petterson, J. J. (1985). Nematode parasite. En: *Biological Control of Mosquito*. Chapman, H. C. Ed. Control Assoc. *Am. Mosq.*, 6 pp 110-122.

Pirt, S. J., y Callow, D. S. (1959). Continuous flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology. *Nature*, 184 pp 307-310.

Platzer, G. E. (2007). *Mermithidae* nematodes. En Biorational control mosquitoes. T. G. Floore (Ed). *American Mosquito Control, Inc*, 7 pp 58-64

Powell, M. J., y Letcher, P. M. (2014). 6 Chytridiomycota, Monoblepharidomycota and Neocallimastigomycota. *Systematics and Evolution: Part A*, pp 141-175.

Prescott, M. (2002). Microbiology. Quinta Ed. *Mc Graw-Hill Interamericana*, pp 105-108; 113-115.

Prior, C., Jollands, P., y Le Patourel, G. (1988). Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hypomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes pulus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal Invertebrate Pathology*, 52(1) pp 66-72.

Prosser, J. I. (1995). Kinetics of filamentous growth and branching. *The growing fungus*, Springer, Dordrecht, pp 301-318.

Puriccelli, E. C. J. M., y March, H. D. (2014). Formulaciones de productos fitosanitarios para sanidad vegetal (N° 6329). *Editorial Rosario*.

Reiner, J. F., Harbach, R. E., y Kitching, I. J. (2009). Phylogeny and classification of the tribe *Aedini* (Diptera: Culicidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 157(4) pp 700-794.

Reyes Villanueva, F., Becnel, J. J., y Butler, J. F. (2001). Morphological traits for distinguishing extracellular gamonts of *Ascogregarina culicis* and *Ascogregarina taiwanesis* in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal Invertebrate Pathology*, 77 pp 227-229.

Richards, T. A., Dacks, J. B., Jekinson, J. M., Thornton, C. R., y Talbot, N. J. (2006). Evolución de los patógenos filamentosos: intercambio de genes a través de reinos eucariotas. *Curr Biol*, 16 pp 1857-1864.

Roberts, D. W., Daoust, R. A., y Wraigt, S. P. (1983). Bibliography on pathogen of medically important arthropods: 1981. *Bulletin World Health Organization*, 83 pp 137.

Roberts, D. W., y Castillo, J. M. (1980). Bibliography on pathogens of medically important arthropods. *Bulletin World Health Organization*, 58 pp 197.

Roberts, D. W., y Strand, M. A. (1977). Pathogens of medically important arthropods. *Bulletin World health organization*, 55(1) pp 419.

Rogers, D. J., Wilson, A. J., Hay, S. I., y Graham, A. J. (2006). The global distribution of yellow fever and dengue. *Ad. Parasitol.*, 62 pp 181-220.

Rosas, G. N. M. (2009). Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative. *Recent Patentson biotechnology*, 3(1) pp 28-36.

Rossi, G. C., y Almirón, W. R. (2004). Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquito de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. *Publicaciones Mundo Sano, Serie Enfermedades Transmisibles*, 5 pp 53.

Rueda, L. M., Patel, K. J., y Axtell, R. D. (1990). Efficacy of encapsulated *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae in artificial containers. *Journal of the American Mosquito Control Association* 6(4) pp 694-699.

Rueda Páramo, M., Falvo, M. L., García, J. J., y López Lastra, C. C. (2019a). Compatibility between *Leptolegnia chapmanii* and diflubenzuron and neem oil for the control *Aedes aegypti*. Compatibilidad de *Leptolegnia chapmanii* con

diflubenzurón y aceite de neem para el control de *Aedes aegypti*. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3) pp 240-244.

Rueda Paramo, M., López Lastra, C. C., García, J. J., y Fernandez, É. K., Marrwto, R. N., y Luz, C. (2015). Effect of ultraviolet-A radiation on the production of *Leptolegnia chapmanii* (Saprolegniales: Saprolegniaceae) zoospore on dead *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae and their larvicidal activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130 pp 133-135.

Rueda Páramo, M., Tavares, I., López Lastra, C. C., y García, J. J. (2019b). *Leptolegnia chapmanii* alternativa biológica para el control de *Aedes aegypti*. *Biomédica*, 39(4) pp 798-810.

Ruíz-Leaza, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C., y Aguilar, C. N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólidos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1) pp 33-40.

Sarwar, M. (2015). Commonly available comercial insecticide formulations and their applications in the field. *International Journal of Materials Chemistry and Physics*, 1(2) pp 116-123.

Schimmel, L., y Noblet, R. (1985). Host range studies with fungus *Leptolegnia*, a parasite of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology*, 22(2) pp 226-227.

Scholte, E. J., Takken, W., y Knols, B. G. (2007). Infection of adults *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta tropica*, 102(3) pp 151-158.

Seymour, R. L. (1984). *Leptolegnia chapmanii*, an oomycete pathogen of mosquito larvae. *Mycologia*, 76(4) pp 670-674.

Shah, P. A., Aebi, M., y Tuor, U. (1998). Method to immobilize the aphid pathogenic fungus *Erynia neoaphidis* in an alginate matrix for biocontrol. *Applied and environmental microbiology*, 64 (11) pp 4260-4263.

Shuler, M. L., Hammer, D. A., Granados, R. R., y Wood, H. A. (1995). Baculovirus esexpresion systems and biopesticides. *Wiley-Liss, New York*, 13-40.

Siegel, J. P., Novak, R. J. y, Maddox, J. V. (1992). Effects of *Ascogregarinas barrette* (Eugregarinida: Lecudinidae) infections on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Illinois. *Journal of Medical Entomology*, 29(6) pp 968-973.

Smidsrod, O. y Skjak Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* 8 pp 71-78.

Soper, R. S., y Ward, M. G. (1981). Production, formulation and application of fungi for insect control. *Biological Control in Corp Production*, pp 161-180.

Sosa Gómez, D. R., López Lastra, C. C., y Humber, R. A. (2010). An overview of arthropod associated fungi from Argentina and Brazil. *Mycopathologia*, 170(1) pp 61-76.

Sparrow, F. K. (1960). Aquatic Phycomycetes. University of Michigan Press. *Ann Arbor, Michigan*.

Sparrow, F. K. (1973). Chytridiomycetes, Hyphochytridiomycetes. The fungi. Edited by Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K., and Sussman, A. S. *Academic Press, New York*, 85-110.

Sparrow, F. K. (1976). The present status of classification in biflagellate fungi. *Recent advances in aquatic mycology*, pp 213-222.

Stein, M., Rossi, G. C., y Almirón, W. R. (2016). Distribución geográfica de Culicidae de Argentina. En: *Investigación sobre mosquitos de Argentina. Universidad Nacional de Mar del Plata*, 4 pp 46-56.

Stock, S. P., y Camino, N. B. (1996). Nematodos entomopatógenos. En: *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga*.

Leucona, R. E., Ed. Buenos Aires, Argentina: Talleres Gráficos Marino Mas, 7 pp 105-107.

Tanada, Y., y Kaya, H. K. (1993). Insect Pathology. *Academic Press, Inc, U.S.A*, pp 665.

Tanzini, M. R., Alves, S. B., Setten, A., y Augusto, N. T. (2001). Compatibilidad de agentes tensioactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Tejerina, E. F., Taratagliano, L. C., De Lima, E. A., y Rodríguez, Y. M. (2016). Acción comunitaria. En Berón, C. M.- Campos, R. E., Gleiser, R. M., Díaz Nieto, L. M., Salomón, O. D. y Schweigmann, N. *Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina*, 28 pp 349-358.

Tseng, M. (2007). *Ascogregarine* parasites as posible biocontrol agents of mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association, Inc*, 23(sp2) pp 30-34.

Ujjan, A. A., Khanzada, M. A., Mahar, A., Q., y Shahzad, S. (2015). Efficiency of *Metarhizium* spp. (Sorokin) strains and insecticides against cotton mealybug *Phenacoccus solenopsis* (Tinsley). *Pakistan Journal of Zoology*, 47(2).

Ummidi, V. R. S., y Vadlamani, P. (2014). Preparation and use of oil formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Spodoptera litura* larvae. *African Journal of Microbiology Research*, 8(15) pp 1638-1644.

Uribe, L. J. (1983). El problema del control de *Aedes aegypti* en América. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (O.P.S)*, 94(5).

Van Suijdam, J. C., y Mentez, B. (1981). Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous mold. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(1) pp 111-148.

Vandergheteyst, J., Scher, H., Guo, H. Y., y Schultz, D. (2007). Water in oil emulsions that improve the storage and delivery of the biolarvacide *Lagenidium giganteum*. *BioControl*, 52(2) pp 207-229.

Vignoli, R., Calvelo, E., Chiparelli, H., y Schelotto, F. (2002). Hantavirus y dengue. www.higiene.edu.uy/cefa/libro2002/cap%207.pdf.

Vyas, N., Dua, K., K., y Prakash, S. (2007). Efficacy of *Lagenidium giganteum* metabolites on mosquito larvae with reference to nontarget organisms. *Parasitology Research*, 101 pp 385-390.

Walker, H. L., Connik, W. J., Jr. (1983). Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Sci* 31 pp 333-338.

Weiser, J. (1991). *Biological control of vectors. Manual for collecting, field determination and handling of biofactors for control of vectors*. John Wiley y Chichester Sons.

Wilkerson, R. C., Linton, Y. M., Fonseca, D. M., Schultz, T. R., Price, D. C. y Strickman, D. A. (2015). Marking mosquito taxonomy useful: A stable classification of tribe *Aedini* that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *Plos one*, 10(7).

Wraight, S. P., Jackson, M. A., y De Kock, S. L. (2001). Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. *Fungi as Biocontrol Agents*, pp 253-287.

Yasuhisa, K. (2007). Current status and prospects microbial control in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95(3) pp 181-186.

Zattau, W. C., y Mc Innis, T. Jr. (1987). Life cycle and mode of infection of *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes) parasitizing *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebral Pathology*, 50(2) pp 134-145.