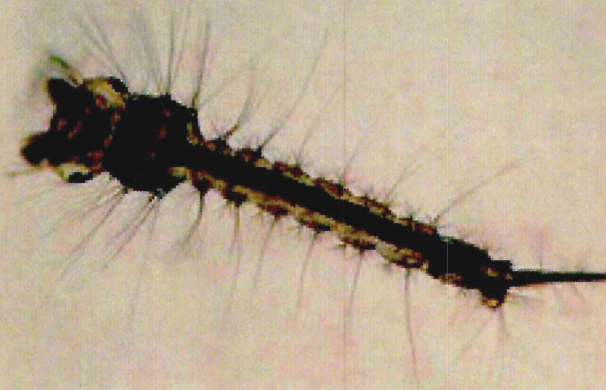
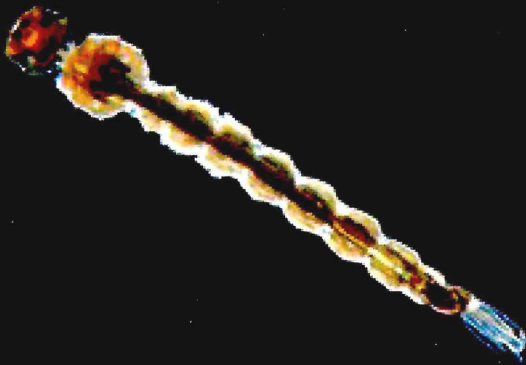




UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

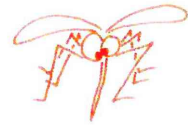
“Estudio y evaluación de depredadores y bacterias entomopatógenas de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens*, como potenciales agentes de control”



TRABAJO DE TESIS DOCTORAL
Lic. TRANCHIDA, MARÍA CECILIA

DIRECTOR: MICELI, MARÍA VICTORIA
CO-DIRECTOR: GARCÍA, JUAN JOSÉ

2010



A mis padres Héctor y Cécica por acompañarme en esta etapa de mi carrera.

A Mateo.

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| ANTECEDENTES | 12 |
| Importancia sanitaria de los culícidos..... | 12 |
| Situación en la Argentina..... | 15 |
| Control de culícidos..... | 17 |
| Enemigos naturales de los culícidos..... | 20 |
| Enemigos naturales de los culícidos en la Argentina, conocimiento actual..... | 24 |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO | 27 |
| OBJETIVOS | 28 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| Instalación y mantenimiento de las colonias de <i>Aedes aegypti</i> y <i>Culex pipiens</i> en el laboratorio..... | 29 |
| CAPÍTULO I | |
| Evaluación de la capacidad depredadora de Copépodos Ciclopoideos (Crustacea:Copepoda) autóctonos de la Argentina, sobre estados inmaduros de <i>Ae aegypti</i> y <i>Cx. pipiens</i> | 33 |
| Introducción y Objetivos..... | 33 |
| Materiales y Métodos..... | 37 |
| Área de Estudio..... | 37 |
| Metodología de muestreo..... | 42 |
| Colonias de copépodos..... | 42 |
| Evaluación de la capacidad depredadora de copépodos sobre especies de mosquitos encontradas en el mismo ambiente..... | 43 |
| Ensayos de depredación en condiciones de laboratorio sobre <i>Ae. aegypti</i> y <i>Cx. pipiens</i> | 44 |
| Tolerancia de los copépodos a la desecación..... | 46 |
| Tolerancia de los copépodos al agua de contenedores artificiales..... | 47 |
| Resultados..... | 49 |

| | |
|---|-----|
| Especies encontradas en el área de muestreo y su capacidad depredadora..... | 47 |
| Ensayos de depredación en condiciones de laboratorio..... | 48 |
| Tolerancia de los copépodos a la desecación..... | 51 |
| Tolerancia de los copépodos al agua de contenedores artificiales..... | 52 |
| Discusión..... | 67 |
| CAPÍTULO II | |
| Evaluación de Platelminos depredadores de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Cx. pipiens</i> | 71 |
| Introducción y Objetivos..... | 71 |
| Materiales y Métodos..... | 74 |
| Área de Estudio y recolección de las muestras..... | 74 |
| Identificación y colonización de los turbelarios..... | 76 |
| Evaluación de la capacidad depredadora de turbelarios sobre especies de mosquitos encontradas en el mismo ambiente..... | 76 |
| Ensayos de depredación en condiciones de laboratorio..... | 77 |
| Tolerancia de los turbelarios al agua de contenedores artificiales..... | 79 |
| Resultados..... | 81 |
| Especies encontradas en el área de muestreo y su capacidad depredadora..... | 81 |
| Ensayos de depredación en condiciones de laboratorio..... | 83 |
| Tolerancia de los turbelarios al agua de contenedores artificiales..... | 86 |
| Discusión..... | 96 |
| CAPÍTULO III | |
| <i>Girardia anceps</i> como agente de control biológico de <i>Ae. aegypti</i> y <i>Cx. pipiens</i> en condiciones de campo..... | 101 |
| Justificación del estudio y Objetivos..... | 101 |
| Materiales y Métodos..... | 102 |
| Resultados..... | 109 |
| Discusión..... | 117 |

CAPÍTULO IV

| | |
|---|-----|
| Evaluación de Peces larvívoros Autóctonos como agentes de control de estados inmaduros de <i>Culex pipiens</i> | 120 |
| Introducción y Objetivos..... | 120 |
| Materiales y Métodos..... | 123 |
| Área de estudio y selección del sitio del ensayo..... | 123 |
| Recolección y liberación de peces larvívoros..... | 124 |
| Seguimiento de la población natural de estados inmaduros de <i>Cx. pipiens</i> posterior a la liberación..... | 125 |
| Capacidad de adaptación del depredador en el ambiente introducido..... | 126 |
| Evaluación de la capacidad depredadora de <i>C. decemmaculatus</i> sobre balsas de <i>Cx. pipiens</i> | 127 |
| Evaluación en el laboratorio de la preferencia del sitio de ovipostura de hembras de <i>Cx. pipiens</i> en presencia-ausencia de <i>C. decemmaculatus</i> | 128 |
| Resultados..... | 130 |
| Área de estudio y selección del sitio del ensayo..... | 130 |
| Seguimiento de la población de estados inmaduros del mosquito..... | 130 |
| Capacidad de adaptación del depredador en el ambiente introducido..... | 134 |
| Evaluación de la capacidad depredadora de <i>C. decemmaculatus</i> sobre balsas de <i>Cx. pipiens</i> | 137 |
| Evaluación en el laboratorio de la preferencia del sitio de ovipostura de hembras de <i>Cx. pipiens</i> en presencia-ausencia de <i>C. decemmaculatus</i> | 137 |
| Discusión..... | 138 |

CAPÍTULO V

| | |
|---|-----|
| Bacterias Patógenas de mosquitos | 142 |
| Introducción y Objetivos..... | 142 |


Bacterias patógenas de mosquitos I


Aislamiento e identificación de bacterias a partir del


| | |
|--|-----|
| hemocele de larvas de <i>Cx. pipiens</i> | 149 |
| Objetivos específicos..... | 149 |
| Materiales y Métodos..... | 149 |
| Recolección de las muestras..... | 149 |
| Aislamiento e identificación del patógeno..... | 149 |
| Caracterización biológica del patógeno: | |
| Estudios de transmisión..... | 150 |
| Prevalencia del patógeno en poblaciones naturales | |
| de <i>Cx. pipiens</i> | 152 |
| Caracterización morfológica y bioquímica del aislamiento | |
| bacteriano..... | 152 |
| Identificación molecular del patógeno..... | 153 |
| Extracción de ADN..... | 153 |
| Amplificación y secuenciación del gen <i>16S rRNA</i> | 153 |
| Análisis de las secuencias..... | 154 |
| Resultados..... | 155 |
| Recolección de larvas de <i>Cx. pipiens</i> e identificación | |
| de posibles patógenos..... | 155 |
| Caracterización biológica del patógeno: | |
| Estudios de transmisión..... | 155 |
| Prevalencia del patógeno en poblaciones naturales | |
| de <i>Cx. pipiens</i> | 156 |
| Caracterización morfológica y bioquímica del | |
| patógeno. Localización histológica..... | 160 |
| Identificación molecular basada en la secuencia | |
| del gen <i>16Sr RNA</i> | 164 |
| Discusión..... | 165 |
| Bacterias patógenas de mosquitos II | |
| Aislamiento y caracterización de cepas de <i>Bacillus</i> a partir de larvas | |
| infectadas de <i>Cx. pipiens</i> | 168 |
| Objetivos específicos..... | 168 |
| Materiales y Métodos..... | 168 |
| Recolección de las muestras y obtención de cepas de | |


| | |
|---|-----|
| <i>Bacillus</i> | 168 |
| Aislamientos de cepas nativas de bacilos..... | 168 |
| Caracterización fenotípica..... | 169 |
| Extracción de ADN..... | 170 |
| Secuenciación de genes <i>16S rRNA</i> | 171 |
| Análisis de las secuencias..... | 171 |
| Análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de genes que codifican toxinas en las cepas nativas..... | 172 |
| Caracterización biológica: Rango de hospedador..... | 173 |
| Resultados..... | 175 |
| Obtención de Cepas nativas de <i>Bacillus</i> | 175 |
| Caracterización fenotípica..... | 175 |
| Análisis de las secuencias del gen <i>16S rRNA</i> | 178 |
| Análisis de la presencia de genes que codifican proteínas tóxicas en <i>B. sphaericus</i> | 180 |
| Caracterización biológica de los aislamientos..... | 182 |
| Discusión..... | 185 |
| DICUSIÓN GENERAL Y CONNCLUSIONES | 191 |
| PERAPECTIVAS FURTURAS | 194 |
| REFERENCIAS | 196 |


| |
|------------------------|
| Agradecimientos |
|------------------------|


 A mi directora de tesis, Dra. María V. Micieli por brindarme su dedicación, dirección, colaboración y apoyo profesional para la realización de esta tesis. También por acompañarme en la realización de este trabajo hasta su culminación.


 A mi co-director, Dr. Juan J. García, por darme la oportunidad de desarrollar el tema y por facilitarme elementos utilizados durante el desarrollo del trabajo.

 Al Dr. Pablo Riccillo por la identificación molecular y bioquímica de las bacterias halladas en este trabajo. Como también por la colaboración en la escritura del capítulo correspondiente.


 Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y a la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) por haber financiado mi carrera de doctorado a través de becas mediante las cuales pude cumplir con los objetivos propuestos.


 A la directora del CEPAVE, Dra. Alda González y a la co-directora Dra. Graciela Navone por haberme permitido realizar este trabajo en dicho Centro.


 Al Dr. Arnaldo Maciá, por ayudarme en la realización de experiencias a campo, en el procesamiento de datos y en la lectura crítica de este manuscrito.

 Al Dr. Sebastián Pelizza, por colaborar en la experiencia a campo realizada con *C. decemmaculatus*.


 Al Dr. Francisco Brusa, por la identificación de los Turbelarios.


 Al Profesor de Letras Darío González, por la corrección de la sintaxis de este manuscrito.


 A los Dres. Ana C. Scorsetti, Augusto Siri, Gerardo Marti, Yanina Mariottini y Margarita Rocca, por la colaboración en diferentes puntos y aspectos de este trabajo.


 Al Profesor Gustavo Rossi, por proporcionarme bibliografía relacionada a diferentes temáticas tratadas a lo largo del manuscrito.


 A las Lic. en Estadística Vilma Bisaro y Celina Beltrán, por el análisis de los datos del capítulo IV.


 Al Lic. Luis Giambelluca, por su colaboración en la toma de fotografías utilizadas en este trabajo.


 Al Lic. Emilio Topa, por los cortes histológicos.


 A las autoridades del Jardín Zoológico Municipal, por permitirme realizar ensayos en las instalaciones.

 A la Dirección de Áreas Naturales Protegidas, Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible, por permitirme tomar muestras en la Reserva Natural de Punta Lara.


 A las autoridades de la Fac. de Cs Agrarias y Forestales de la UNLP, por permitirme el acceso a la Estación Experimental de Los Hornos, como la extracción de muestras de dicho lugar.


 A las autoridades del Cementerio Municipal, por permitirme el acceso a las instalaciones para la colecta de *Ae. aegypti*.

 A la Dra. Claudia López Lastra, por proporcionarme en más de una ocasión insumos para realizar experiencias, como también material bibliográfico.

 A los jurados de esta Tesis, Dres. Ricardo Gürtler, Nicolás Schweigmann y Raúl Campos, porque sus evaluaciones mejoraron considerablemente este manuscrito.

 A todo el personal del CEPAVE, por compartir estos años.

 A mis amigos de toda la vida, por acompañarme durante este período. Especialmente a la Lic. Nadia Gardella por el diseño de la carátula.

 A mi familia, por apoyarme constantemente para que alcanzara esta meta, sin perder los valores que ellos me inculcaron como persona a lo largo de mi vida.

RESUMEN

Aedes aegypti y *Culex pipiens* se encuentran entre las principales especies de mosquitos vectores de enfermedades a nivel mundial. Ambas, son de gran importancia sanitaria en la Argentina. *Aedes aegypti*, es el principal vector del dengue y la fiebre amarilla. Está presente en la Argentina desde 1983, cuando fue confirmada su reemergencia en nuestro país. A partir de entonces comenzaron a detectarse casos de dengue hasta que el último brote de esta enfermedad en 2009 produjo 24.720 casos autóctonos confirmados por la OPS a nivel nacional. *Culex pipiens* es vector de algunas filariasis, y de importantes arbovirosis como la ocasionada por el virus del Nilo Occidental. La actividad vectorial de este mosquito se ve incrementada en zonas donde la densidad de zanjas de desagüe domiciliario es elevada, ya que este tipo de ambiente constituye un lugar propicio para su desarrollo.

De su importancia sanitaria nace la necesidad de controlar su actividad vectorial, manteniendo las poblaciones en bajas densidades. El objetivo de este trabajo fue desarrollar estrategias para el control de *A. aegypti* y *C. pipiens*, basadas en métodos biológicos, eficaces, permanentes y seguros para el ambiente, mediante el empleo de enemigos naturales presentes en las poblaciones de ambas especies. En este trabajo, fueron evaluados copéodos, turbelarios y peces como depredadores; y bacterias entomopatógenas (α -proteobacterias y bacterias esporulantes).

El estudio de los copéodos, tuvo como objetivo identificar a la comunidad de copéodos larvivoros que se desarrolla en los criaderos de mosquitos, ubicados en los alrededores de la ciudad de La Plata, para identificar nuevas especies capaces de depredar mosquitos que habitan recipientes artificiales (*A. aegypti* y *C. pipiens*). La diversidad de copéodos larvivoros fue mayor en los cuerpos de agua permanentes. *Acanthocyclops robustus*, *Diacyclops uruguayensis*, *Macrocyclus albidus* y *Mesocyclops longisetus* fueron seleccionados por su capacidad depredadora. En el laboratorio fueron evaluadas: la capacidad de depredación de ambos sexos y diferentes estadios, preferencia de especie presa, y la tasa de depredación diaria. Las hembras de estas especies de copéodos presentaron mayor capacidad depredadora. No se detectó preferencia de los copéodos hacia

ninguna de las especies de mosquitos. También se evaluó la tolerancia a la desecación y la capacidad de vivir en el agua que se acumula en los recipientes artificiales. *Diacyclops uruguayensis* y *A. robustus* sobrevivieron en las condiciones de sequía ensayadas en este estudio, pero *D. uruguayensis* mostró una menor supervivencia en el agua de recipientes artificiales. *Macrocyclops albidus* no sobrevivió en condiciones de sequía ni toleró el agua extraída de los recipientes artificiales. La supervivencia de *M. longisetus* ante estas condiciones, fue reducida. Se concluyó que las especies *D. uruguayensis* y *A. robustus* podrían ser buenos candidatos para el control de especies de mosquitos que crían en recipientes artificiales.

Otro punto evaluado en esta tesis fue la capacidad depredadora de Platemintos Turbelarios. Para seleccionar especies que pudiesen ser empleadas como agentes de control biológico de *A. aegypti* y *C. pipiens*, se llevó a cabo una búsqueda de Turbelarios en el campo. Mediante experimentos de laboratorio se evaluó la tasa de depredación diaria, la depredación diferencial de cada tamaño de depredador sobre cada estadio larval de mosquitos, la depredación selectiva sobre *A. aegypti* o *C. pipiens*, y la tolerancia de los turbelarios depredadores a la desecación y al agua de recipientes artificiales. A partir de cuerpos de agua temporales y permanentes fueron aislados e identificados: *Girardia anceps* (Tricladida paludicola, Dugesiidae), *Mesostoma ehrenbergii* y *Bothromesostoma* cf. *evelinae* (Rhabdocoela, Typhloplanoida, Typhloplanidae). Estas especies depredaron entre el 52 y 100% de las larvas de las especies de mosquitos que coexisten en el hábitat. No se detectó preferencia por las larvas de *A. aegypti* o *C. pipiens* por parte de los depredadores. Se observó una relación directa entre el tamaño del depredador y el estadio de la presa. *Girardia anceps* y *B. cf. evelinae* sobrevivieron después de un período seco a través de cocones. La tolerancia al agua de los recipientes artificiales fue mayor en *G. anceps*, por lo que podría ser un depredador adecuado para reducir poblaciones de mosquitos en recipientes artificiales mediante una estrategia inoculativa. Por este motivo, se seleccionó a *G. anceps* para realizar pruebas a campo. Fueron diseñados dos experimentos que se realizaron en el zoológico de la ciudad de La Plata. En ellos, se observó que *G. anceps* es capaz de controlar *A. aegypti* y *C. pipiens* en ovitrampas y neumáticos.

También resultó eficiente para el control de *A. aegypti* durante una temporada de cría de esta especie en condiciones de campo.

Cnesterodon decemmaculatus (Poeciliidae) fue estudiado como potencial agente de control a largo plazo, de poblaciones naturales de *C. pipiens*. En 9 zanjas de desagüe domiciliario fueron liberadas tres densidades de peces: 1, 7, y 13 peces/m². Este experimento se realizó durante dos años (2006-2008). El número de larvas de *C. pipiens* fue registrado en las zanjas, antes de la liberación. Mensualmente se registró el contenido del tracto digestivo de ejemplares de *C. decemmaculatus* y el número de crías por hembra. En ensayos de laboratorio, se evaluó si las hembras de *C. pipiens* seleccionan el sitio de ovipostura, respecto a la presencia-ausencia del depredador. Luego de 15 semanas de la liberación, se registró una reducción del 99% en el número de estados inmaduros de mosquitos en las zanjas en donde se introdujeron 13 peces/ m², y luego de 22 semanas este porcentaje se registró en zanjas con 7 peces/m². En las zanjas tratadas con 1 pez/ m², el número de larvas fue menor, pero no estadísticamente diferente al registrado en las zanjas controles. El número de crías por hembra adulta de *C. decemmaculatus* varió entre $4 \pm 1,41$ (promedio \pm De) a $7,4 \pm 0,89$. Restos de larvas de mosquitos fueron detectados en los peces colectados en enero, febrero, marzo y septiembre de 2006. Se comprobó que la probabilidad de encontrar balsas en un contenedor no depende de la presencia o ausencia de peces en él.

De la hemolinfa de larvas de *C. pipiens* fueron obtenidas α -protobacterias. Se realizaron estudios de transmisión y prevalencia del patógeno en poblaciones naturales de *C. pipiens*. La prevalencia a campo se evaluó durante 3 años de muestreo en 4 sitios diferentes. Para evaluar el modo de transmisión, larvas sanas y con lesiones en la cutícula, fueron expuestas a diferentes concentraciones bacterianas. Larvas con sintomatología de infección fueron registradas en los 4 sitios en porcentajes que no superaron el 10% y, en el laboratorio, sólo se obtuvo sintomatología de infección en las larvas que presentaron lesiones cuticulares, estos resultados sugieren que el modo de transmisión no es por ingestión. También, se determinó el status taxonómico de esta bacteria intrahemocélica por técnicas moleculares, mediante extracción de ADN

bacteriano, amplificación por PCR y secuenciación del gen *16S rRNA*. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias *16S rRNA* disponibles en bases de datos BLAST. Esta búsqueda en BLAST mostró que nuestros aislamientos tienen una elevada similitud (92%) con alfa-protobacterias del género *Aquaspirillum*. Este es el primer registro de *Aquaspirillum* como patógeno de mosquitos, ya que la información acerca de relaciones de estas bacterias con insectos es nula.

Tres aislamientos nativos de bacterias esporulantes, fueron obtenidos en este trabajo, los que se denominaron C107, C207 y C307. Estos fueron caracterizados en base a estudios morfológicos, biológicos, bioquímicos y moleculares. La morfología se estudió mediante tinciones de Gram y de verde de malaquita. Se evaluó crecimiento en diferentes fuentes de carbono y en gelatina. Se determinó la resistencia a antibióticos, el crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl y ácido bórico, actividad catalasa, hidrólisis de urea y hemólisis. Se amplificaron y secuenciaron genes *16S rRNA*. Las secuencias fueron alineadas mediante CLUSTAL V y se analizó la distancia filogenética de las cepas nativas con las cepas de referencia, por construcción de árboles filogenéticos. La presencia de genes *bin* y *mtx*, que codifican toxinas en *Bacillus sphaericus*, se examinó mediante PCR. El rango de hospedador se evaluó sobre 6 especies de mosquitos y se calculó la CL_{50} mediante análisis PROBIT. Los aislamientos C107 y C207, mostraron actividad mosquitocida. La especie más susceptible a C107 fue *C. pipiens* y *O. albifasciatus* resultó la especie más susceptible a C207. *Ae aegypti* no fue susceptible a estos aislamientos. En ellos se registró la presencia de genes *bin A*, *bin B* y *mtx*. El análisis de la secuencia de genes *16S rRNA*, junto a la morfología, características bioquímicas y biológicas, mostraron que el aislamiento C107 tiene un 99 % de similitud con *B. sphaericus* y, C207 con *B. fusiformis*. El aislamiento C307, presentó una similitud de 99% con *B. licheniformis* y no presentó actividad mosquitocida.

En conclusión, los enemigos naturales son una buena alternativa para el control de mosquitos vectores empleados en el contexto de un plan de manejo integrado, constituyendo una técnica de control segura para el ambiente.

ABSTRACT

Aedes aegypti and *Culex pipiens* are important species of mosquitoes as disease vectors worldwide. Both species have major medical relevance as vectors of human diseases such as dengue and yellow fever, and certain encephalitis and filarial worms, respectively. They usually breed in water accumulated in tanks, cemetery vases, discarded receptacles and automobile tires. *Culex pipiens* also breed in drainage ditches, and their vectorial activity is increased in areas where the drainage ditches density is high. *Aedes aegypti* is present in Argentina since 1983, when its re-emergence was confirmed in our country. Thereafter dengue cases increased until the last outbreak of this disease in 2009 with 24.720 autochthonous cases confirmed by PAHO in our country.

The general aim of this work was to search a new natural enemies for controlling *A. aegypti* and *C. pipiens*, based on biological methods, effective, permanent and safe for the environment, using natural enemies present in the populations of both mosquito species. Predators (copepods, turbellaria, and fishes), and entomopathogenics (α -proteobacteria and sporulated bacteria) as of mosquito were evaluated in this study.

I conducted a field survey with the aims of identify the local community of larvivorous copepods living in mosquito breeding sites, and search for new predator species of mosquitoes from artificial containers. The survey was made in permanent and temporary pools, rice field, drainage ditches, natural and artificial containers. Diversity of larvivorous cyclopoids was highest in permanent pools. *Acanthocyclops robustus*, *Diacyclops uruguayensis*, *Macrocyclus albidus* and *Mesocyclops longisetus* were selected by its predatory capacity on mosquito larvae. I examined predation capacity of both sexes and age of copepods, preference of predation on mosquito species, and daily predation during five days. Female copepods presented the highest predatory capacity. No predatory preference on both mosquito species was found. Copepod tolerance to desiccation and ability to withstand on water from artificial containers were also evaluated. *Diacyclops uruguayensis* and *A. robustus* survived under dry conditions, but *D. uruguayensis* showed lower survival in water from cemetery flower vases. *Macrocyclus albidus* did not

survive under dry conditions and did not tolerate water extracted from artificial containers. *Mesocyclops longisetus* survival was reduced after dryness and after being bred in water from flower vases. I conclude that the Neotropical cyclopoids *D. uruguayensis* and *A. robustus* could be viewed as good candidates and deserves further research as biological control agents of mosquitoes.

The predatory capacity of flatworms (Platyhelminthes: Turbellaria) was also evaluated in this work. To select predators flatworm species as potential biological control agents of *A. aegypti* and *C. pipiens*. I conducted a field survey. Laboratory experiments were performed to determine the daily predation rate, differential predation on each mosquito larval instars, selective predation on either *A. aegypti* or *C. pipiens*, and predator tolerance to water from artificial containers. *Girardia anceps* (Tricladida, Paludicola, Dugesiidae), *Mesostoma ehrenbergii* and *Bothromesostoma* cf. *evelinae* (Rhabdozoa, Typhloplanoida, Typhloplanidae) were found in temporary puddles and permanent pools. In the laboratory, they killed between 52 and 100% of immature mosquitoes coexisting in the same habitat. No preference of flatworms for mosquito preys was detected. Predation rate was related to predator size and instars of preys. *Girardia anceps* and *B. evelinae* survived after a dry period and when re-flooding occurred, they laid eggs. Tolerance to water from artificial containers was highest in *G. anceps* and this species could be a suitable predator to reduce mosquito populations from artificial containers using an inoculative approach. For this reason, I selected *G. anceps* for further field studies. Two experiments were designed to be performed at the zoo in the city of La Plata. As a result, I found that *G. anceps* is able to control *A. aegypti* and *C. pipiens* in oviposition traps and tires under manipulated natural conditions. It also proved to be effective as a biological control agent of *A. aegypti* along a breeding season of this species at field conditions.

The native mosquito fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Poeciliidae) was released into suburban drainage ditches in order to evaluate its potential as a long-acting agent for the control of *C. pipiens* larvae in natural breeding sites. The inoculation of predatory fishes was made in 9 ditches at three densities: 1, 7, and 13 fish/m². The experiment was conducted during a

period of 2 years (2006—2008). The number of immature stages of *C. pipiens* was recorded before and after release. Fifteen weeks after release, a 99% reduction in the number of immature stages was registered in the drainage ditches containing 13 fish/m², while at 22 weeks, a value of 99% was also observed in those with 7 fish/m². The ditches with 1 fish/m² showed reductions in the density of immature stages relative to the controls, but over the entire experiment these diminutions did not prove to be statistically significant. On a monthly basis, the digestive tract contents of some fish and the average number of offspring from the females were recorded. The number of offspring registered per adult *C. decemmaculatus* female ranged from 4 ± 1.41 (mean \pm SD) to 7.4 ± 0.89 . Larval remains were detected in fishes collected in January, February, March, June, and September of 2006. A bioassay was performed to evaluate if *C. pipiens* females were able to choose oviposition sites according to the presence or absence of predators. The probability of finding rafts was not significantly different in containers with or without *C. decemmaculatus*.

An α -proteobacteria was obtained from the *C. pipiens* hemolymph larvae. Studies of pathogen transmission and prevalence in natural populations of *C. pipiens* were performed. Field prevalence was evaluated during 3 years in 4 drainage ditches. Larvae with symptoms of infection were recorded in the 4 sites but the percentages of infection never reached 10%. The transmission pathway, was assess at laboratory conditions. *Culex pipiens* healthy larvae exposed to a large bacteria suspension from axenic culture were not infected larvae that presented tegument injuries and exposed to the bacteria suspension, became infected and showed similar symptoms than the field collected infected larvae. These results suggest that the transmission is not *per os*. The majority of infected larvae with such sintomatology died in IV instar. Also, I determined the taxonomic status of these intrahemocelic bacteria by molecular techniques: bacterial DNA extraction, PCR amplification and sequencing of *16S rRNA* gene. The sequences obtained were compared with *16S rRNA* sequences available in BLAST databases. The BLAST search showed that our isolates have high similarity (92%) with α -proteobacteria of the genus *Aquaspirillum*. This is the first record of *Aquaspirillum* sp. as pathogen of mosquito larvae. Bacteria

belonging to this genus are widely distributed in different aquatic environments, but the information about relationships of these bacteria and insects is scarce.

Three native isolates of sporulating bacteria, called C107, C207 and C307 were obtained. These were characterized on the basis of morphological, biological, biochemical and molecular studies. The morphology was studied by Gram staining and malachite green. I assessed growth in cultures using different carbon sources and gelatin. I determined the antibiotic resistance, growth in different concentrations of NaCl and boric acid, catalase activity, the ability to hydrolyzed urea and produce hemolysis. The amplification and sequencing of *16S rRNA* genes were performed. The sequences were aligned using CLUSTAL V and the phylogenetic distance of these native strains respect to reference strains was analyzed. The presence of *bin* and *mtx* genes that encode toxins in *Bacillus sphaericus* was examined by PCR using specific primers. The host range was assessed on 6 mosquito species. Lethal concentration₅₀ (LC₅₀) was calculated by PROBIT analysis. The isolates C107 and C207 showed mosquitocidal activity. *C. pipiens* was the most susceptible species to C107 while *O. albifasciatus* was to C207. *Ae aegypti* was not susceptible to these native strains. The presence of genes *bin A*, *bin B* and *mtx* were recorded. The analysis of the 16S rRNA gene sequence, the morphology, biochemical and biological characteristics showed that C107 strain has a 99% of similarity with *B. sphaericus* and C207 with *B. fusiformis*. The isolation C307 presented a 99% of similarity with *B. licheniformis* and had no mosquitocidal activity.

In conclusion the natural enemies are an alternative, environmentally safe, for control of mosquitoes vectors as part of integrated control program.

| |
|---------------------|
| INTRODUCCIÓN |
|---------------------|

Los culícidos constituyen uno de los grupos de insectos más importante constituido por un gran número de especies, muchas de las cuales tienen importancia sanitaria debido a que son vectores de enfermedades tropicales tales como, malaria, filariasis, encefalitis, fiebre amarilla, dengue y otras arbovirosis. Más de la mitad de la población mundial vive en áreas de riesgo de contraer enfermedades transmitidas por mosquitos, las que causan varios millones de muertes anuales en el mundo.

Aedes aegypti (L.) y *Culex pipiens* (L.) son dos de las principales especies vectoras en amplias regiones del mundo, incluida la Argentina. *Aedes aegypti* es el vector principal del dengue y fiebre amarilla urbana en América. Su distribución actual en la Argentina tiene como límite sur las provincias de Buenos Aires y La Pampa. La actividad vectorial de *C. pipiens* en la Argentina no ha sido investigada, aunque es uno de los principales vectores de filariasis y de virus del Nilo Occidental en el mundo.

En la provincia de Buenos Aires, *A. aegypti* y *C. pipiens* son dos de las especies de mosquitos de mayor importancia sanitaria. *Aedes aegypti*, está presente en la mayoría de los partidos bonaerenses al norte del Partido de Brandsen y La Plata, siendo (actualmente Olavarria el límite sur de su distribución (36°50´). En la Provincia de Buenos Aires durante el período 2008-2009, se registraron 108 casos, 14 de los cuales se confirmaron como autóctonos. Las poblaciones del vector han crecido notablemente en la provincia asociada a la enorme variedad de sitios de cría del mismo (recipientes artificiales, cubiertas de automóviles, etc.). Este crecimiento en conjunto con la gran movilidad que se registra en la región de ciudadanos provenientes de áreas endémicas de dengue, como el norte argentino, Paraguay y Brasil, genera áreas de riesgo sanitario.

Culex pipiens es conocido por las molestias permanentes que causan a los habitantes de áreas cercanas a los criaderos del mosquito en la Provincia de Buenos Aires. Las zanjas de drenaje domiciliario de las áreas suburbanas constituyen una de las principales fuentes de cría de *C. pipiens*. Aquellas zonas donde existe una gran cantidad de zanjas y por lo tanto elevadas densidades poblacionales de *C. pipiens*, presentan prevalencias superiores

al 80% de dirofilariasis canina producida por el gusano del corazón del perro, *Dirofilaria immitis* (Elidy), que afecta a perros y ocasionalmente al hombre (Caballer *et al.*, 1994)

De su importancia sanitaria nace la imperiosa necesidad de controlar la actividad vectorial de los mosquitos manteniendo en bajas densidades las poblaciones, por lo que la Organización Mundial de la Salud recomienda y enfatiza el control de estos vectores, incluyendo tanto las estrategias de control de estados inmaduros como de adultos, mediante métodos culturales, químicos y biológicos. Los métodos químicos han sido utilizados ampliamente para controlar a los culícidos y resultan eficaces en el corto plazo y en situaciones de brote epidémico, pero en general, son poco efectivos en el mediano y largo plazo, poseen baja o nula especificidad, producen desarrollo de resistencia en los insectos y deterioran el ambiente.

Por las desventajas que presenta del uso excesivo y/o exclusivo de los métodos químicos se ha promovido la búsqueda de nuevas herramientas para regular la densidad de los culícidos vectores. El uso de los enemigos naturales para el control es una alternativa segura para el ambiente, específica y puede ser eficaz a largo plazo.

En el mundo se han citado como causantes de mortalidad en culícidos, virus, bacterias, protozoos, hongos, nemátodos y depredadores (Chapman, 1985; Jenkins, 1964; Roberts y Castillo, 1980; Roberts y Strand, 1977; Roberts *et al.*, 1983). Algunos de estos han sido utilizados con éxito e inclusive se han convertido en productos comerciales como *Bacillus thuringiensis* (Berliner) var. *israelensis* de Barjac (Bti) y *Bacillus sphericus* Neide (Bs). También son muy abundantes los ejemplos referentes a la utilización del pez larvívoro *Gambusia affinis* (Baird y Girard), y de copépodos ciclopoideos para el control de mosquitos. (Weiser, 1991)

En la Argentina los enemigos naturales de *A. aegypti* y *C. pipiens* han sido poco estudiados. Se ha citado el nemátodo *Strelkovimermis spiculatus* (Poinar y Camino) y el microsporidio *Hazardia milleri* (Hazard y Fukuda), en larvas de *C. pipiens* (García y Camino, 1990). Los estudios sobre el mencionado microsporidio se restringen sólo a su identificación. En las

larvas de *A. aegypti* sólo ha sido citada *Ascogregarina culicis* (Dellapé *et al.*, 2005).

En cuanto a los depredadores, se realizaron evaluaciones preliminares de la capacidad depredadora de adultos del copépodo *Mesocyclops annulatus* (Wierzejski) sobre larvas de *A. aegypti* en el laboratorio (Micieli *et al.*, 2002, Marti *et al.*, 2004).

Por la ausencia de conocimiento acerca de los enemigos naturales de las principales especies vectoras de nuestra región, como *A. aegypti* y *C. pipiens*, en este trabajo se plantea un seguimiento de las poblaciones naturales de ambas especies de mosquitos, intensificando la búsqueda de enemigos naturales, su aislamiento y su evaluación en pruebas de laboratorio y a campo, para su potencial uso como agentes de control biológico.

| |
|---------------------|
| ANTECEDENTES |
|---------------------|

Importancia sanitaria de los culícidos

La Familia Culicidae, perteneciente a la Clase Insecta y al Orden Diptera, es el grupo de insectos de mayor importancia sanitaria e incluye más de 3.500 especies en todo el mundo. Los culícidos han recibido particular atención desde el punto de vista sanitario, debido al comportamiento que presentan las hembras de la mayoría de las especies, las cuales son hematófagas; por lo que necesitan ingerir sangre de aves y mamíferos para el desarrollo de los huevos y la ovipostura. Por medio de picaduras pueden transmitir un amplio espectro de parásitos y patógenos (virus, protozoos y nemátodos) tanto a animales como al hombre, resultando ser vectores de importantes enfermedades.

La OMS estima que la mitad de la población mundial, más de 3.000 millones de personas, viven en áreas de riesgo de contraer enfermedades transmitidas por culícidos (OMS, 2004). Estos insectos transmiten los agentes etiológicos de paludismo, filariasis y varias arbovirosis (dengue, fiebre amarilla y encefalitis) que dan como resultado 540 millones de enfermos en el mundo por año, muchos de los cuales pueden ser fatales. Además producen inconvenientes que dificultan las actividades en amplias zonas muy productivas del planeta. Esto se debe a que los estados inmaduros de culícidos se desarrollan en una amplia variedad de ambientes acuáticos tanto naturales como artificiales, permanentes como temporarios (Laird, 1988).

La situación continental referida a las enfermedades transmitidas por culícidos es compleja, con cientos de miles de casos de dengue anuales, un incremento manifiesto de los casos de fiebre amarilla y la rápida distribución del virus del Nilo occidental (WNV), ingresado al continente americano en 2000 (Rossi y Almirón, 2004).

La arbovirosis más importante transmitida por los mosquitos y que afecta al hombre, es el dengue. Es provocada por un virus ARN de la familia Flaviviridae. Este virus posee cuatro serotipos (Den1, Den2, Den3 y Den4) y

los cuatro circulan en el continente americano, donde los casos de dengue han aumentado de 322.256 de dengue clásico y 5.216 de dengue hemorrágico en 1999 con 82 muertos (OPS, 1999), a 613.893 casos que corresponden a dengue clásico, 11.601 a dengue hemorrágico y 211 muertes en 2009 (OPS, 2009). Los principales vectores del dengue son los culícidos *A. aegypti* y *Aedes albopictus* (Skuse). Esta enfermedad tiene dos manifestaciones, el dengue clásico y el dengue hemorrágico; las cuales conjuntamente producen 50 millones de infectados por año. Se estima que 500.000 personas anualmente contraen los casos más serios de dengue y que alrededor de 21.000 personas mueren a causa de la enfermedad (WHO, 2007).

Aedes aegypti, es también el principal vector de la fiebre amarilla, arbovirosis provocada por un virus que al igual que el dengue pertenece a la Familia Flaviviridae. Esta enfermedad consta de dos ciclos: la fiebre amarilla urbana y la selvática. *Aedes aegypti* es el vector responsable del ciclo urbano de la enfermedad, haciendo posible el contagio de la misma entre personas. La fiebre amarilla selvática es una enfermedad que involucra a los monos como una forma de contribuir al mantenimiento y transmisión del virus. Este arbovirus puede ser transmitido al hombre cuando se introduce ocasionalmente en el hábitat selvático; siendo responsables de la transmisión las especies de mosquitos pertenecientes a los géneros *Haemagogus*, como *Haemagogus capricornii* (Lutz), *Haemagogus janthinomys* (Dyar), *Haemagogus leucocelaenus* (Dyar y Shannon), *Haemagogus spegazzinii* (Brèthes). *Aedes*, principalmente *A. aegypti*, *A. albopictus* y *Sabethes*, en particular *Sabethes chloropterus* (Humboldt) (Salvatella Agrelo, 1996; Goddard, 2000; Rossi y Almirón, 2004.). El norte de América del Sur es actualmente la zona más afectada por fiebre amarilla (Goddard, 2000), la OMS recomienda la vacunación masiva en países del cono sur, incluyendo a la Argentina, debido a que es una zona de riesgo y si bien en zonas endémicas los niveles de mortalidad por fiebre amarilla no superan el 5%, en situaciones de epidemias la tasa de mortalidad puede superar el 50% (Benenson, 1995).

Otro grupo de arbovirosis transmitidas por culícidos a aves y mamíferos, inclusive al hombre, se agrupan dentro del término encefalitis. Una de las más importantes es aquella cuyo agente etiológico es el Virus del Nilo Occidental, cuyos vectores más importantes corresponden al género *Culex* y fue detectado en este continente recién en 1999 en Estados Unidos. En cuanto a las posibles vías de ingreso al continente americano se pueden mencionar, el ingreso de mosquitos infectados en barcos o aviones, y la importación de aves (Komar *et al.*, 2006). La Encefalitis Equina del Este es una de las arbovirosis más severas, pudiendo provocar entre 30 y 60 % de mortalidad en équidos y en humanos. Entre otras, hay que destacar las encefalitis de San Luis, Equina de Venezuela, LaCrosse y Equina del Oeste (Goddard, 2000).

La malaria o paludismo, cuyos agentes etiológicos son protozoos del género *Plasmodium*, es transmitida de persona a persona por culícidos del género *Anopheles*; este vector provoca entre 300 y 500 millones de casos de infecciones anuales, de los cuales uno a dos millones resultan mortales, sobre todo en niños pequeños (OMS, 2004).

Las enfermedades transmitidas por culícidos, cuyos agentes etiológicos son nemátodos filarioideos, son denominadas filiarisis. Las filiarisis más importantes son causadas por *Wuchereria bancrofti* (Cobbold) que produce la filiarisis bancroftiana, ampliamente distribuida en el continente americano y que es transmitida al hombre por mosquitos de los géneros *Culex*, especialmente la especie *C. pipiens*; *Anopheles* y *Aedes* (Marcquardt *et al.*, 2000). Otra importante filaria es *Brugia malayi* (Brug) que es transmitida al hombre por diferentes especies de culícidos de los géneros *Mansonia*, *Anopheles* y *Aedes*, cuya distribución corresponde mayormente a los continentes asiático y africano (Marcquardt *et al.*, 2000). *Dirofilaria immitis*, es transmitida por *C. pipiens* (García, 2001) y es la responsable de la filiarisis del corazón de los perros. Provoca severos daños en estos animales y, en algunas situaciones, en el hombre. Existen 1100 millones de personas que viven en áreas de riesgo de filiarisis, en más de 76 países en el mundo y existen actualmente 120 millones de personas infectadas por filarias (OMS, 2004).

Sumadas a todas estas enfermedades que pueden transmitir los culícidos, están las molestias causadas cuando la densidad de adultos es elevada, ya que producen pérdidas económicas en la actividad agrícola-ganadera, pues dificultan la recolección manual de frutas y verduras, reducen la producción de leche y carne, como así también afectan notablemente las actividades al aire libre en áreas turísticas (McClelland, 1984).

Situación en la Argentina

Son más de 200 las especies de culícidos citadas para la Argentina en la actualidad (Darsie, 1985; Rossi *et al.*, 2006) aunque el número de especies reconocidas como vectoras de enfermedades o como especies que dificultan las actividades económicas humanas, es reducido y bastante menor al número de especies citadas. Las especies que en la actualidad merecen especial atención, en la Argentina, por su capacidad vectorial son *A. aegypti*, *A. albopictus*, *Anopheles darlingi* (Root), *Anopheles pseudopunctipenis* (Theobald), *C. pipiens* y *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquardt). La necesidad de realizar estudios para la identificación de vectores de arbovirosis, como también de especies del género *Anopheles* por su capacidad vectorial del agente etiológico del paludismo, dará sin duda como resultado un incremento en el número de especies citadas hasta hoy como importantes vectores en el territorio argentino.

El dengue es la arbovirosis de mayor importancia en nuestro país, ya que su vector, *A. aegypti* encuentra un ambiente favorable para su desarrollo en 16 provincias argentinas, siendo el límite sur las provincias de Buenos Aires y La Pampa (Curto *et al.*, 2002). Una importante epidemia de dengue fue registrada en la Argentina en el año 1916 en Concordia y Paraná (Entre Ríos) (Gaudino, 1916). En 1965, se confirmó en la Argentina la erradicación del mosquito transmisor, junto con otras 48 naciones, como resultado de campañas realizadas por la Organización Panamericana de La Salud (OPS) luego de 18 años de ser implementadas. La interrupción de estas campañas

condujo a una re-emergencia de la enfermedad por nuevas invasiones del culícido vector, registrándose brotes de dengue durante febrero y marzo de 1998 en Tartagal (Salta) y, en Misiones, en mayo de ese mismo año. Según la información de la cartera de salud de marzo de 2007, se detectaron 192 casos de dengue, de los cuales 8 fueron reconocidos como autóctonos (ANSA). Los casos de dengue en la provincia de Buenos Aires, registrados hasta el 19-03-07 fueron 57 según el Ministerio de Salud Bonaerense (Ricci y Padín, 2007).

Durante el brote de dengue, registrado en 2009, el Ministerio de Salud de la Nación, confirmó 24.720 casos, de los cuales 6 fueron de dengue hemorrágico, 3 resultaron mortales y 2 de ellos con síndrome de choque. Se estima que en la próxima temporada de cría de *A. aegypti*, el número de casos de dengue hemorrágico, aumentará considerablemente.

Otro importante vector de esta enfermedad y otras arbovirosis como fiebre amarilla, virus de Mayaro, virus de Oropouche y varias encefalitis como la Equina del Este, Equina del Oeste y Encefalitis de San Luis, es *A. albopictus*, detectado en 1998 en la Argentina (Rossi *et al.*, 1999), lo cual complica aun más la situación sanitaria tanto de nuestro país como del resto de América, ya que esta especie tolera condiciones ambientales más extremas que *A. aegypti*, por lo que podría llegar a tener una distribución mucho más amplia (OPS, 1987).

En la Argentina es escasa la información sobre virus de encefalitis y sus vectores. Epizootias de Encefalitis Equina, que han afectado principalmente a la provincia de La Pampa, han sido registradas desde 1908 (Sabattini *et al.*, 1985). Durante los años 1982-1983 se registró en la provincia de Santa Fe una epizootia de Encefalitis Equina del Oeste, que se extendió hasta la provincia de Río Negro, y si bien la aparición de casos humanos fue rara, las pérdidas económicas fueron importantes (Sabattini *et al.*, 1985). En el año 2002, después de varios años de ausencia en el territorio argentino, se registraron casos de encefalitis de San Luis en la ciudad de Córdoba (Spinsanti *et al.*, 2003)

En la Argentina, el número de enfermos de paludismo supera los 400 por año, siendo las especies *A. darlingi* y *A. pseudopunctipenis* las

principales responsables de la transmisión de esta enfermedad en la región palúdica que actualmente se encuentra reducida a focos en el norte de Argentina, representado por las provincias de Salta, Jujuy y Misiones (Dantur Juri *et al.*, 2003).

La identificación de vectores de filariasis y los casos de estas enfermedades en humanos y animales domésticos, ha sido poco investigada en nuestro país. En las provincias de Chaco, Formosa, Corrientes y Buenos Aires, fueron realizados estudios de prevalencia de filariasis canina y se observó que la misma alcanza un 80% de los casos estudiados (Lighthowler *et al.*, 1992; Meyer y Milanta, 1997).

La actividad vectorial de *C. pipiens* en la Argentina no ha sido investigada exhaustivamente. Ha sido incriminado como vector de virus de encefalitis y de *D. immitis*, habiéndose registrado casos de dirofilariasis immitis pulmonar en humanos, en las provincias de Buenos Aires y Corrientes (Barcat *et al.*, 1999; Caballer *et al.*, 1994).

Por último es necesario mencionar los inconvenientes ocasionados por la proliferación de los adultos de *O. albifasciatus*, (conocido como "el mosquito de las inundaciones"). Amplias áreas urbanas y rurales de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, La Pampa, Mendoza, Río Negro y Santa Fe, sufren en primavera y otoño; el incremento poblacional de esta especie de culícido que ocasiona la muerte de terneros en zonas de cría, pérdidas en la producción de carne y leche, encarecimiento de la recolección de frutas y hortalizas e imposibilidad de actividades al aire libre en áreas recreativas (Prosen *et al.*, 1960; Hack *et al.*, 1978; Gleisser *et al.*, 1997).

Control de culícidos

Las enfermedades e inconvenientes (descritos en los puntos anteriores) causados por la proliferación de culícidos, hacen indispensable un control de los mismos mediante el uso de agentes químicos o biológicos. Dentro de los agentes químicos, los adulticidas son considerados menos efectivos que los

larvicidas, pero resultan útiles durante un brote, para el control de adultos que causan molestias y transmiten enfermedades. El uso de adulticidas junto a una buena estrategia de control de las larvas llevan a un mejor resultado en los programas de control (Becnel y Floore, 2007).

Los adultos son controlados mediante la aplicación terrestre o aérea de insecticidas químicos, pero las picaduras de éstos pueden ser prevenidas a nivel personal con el uso de repelentes en la piel, ropa que cubra la mayor parte del cuerpo, mosquiteros, etc. (McClelland, 1984).

Para el control de larvas, se han empleado hasta el momento diferentes métodos que consisten en control cultural, químico y biológico.

Los métodos culturales son y han sido empleados en diferentes partes del mundo en planes de control que requieren gran esfuerzo de organización y educación comunitaria, pero que resultan preventivos, eficaces y económicos. Estos planes tienen como objetivo principal el saneamiento ambiental mediante la reducción o eliminación de los sitios de cría de culícidos. Este método es utilizado principalmente en planes de control de *A. aegypti* (Montada Dorta *et al.*, 2005).

El control biológico consiste en el empleo de enemigos naturales (depredadores, parásitos, parasitoides y patógenos), con el objetivo de disminuir la densidad poblacional de insectos perjudiciales, por debajo del umbral de transmisión de enfermedades o de daño económico. Los agentes biológicos empleados en este tipo de control tienen características que los hacen altamente favorables: no contaminan el ambiente, son altamente específicos atacando solo sobre organismos blanco y persisten en el ambiente por largos períodos de tiempo, algunos de ellos se autodispersan permitiendo el control en lugares inaccesibles. El costo elevado de la cría de los agentes de control y el de la aplicación en el campo, son desventajas importantes que hacen que este tipo de control sea poco accesible.

La bibliografía a nivel mundial sobre enemigos naturales de culícidos y su uso como agentes de control es abundante. Se han citado numerosos hongos, virus, bacterias, nematodos, protozoos y depredadores, tanto de estados inmaduros como de adultos. (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; Mogi, 2007; Tseng, 2007; Platzler, 2007).

Los productos químicos más elegidos por su efectividad para el control de estadios inmaduros de culícidos han sido los insecticidas, los cuales son empleados desde principios del siglo XX. Uno de los primeros en utilizarse fue la piretrina en polvo como se hizo en la campaña contra fiebre amarilla en Cuba y Panamá, donde las casas fueron tratadas con el producto mencionado y los criaderos del vector rociados con petróleo (OPS, 1999). En la década del '40, el producto más utilizado en los programas contra culícidos vectores fue el DDT dadas sus propiedades insecticidas, hasta que 20 años más tarde su efecto disminuyó enormemente por la resistencia de las plagas a este producto. Para este momento ya se conocían en el mundo otros productos que aun hoy se utilizan, como fentión, malatión, fenitrotión y temefós (OPS, 1999).

El uso de insecticidas químicos de amplio espectro está disminuyendo progresivamente en muchos países, debido a que la aplicación prolongada en dosis crecientes, ha provocado contaminación ambiental (tanto de aguas como de tierras cultivadas), con efectos peligrosos y preocupantes en organismos no blanco. Por otro lado, las poblaciones de insectos vectores tratadas con este tipo de productos, no fueron totalmente erradicadas, retornando y desarrollando resistencia a muchos insecticidas (Georghiou y Saito, 1983). Este uso inapropiado de productos químicos derivó en la necesidad de aplicar dosis cada vez más elevadas.

Es necesario hallar una técnica que permita el control de insectos vectores y no perjudique a la naturaleza, por lo que en los últimos años la búsqueda de un control de insectos, que sea seguro y compatible con el ambiente, se ha intensificado enormemente (Weiser, 1991; Tanada y Kaya, 1993; Lacey y Brooks, 1997).

Enemigos naturales de los culícidos

El control biológico se basa en el uso de enemigos naturales que incluyen depredadores, patógenos y parásitos. En la bibliografía acerca de esta estrategia para el control de dípteros culícidos son descritos numerosos virus, bacterias, hongos, protozoos, nemátodos y depredadores; tanto de estadios inmaduros como adultos de culícidos (Jenkins, 1964; Robert y Strand, 1977; Roberts y Castillo 1980; Roberts *et al.*, 1983; Weiser, 1991).

Entre los depredadores de estados inmaduros de mosquitos se han citado peces, larvas de mosquitos, copépodos, turbelarios, hemípteros, coleópteros y odonatos.

Los más citados por la cantidad de estudios realizados hasta el momento, son los peces larvívoros, siendo *G. affinis* el pez larvívoro más utilizado en el mundo como regulador de los estadios inmaduros de culícidos (Hoy y Reed, 1971; Davey y Meisch, 1977; Bay, 1985; Meish, 1985; Walton, 2007).

Las larvas de mosquito del género *Toxorhynchites*, por su capacidad larvívora, son utilizadas para el control de estados inmaduros de otros culícidos. Presentan la ventaja de habitar en los mismos ambientes que los culícidos a controlar (contenedores naturales y artificiales). Los adultos no son hematófagos, sino que se alimentan de jugos vegetales, por lo tanto no resultan perjudiciales para el hombre (Focks, 2007).

La capacidad de ciertos copépodos ciclopoideos de depredar estadios larvales tempranos de mosquitos es muy conocida (Marten y Reid, 2007), y en los últimos años, el uso de copépodos en recipientes artificiales ha sido reportado como un método eficaz en la erradicación de *A. aegypti* (Marten, 1990a, Nam *et al.*, 1998, Kay y Nam, 2005)

Los Platelminetos turbelarios (Tricladidos y Rabdochoelos) depredadores de larvas de mosquitos, han sido evaluados en países como Estados Unidos (Legner, 1985, 1995), Brasil (Melo y Andrade, 2001), Canadá (George *et al.*, 1983) y Malasia (Loh *et al.*, 1992). Los Tricladidos más estudiados pertenecen al género *Dugesia*, los cuales capturan a su presa de forma directa, atrapándola en una secreción mucosa (Meyer y Learnd, 1981;

Mckee *et al.*, 1997). Entre los menos estudiados Rabdochoelios, *Mesostoma* es el género más conocidos, depreda larvas de *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, y *Culiseta* en ensayos de laboratorio, mediante captura directa, trampas de mucus y toxinas liberadas al agua (Kolasa, 1984; Wrona y Koopowitz, 1998).

El número de patógenos y parásitos de mosquitos estudiados y evaluados como controladores biológicos, ha aumentado considerablemente en los últimos años. Entre ellos se han estudiado virus, bacterias, protozoos, hongos y nemátodos (Chapman, 1985).

Los virus comúnmente encontrados en mosquitos son, los baculovirus (NPVs) (Baculoviridae: Nucleopoliedrovirus), los reovirus o virus poliédricos citoplasmáticos (CPVs) (Reoviridae: Cypovirus), los densovirus (DNVs) (Parvoviridae: Brevidensovirus) y los iridovirus (MIVs) (Iridoviridae: Chloriridovirus). Los baculovirus, densovirus e iridovirus, son ADN virus mientras que los cypovirus son los principales ARN virus en mosquitos. (Becnel y White, 2007).

Las bacterias entomopatógenas no son comunes en las poblaciones de mosquitos, pero algunas bacterias que se encuentran en el suelo, resultan altamente patogénicas para estas larvas, siendo inofensivas para el hombre. Las más estudiadas y utilizadas, pertenecen al género *Bacillus* y se caracterizan por formar esporas, ser gram-positivas, y ser bacterias aeróbicas encontradas en diversos hábitat (Lacey, 2007). El denominado Bti es el producto obtenido de la fermentación de la bacteria *B. thuringiensis* var *israelensis* H 14, siendo el producto biológico más aceptable para el control de culícidos en la actualidad. La inclusión parasporal, conocida también como cuerpo parasporal y cristal, que forma esta bacteria en el momento de la esporulación, contiene una toxina con alto poder larvicida que se activa exclusivamente en un ambiente alcalino como tienen los dípteros del suborden Nematocera en el tubo digestivo. (Lacey y Lacey, 1981; Lacey y Singer, 1982; Mc Laughlin y Billodeaux, 1983; Thiery y Frachon, 1997; Skovmand *et al.*, 1998; Follet y Duan, 2000; Federici *et al.*, 2007). *Bacillus sphaericus* es otra de las especies de este género, que presenta actividad mosquitocida por la toxina producida por sus células vegetativas (Lacey y Lacey, 1981; Lacey, 2007).

Formulados comerciales, elaborados en base a toxinas de *Bti* y *B. sphaericus*, han llegado al mercado en diferentes formulaciones siendo uno de los productos biológicos comerciales más ampliamente empleados en el control no-químico de larvas de mosquitos vectores (Lacey y Kaya, 2000; Federici *et al.*, 2007; Lacey, 2007).

Los protozoos, representan otro importante grupo de entomopatógenos. Entre los protozoos parásitos de mosquitos podemos mencionar: ciliados, gregarinas y flagelados. Ciliados pertenecientes a los géneros *Chilodonella*, *Lambornella* y *Tetrahymena* han sido hallados en varias oportunidades parasitando larvas de culícidos (Grassmick, 1973; Corliss y Coats, 1976; Dzerzhinskii y Dubitskii, 1977). La presencia de flagelados en culícidos no ha sido registrada con frecuencia, siendo las especies más representativas *Crithidia fasciculata* (Leger) y *Blastocrithidia culicis* (Novy, Mc Neal y Torry) (Weiser, 1991).

Entre los nematodos, los únicos que han sido identificados a partir de infecciones naturales de culícidos pertenecen a la familia Mermithidae, superando en el presente las 80 especies descritas (Pettersen, 1985). *Romanomermis culicivorax* (Ross y Smith) es la especie parásita de mosquitos más estudiada. Presenta una alta especificidad por estos hospedadores, aunque otras familias de dípteros pueden ser infectadas (Pettersen, 1985). El uso de nemátodos para el control biológico de culícidos se sustenta en su capacidad de adaptación a nuevos ambientes y a condiciones adversas, por su resistencia a los productos químicos, por su especificidad hacia el insecto blanco siendo inocuo para otros animales y por su capacidad de actuar en forma sinérgica con otros entomopatógenos que aumentan su eficacia (Stock y Camino, 1996).

Otro importante grupo de patógenos de culícidos lo constituyen los hongos. Estos entomopatógenos son microorganismos ampliamente estudiados en todo el mundo, existiendo más de 700 especies reunidas en 100 géneros. Los hongos tienen la particularidad de parasitar diversos tipos de artrópodos en el hábitat acuático y terrestre (Humber, 1997). Entre los más importantes se pueden citar *Culicinomyces clavispurus* (Couch), *Coelomomyces spp.* (Roberts, 1974; Lacey y Undeen, 1986; Federici, 1995; Lacey, 1997; Humber, 1997; Kerwin, 2007), y *Lagenidium giganteum*

(Couch). *Culicinomyces clavisporus*, patógeno de larvas de mosquitos, ha sido encontrado parasitando larvas de *Anopheles quadrimaculatus* (Say) y *A. amictus* (Edwards) (Lecuona, 1996). Al género *Coelomomyces* pertenecen más de 70 especies de hongos acuáticos parásitos obligados. La patogenicidad de *Coelomomyces* está enteramente restringida a larvas de dípteros acuáticos, *Psychodidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Tabanidae* y *Culicidae* (Lead y Pedroso, 1964; Chapman, 1974; Roberts, 1970). *Lagenidium giganteum* es una de las especies de hongos patógenas de insectos acuáticos, sobre todo de los géneros *Culex* (Merrian y Axtell, 1982; Jaronski *et al.*, 1983.), *Mansonia* (Cuda *et al.*, 1997) y *Anopheles* (Kerwin y Washino, 1986) más estudiada a nivel mundial. Un producto disponible en el mercado, cuyo nombre comercial es Laginex^{MR}, se ha obtenido a partir de esta especie.

Los microsporidios, clasificados por Cavalier-Smith (2000b) como integrantes del Reino Fungi (anteriormente protozoos), son parásitos intracelulares obligados, exclusivos de otros organismos eucariotas, que poseen un mecanismo único y altamente especializado para invadir las células del hospedador, mediante esporas. La espora es el único estado en el cual estos microorganismos pueden vivir fuera del hospedador, son las responsables de la transmisión horizontal entre hospedadores (mediante ingestión), de la transmisión vertical (transovárica) entre el hospedador y su descendencia, y constituyen un carácter diagnóstico para la identificación de las especies (Keeling y Fast, 2002). En culícidos han sido descritas decenas de especies pertenecientes a 23 géneros, siendo los géneros heterospóricos *Amblyospora* y *Parathelohania* los más representados por el número de especies descritas (Sprague, 1977; Becnel y Andreadis, 1999; Andreadis, 2007).

Entre los organismos acuáticos pertenecientes al Reino Straminipila (antes hongos acuáticos) podemos mencionar: *Aphanomyces*, *Leptolegnia chapmanii* (Seymour), *L. caudata* Bary, *Pythium flevoense* (Van Der Plaats-Niterink), *P. carolinianum* (Matthews), *Crypticola clavulifera* (Humber, Frances y Sweeney), *Aphanomyces astaci* (Schikora), *Saprolegnia ferox* y *S. parasitica* (Coker). Muchas de estas especies se han encontrado infectando larvas de mosquitos, cumpliendo un rol de parásitos facultativos,

pero han recibido limitada atención ya que resultan ser patógenos oportunistas débiles en condiciones de "stress" y solo actúan como patógenos ocasionalmente (Seymour y Briggs, 1985).

Enemigos naturales de culícidos en la Argentina, conocimiento actual

En la Argentina el estudio de parásitos y patógenos de mosquitos, comenzó a realizarse en la década del 80. A pesar de que el conocimiento de los enemigos naturales de culícidos pretende la incorporación de los mismos en programas para el control, hasta los años 90 en nuestro país la información acerca del tema era escasa y se limitaba al hallazgo y la ubicación taxonómica de los parásitos, patógenos y depredadores (García 1989; García y Camino, 1990; García y López Lastra 1989; López Lastra 1990 a, b; Poinar y Camino 1986). Un punto importante para el empleo de enemigos naturales en nuestro país, es que la información acerca de la biología y ecología de los mosquitos hospedadores resulta insuficiente para la correcta implementación de éstos como estrategia de control, dificultando su uso benéfico (García *et al.*, 1994a).

Entre los patógenos y parásitos que han sido encontrados en mosquitos, y citados en la bibliografía para la Argentina figuran: virus del grupo de los Nucleopoliedrovirus, bacterias esporuladas y no esporuladas, no identificadas taxonomicamente, hongos como *Aphanocladium album* (Preuss) Gams, *Tolyptocladium cylindrosporum* Gams, *Coelomomyces illiensis* (Keillin) Couch, *Leptolegnia chapmanii* (Seymour) y *Smitium* sp. (Campos *et al.*, 1993; García y López Lastra, 1989; López Lastra, 1990a, 1990b; López Lastra *et al.*, 1992; López Lastra y García, 1997; López Lastra *et al.*, 1991; 1999); gregarinas como *Ascogregarina culicis* (Ross) (Dellapé *et al.*, 2005); microsporidios de los géneros *Amblyospora* sp., *Parathelohania* sp., y la especie *Hazardia millieri* (García, 1989; García y López Lastra, 1989; García y Camino, 1990; García y Becnel, 1994; Micieli *et al.*, 2000 a, b); y los mermítidos *Steinernema rarum* (Oli) (Doucet *et al.*, 1999), *Hydromermis* sp. y *Strelkovimermis spiculatus* (Poinar y Camino, 1986; García y Camino, 1990).

Posteriormente, los conocimientos acerca de los ciclos biológicos, de las vías de transmisión, de los factores que afectan la infectividad y virulencia y del rango de hospedadores, fueron ampliados para algunos de estos patógenos y parásitos.

Se ha profundizado el conocimiento de *L. chapmanii* sobre varios aspectos de su biología, como el rango de hospedador, (López Lastra *et al.*, 2004), factores bióticos y abióticos que afectan su infectividad, y producción de zoosporas en el laboratorio (Pelizza *et al.*, 2007a, 2007b, 2008). La virulencia de *A. album* y *T. cylindrosporum*, fue evaluada para larvas de *C. pipiens* en ensayos preliminares de laboratorio (López Lastra *et al.*, 1992).

La dinámica poblacional de *A. culicis*, patógeno hallado y descrito anteriormente por Dellapé *et al.*, (2005), fue estudiada recientemente en poblaciones de *A. aegypti* de la ciudad de Buenos Aires (Albicocco y Vezzani, 2009).

Estudios epizootiológicos y de transmisión se han llevado a cabo para algunos sistemas hospedador-parásito en microsporidios, principalmente del género *Amblyospora* (Micieli *et al.*, 1998, 2000 a, b; 2001, 2003; 2006).

Strelkovimermis spiculatus fue estudiado en el laboratorio describiéndose el ciclo biológico (Camino y Reboredo, 1994) su producción masiva (Camino y Reboredo, 1996), rango hospedador y factores que afectan su supervivencia e infectividad (Camino y Reboredo, 2000; Achinelly y García, 2003; Campos y Sy, 2003; Achinelly *et al.*, 2004 a, 2004b).

Los depredadores, en su rol de enemigos naturales, son empleados para el control de culícidos. En la Argentina se han estudiado crustáceos decápodos, como el camarón de agua dulce *Palaemonetes argentinus* (Nobili) abundante en el valle de inundación del Río Paraná, como potencial controlador de larvas de *C. pipiens* (Giri y Collins, 2003) y, copépodos ciclopoideos como *M. annulatus*, depredador de *A. aegypti* y *C. pipiens* (Micieli *et al.*, 2002; Marti *et al.*, 2004).

Entre los insectos depredadores de mosquitos han sido citados Coleópteros Hydrophilidos como *Tropisternus lateralis limbatus* (Brullé) y *T. setiger* (Germar), y Coléopteros Dysticidos entre los que se mencionan *Liodessus* sp., *L. marginatus* (Steinheil) y *Rhantus signatus signatus* (Fabricius) (Campos *et al.*, 2004). Larvas de *Psorophora ciliata* (Fabricius)

(Diptera culícidae) junto a Ephemeropteros, Odonatos y Heterópteros (Belostomatidae y Notonectidae), forman parte de la fauna de insectos citada como depredadores de mosquitos (Campos *et al.*, 2004).

Por otra parte, el potencial depredador de peces autóctonos ha sido estudiado en condiciones de laboratorio como posibles candidatos para el control de estados inmaduros de *Culex* sp. y *Culex pipiens*. *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns) (Poeciliidae) y *Jenynsia multidentata* (Jenyns) (Anablepidae), fueron estudiados en la provincia de Buenos Aires por Marti *et al.* (2006). En la Provincia de Corrientes, estudios similares se han realizado con *Astyanax bimaculatus* (L) (Tetragobopteridae), *Pyrrhulina australis* (Eigenman y Kennedy) (Tetragobopteridae) y *Gymnogeophagus australis* (Eigenman) (Ciclidae) (Gene *et al.*, 1999).

Si bien el conocimiento acerca de la utilización de enemigos naturales avanzó en los últimos años en nuestro país, son prácticamente nulos los estudios referidos al impacto que se produce en la densidad poblacional de culícidos por la introducción o el incremento de sus parásitos, patógenos o depredadores en los criaderos. Por lo que es necesario aumentar esfuerzos y encaminar investigaciones para conocer con más detalle el impacto de la utilización de enemigos naturales en el control de los mosquitos vectores.

| |
|-----------------------------|
| HIPÓTESIS DE TRABAJO |
|-----------------------------|

Los enemigos naturales son importantes reguladores de las densidades de *A. aegypti* y *C. pipiens* en poblaciones naturales. La introducción o el incremento de los mismos en estas poblaciones proporcionan un control duradero y específico de los estados inmaduros de estas especies de mosquitos vectores.

| |
|------------------|
| OBJETIVOS |
|------------------|

Objetivo general

Desarrollar estrategias para el control de culícidos vectores basadas en métodos biológicos, eficaces, permanentes y seguros para el ambiente.

Objetivos particulares

Aislar e identificar depredadores y patógenos de culícidos vectores, con énfasis en *A. aegypti* y *C. pipiens*.

Determinar la variación estacional y la prevalencia de los enemigos naturales identificados.

Evaluar en el laboratorio la capacidad depredadora y patogénica de los depredadores y patógenos aislados.

Evaluar el impacto de la introducción o el incremento de los depredadores y/o patógenos sobre la densidad de *A. aegypti* y/o *C. pipiens*

| |
|-----------------------------|
| MATERIALES Y MÉTODOS |
|-----------------------------|

Instalación y mantenimiento de las colonias de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* en el laboratorio.

Culex pipiens

Para la instalación de la colonia en insectarios del CEPAVE, Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CONICET-UNLP), estados inmaduros de estas especies (Fig. 1) fueron recolectados en sus sitios de cría naturales, ubicados en los alrededores de la ciudad de La Plata.

La colecta de los estadios larvales se realizó mediante el uso de cucharones de 250 ml y redes de acuario con malla de 100 μ . Las larvas fueron colocadas en recipientes plásticos de 3 l. de capacidad con agua del lugar y llevadas al laboratorio, donde se separaron por estadios y se acondicionaron en bandejas plásticas de 38 x 28 cm, con 1000 ml de agua del lugar de origen y aireadores. Estas bandejas permanecieron en el insectario a temperatura constante de 26° C, fotoperíodo 12:12 (L:O) y 85 % de humedad relativa. (Fig. 2, 3 y 4).

Como fuente de alimento, se les proporcionó a los estados larvales 1 g de alimento para conejos finamente molido por día.

Una vez alcanzado el estado de pupa, éstas fueron colocadas en recipientes plásticos de 20 cm de diámetro y agua de clorinada, en jaulas de emergencia de 50 x 50 x 50 cm de alambre tejido mosquitero (Fig. 5) para la obtención de los adultos.

Los adultos emergidos fueron colocados, usando un aspirador manual a batería, en jaulas nuevas (Jaulas de cría) similares a las anteriores, para la alimentación y ovipostura.

En las jaulas de cría, dos veces por semana, se introdujo un pollo como fuente de sangre para la producción de huevos por parte de las hembras hematófagas. El mismo se colocó por períodos de 4 a 6 hs en condiciones de oscuridad. Como fuentes de hidratos de carbono, se les proporcionó pasas de uva.

Transcurridas entre 24 a 48 horas de la ingesta sanguínea, en la jaula de cría, se colocaron recipientes plásticos de 20 cm de diámetro y agua declorinada para la obtención de huevos.

Los huevos obtenidos sobre la superficie del agua, agrupados en balsas (Fig. 6), fueron retirados de las jaulas y colocados en bandejas plásticas acondicionadas de la forma mencionada previamente, hasta la obtención de pupas.

Aedes aegypti

Las colonias de *A. aegypti*, fueron instaladas y mantenidas mediante un método similar al descrito para *C. pipiens*. Sin embargo, debido a que estas especies presentan diferencias biológicas, no se usaron aireadores en las bandejas, el pollo para la ingesta sanguínea, fue colocado una vez por semana sin distinción de la cantidad de luz al momento de alimentar a las hembras adultas. Para la ovipostura se incorporó dentro de la jaula, un recipiente plástico, en cuyo perímetro interno se colocó un papel secante y agua hasta la mitad de este papel, quedando una porción sin sumergir, en donde esta especie coloca sus huevos (Fig. 7). Luego de la ovipostura, estos papeles fueron retirados y guardados en bolsas de polietileno, para luego sumergirlos en agua, en bandejas de iguales características que las descritas anteriormente, para la eclosión de los huevos contenidos en él.

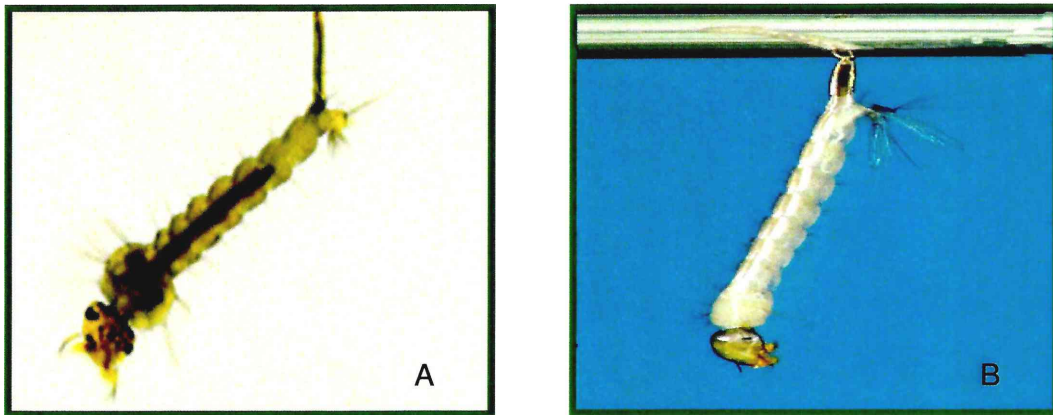


Figura 1. Estados inmaduros de *Culex pipiens* (A) y *Aedes aegypti* (B).



Figura 2. Elementos utilizados para la recolección de estados inmaduros de culicidos en el campo. Contenedor de 3-l de capacidad, cucharón y red.

Figura 3. Bandeja plástica y aireador para la cría de estados inmaduros de *C. pipiens* en condiciones de laboratorio.

Figura 4. Bandejas plásticas empleadas para la cría de estados inmaduros de *A. aegypti* en insectario.





Figura 5. Jaula de alambre mosquitero donde se colocan los mosquitos adultos para la obtención de huevos.

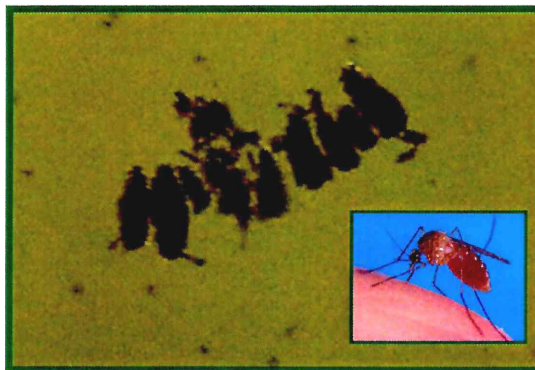


Figura 6. Adulto y huevos de *C. pipiens* formando balsas.

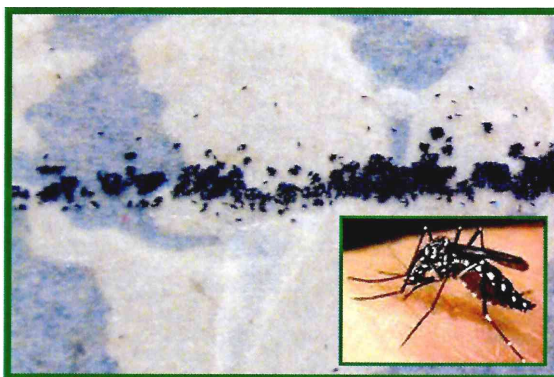


Figura 7. Huevos y adulto de *A. aegypti*.

| |
|-------------------|
| CAPÍTULO I |
|-------------------|

**Evaluación de la capacidad depredadora de Copépodos Ciclopoideos
(Crustacea: Copepoda) autóctonos, sobre estados inmaduros de *A.
aegypti* y *C. pipiens*¹**

Introducción

Los Copépodos Ciclopoideos son importantes miembros de las comunidades de agua dulce, destacándose entre los organismos de la fauna componente del plancton, por su rol de consumidores. Varias especies de copépodos han sido citadas como depredadoras de larvas de mosquitos (Suarez *et al.*, 1984, Rivière *et al.*, 1987a, Marten 1989, 1990a, 1990b, Marten *et al.*, 1994b, Brown *et al.*, 1991). El grupo de los ciclopoideos, es considerado uno de los más eficientes depredadores de culícidos entre los invertebrados (Marten y Reid 2007). La capacidad de los copépodos de controlar larvas de mosquitos fue observada por primera vez por Rivière y Thirel en 1981, quienes detectaron que el número de larvas de *A. aegypti* y *Aedes polynesiensis* (Marks) disminuía de manera evidente en ovitrampas que contenían *Mesocyclops aspericornis* (Daday), introducido accidentalmente con agua proveniente de arroyos (Rivière y Thirel, 1981). Además, Marten (1984) en Hawaii y Suarez *et al.* (1984) en Colombia, observaron la reducción del número de larvas de *A. albopictus* y *A. aegypti*, respectivamente, en contenedores artificiales donde encontraron *M. aspericornis*.

En la bibliografía se ha citado el uso de varias especies de copépodos para el control de diferentes géneros de mosquitos que se desarrollan en diversos ambientes. Entre ellos podemos mencionar el control de *Aedes* de inundación y *Culex* en ambientes temporarios (Marten *et al.*, 1989, 1992, 1994a), de *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* de inundación en marismas (Marten, 1990, 1991); en campos de arroz fueron aplicados para el control de

¹ La información contenida en este capítulo ha sido publicada:
Tranchida M.C, Micieli M.V., Maciá A. and García J.J. 2009. Native Argentinian cyclopoids (Crustacea:Copepoda) as predators of *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Revista de Biología Tropical 57 (4): 1059-1068.

Anopheles (Marten *et al.*, 1989, 2000a), y en zanjas linderas a los caminos para el control de *Culex* (Marten *et al.*, 1994a, 2000b).

Distintas especies de copépodos han sido utilizadas en ensayos de campo para el control de mosquitos, en numerosas partes del mundo (Marten y Reid 2007). En varias ocasiones, los resultados de estos estudios fueron publicados como exitosos (Marten *et al.*, 1994b, Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 1998, Nam *et al.*, 2000). Un ejemplo de estas liberaciones es el empleo de una combinación de *Mesocyclops woutersi* (Van de Velde), *Mesocyclops thermocyclopoides* (Harada) y *Mesocyclops peheiensis* (Hu), dentro del marco de un intenso programa de control contra *A. aegypti*, que se realizó en el norte de Vietnam. Los copépodos fueron liberados en pozos, tanques de cemento, jarrones de cerámica y todo recipiente que pudiese contener agua de lluvia. Luego de 8 meses de la introducción de estos depredadores, se logró erradicar a *A. aegypti* de esa zona y esta especie de mosquito no fue encontrada nuevamente en el lugar durante el período de estudio (Nam *et al.*, 1997a, 1997b, 1998, 2000, 2005; Kay y Nam, 2005).

Estos estudios han demostrado que la incorporación de ciclopoideos depredadores a los programas integrados de control contra mosquitos, resulta útil y apropiado para mantener en niveles no perjudiciales, las poblacionales de estos insectos vectores. Sin embargo, es necesario obtener información acerca de las especies locales, antes de su implementación como agentes de control biológico. Conocer los factores biológicos y ambientales que afectan la supervivencia de las especies y el tamaño de las poblaciones, resulta útil cuando se quiere emplear con éxito estos depredadores para el control de mosquitos. El principal factor biológico que afecta la depredación es el tamaño del cuerpo del depredador. Aquellos que miden menos de 1 mm de longitud, no son capaces de atacar larvas de mosquitos, como por ejemplo algunas especies de *Microcyclops*, *Tropocyclops*, *Paracyclops* y *Thermocyclops*. Los copépodos que alcanzan 1 mm de longitud suelen ser eficaces consumiendo estadios tempranos de larvas de mosquitos, como algunas especies de *Eucyclops*, *Ectocyclops* y *Thermocyclops* y los que presentan un tamaño mayor de 1 mm, son eficaces en la depredación de los distintos tamaños de presa (Marten, 1989; Marten y Reid, 2007). La disponibilidad de alimento es limitante para el desarrollo de

la población, pero por lo general los contenedores que contienen suficiente alimento para el desarrollo de la población de mosquitos, también pueden sustentar la población de copépodos (Jennings *et al.*, 1993; Marten *et al.*, 1994b; Dieng *et al.*, 2003a; Kosiyachinda *et al.*, 2003). La temperatura ambiental es una limitante en la supervivencia de la mayoría de las especies, siendo muy pocas aquellas que toleran un amplio rango de temperaturas y presentan distribución cosmopolita como *Macrocyclops lbidus* (Jurine) (Marten *et al.*, 1994b; Jennings *et al.*, 1994). Son pocas las especies que pueden sobrevivir en condiciones ambientales extremas, por ejemplo los géneros *Mesocyclops* y *Macrocyclops* sobreviven en suelo húmedo y entre la hojarasca (Marten y Reid, 2007).

La factibilidad de la producción masiva de estos copépodos permite la obtención de un gran número de ellos, para la realización de ensayos de laboratorio como también liberaciones a campo. La producción masiva puede realizarse en contenedores de cualquier tamaño siempre que se les proporcionen una fuente adecuada de alimento, como pueden ser algas, rotíferos y paramecios, o una mezcla de los mismos (Rivière *et al.*, 1987a; Suarez *et al.*, 1992; Marten *et al.*, 1997).

En la Argentina, *M. annulatus*, es la única especie que ha sido evaluada como depredadora de los mosquitos *A. aegypti* y *C. pipiens*. La información sobre su capacidad depredadora se limita a estudios en condiciones de laboratorio realizados por Micieli *et al.* 2002, y en condiciones semi-naturales realizados por Marti *et al.*, 2004. A partir de estos estudios se comprobó la eficacia de *M. annulatus* como depredador de estadios tempranos de ambas especies de mosquitos.

Debido a la limitada información existente acerca de estos enemigos naturales, se considera necesaria la búsqueda de especies autóctonas de copépodos depredadores y el estudio de su eficacia como controladores de mosquitos vectores en nuestro país, para el futuro empleo de los mismos en programas de control de culícidos.

En este capítulo se plantearon dos objetivos:

* El aislamiento e identificación de distintas especies de copépodos ciclopoideos como depredadores de larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens*, como también de las especies de mosquitos que comparten el mismo hábitat, a

partir de sitios de cría naturales relacionados con ambientes urbanos, en áreas cercanas a la ciudad de La Plata, en la Provincia de Bs. As.

* La evaluación de distintas especies de copépodos ciclopoideos como depredadores de mosquitos que crían en recipientes artificiales, *A. aegypti* y *C. pipiens*.

Materiales y Métodos

Área de estudio

El estudio se realizó en la Ciudad de La Plata (34°51'07''S, 58°57'30''W) y en zonas cercanas a la misma, durante el período comprendido entre octubre de 2005 y abril de 2006. En esta región se realizó una búsqueda de copépodos, en los mismos sitios naturales de cría de especies de mosquitos.

Los sitios comprendieron cuerpos de agua dulce con diferentes características, que permitieron la siguiente clasificación:

a- Cuerpos de agua temporarios: fueron relevados tres ambientes, ubicados a 12 km de la ciudad de La Plata en el municipio de Punta Lara partido de La Ensenada. Los mismos presentaron una superficie de inundación que varió entre 20 y 100 m². Las variaciones en el volumen de agua presente se debieron al ritmo de las lluvias y a la época del año, permaneciendo inundados por un tiempo mínimo de tres días y un máximo de cinco semanas. La vegetación en ellos corresponde a la de pastizal (Fig. 8).

b- Cuerpos de agua permanentes: estos cuerpos de agua presentaron una superficie aproximada de 25 x 25 x 1 m de ancho, largo y profundidad respectivamente, con vegetación arraigada y flotante. Se consideraron dos ambientes, uno ubicado en las cercanías a la Selva Marginal de Punta Lara y sometido a inundaciones por las crecidas del Río de La Plata. El otro sitio se localizó en el Campo Experimental de La UNLP en la localidad de Los Hornos, partido de La Plata. El agua de inundación del mismo proviene de precipitaciones (Fig. 9).

c- Zanjas de desagüe domiciliario: se consideraron 12 zanjas de desagüe domiciliario ubicadas en los alrededores de la ciudad de La Plata. Cada ambiente presentó una superficie aproximada de 25 x 0,5 x 0,4 m de largo, ancho y profundidad. Estos sitios presentaron agua con desechos

domiciliarios como hipoclorito de sodio, detergentes, latas, envases plásticos, aceite quemado, etc. En ellas es común la presencia de algas y vegetación arraigada (Fig. 10).

d- Campo de arroz: este ambiente, ubicado en el predio Experimental de la UNLP en Los Hornos, consistió de canales de riego empleados para la siembra del arroz. Este campo de siembra se inunda artificialmente con agua por medio de estos canales, entre noviembre y diciembre de cada año y se mantiene con suministro de agua hasta el momento de la siembra y la aparición de los primeros brotes del arroz (febrero). Posteriormente, se elimina el aporte artificial de agua, la cual permanece en los canales un tiempo variable de acuerdo a las condiciones ambientales, que permiten el incremento o retardo de la evapotranspiración. Para este estudio se consideraron 40 canales de riego. Cada canal presentó una superficie de aproximadamente 20 x 0,25 x 0,15 m de largo, ancho y profundidad (Fig. 11).

e- Contenedores artificiales: se consideraron dos clases de contenedores artificiales; recipientes empleados habitualmente para la colocación de flores en el cementerio y cubiertas de automóviles en desuso. Para la primer clase se consideraron cincuenta floreros, de zinc o cerámica, de aproximadamente 1 l de capacidad ubicados en el cementerio municipal de la ciudad de La Plata. Las cubiertas de automóvil se ubicaron en 2 gomerías de los alrededores de la ciudad y en un depósito de autopartes. El agua contenida en las mismas proviene de precipitaciones (Fig. 12).

f- Contenedores naturales: estos contenedores estuvieron representados por ejemplares de *Eryngium cabreræ* Pontiroli (Apiaceae), ubicadas en la Selva Marginal de Punta Lara, Bs As. En el agua que se acumula en las axilas de estas plantas, se desarrolla una comunidad de organismos considerado en su conjunto como fitotelmata (Fig. 13).



Figura 8. Cuerpo de agua temporario.



Figura 9. Cuerpo de agua permanente

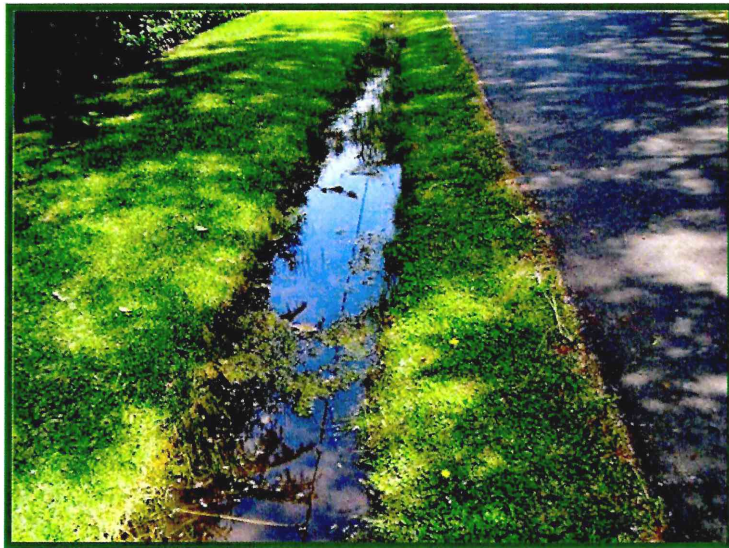


Figura 10. Zanja de desagüe domiciliario



Figura 11. Campo de arroz.

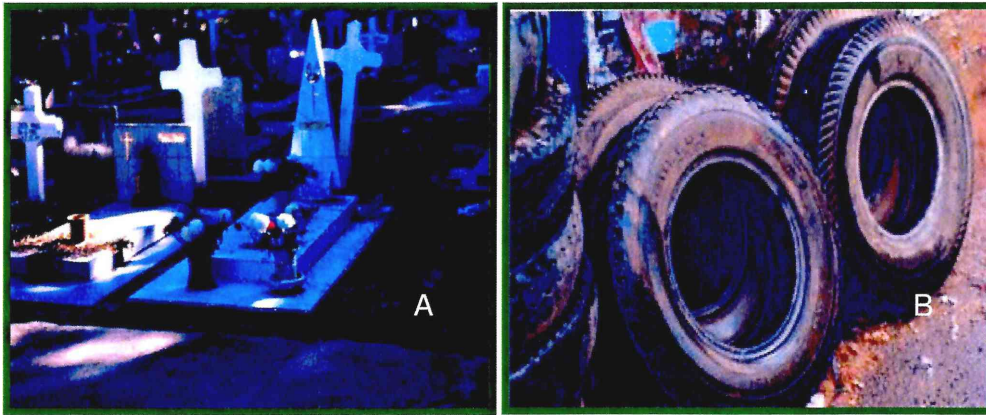


Figura 12. Contenedores artificiales. A) Jarrones y floreros del cementerio. B) Cubiertas de automóvil en desuso (Neumáticos)



Figura 13. Contenedor natural (*E. Cabrerae*)

Metodología de muestreo

En los ambientes temporarios y permanentes se tomaron 100 cucharones de 250 ml de capacidad, con una frecuencia semanal. En las zanjas de desagüe domiciliario, se colectaron semanalmente cinco cucharones de 250 ml. En el campo de arroz, una muestra semanal compuesta de 100 cucharones de 250 ml cada uno, fue colectada de los canales de irrigación. Respecto a los recipientes artificiales, se seleccionaron al azar 50 jarrones del cementerio, en cada muestreo semanal. Diez cubiertas de automóvil en desuso fueron revisadas en cinco oportunidades diferentes en cada lugar de acopio. El agua contenida en ellas, fue colectada mediante el uso de pipetas. Las muestras de los contenedores naturales fueron tomadas mediante el uso de pipetas plásticas con las cuales fue retirada el agua contenida en sus axilas. En cada fecha de muestreo se seleccionaron diez plantas al azar para la colecta de la muestra.

Las muestras de mosquitos y copépodos colectadas, fueron filtradas mediante el uso de redes y colocadas en recipientes plásticos con agua del lugar donde fueron obtenidas y transportadas al laboratorio.

Algunos ejemplares de copépodos fueron mantenidos vivos para iniciar colonias de las diferentes especies, mientras que otros fueron conservados en alcohol 70%, para su posterior identificación taxonómica. Para ello se emplearon las claves dicotómicas de Reid (1985) y Ringuelet (1958). Posteriormente la identificación de los ejemplares fue confirmada por la Doctora Silvina Menú-Marque de la Universidad de Buenos Aires. Las especies de mosquitos fueron identificadas a nivel específico, utilizando las claves de Darsie (1985) y Lane (1953).

Colonias de copépodos

Para obtener las colonias de copépodos a partir de las muestras colectadas en el campo, hembras grávidas (Fig. 14 A), fueron colocadas individualmente en contenedores plásticos con 150 ml de agua declorinada. Como fuente de alimento y nutrientes, se les proporcionó una alícuota de 5 ml de una suspensión preparada a partir de 50 gramos de alimento de

conejo finamente molido suspendido en 250 ml de agua destilada. Las naupliis (Fig. 14 B) fueron traspasadas a contenedores de 500 ml de capacidad, hasta la obtención del estado adulto.

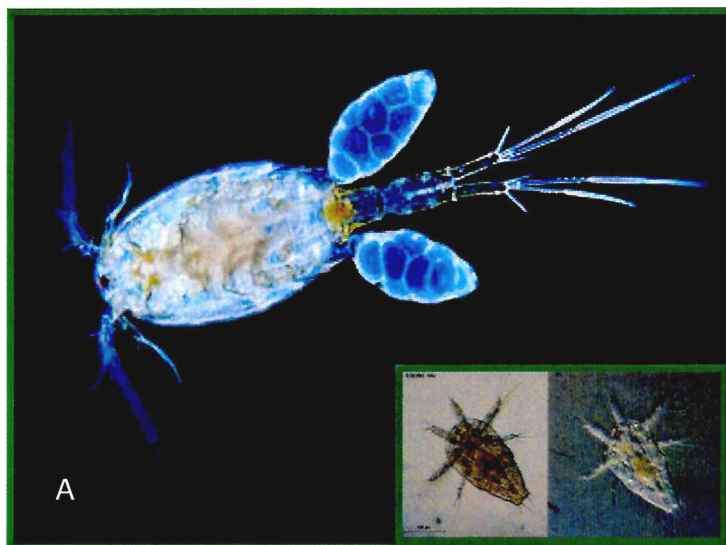


Figura 14. A) Hembra de copépodo ciclopoideo grávida. B) Estado Naupliis de copépodos ciclopoideos.

Evaluación de la capacidad depredadora de copépodos sobre especies de mosquitos encontradas en el mismo ambiente

Los copépodos colectados en los ambientes descritos anteriormente, fueron colocados en recipientes junto con larvas de mosquitos de las especies que habitan en el mismo lugar. Para probar la capacidad depredadora, una hembra adulta de cada especie de copépodo fue expuesta a larvas de pequeño tamaño (Larvas de primer y segundo estadio) en cajas de cultivo celular (Fig. 15) con 10 ml de agua declorinada y sin agregado de alimento. El número de presas expuestas dependió de la cantidad de larvas de estadios 1 y 2 halladas en el campo durante el muestreo. Se realizaron 3 réplicas de cada combinación de especie de depredador y presa. El número de larvas depredadas fue registrado en cada contenedor a las 24 horas de

iniciado el ensayo, considerándose depredadas sólo a las larvas faltantes, asumiendo que fueron ingeridas por el depredador. Una réplica con el mismo número de larvas pero sin la incorporación del depredador fue utilizada como control.



Figura 15. Celdas de cultivo celular.

Ensayos de depredación en condiciones de laboratorio sobre A. aegypti y C. pipiens

Una estimación de la capacidad depredadora de los copépodos encontrados en las muestras de campo, sobre estados inmaduros de *A. aegypti* y *C. pipiens*, fue realizada utilizando una serie de experimentos, para seleccionar las especies más aptas para el control de estas especies de mosquitos.

Todos los ensayos fueron realizados con agua declorinada y en condiciones controladas en cámara de cría a una temperatura de $26 \pm 1^\circ \text{C}$ y fotoperíodo 12:12 hs (L:O). Cuatro especies de copépodos fueron evaluadas separadamente, para lo cual se utilizaron, para cada especie, 9 réplicas y 3 controles. Los controles (recipientes donde se colocaron larvas de culícidos sin depredadores) con la finalidad de descartar mortalidad larval por causas intrínsecas de las mismas. Por tratarse de diseños experimentales aleatorios, éstos no fueron empleados en los análisis estadísticos. Para

realizar los análisis estadísticos, la homogeneidad de las varianzas fue comprobada mediante Análisis de Residuales; en los casos que no resultaron homogéneas, fueron transformados utilizando la transformación angular o se realizó el equivalente no paramétrico (Sokal y Rohlf 1980).

En estos ensayos fueron consideradas depredadas sólo las larvas faltantes, asumiendo que fueron ingeridas por el depredador. Las larvas muertas pero no ingeridas no fueron tenidas en cuenta en los resultados ni es su análisis.

Se realizaron los siguientes experimentos:

Experimento 1: Para evaluar la depredación individual y detectar diferencias entre sexos y estadios de los copépodos; una hembra adulta, un macho adulto y un copepodito de los últimos estadios (4 y 5), de cada especie evaluada, fueron colocados de forma individual en un recipiente de 8 cm de diámetro, con 150 ml de agua declorinada y 25 larvas de primer estadio (L1) de *C. pipiens* y 25 larvas de primer estadio de *A. aegypti*, separadamente. Las diferencias fueron evaluadas mediante Análisis de la Varianza, seguido por un test de comparaciones a posteriori de Duncan.

Experimento 2: El objetivo de este ensayo fue observar la capacidad de depredación de los copépodos seleccionados sobre cada uno de los estadios de *A. aegypti* y *C. pipiens*. Para esto, una hembra adulta de cada especie de copépodo y 25 L1, L2, L3 o L4 de cada especie de mosquito, fueron colocadas independientemente en recipientes con 150 ml de agua declorinada. La depredación de cada especie de copépodo sobre los 4 estadios de ambas especies de mosquitos fueron analizados mediante test de ANOVA bifactorial seguido por un test de comparaciones múltiples de Duncan.

Experimento 3: Para estudiar la existencia de preferencia de las especies de copépodos, por la especie de mosquito presa, se llevó a cabo la exposición de una hembra adulta de copépodo con 25 L2 de *A. aegypti* y 25 L2 de *C. pipiens* (50 larvas en total), en un mismo recipiente con 200 ml de

agua declorinada. Los datos fueron analizados mediante un test de Student con un nivel de significancia de 0,05.

En los experimentos 1, 2 y 3, la mortalidad larval fue registrada a las 24 horas de iniciado el ensayo.

Experimento 4: La tasa de depredación diaria fue evaluada durante 5 días consecutivos para cada una de las cuatro especies de copépodos estudiadas. Cada hembra adulta fue expuesta durante 5 días a 25 L2 de *A. aegypti* ó *C. pipiens*, registrándose la mortalidad cada 24 horas. Las larvas restantes fueron removidas del contenedor y reemplazadas por otras 25 larvas nuevas. El número de larvas de cada culícido consumido por cada especie de copépodo durante los 5 días fue comparado mediante ANOVA, seguido por un test de Duncan para comparaciones múltiples entre tratamientos. Por otro lado, la depredación de las 4 especies de copépodos sobre larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* fueron analizados mediante un modelo de Medidas Repetidas en el Tiempo.

Tolerancia de los copépodos a la desecación

En este experimento fue evaluada la capacidad de las especies de copépodos de sobrevivir a condiciones de desecación del ambiente. Cincuenta copépodos de cada especie se colocaron en recipientes plásticos de 8 cm de diámetro, con 2 cm de arena esterilizada en el fondo y 150 ml de agua (Fig. 16). Estos recipientes fueron mantenidos a 25 ± 1 °C y 12:12 hs (L:O). Se realizaron 3 réplicas para cada especie. Luego de 24 horas, el agua de los recipientes, fue removida utilizando una pipeta. Se evaluaron dos períodos de tiempo de desecación, 15 y 30 días. Transcurridos 15 días se inundaron 3 recipientes de cada una de las especies de copépodos. Los restantes fueron inundados luego de 30 días de comenzado el experimento. El número de copépodos sobrevivientes en cada recipiente fue registrado para cada período de tiempo. Si bien la cantidad de agua retenida en los recipientes al final del experimento no fue medida, se considera que el grado

de humedad entre recipientes no varía, debido a que fueron expuestos a las mismas condiciones iniciales y de tratamiento.

El número de copépodos sobrevivientes de cada especie para cada tiempo de exposición fue comparado mediante el test de Rangos de Mann Whitney.



Figura 16. Contenedor plástico de 8 cm de diámetro, con 2 cm de arena estéril y 150 ml de agua.

Tolerancia de los copépodos al agua de contenedores artificiales

Este ensayo fue realizado para conocer si las especies de copépodos estudiadas en este capítulo, eran capaces de sobrevivir en agua acumulada en contenedores artificiales, sitio habitual de desarrollo de los estados inmaduros de *A. aegypti* y *C. pipiens*. Para ello, el agua de 25 jarrones del Cementerio de La Plata, fue recolectada en un mismo recipiente utilizando una red de malla fina para la concentración de la misma. En el laboratorio, el agua fue filtrada con el empleo de papel de filtro de retención de partículas de 2,5 μm . Para la realización del experimento, 15 copépodos adultos de cada especie, fueron colocados en un recipiente de 8 cm de diámetro, con 100 ml de agua obtenida a partir de las muestras de campo. La mortalidad fue registrada luego de 7, 14 y 21 días. Fueron realizadas tres réplicas con agua de contenedores artificiales y tres con agua declorinada. La mortalidad promedio de los ejemplares de cada especie de copépodos tratados con

agua proveniente de contenedores artificiales y con agua declorinada, para los 3 períodos de tiempo evaluados, fue comparada mediante el test de Friedman con una significancia de 0,01.

Resultados

Especies encontradas en el área de muestreo y su capacidad depredadora

La capacidad depredadora de cada especie de copépodo hallada en el campo, se presenta en la Tabla 1.

En los cuerpos de agua temporarios fueron halladas poblaciones naturales de las especies identificadas como *M. annulatus* y *Diacyclops uruguayensis* (Kiefer). En estos sitios, las especies de mosquitos encontradas han sido identificadas como *O. albifasciatus* y *Culex dolosus* (Lynch Arribalzaga). Las especies de copépodos obtenidas de estos cuerpos de agua, fueron depredadoras sobre estadios tempranos de ambas especies de mosquitos presentes.

Las poblaciones de copépodos de los cuerpos de agua permanente están formadas por las especies larvívoras *Acanthocyclops robustus* (Sars), *M. albidus*, *Mesocyclops longisetus* (Thiébaud) y *Metacyclops mendocinus* (Wierzejski). Por otra parte, también componen estas poblaciones *Ectocyclops rubescens* (Brady), *Eucyclops* sp., *Microcyclops* sp. y *Paracyclops* sp., pero no presentaron capacidad de depredación sobre las larvas de *C. dolosus* y *Culex eduardoi* (Casal y García), especies de mosquitos comúnmente encontradas en ese tipo de hábitat.

En las zanjas de desagüe domiciliario, donde la especie de mosquito hallada fue identificada como *C. pipiens*, se obtuvieron ejemplares de *Paracyclops* sp. y *E. rubescens*. Ninguna de estas dos especies de copépodos presentó capacidad depredadora sobre larvas de primer estadio de *C. pipiens*.

En las muestras tomadas en el campo de arroz, las especies de mosquitos presentes fueron *Anopheles albitarsis* (Lynch Arribalzaga) y *C. dolosus*. En este mismo sitio se identificaron los copépodos *A. robustus*, *M. albidus*, *E. rubescens*, *Eucyclops* sp. y *Microcyclops* sp. Solamente *A. robustus* y *M. albidus*, presentaron capacidad depredadora sobre ambas especies de mosquitos.

Paracyclops sp., fue la única especie de copépodos identificada en los contenedores artificiales, siendo los culícidos encontrados, *C. pipiens* y *A. aegypti*. Este copépodo no demostró capacidad depredadora sobre las larvas de estos mosquitos.

Dos especies de copépodos fueron encontradas en el agua de las axilas de *E. cabreræ* e identificadas como *Paracyclops* sp. y *E. rubescens*. La especie de mosquito que comparte con ellos este hábitat, identificada como *Culex renatoi* Lane y Ramallo, no fue depredada por ninguno de los copépodos encontrados en esta fitotelmata.

Ensayos de depredación en condiciones de laboratorio

Las especies *A. robustus*, *D. uruguayensis*, *M. albidus* y *M. longisetus* fueron seleccionadas a partir de las muestras obtenidas en el campo para la realización de los ensayos de depredación sobre *A. aegypti* y *C. pipiens*.

La capacidad depredadora de *M. annulatus* en condiciones de laboratorio, no fue evaluada en este trabajo debido a que existe amplia información publicada sobre esta especie (ver Referencia Micieli et. al, 2002, Marti et al 2004).

Metacyclops mendocinus no fue incluida en estos ensayos debido a que no fue posible el mantenimiento de colonias en condiciones de laboratorio.

Experimento 1

Hembras y machos adultos de *D. uruguayensis* fueron capaces de depredar larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens*, por el contrario los estados tardíos de copepoditos no consumieron larvas de estas especies de culícidos (Tabla 2). La comparación del promedio de larvas de ambas especies de culícidos depredadas por hembras, machos y copepoditos, mediante Análisis de la varianza, mostró diferencias significativas ($F=99,2$; $gl=2$; $p<0,01$ para *A. aegypti* y $F= 73,5$; $gl=2$; $p<0,01$ para *C. pipiens*). Mediante el test de comparaciones de Duncan, no se hallaron diferencias significativas ($p>0,01$) entre el promedio de larvas depredadas por machos y

copepoditos. Sin embargo, las diferencias entre las larvas consumidas por machos y copepoditos, respecto de las hembras, resultaron significativas ($p < 0,01$).

Las larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* fueron depredadas tanto por copepoditos como por hembras y machos adultos de *A. robustus* (Tabla 2), siendo los resultados estadísticos: $F = 22,05$; $gl = 2$; $p < 0,01$ para *A. aegypti* y $F = 44,62$; $gl = 2$; $p < 0,01$ para *C. pipiens*. El test de Duncan mostró homogeneidad en los promedios ($p > 0,01$) de larvas depredadas por machos y copepoditos, y diferencias significativas ($p < 0,01$) entre este número y el depredado por las hembras.

Las hembras de *M. albidus* fueron capaces de consumir $12,3 \pm 0,5$ *A. aegypti* y $12,37 \pm 1,3$ larvas de *C. pipiens*. Machos adultos y copepoditos de esta especie mostraron la capacidad de depredar larvas de ambos culícidos en condiciones de laboratorio como se muestra en la Tabla 2. Los resultados del análisis estadístico fueron: $F = 93,34$; $gl = 2$; $p < 0,01$ para *A. aegypti* y $F = 61,48$; $gl = 2$; $p < 0,01$ para *C. pipiens*, para ambas especies de culícidos no fueron evidenciadas diferencias significativas al comparar el promedio de larvas consumidas por machos y copepoditos mediante el test de Duncan, pero si al comparar estos números con el número de larvas consumido por las hembras.

Copepoditos, machos y hembras adultas de *M. longisetus* mostraron capacidad depredadora sobre *C. pipiens* ($F = 23,19$; $gl = 2$; $p < 0,01$) y *A. aegypti* ($F = 62,34$; $gl = 2$; $p < 0,01$) (Tabla 2). Mediante el test de Duncan, se observó la homogeneidad ($p > 0,01$) de los promedios en el número de larvas depredadas por copepoditos y machos, y diferencias significativas ($p < 0,01$) entre estos promedios y el promedio de larvas de ambos culícidos consumidas por las hembras.

Experimento 2

Las hembras de *D. uruguayensis* no fueron capaces de depredar larvas de tercer estadio de *A. aegypti* ni de cuarto estadio de ambas especies de culícidos. En la Tabla 3 se observa el promedio de larvas de cada estadio y especie que *A. robustus* fue capaz de consumir. El test de ANOVA bifactorial

aplicado para comparar el consumo de *D. uruguayensis* sobre todos los estadios de ambas especies de mosquitos, mostró efectos significativos para el factor “especie de presa” ($F=5.73$, $gl=1$, 64 ; $p=0.019$) y para “estadios larvales” ($F=99.3$, $gl=3$, 64 , $p<0.05$). La interacción de ambos factores (especie de presa y estadio larval), no resultó significativa para esta especie de copépodo ($F=2.5$, $gl=3$, 64 ; $p=0.066$). Las comparaciones a posteriori realizadas mediante el test de Duncan mostraron diferencias no significativas ($p>0,05$) entre los siguientes pares de comparaciones de promedios, agrupándolos en cuatro grupos homogéneos: L3 y L4 de *A. aegypti* y *C. pipiens*, L2 de *A. aegypti*, L2 de *C. pipiens* y por otro lado las L1 de ambas especies (Fig. 17) siendo significativas ($p<0,05$) las diferencias para los restantes pares de comparaciones entre promedios.

Acanthocyclops robustus no depredó larvas de cuarto estadio de ninguno de ambos culícidos. El promedio de larvas de estadios inferiores, consumidas por esta especie, puede observarse en la tabla 3. Al comparar mediante ANOVA bifactorial los promedios de larvas consumidas por *A. robustus* entre todos los estadios (L1, L2, L3 y L4) de ambos culícidos el factor “estadio larval” fue el único que tuvo efecto significativo ($F=57,39$, $gl=3$, 64 ; $p<0,05$), siendo no significativos los efectos del factor “especie de presa” ($p>0,05$) y la interacción entre ambos factores (especie de presa por estadio larval) ($p>0,05$). El test de comparaciones a posteriori de Duncan no evidenció diferencias significativas ($p>0,05$) entre los siguientes pares de comparaciones de promedios, agrupándolos de la siguiente manera: L2 de *A. aegypti* junto con L3 y L4 de ambas especies, L2 de *A. aegypti* y *C. pipiens* y L1 de ambas especies de culícidos (Fig. 18) siendo significativas ($p<0,05$) las diferencias para los restantes pares de comparaciones entre promedios .

La depredación de *M. albidus* sobre cada estadio de ambas especies de presa, fue comparada mediante un test de ANOVA de dos vías, el cual dio como resultado que los factores “especie de presa” ($F= 23,6$ $gl=1$, 64 , $p<0,05$), “estadio larval” ($F=213,3$, $gl= 3$, 64 , $p<0,05$) y la interacción entre ambos ($F= 22,0$, $gl= 3$, 64 ; $p<0,05$) presentan diferencias estadísticas significativas. Posteriormente, el test de Duncan no evidenció diferencias significativas ($p>0,05$) entre los siguientes pares de comparaciones de

promedios: L3 y L4 de *C. pipiens* y *A. aegypti*, L2 de *A. aegypti*, L2 de *C. pipiens* y L1 de ambas especies (Fig. 19), siendo significativas ($p < 0,05$) las diferencias para los restantes pares de comparaciones entre promedios. Los promedios de larvas de cada estadio y especie, depredadas por las hembras de esta especie de copépodo, se muestran en la tabla 3.

La capacidad depredadora de *M. longisetus* sobre cada estadio larval de ambas especies de mosquitos, analizada mediante ANOVA bifactorial, mostró diferencias significativas en el factor “estadio larval” ($F=236,17$; $gl=3, 64$; $p < 0,05$) y no significativas ($p > 0,05$) en el factor “especie de presa” ni en la interacción de ambos factores (estadio larval por especie de presa). El test de Duncan de comparaciones a posteriori, no evidenció diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los siguientes pares de comparaciones de promedios: L3 y L4 de *A. aegypti* y *C. pipiens*, L2 de ambas especies y L1 también de ambas especies (Fig. 20), siendo significativas el resto de las comparaciones entre pares de promedios. En la tabla 3 se puede observar el promedio de larvas de cada estadio y especie consumidas por las hembras de esta especie.

Experimento 3

Cuando las larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* de segundo estadio fueron expuestas en un mismo contenedor, a una hembra de *D. uruguayensis*, no se observaron diferencias significativas ($t= 9,0$; $gl=1$; $p=0,07$) en el número de larvas depredadas de ambas especies (Fig. 21).

Acanthocyclops robustus no mostró preferencia por ninguna de ambas especies de mosquitos, cuando estas fueron ofrecidas como presa, en un mismo recipiente ($t=10,0$; $gl=1$; $p=0,063$) (Fig. 22).

Macrocyclops albidus mostró una leve preferencia estadísticamente significativa ($t= 16,3$; $gl=1$; $p=0,039$) por las larvas de *C. pipiens* cuando ambas especies de mosquitos fueron expuestas juntas a una hembra adulta en un contenedor (Fig. 23).

No se detectaron diferencias significativas entre el número de larvas de ambas especies de mosquito depredadas por *M. longisetus* ($t=7,48$; $gl=1$; $p=0,085$) (Fig. 24).

Experimento 4.

La comparación en el número de ejemplares inmaduros de *A. aegypti* y *C. pipiens* consumido por cada una de las 4 especies de copépodos, durante los 5 días de ensayo, mostró los siguientes resultados:

Diacyclops uruguayensis, no presentó diferencias significativas ($F=0,56$; $gl=4,40$; $p=0,69$ para *A. aegypti* y $F=0,71$; $gl=4,40$; $p=0,59$ para *C. pipiens*) en la tasa de consumo durante los 5 días sobre ninguna de las especies de culícidos (Fig. 25).

Acanthocyclops robustus presentó una tasa de depredación diaria que fue constante a lo largo del ensayo para ambas especies de culícidos ya que no se observaron diferencias significativas ($F=0,57$; $gl=4,40$; $p=0,68$ para *A. aegypti* y $F=0,48$; $gl=4,40$; $p=0,58$ para *C. pipiens*) entre los días evaluados (Fig. 26).

La capacidad depredadora de *M. albidus* se redujo luego del primer día de estudio y las diferencias entre este día y los cuatro siguientes resultó significativa ($F=4,13$; $gl=4,40$; $p=0,0006$ para *A. aegypti* y $F=5,68$; $gl=4,40$; $p=0,0058$ para *C. pipiens*) (Fig. 27).

Durante el período de prueba, la tasa de depredación de *M. longisetus* sobre ambas especies de mosquito no resultó constante, observándose diferencias significativas al comparar los 5 días entre sí ($F=19,01$; $gl=4,40$; $p=0,0003$ para *A. aegypti* y $F=17,54$; $gl=4,40$; $p=0,0004$ para *C. pipiens*). La mayor cantidad de larvas consumidas fue registrada el primer día de ensayo, presentando diferencias con el segundo y cuarto día (los cuales no presentaron diferencias entre sí, $p>0,05$), con el tercero y el quinto (que también fueron homogéneos entre sí, $p>0,05$) (Fig. 28).

Al comparar el número de larvas consumidas de *A. aegypti* por las 4 especies de copépodos durante los 5 días mediante el test de Medidas Repetidas en el Tiempo, se observó un efecto significativo ($p<0,05$) (Tabla 4 A), de las especies de copépodos, el tiempo y la interacción de ambos factores. Mediante el test de comparaciones múltiples de Duncan (Tabla 4 A¹), se pudo observar que en el primer día del ensayo, *D. uruguayensis* y *A. robustus* consumieron una cantidad de larvas cuya diferencia no fue significativa ($p<0,01$); lo mismo ocurrió en el día 1 entre *M. albidus* y *M.*

longisetus, sin embargo existieron diferencias significativas entre las dos especies mencionadas primero y las dos últimas (Tabla 4 A¹).

En el segundo día no se observaron diferencias significativas ($p > 0,01$) entre lo consumido por *D. uruguayensis*, *A. robustus* y *M. albidus*, mientras que el promedio de larvas consumido por *M. longisetus* resultó significativamente diferente ($p < 0,01$) respecto de estos 3 anteriores (Tabla 4 A¹).

Luego de 72 horas (tercer día) de experimentación, las 4 especies de copépodos consumieron larvas de *A. aegypti* en cantidades que no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0,01$) (Tabla 4 A¹).

Para el cuarto día, *D. uruguayensis* mostró diferencias significativas ($p < 0,01$) sólo con *A. robustus*. *Acanthocyclops robustus*, consumió un número de larvas de *A. aegypti* similar ($p > 0,01$) sólo al consumido por *M. albidus*. Por otro lado *M. longisetus* ingirió un promedio de larvas similar a *D. uruguayensis* y diferente de las restantes especies (Tabla 4 A¹).

En el quinto día se obtuvieron iguales resultados a los obtenidos durante el cuarto día con la diferencia de que *M. longisetus* consumió un promedio de estados inmaduros de *A. aegypti* diferente ($p < 0,01$) del consumido por las otras 3 especies evaluadas (Tabla 4 A¹).

El análisis de Medidas Repetidas en el Tiempo para comparar la depredación de las 4 especies de copépodos sobre *C. pipiens* mostró resultados significativos ($p < 0,05$) (Tabla 4 B), para los factores especie, tiempo y la interacción de ambos. El primer día de ensayo con estados inmaduros de *C. pipiens*, sólo fue significativa ($p < 0,01$) la diferencia del número de larvas consumidas por *M. longisetus* con respecto a *D. uruguayensis*, *A. robustus* y *M. albidus*, mientras que estas tres últimas especies no mostraron diferencias significativas ($p > 0,01$) entre sí (Tabla 4 B¹).

A las 48 horas (día 2) se observó que *D. uruguayensis* y *M. longisetus*, consumieron un número similar de larvas de *C. pipiens* entre sí y a la vez diferente ($p < 0,01$) al consumido por, *M. albidus* y *M. longisetus*, los cuales no mostraron diferencias significativas entre si ($p > 0,05$). *Acanthocyclops robustus*, presentó diferencias significativas ($p < 0,01$) en el promedio de larvas depredado solo con *M. albidus* (Tabla 4 B¹).

Durante el tercer día, *D. uruguayensis* y *A. robustus*, ingirieron un número similar de larvas de *C. pipiens*, siendo las diferencias no significativas ($p > 0,01$). *Acanthocyclops robustus*, a la vez consumió un promedio de *C. pipiens* similar ($p > 0,01$) a *M. albidus* y *M. longisetus* (Tabla 4 B¹).

En el cuarto día se obtuvieron dos grupos homogéneos de comparaciones ($p > 0,01$), el primero formado por *D. uruguayensis*, *A. robustus* y *M. longisetus*, y el segundo formado por las 2 últimas especies mencionadas junto a *M. albidus* (Tabla 4 B¹).

El último día de ensayo se observó un grupo de comparaciones homogéneo ($p > 0,01$) entre *D. uruguayensis*, *A. robustus* y *M. albidus*, que presentó diferencias significativas ($p < 0,01$) con *M. longisetus* (Tabla 4 B¹ "B").

Tolerancia de los copépodos a la desecación

Acanthocyclops robustus no registró mortalidad durante este experimento. *Diacyclops uruguayensis* sobrevivió en un 100% durante los primeros 15 días del ensayo y el 90 % ($n=45$) de los ejemplares expuestos no presentaron mortalidad luego de 30 días de desecación, siendo no significativa la diferencia entre los promedios de los ejemplares que sobrevivieron a cada período de evaluación ($z=-1,31$; $p= 0,19$). El 80% ($n=40$) de los ejemplares de *M. longisetus* expuestos a esta condición, pudo sobrevivir los primeros 15 días y sólo el 60% ($n=30$) logró tolerar la desecación transcurridos los 30 días. La diferencia del promedio de ejemplares capaces de sobrevivir a cada período, resultó significativa ($z=1,96$; $p=0,048$). *Macrocyclops albidus* registró un 100% ($n=50$) de mortalidad en los primeros 15 días de la experiencia.

Tolerancia de los copépodos al agua de contenedores artificiales

La mortalidad de *A. robustus* a los 7, 14 y 21 días de prueba resultó nula. *Diacyclops uruguayensis* presentó una mortalidad del 0% a los 7 días, 20% a los 14 días y de 40% luego de 21 días, las diferencias el número de

individuos muertos para los 3 períodos fue no significativa ($X^2_{(N=6; gl=2)} = 7,43$ $p < 0,024$). No se registró mortalidad a los 7 días para *M. longisetus* en el agua de contenedores artificiales, un 20% de mortalidad fue registrada luego de 14 días, manteniéndose constante este porcentaje hasta el final del estudio; no se registraron diferencias significativas entre los 3 períodos de tiempo. ($X^2_{(N=6; gl=2)} = 6,00$; $p < 0,049$). *Macrocyclops albidus* mostró un 20% de mortalidad a los 7 días, 40% a los 14 días de iniciado el ensayo y en este caso, la mortalidad también fue constante durante el experimento; no se encontraron diferencias significativas en la mortalidad de *M. albidus* para los períodos evaluados ($X^2_{(N=6, gl=2)} = 7,41$; $p < 0,024$).

En los recipientes con agua de clorinada no se registró mortalidad en ninguna de las especies de copépodos.

Tabla 1. Especies de copépodos encontradas en los diferentes ambientes y su capacidad depredadora sobre las larvas de mosquitos con las que cohabitan.

| Especie de copépodo | Tipo de ambiente | Especie de mosquito | Larvas expuestas (n) | Mortalidad (%) |
|--------------------------------|--|-------------------------|----------------------|----------------|
| <i>Diacyclops uruguayensis</i> | Temporarios | <i>O. albifasciatus</i> | 7 | 71.7 |
| <i>Acanthocyclops robustus</i> | Permanente | <i>C. dolosus</i> | 10 | 70 |
| <i>Macrocyclus albidus</i> | Campo de arroz Permanente | <i>C. dolosus</i> | 10 | 80 |
| | | <i>A. albitarsis</i> | 5 | 100 |
| <i>Mesocyclops longisetus</i> | Permanente | <i>C. dolosus</i> | 10 | 80 |
| <i>Metacyclops mendocinus</i> | Permanente | <i>C. dolosus</i> | 10 | 60 |
| <i>Mesocyclops annulatus</i> | Temporarios | <i>O. albifasciatus</i> | 7 | 85,7 |
| | | <i>C. dolosus</i> | 10 | 100 |
| <i>Paracyclops</i> sp. | Contenedor artificial Permanente <i>Eryngium cabreræ</i> , zanjas y campo de arroz | <i>C. dolosus</i> | 10 | 0 |
| | | <i>C. pipiens</i> | 25 | 0 |
| | | <i>C. renatoi</i> | 10 | 0 |
| | | <i>A. albitarsis</i> | 5 | 0 |
| | | <i>A. aegypti</i> | 25 | 0 |
| <i>Ectocyclops rubescens</i> | Permanente, zanjas, <i>Eryngium cabreræ</i> | <i>C. pipiens</i> | 25 | 0 |
| | | <i>C. renatoi</i> | 10 | 0 |
| | | <i>C. dolosus</i> | 10 | 0 |
| <i>Eucyclops</i> sp | Permanente | <i>C. dolosus</i> | 10 | 0 |
| <i>Microcyclops</i> sp | Permanente | <i>C. dolosus</i> | 10 | 0 |

Tabla 2. Capacidad depredadora de las cuatro especies de copépodos evaluadas sobre el primer estadio de *A. aegypti* y *C. pipiens*.

| Especie de copépodo | Capacidad depredadora (%) | | | | | |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Hembras | | Machos | | Copepoditos | |
| | <i>Ae. aegypti</i> | <i>Cx. pipiens</i> | <i>Ae. aegypti</i> | <i>Cx. pipiens</i> | <i>Ae. aegypti</i> | <i>Cx. pipiens</i> |
| <i>Diacyclops uruguayensis</i> | 21,5 | 24,6 | 1,3 | 2,6 | 0 | 0 |
| <i>Acanthocyclops robustus</i> | 25 | 17,3 | 5 | 3,3 | 1,3 | 2 |
| <i>Macrocyclops albidus</i> | 47,3 | 49,5 | 11,5 | 9,3 | 5 | 4 |
| <i>Mesocyclops longisetus</i> | 38 | 40 | 4 | 3,6 | 16 | 16 |

Tabla 3. Depredación de las cuatro especies de copépodos sobre cada estadio de *A. aegypti* (Aa) y *C. pipiens* (Cp), en condiciones de laboratorio. Cada celda muestra la media (\pm DE) de tres réplicas, del número de larvas muertas luego de 24 hs de exposición.

| Especie de Copépodo | Larvas consumidas (n) | | | | | | | |
|------------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| | L1 | | L2 | | L3 | | L4 | |
| | Aa | Cp | Aa | Cp | Aa | Cp | Aa | Cp |
| <i>D. uruguayensis</i> | 5,6 \pm 2,1 | 6,33 \pm 1 | 4,1 \pm 0,68 | 3,66 \pm 1,5 | 0 | 0,4 \pm 0,5 | 0 | 0 |
| <i>A. robustus</i> | 5,33 \pm 2,3 | 6,1 \pm 2 | 3,33 \pm 0,7 | 3 \pm 1,2 | 0,6 \pm 0,7 | 0,33 \pm 0,6 | 0 | 0 |
| <i>M. albidus</i> | 12,8 \pm 2,8 | 12,5 \pm 1,3 | 7 \pm 1 | 9,3 \pm 3,6 | 3,2 \pm 1,1 | 2,4 \pm 1,3 | 0,55 \pm 0,5 | 0,57 \pm 0,4 |
| <i>M. longisetus</i> | 13,5 \pm 1,4 | 12 \pm 1,05 | 6,6 \pm 1 | 7 \pm 1 | 3,6 \pm 0,8 | 3,1 \pm 1 | 0 \pm 1 | 0,66 \pm 0,7 |

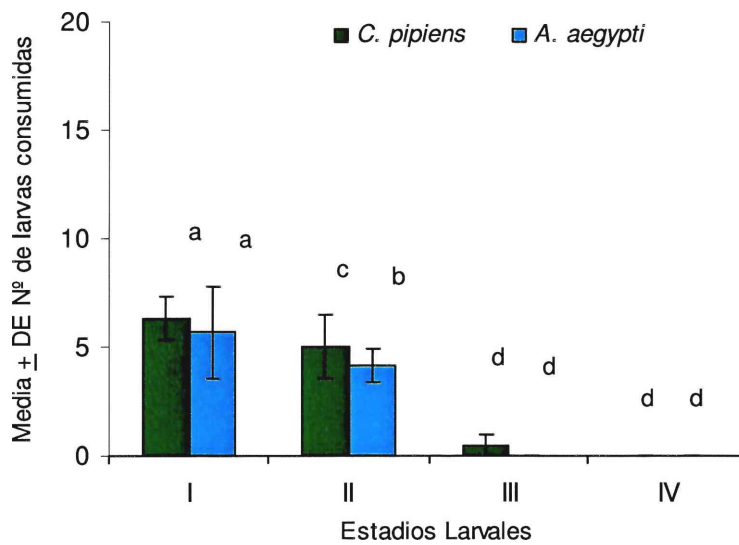


Figura 17. Promedio (\pm De) del número de larvas de los diferentes estadios (L1 a L4) de *A. aegypti* y *C. pipiens* depredadas por *Diacyclops uruguayensis*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los 4 estadios de ambas especies en el resultado del test de Duncan ($p < 0.05$).

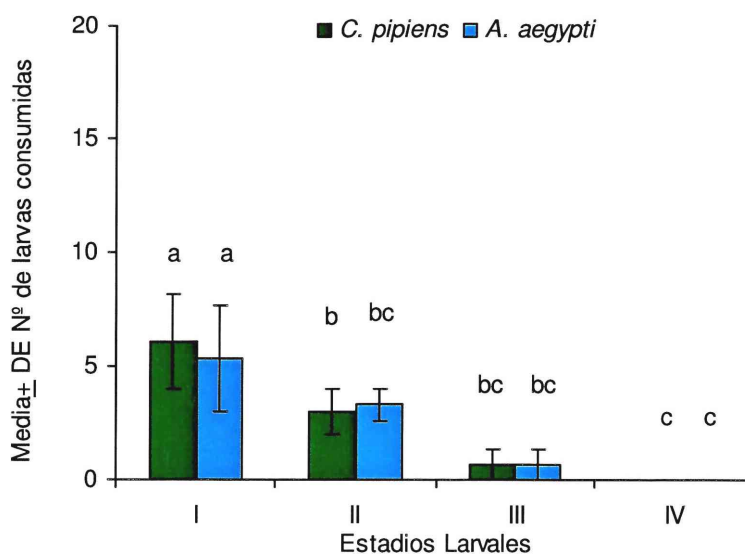


Figura 18. Promedio (\pm De) de larvas (L1 a L4) de *A. aegypti* y *C. pipiens* depredadas por *Acanthocyclops robustus*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los 4 estadios de ambas especies en el resultado del test de Duncan ($p < 0.05$).

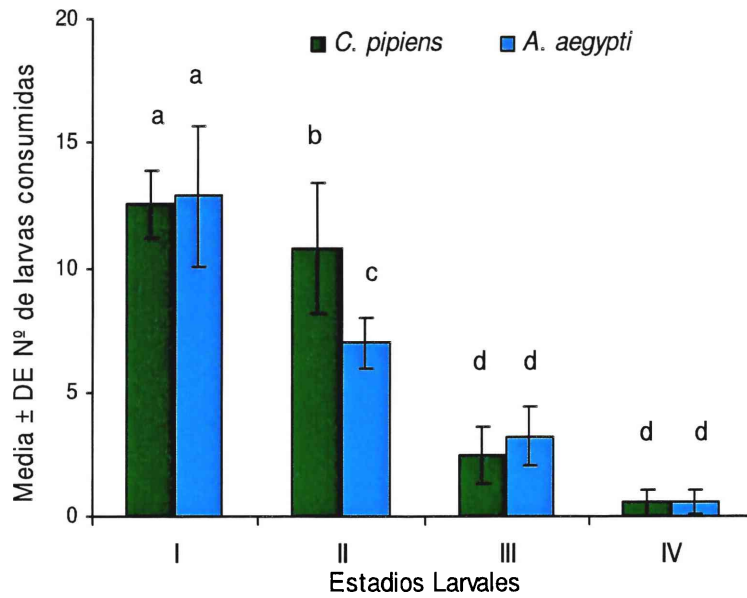


Figura 19. Promedio (\pm De) del número de larvas de los diferentes estadios (L1 a L4) de *A. aegypti* y *C. pipiens* depredadas por *Macrocyclus albidus*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los 4 estadios de ambas especies en el resultado del test de Duncan ($p < 0,05$).

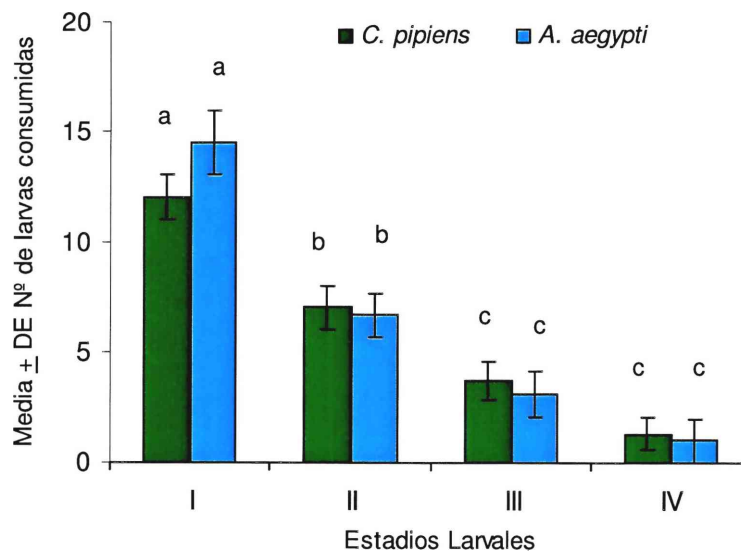


Figura 20. Promedio (\pm De) de larvas (L1 a L4) de *A. aegypti* y *C. pipiens* depredadas por *Mesocyclops longisetus*. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los 4 estadios de ambas especies en el resultado del test de Duncan.

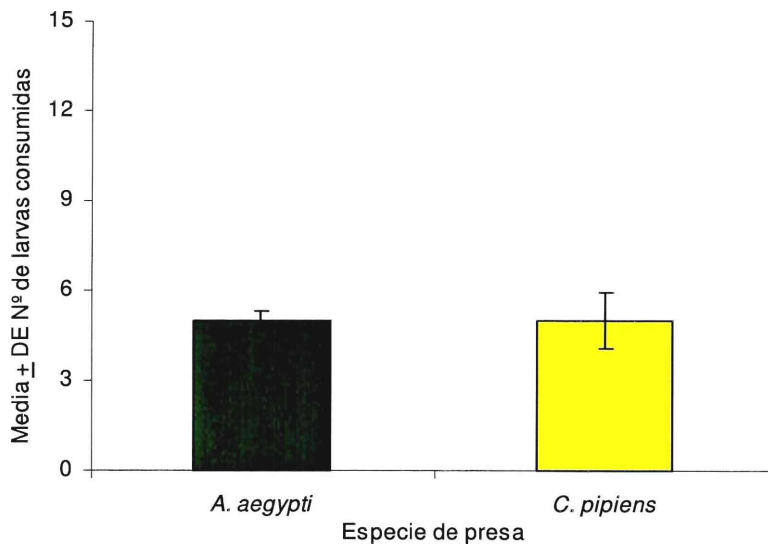


Figura 21. Elección de especies de larvas presa por *Diacyclops uruguayensis*.

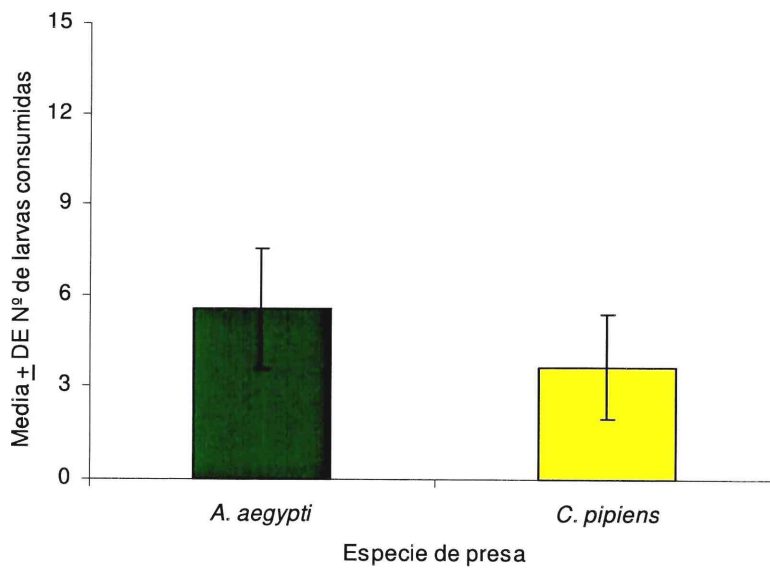


Figura 22. Elección de especies de larvas presa por *Acanthocyclops robustus*

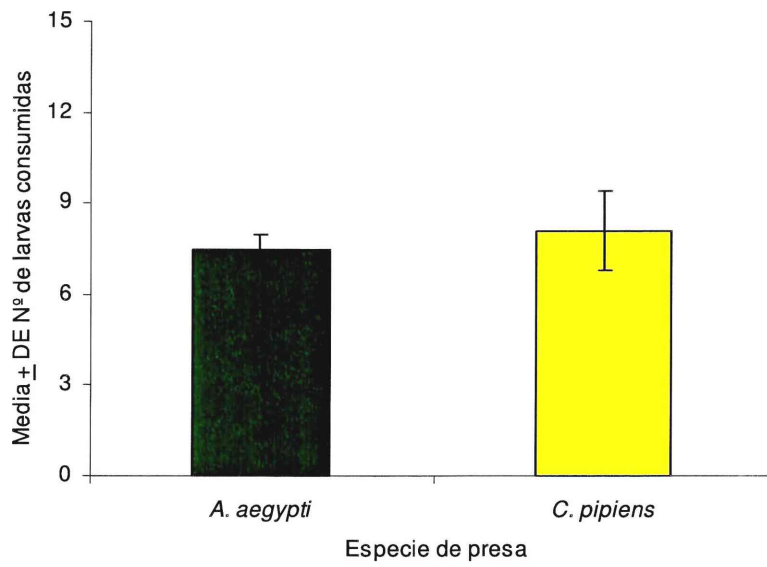


Figura 23. Elección de especies de larvas presa por *Macrocyclus albidus*

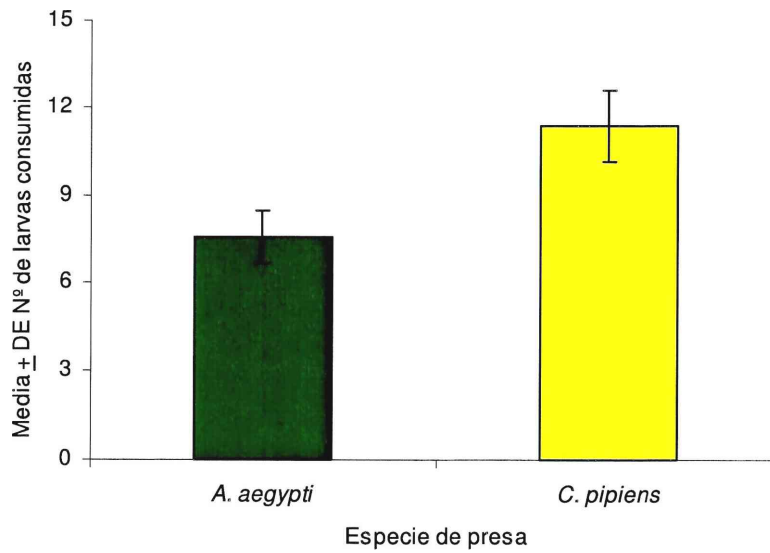


Figura 24. Elección de especies de larvas presa por *Mesocyclops longisetus*

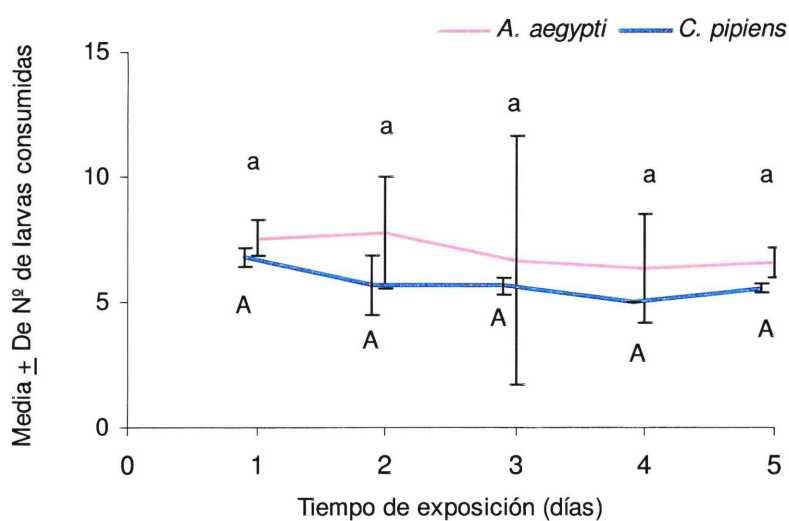


Figura 25. Capacidad depredadora de *Diacyclops uruguayensis* durante cinco días. Las letras iguales minúsculas indican diferencias no significativas entre días ($p>0,05$) en los resultados del test de Duncan para *A. aegypti*, Letras mayúsculas indican los mismos resultados para *C. pipiens*.

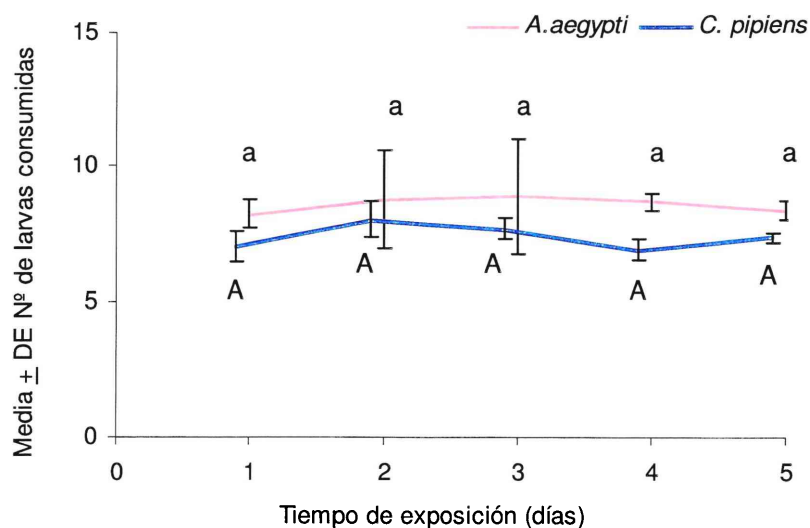


Figura 26. Capacidad depredadora de *Acanthocyclops robustus* durante cinco días. Las letras iguales minúsculas indican diferencias no significativas entre días ($p>0,05$) en los resultados del test de Duncan para *A. aegypti*, Letras mayúsculas indican los mismos resultados para *C. pipiens*.

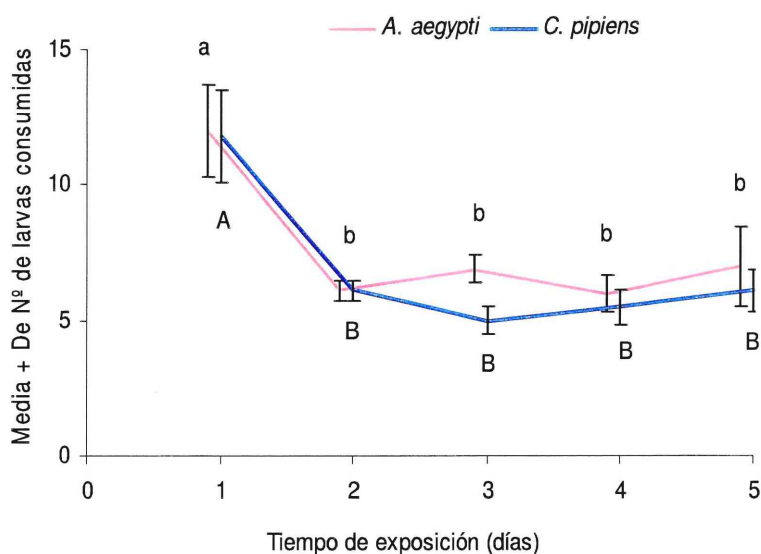


Figura 27. Capacidad depredadora de *Macrocyclus albidus* durante cinco días. Las letras distintas minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en los resultados del test de Duncan, entre días para *A. aegypti*. Letras mayúsculas indican los mismos resultados para *C. pipiens*.

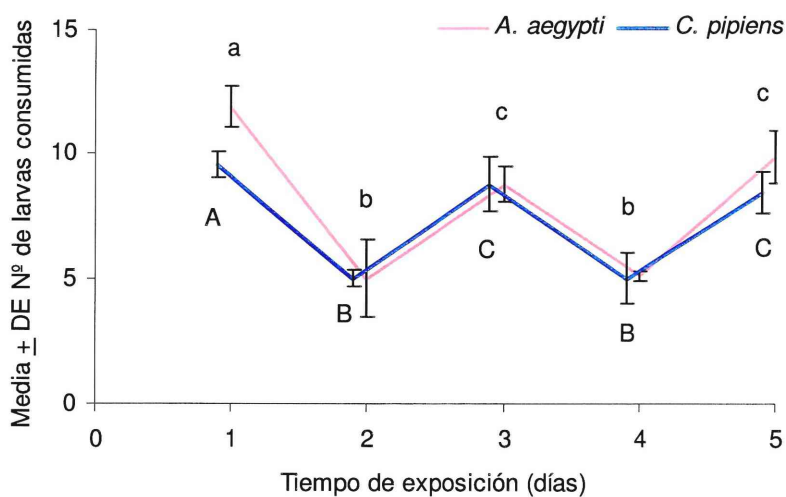


Figura 28. Capacidad depredadora de *Mesocyclops longisetus* durante cinco días. Las letras distintas minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en los resultados del test de Duncan, entre días para *A. aegypti*. Letras mayúsculas indican los mismos resultados para *C. pipiens*.

Tabla 4. Resultados del test de Medidas Repetidas en el Tiempo (A y B) y del test de comparaciones múltiples de Duncan (A¹, B¹) respectivo. Sección “A”, resultados para *A. aegypti*. Sección “B” resultados para *C. pipiens*.

En los resultados del Test de Duncan (A¹, B¹), letras diferentes en un mismo día indican diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los promedios de larvas depredadas por las especies de copépodos correspondientes.

Sección A

| Factor | F | gl | p |
|-------------------------|-------|--------|-------|
| Especie de copépodo (1) | 2,94 | 3, 32 | <0,05 |
| Tiempo (2) | 12,64 | 4, 128 | <0,05 |
| 1x2 | 7,72 | 12,128 | <0,05 |

Sección A¹

| Especie de copépodo | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>D. uruguayensis</i> | a | a | a | a | a |
| <i>A. robustus</i> | a | a | a | b | b |
| <i>M. albidus</i> | b | a | a | a b | a b |
| <i>M. longisetus</i> | b | b | a | a c | c |

Sección B

| Factor | F | gl | p |
|-------------------------|-------|--------|-------|
| Especie de copépodo (1) | 35,37 | 3,32 | <0,05 |
| Tiempo (2) | 28,18 | 4,128 | <0,05 |
| 1x2 | 10,37 | 12,128 | <0,05 |

Sección B¹

| Especie de copépodo | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>D. uruguayensis</i> | a | a | a | a | a |
| <i>A. robustus</i> | a | a b | a b | a b | a |
| <i>M. albidus</i> | a | b | b | b | a |
| <i>M. longisetus</i> | b | a b | b | a b | b |

Discusión

El mayor número de especies de copépodos larvívoros fue hallado en los ambientes permanentes del área de estudio y sólo dos especies de copépodos depredadores fueron encontradas en los ambientes temporarios. Estos resultados no fueron sorprendidos porque en general ambientes más estables resultan más diversos en cuanto al número de especies en ellos presentes cuando son comparados con ambientes sujetos a fluctuaciones (Connell y Orias, 1964). Es desconocida la influencia y magnitud con que la depredación por parte de este conjunto de especies de microcrustáceos influye en el control de las larvas de mosquitos en condiciones naturales, por lo que es de suma importancia el aporte de una investigación complementaria en condiciones de campo. En los principales ambientes de cría de *A. aegypti* y *C. pipiens*, como son los contenedores artificiales y las zanjas de drenaje domiciliario, no se encontraron copépodos larvívoros. Esta ausencia puede deberse a que estos ambientes son originados por la acción del hombre y se encuentran aislados de cuerpos de agua naturales, lo que dificultaría el acceso de los copépodos para la colonización de los mismos.

Las especies *E. rubescens*, *Eucyclops* sp., *Microcyclops* sp., y *Paracyclops* sp., no fueron capaces de depredar larvas de mosquitos en condiciones de laboratorio, por lo tanto no fueron utilizadas en ensayos posteriores. La ausencia de actividad depredadora puede relacionarse con el pequeño tamaño corporal que estas especies presentan (Marten y Reid 2007). Por el contrario, las especies *A. robustus*, *D. uruguayensis*, *M. albidus*, y *M. longisetus* manifestaron capacidad depredadora sobre larvas de mosquitos y por tal motivo fueron seleccionados para estudiarlas en profundidad.

Acanthocyclops robustus, *D. uruguayensis*, *M. albidus* y *M. longisetus* depredaron larvas de mosquitos pero la eficiencia de depredación fue mayor en las dos últimas especies mencionadas. Estas cuatro especies depredan principalmente sobre estadios tempranos de larvas (L1 y L2), siendo casi nulo el número de L3 y L4 consumidos. Esto último responde a que los copépodos ciclopoideos, no son lo suficientemente grandes como para atrapar larvas de estadios avanzados, que pueden ser mayores en talla.

Bajas tasas de depredación sobre L3 y L4 fueron reportadas anteriormente por varios autores (Marten *et al.* 1989, 1994b, Schreiber *et al.*, 1996, Manrique-Saide *et al.*, 1998, Soumare *et al.*, 2004).

La capacidad depredadora de las hembras adultas de las especies de copépodos estudiadas, fue significativamente mayor que la de los machos adultos y copepoditos, lo cual puede relacionarse con el mayor tamaño, una mayor movilidad y/o un comportamiento más agresivo frente a las presas.

Macrocyclops albidus fue la única de las especies evaluadas que presentó preferencia sobre los estados inmaduros de *C. pipiens*. Estos resultados difieren del comportamiento de preferencia de *M. annulatus* por las larvas de *A. aegypti* observado por Micieli *et al.*, (2002). La preferencia de estos copépodos por una presa específica, también fue mencionada por Soumare *et al.* (2004), en estudios de la capacidad depredadora en condiciones de laboratorio, de adultos de *M. longisetus*, utilizando larvas de *A. albopictus* y *Culex quinquefasciatus* Say como presas.

Diacyclops uruguayensis es una especie conocida en Uruguay y Brasil (Reid, 1998) y recientemente hallada en la Argentina (Menu-Marque y Micieli, 2007). Los resultados obtenidos sobre su capacidad depredadora son novedosos considerando la ausencia de información acerca de esta especie de copépodo. Los resultados a partir de ensayos similares realizados con especies pertenecientes al mismo género concuerdan con los obtenidos en este trabajo (Marten, 1989; Marten *et al.*, 1989, 1990 a, 1990 b, Andreadis y Gere 1992). Teniendo en cuenta que *D. uruguayensis* habita en cuerpos de agua temporarios, la capacidad de sobrevivir a períodos de sequía observada en este estudio, resulta coherente.

Acanthocyclops robustus, es un copépodo de distribución neotropical (Menu-Marque, 2001). Esta especie presentó una capacidad depredadora similar a la observada en *Acanthocyclops vernalis* (Fischer) (Marten, 1989). *A. vernalis* solamente depreda sobre primer estadio de larvas de mosquito cuando se encuentra bajo condiciones de laboratorio (Marten, 1989, 1990a; Andreadis y Gere, 1992). En este trabajo se demostró que *A. robustus* es un depredador de estados inmaduros de mosquitos y a la vez presenta la característica de sobrevivir a las condiciones de desecación y a de calidad del agua que presentan los contenedores artificiales.

Mesocyclops longisetus presenta distribución neotropical y fue previamente citado como controlador de la densidad larval de poblaciones de *Anopheles albimanus* Wiedemann en zanjas linderas a los caminos (Marten *et al.*, 1989) y también como eficiente depredador de *A. aegypti* y *A. albopictus* en los recipientes en que habitan (Schreiber *et al.*, 1993, Marten *et al.*, 1994, Manrique-Saide *et al.*, 1998). En estos ensayos, *M. longisetus*, demostró una alta capacidad depredadora sobre *A. aegypti* y *C. pipiens*, y también la capacidad para sobrevivir a las condiciones de desecación expuestas. Este mecanismo de tolerancia a la desecación ha sido observado por otros autores en diferentes especies de *Mesocyclops* (Zhen *et al.*, 1994). Sin embargo, existen datos contradictorios como los citados por Gorrochotegui-Escalante *et al.* (1998), quienes registraron una importante mortalidad de esta especie durante la estación seca en México. La supervivencia de la especie disminuyó durante la exposición al agua de floreros, pero la mortalidad registrada en este estudio no fue significativa, situación que permite el potencial uso de *M. longisetus* como controlador de los estados inmaduros de las poblaciones de mosquitos que crían en recipientes artificiales.

Macrocyclus albidus presenta una distribución cosmopolita (Menu-Marque, 2001). Los resultados de los experimentos de depredación realizados, concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores por otros autores (Marten, 1990a), mostrando una buena capacidad de la especie para controlar larvas de mosquitos. La incapacidad para sobrevivir en condiciones de sequía sugiere una eficacia limitada en el empleo de este copépodo sobre estados inmaduros de *A. aegypti* y *C. pipiens*. Por otra parte, temperaturas superiores a 37°C disminuyen la supervivencia de esta especie (Marten *et al.*, 1994b), característica importante que no favorece el uso potencial de este copépodo, debido a que la temperatura suele ser muy alta en contenedores expuestos al sol durante el verano.

En conclusión, las tasas de depredación más elevadas, al evaluar esta capacidad a lo largo del tiempo, fueron registradas para *M. longisetus* y *M. albidus*, pero mediante el análisis de Medidas Repetidas en el Tiempo se observó una tendencia a que las diferencias en la tasa de consumo diaria de estas especies se igualen a lo largo del tiempo con las registradas para *D.*

uruguayensis y *A. robustus*, quienes presentaron un menor consumo al inicio de la evaluación. Por lo tanto, el efecto de cualquiera de las cuatro especies de copépodos sobre la población de los mosquitos, no resultaría diferente si se aplicaran como controladores poblacionales. Teniendo en cuenta la tolerancia a la desecación, *A. robustus* y *D. uruguayensis* son interesantes depredadores de especies de mosquitos que viven en recipientes artificiales y pueden ser considerados dentro de un programa de manejo integrado que se desarrolle en lugares y momentos aptos para la supervivencia de estos ciclopoideos.

| |
|--------------------|
| CAPÍTULO II |
|--------------------|

Evaluación de Platelminfos depredadores de *C. pipiens* y *A. aegypti*²

Introducción

Los Platelminfos Turbelarios son gusanos chatos de vida libre que viven, en su mayoría, en agua dulce. Los más conocidos de este grupo son los Tricladidos, llamados comúnmente planarias. Son animales acelomados, de simetría bilateral, que presentan ciclos de vida simples. Son hermafroditas con fertilización cruzada luego de la cópula. Una vez ocurrida la fertilización, colocan cocones a partir de los cuales emergen de 2 a 10 individuos jóvenes, de desarrollo directo, los cuales, no presentan diferencias morfológicas con el adulto. Los cocones están formados por embriones, células vitelinas y una membrana celular a modo de cubierta o cáscara. Sincrónicamente con la postura del cocón, son segregadas sustancias glandulares que se endurecen formando una cáscara, haciendo que éste cumpla la función de huevo de resistencia (Hyman, 1951).

Los turbelarios de vida libre son conocidos como depredadores de algunos invertebrados. La presa es capturada mediante mucus que es secretado al detectar perturbaciones en el agua causadas por las presas y recibidas como estímulos en los mecanorreceptores de la superficie de sus cuerpos. Por esto son clasificados como depredadores táctiles con digestión externa (Wrona y Koopowitz, 1998; Trochine *et al.*, 2005). Se sabe que en su ambiente natural, se alimentan de varios animales entre los que se han citado oligoquetos, diferentes artrópodos y moluscos (Hyman 1951; Jennings, 1957; Reynoldson y Young, 1963; Mitchell, 1974). En el laboratorio *Dafnia* spp, y naupliis de *Artemia salina* (L.) han sido utilizados como alimento para los platelmintos (McConnell, 1967).

² La información contenida en este capítulo ha sido publicada:
Tranchida M.C, Maciá A., Brusa F., Micieli M.V. and García J.J. 2009. Predation potential of three flatworms species (Platyhelminthes: Turbellaria) on mosquitoes (Diptera: Culicidae). Biological Control 49 : 270-276

Los Rabdocoelos, otro grupo de platelmintos turbelarios estrechamente relacionado con los tricládidos, han sido menos estudiados como depredadores de organismos acuáticos (Motoyoshi, 2007). A pesar de la escasa información que existe acerca de este grupo, como controladores de estados inmaduros de mosquitos, se conoce que algunas especies del género *Mesostoma* depredan sobre larvas de *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* y *Culiseta* en condiciones de laboratorio (Kolasa, 1984, Blaustein 1990, Wrona y Koopowitz, 1998). *Mesostoma ehrenbergii* (Focke) Örsted ha sido citado como consumidor de zooplancton en hábitat en donde no se registró la presencia de peces (Maly *et al.*, 1980; Brendonck *et al.*, 2002; Eitam *et al.*, 2004; Trochine *et al.*, 2005).

La depredación de larvas de mosquitos, por parte de los gusanos chatos de vida libre, fue registrada por primera vez por Lischetti en 1919 y desde entonces se ha abordado el estudio de estos animales como controladores biológicos de culícidos. Desde fines de la década del 70, algunas especies de turbelarios han sido estudiadas para su aplicación en el control de mosquitos. Diferentes especies de *Dugesia* fueron estudiadas en países como Canadá (George *et al.*, 1983), Brasil (Melo y Andrade, 2001) y Malasia (Loh *et al.*, 1992) con el fin de ser aplicadas como enemigos de mosquitos vectores. En experimentos de campo, las larvas de *Culex sp.*, fueron reducidas en más del 90%, en 26 días por *Dugesia dorotocephala* (Woodsworth) en California (Legner y Yu, 1975). *Dugesia tigrina* (Girard) redujo significativamente poblaciones de *Culex sp.* que se desarrollan en cunetas en Canadá (George *et al.* 1983), pero no controló poblaciones de mosquitos en cuerpos de agua temporales en Dakota del Norte (Meyer y Learned, 1981). Suprakash y Aditya (2003), emplearon *Anopheles* y *Culex* como presas para evaluar turbelarios depredadores, y verificaron que las larvas son más palatables respecto de los estadios de huevo y pupa. Todas las observaciones mencionadas, sugieren que los turbelarios pueden ser aplicados como agentes de control biológico, pero los estudios tendientes a su empleo como enemigos naturales de mosquitos, disminuyeron a causa del uso de *Bacillus thuringiensis israelensis* como un eficaz bioinsecticida (Legner, 1995). Por otra parte, el uso de turbelarios posee una serie de

limitaciones que restringen el éxito de su aplicación a sitios específicos. Por esta razón, es necesario estudiar el sistema depredador-presa y su aplicabilidad como agentes de control biológico, antes de su integración a programas de control de vectores. Por lo tanto, las contribuciones al conocimiento de la fauna local de platelmintos son útiles para seleccionar las especies que presentan potencial para depredar larvas de mosquitos vectores.

En este capítulo se plantean dos objetivos:

- * Identificar las comunidades de platelmintos de vida libre que son más abundantes en los sitios de cría de estados inmaduros de mosquitos.

- * Evaluar la capacidad depredadora de la fauna de platelmintos nativos de vida libre, como depredadores de mosquitos que crían en recipientes artificiales.

Materiales y Métodos

Área de estudio y recolección de las muestras.

Las colectas del material para los ensayos, se realizaron en diferentes lugares de cría de mosquitos en la ciudad de La Plata y sus alrededores (34°51'07''S, 58°57'30''W). Las muestras fueron colectadas entre septiembre de 2005 y abril de 2006. La búsqueda de mosquitos y turbelarios se realizó en los siguientes cuerpos de agua dulce: cuerpos de agua temporarios (n= 3), cuerpos permanentes (n= 2), campo de arroz (n= 1), zanjas de drenaje (n= 12), contenedores artificiales (n= 50) (floreros y jarrones del cementerio municipal de la ciudad de La Plata y cubiertas de automóviles en desuso) y contenedores naturales (n= 10) (agua acumulada en las axilas de las hojas de *E. cabreræ*).

Los 50 contenedores artificiales y los 10 naturales (Fig. 12 y 13, página 41), fueron seleccionados al azar en cada semana de muestreo y el contenido filtrado con redes de malla fina para concentrar y transportar la muestra al laboratorio. En los restantes ambientes, se colectaron 100 cucharones de 250 ml de capacidad por semana, que se filtraron mediante redes de 100- μ m. Las muestras fueron colocadas en recipientes plásticos de 3-l de capacidad y transportadas al laboratorio para su procesamiento.

Los tres cuerpos de agua temporarios (Fig. 8, página 39), consistieron en depresiones en el suelo, que se inundan por el agua de lluvia. La superficie de inundación varió entre 20 a 100 m², con una profundidad aproximada de 0.35 m. Asimismo, el tiempo de permanencia del agua fue variable, desde pocos días hasta varios meses dependiendo de las condiciones ambientales. Los criaderos se ubicaron en sitios abiertos, expuestos al sol, localizados aproximadamente a 6 km de la zona urbana en la ciudad de La Plata.

Los ambientes permanentes (Fig. 9 página 39) presentaron una superficie aproximada de 25 x 25 x 1m (largo x ancho x profundidad). Uno de ellos se localizó en las proximidades del Río de La Plata, a 9 Km de la ciudad de La Plata. El segundo ambiente estuvo situado en un campo

experimental perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata, en Los Hornos, aproximadamente a 7 Km de la ciudad de La Plata.

El campo de arroz (Fig. 11 página 40) se encuentra surcado por canales utilizados para el abastecimiento de agua requerida durante la fase de la siembra del arroz. Es inundado artificialmente en diciembre de cada año, manteniéndose el suministro de agua hasta marzo. Se consideraron para la recolección de las muestras, 40 canales de 20 x 0.25 x 0.15 m (largo, ancho y profundidad).

Las zanjas de drenaje (Fig. 10 página 40) ubicadas en la zona suburbana de la ciudad de La Plata, contienen residuos domiciliarios como detergente, cloro, jabón, grasa, latas, papeles, plásticos y vidrios, además del agua de lluvia que circula por ellas. Pueden presentar vegetación acuática, entre las que se hallan algas y plantas arraigadas y flotantes. Las muestras, a diferencia de los ambientes descritos anteriormente, fueron recolectadas semanalmente con el empleo de cucharones de 250 ml de capacidad, obteniéndose 5 cucharones en cada una de las 12 zanjas seleccionadas. Las mismas fueron concentradas y transportadas al laboratorio de la igual manera que la descrita anteriormente para los demás ambientes.

Para tomar las muestras de los contenedores artificiales y naturales, fue empleada una técnica de muestreo diferente a la mencionada. En el caso de los floreros y jarrones del cementerio, su contenido total fue colocado en bandejas para ser revisado in situ y luego filtrado con redes para concentrar la muestra y llevarla al laboratorio en recipientes plásticos. En el caso de los contenedores naturales y las cubiertas en desuso, el contenido fue retirado mediante pipetas plásticas y colocado en recipientes plásticos para el traslado al laboratorio.

En el laboratorio, el contenido de los recipientes fue trasvasado a bandejas plásticas, y los turbelarios y las larvas de mosquitos fueron separados con el empleo de pipetas.

Identificación y colonización de los turbelarios

Los turbelarios extraídos de las muestras tomadas en los diferentes ambientes, fueron separados en contenedores individuales de 500-ml con agua declorinada, para iniciar colonias de cada especie hallada. Los ejemplares de las colonias fueron alimentados mediante el agregado de larvas de mosquitos a los recipientes. Una vez obtenidos los cocones, fueron separados nuevamente en contenedores para aumentar el número de individuos de cada especie. Con el fin de realizar la identificación de las especies encontradas, ejemplares de las colonias de laboratorio, fueron colocados en el fijador Bouin e incluidos en parafina. Posteriormente se realizaron cortes sagitales en series de 4- μ m de espesor, se colorearon con el método de hematoxilina-eosina y finalmente fueron identificados según Noreña-Janssen y Faubel (1992), y Sluys *et al.* (2005). Mediante estas técnicas se diferencian caracteres anatómicos del sistema reproductor, que se utilizan en la identificación a nivel específico.

Una vez identificadas, las especies obtenidas de las muestras fueron separadas por la morfología externa y la coloración del cuerpo.

Evaluación de la capacidad depredadora de turbelarios sobre especies de mosquitos encontradas en el mismo ambiente

Los turbelarios recolectados en los diferentes sitios de cría de mosquitos, fueron divididos en dos categorías según el tamaño de los individuos. “Pequeños” (P), aquellos que presentaron un tamaño menor o igual a 0.5 cm y “Grandes” (G), aquellos con un tamaño mayor a 0.5 cm. En el caso de que los individuos de alguna especie hallada fuesen menores que 0.5 cm, no fueron separados por rango de tamaño.

Los turbelarios fueron expuestos a las larvas de las especies de mosquitos halladas en cada sitio muestreado. Para cada réplica se utilizó un recipiente plástico de 8 cm de diámetro en donde se expusieron a un turbelario, larvas de mosquitos de estadios tempranos en 50 ml de agua declorinada. Fueron probados individuos de ambas categorías de tamaños

de todas las especies de turbelarios identificadas. La depredación diaria en cada recipiente fue registrada como el número total de larvas faltantes, considerándose las consumidas por los depredadores más las muertas pero no consumidas. Ninguna otra fuente de alimento fue incorporada a los recipientes. Un contenedor de las mismas características que los descritos antes, con larvas y sin depredador fue considerado como control, con la finalidad de descartar muerte por causas intrínsecas de las presas. Se realizaron tres réplicas (sin repeticiones) para cada combinación de especies de presa y depredador, incluyendo los dos tamaños considerados.

Ensayos de depredación en condiciones de laboratorio

Con el objetivo de evaluar la mortalidad que causan estas especies de turbelarios sobre larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens* se realizaron una serie de experimentos en el laboratorio. Los mismos se llevaron a cabo bajo condiciones controladas, en incubadoras a $26 \pm 1^{\circ}$ C y fotoperíodo de 12:12 h (L:O). Se emplearon nueve réplicas para cada combinación de especie y tamaño de depredador. Larvas, sin depredadores fueron mantenidas bajo las mismas condiciones, con la finalidad de detectar mortalidad por causas intrínsecas. No se agregó otra fuente de alimento y los individuos utilizados para estos experimentos no fueron sometidos a ayuno previamente. La mortalidad que causa el depredador fue registrada teniendo en cuenta las larvas depredadas (ingeridas), más las larvas muertas a causa del mucus (sustancia producida como trampa para las presas), pero no ingeridas.

Experimento 1

Para evaluar si la mortalidad que causan estas especies de turbelarios sobre larvas de culícidos, depende del tamaño del depredador y de la presa, se realizó el siguiente ensayo: fueron expuestas a un turbelario (pequeño y grande), 25 larvas de cada estadio (L1 a L4) de las especies de culícidos estudiadas, en contenedores plásticos de 8 cm de diámetro, conteniendo 150 ml de agua declorinada.

Los datos fueron analizados por tests ANOVA bifactorial (luego de haber sido comprobada la homogeneidad de varianzas mediante Análisis de Residuales) para testear el efecto de los factores “estadio larval” y “tamaño del depredador”. Tests de ANOVA independientes fueron realizadas para cada combinación de depredador y presa.

Experimento 2

Con la finalidad de evaluar si los turbelarios presentan preferencia por alguna de las especies ofrecidas como presas, 25 larvas de segundo estadio de *A. aegypti* y 25 larvas de segundo estadio de *C. pipiens* (50 larvas/contenedor), fueron expuestas a un turbelario depredador. Se utilizaron recipientes con las mismas características que los antes descritos, pero en este caso con 250 ml de agua declorinada. Para las especies de turbelarios que presentaron más de un rango de tamaño, sólo fue probado el tamaño “grande” de depredadores. Los datos fueron analizados mediante un test Student. En los experimentos 1 y 2, el número de larvas muertas por causa del depredador fueron registradas una vez transcurridas las 24 hs de haber iniciado el experimento.

Experimento 3

Para evaluar la mortalidad que causan estos turbelarios depredadores a lo largo del tiempo, 25 larvas de segundo estadio de *A. aegypti* y *C. pipiens* (de forma independiente) fueron expuestas a un turbelario (Pequeño o Grande), en contenedores con 150 ml de agua declorinada. Se tomó en cuenta un período de 5 días consecutivos durante el cual cada 24 hs se registró el número de larvas muertas. Las larvas vivas restantes fueron retiradas del contenedor y reemplazadas por 25 larvas nuevas.

Los resultados fueron analizados mediante un test de Medidas Repetidas en el Tiempo, ya que los datos se registraron equiespaciadamente durante el periodo de estudio, siendo “días” el factor intra-sujeto. Para lograr la homocedasticidad y normalidad de los datos, el número de larvas muertas por efecto del depredador fue transformado

utilizando la función logarítmica ($\log x + 1$). Los resultados fueron contrastados mediante el test de Duncan.

Experimento 4

Este experimento fue diseñado para determinar si alguna de las especies de turbelarios es capaz de tolerar condiciones de desecación a las que están expuestos los recipientes donde cría *A. aegypti* y *C. pipiens*. Para los turbelarios, la forma de tolerar condiciones de sequía es por medio de huevos de resistencia que dejan los individuos adultos antes de morir a causa de la desecación. Para este experimento, fueron colocados 15 ejemplares de cada especie, en cápsulas de Petri de 10-cm de diámetro con 50-ml de agua de clorinada y arena estéril en el fondo. Las cápsulas fueron colocadas a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del agua, lo cual tardó aproximadamente 7 días. Las cajas fueron separadas en dos grupos. Uno de ellos fue inundado luego de 15 días de que el agua se evaporara y el otro luego de 30 días. Tres cápsulas para cada especie de turbelarios fueron inundadas en estos dos períodos de tiempo. Una vez inundados, se registró el número de cocones presentes en cada cápsula, cada 24 horas durante 7 días. Aquellos cocones colapsados fueron considerados como no viables y no fueron considerados para el análisis. Los promedios de cocones presentes de cada especie en los períodos de tiempo considerados fueron comparados mediante el test de Rangos de Mann-Whitney. La aparición de individuos juveniles fue registrada cada 24 horas, luego de transcurridas 72 horas de la inundación y durante un período total de 7 días, como “individuos presente” o “individuos ausentes”.

Tolerancia de los turbelarios al agua de contenedores artificiales

Este ensayo se llevó a cabo para determinar si los turbelarios pueden tolerar la calidad del agua en donde crían las especies de culícidos

estudiadas (*A. aegypti* y *C. pipiens*). Para evaluar si el agua de los contenedores artificiales produce mortalidad en los turbelarios, se colectó el agua de 25 floreros del cementerio de La Plata, transportada luego en un contenedor de 3-l. En el laboratorio, el agua colectada fue filtrada utilizando papel de filtro Whatman® N° 5, el cual retiene partículas de 2.5 µm. Posteriormente, 10 turbelarios de cada especie fueron colocados en recipientes plásticos de 250-ml de capacidad, con 150 ml del agua de los floreros filtrada. No fue incorporada ninguna fuente de alimento, quedando sólo disponible como alimento aquellos microorganismos que pudieron atravesar el papel de filtro. Para cada especie de turbelarios se realizaron tres réplicas. Otras tres réplicas para cada especie, en agua declorinada fueron realizadas, con la finalidad de comparar la mortalidad en ambas calidades de agua. Se registró la mortalidad luego de 7,14 y 21 días de iniciado el ensayo. Los datos fueron analizados mediante el test de Friedman, con un nivel de significancia de 0,01.

Resultados

Especies encontradas en el área de muestreo y su capacidad depredadora

En el área de estudio fueron reconocidas tres especies de turbelarios en las muestras colectadas en los diferentes ambientes relevados: *Bothromesostoma* cf. *evelinae* Marcus y *M. ehrenbergii* (Rhabdocoela, Typhloplanoida, Typhloplanidae), y *Girardia anceps* (Kenk) Ball (Tricladida, Paludicola, Dugesiidae). (Tabla 5, Fig. 29, 30 y 31)

En los ambientes temporarios fueron encontrados estados inmaduros de *O. albifasciatus* y *C. dolosus*, junto a las tres especies de turbelarios. En los cuerpos de agua permanente, ejemplares de *M. ehrenbergii* y *B. cf. eveliana*, fueron colectados entre la vegetación flotante del lugar, colonizado por estados inmaduros de *C. dolosus* y *C. eduardoi*. En el campo de arroz, en zanjas de desagüe domiciliario, en contenedores artificiales y en las axilas de *E. cabreræ*, no se encontraron turbelarios. En estos ambientes fueron colectados estados inmaduros de diferentes especies de culícidos; *A. albitarsis* y *C. dolosus* fueron colectados en el campo de arroz, *C. pipiens* en zanjas de drenaje, *C. renatoi* en las axilas de *E. cabreræ*, y *A. aegypti* y *C. pipiens* en contenedores artificiales.

En el experimento de depredación sobre larvas colectadas en el mismo ambiente, los turbelarios consumieron todas las larvas de *C. dolosus* y *O. albifasciatus* colectadas en los mismos ambientes que los depredadores. Las tres especies de depredadores encontradas depredaron sobre estadios tempranos de larvas de mosquitos y el porcentaje de larvas consumidas fue registrado en un rango de 52 a 100 % (Tabla 5). En las especies de turbelarios separadas en dos categorías de tamaño, los individuos grandes y pequeños consumieron larvas de mosquito en cantidades similares. La capacidad depredadora no fue evaluada sobre larvas de *C. eduardoi* debido a que fueron colectados ejemplares en un número bajo.

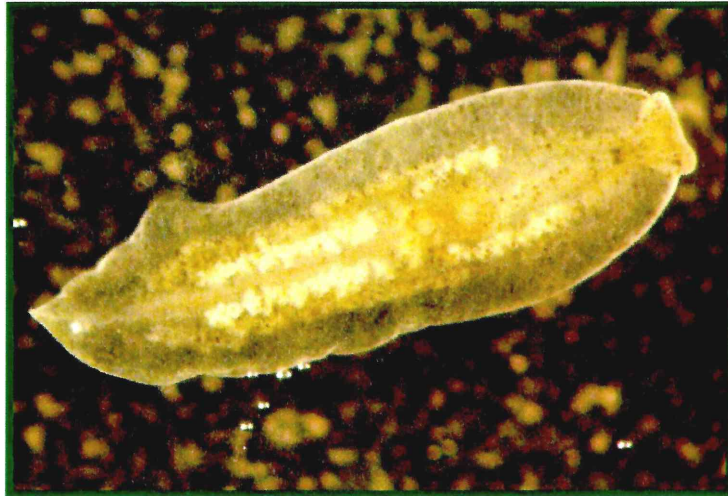


Figura 29. *Mesostoma ehrenbergii*

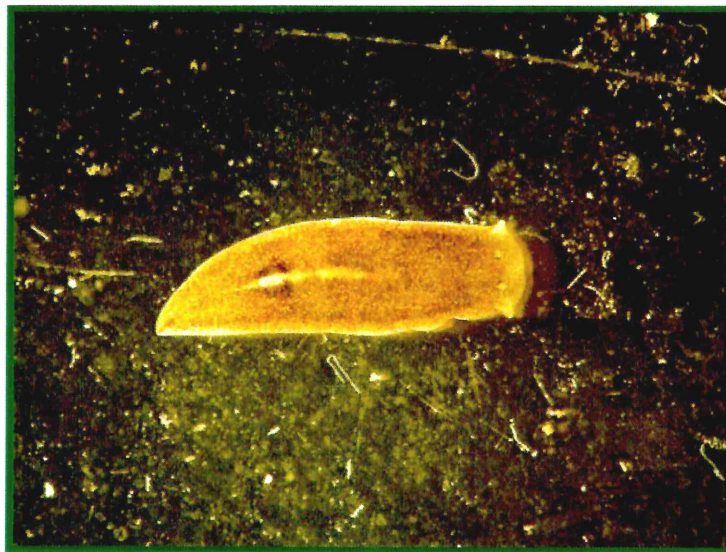


Figura 30. *Girardia anceps*



Figura 31. *Bothromesostoma* cf. *evelinae*

Ensayos de depredación en condiciones de laboratorio

Experimento 1

Los resultados del análisis de la varianza para cada especie de turbelario se muestran en la Tabla 6. Los resultados de las comparaciones de pares de promedios obtenidas a partir del test de Duncan, se observan sobre la figura correspondiente a cada especie de turbelario.

Girardia anceps vs. *A. aegypti*: los individuos clasificados como grandes de *G. anceps* consumieron mayor cantidad de larvas de primer y segundo estadio que de tercero y cuarto. Los individuos correspondientes a la categoría “pequeños” mostraron diferencias significativas en el test de Duncan, entre el número de larvas consumidas de primer y tercer estadio. (Fig. 32 A)

Girardia anceps vs. *C. pipiens*: tanto los ejemplares “pequeños” como los “grandes” de *G. anceps* depredaron diferencialmente sobre larvas de primer y segundo estadio. En el caso de presas de mayo tamaño (tercer y cuarto estadio), los diferentes tamaños del depredador no mostraron diferencia en la capacidad de consumir este tipo de presa. (Fig. 32 B)

Mesostoma ehrenbergii vs. *A. aegypti*: la capacidad depredadora de los individuos “pequeños” de *M. ehrenbergii* disminuyó al incrementarse el tamaño de la presa. Para los depredadores “grandes” de esta especie, no se detectaron diferencias significativas en la capacidad de consumir los diferentes estadios larvales de *Ae aegypti*. (Fig. 33 A)

Mesostoma ehrenbergii vs. *C. pipiens*: la capacidad depredadora de los ejemplares de *M. ehrenbergii* “pequeños” fue significativamente menor cuando fueron expuestas larvas de tercer y cuarto estadio. El número de larvas de *C. pipiens* depredadas en los cuatro estadios, no mostraron diferencias significativas al ser consumidas por *M. ehrenbergii* de tamaño “grande” (Fig. 33 B).

Bothromesostoma cf. *evelinae* vs. *A. aegypti* y *C. pipiens*: ambas especies de mosquitos fueron depredadas por esta especie de turbelario. Se encontraron diferencias significativas en el número de larvas de primer y tercer estadio consumidas por este depredador, con el número de larvas faltantes de cuarto estadio. (Fig. 34 A y B)

Experimento 2

Mesostoma ehrenbergii fue la única de las 3 especies de turbelarios que mostró preferencia por alguna de las especies presa ($t=61,00$; $gl=1$; $p=0,011$). No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre el promedio de larvas muertas de *A. aegypti* y *C. pipiens* cuando fueron expuestas juntas a un ejemplar de *G. anceps* y *B. cf. evelinae*, siendo los resultados estadísticos respectivos: $t= 9,13$, $gl=1$; $p=0,069$ y $t=7,50$; $gl=1$; $p=0,084$. (Fig. 35)

Bothromesostoma cf. *evelinae* depredó un menor número de larvas (promedio \pm DE número de larvas muertas, *C. pipiens*: $5,0 \pm 1,1$, *A. aegypti*: $4,3 \pm 0,8$) que *M. ehrenbergii* (*C. pipiens*: $14,5 \pm 1,3$, *A. aegypti*: $13,8 \pm 0,8$) y *G. anceps* (*C. pipiens*: $20,5 \pm 1,3$, *A. aegypti*: $22,3 \pm 0,5$).

Experimento 3

Girardia anceps no mostró diferencias significativas en la tasa diaria de mortalidad larval causada durante los cinco días del experimento (Tabla 7, Fig. 36). *Mesostoma ehrenbergii* consumió un número menor de larvas de ambas especies de presa en el quinto día de experimentación, mostrando diferencias significativas en la tasa de mortalidad larval causada entre ese día y los anteriores (Tabla 7, Fig. 37). La tasa de mortalidad larval causada por *B. cf. evelinae* fue constante sobre *C. pipiens* a lo largo de los cinco días, no habiendo diferencias significativas entre el número de larvas muertas por día. Por el contrario, la mortalidad causada por esta especie sobre larvas de *A. aegypti* mostró un pico de consumo máximo el tercer día del experimento, que resultó significativamente diferente a los restantes días (Tabla 7, Fig. 38).

Experimento 4

Se obtuvieron 9 ± 1.5 (promedio \pm DE) cocones y ausencia de individuos de *G. anceps* viables por réplica luego de 15 días de desecación, y 6 ± 3.6 cocones transcurridos 30 días de desecación, siendo no significativa la diferencia en el número de cocones registrados en ambos tiempos ($z= 1,31$; $p=0,19$), en este momento se registró la presencia de individuos de esta especie. Los individuos de *M. ehrenbergii* dejaron 3 ± 1.5 cocones por réplica luego de 15 días y 1 ± 1 luego de un período de 30 días, no habiendo diferencias significativas para ambos tiempos evaluados en cuanto al número de cocones presentes ($z=1,53$; $p= 0,13$). Se registraron individuos juveniles emergidos de estos cocones, corroborando la viabilidad de los mismos. *Bothromesostoma cf. evelinae* no fue capaz de sobrevivir bajo estas condiciones de desecación, puesto que no fueron encontrados cocones o ejemplares de la especie, luego de transcurridos los períodos de tiempo evaluados.

Tolerancia de los turbelarios al agua de contenedores artificiales

Entre 7 y 14 días de exposición de *G. anceps* al agua de contenedores artificiales, no se registró mortalidad. Un 6.6% (N=1) de mortalidad, en los ejemplares de esta especie, fue registrado a los 21 días de exposición. La diferencia en el número de individuos muertos en los 3 períodos evaluados en ambas calidades de agua resultó no significativa ($X^2_{(N=6, gl=2)}=6,00$; $p<0,049$). Para *M. ehrenbergii* se registró 0%, 13.3% y 20% de mortalidad luego de 7, 14 y 21 días respectivamente, siendo estas diferencias de mortalidad no significativas ($X^2_{(N=6, gl=2)}=4,66$; $p<0,097$). La mortalidad de *B. cf. evelinae* alcanzó un 6.6% a los 7 días, un 40 % a los 14 días y 66.6% luego de 21 días, siendo significativas las diferencias observadas ($X^2_{(N=6, gl=2)}=11,00$; $p<0,0041$) en cuanto al número de individuos muertos en cada período de tiempo y calidad de agua, ya que en agua declorinada no se registró mortalidad para ninguno de los 3 períodos. Como resultado adicional, se observó que los individuos de *M. ehrenbergii* colocaron 3 cocones y los de *B. cf. evelinae* 5 cocones luego de 21 días de haber sido expuesto en agua de recipientes artificiales.

Tabla 5. Especies de mosquitos y turbelarios encontradas en los sitios de cría naturales de la ciudad de La Plata. Porcentaje de larvas ingeridas en condiciones de laboratorio.

| Habitat | Especie de turbelario | Tamaño de los turbelarios | Especie de mosquito (número expuesto) | Larvas muertas (%) |
|-----------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| | <i>G. anceps</i> | >0.5 cm | | 100 |
| | | ≤0.5 cm | <i>O. albifasciatus</i> | 100 |
| | <i>M. ehrembergii</i> | >0.5 cm | (15) | 100 |
| | | ≤0.5 cm | | 87 |
| Ambientes temporarios | <i>B. cf. evelinae</i> | ≤0.5 cm | | 80 |
| | | >0.5 cm | | 100 |
| | <i>G. anceps</i> | ≤0.5 cm | <i>C. dolosus</i> | 96 |
| | | >0.5 cm | (25) | 100 |
| | <i>M. ehrembergii</i> | ≤0.5 cm | | 92 |
| | <i>B. cf. evelinae</i> | ≤0.5 cm | | 60 |
| Ambientes permanentes | <i>M. ehrembergii</i> | >0.5 cm | <i>C. dolosus</i> | 100 |
| | | ≤0.5 cm | (25) | 88 |
| | <i>B. cf. evelinae</i> | ≤0.5 cm | | 52 |

Tabla 6. Resultado del test de ANOVA de dos vías del experimento 1 para evaluar la mortalidad que *G. anceps* y *M. ehrenbergii* causan sobre larvas de primer a cuarto estadio de *A. aegypti* y *C. pipiens*. Para *B. cf evelinae* fue realizado un test de ANOVA de una vía, debido a que el factor “tamaño”, no fue incluido para la especie.

| Especie de turbelario | Especie de mosquito | Efecto | gl | F | P |
|------------------------------|---------------------|---------------------------------|-------|-------|--------|
| <i>G. anceps</i> | <i>A. aegypti</i> | Estadio <i>A. aegypti</i> | 3, 64 | 62,40 | <0.001 |
| | | Tamaño de <i>G. anceps</i> | 1, 64 | 85,55 | <0.001 |
| | <i>C. pipiens</i> | Tamaño x Estadio | 3, 64 | 18,58 | <0.001 |
| | | Estadio de <i>C. pipiens</i> | 3, 64 | 17,28 | <0.001 |
| | | Tamaño de <i>G. anceps</i> | 1, 64 | 16,11 | <0.001 |
| | | Tamaño x Estadio | 3, 64 | 4,98 | 0,004 |
| <i>M. ehrenbergii</i> | <i>A. aegypti</i> | Estadio <i>A. aegypti</i> | 3, 64 | 19,91 | <0.001 |
| | | Tamaño de <i>M. ehrenbergii</i> | 1, 64 | 25,40 | <0.001 |
| | <i>C. pipiens</i> | Tamaño x Estadio | 3, 64 | 10,70 | <0.001 |
| | | Estadio de <i>C. pipiens</i> | 3, 64 | 21,72 | <0.001 |
| | | Tamaño de <i>M. ehrenbergii</i> | 1, 64 | 48,34 | <0.001 |
| | | Tamaño x Estadio | 3, 64 | 1,41 | 0,24 |
| <i>B.cf evelinae</i> | <i>A. aegypti</i> | Estadio <i>A. aegypti</i> | 3, 32 | 10,95 | <0.001 |
| | <i>C. pipiens</i> | Estadio de <i>C. pipiens</i> | 3, 32 | 9,50 | <0.001 |

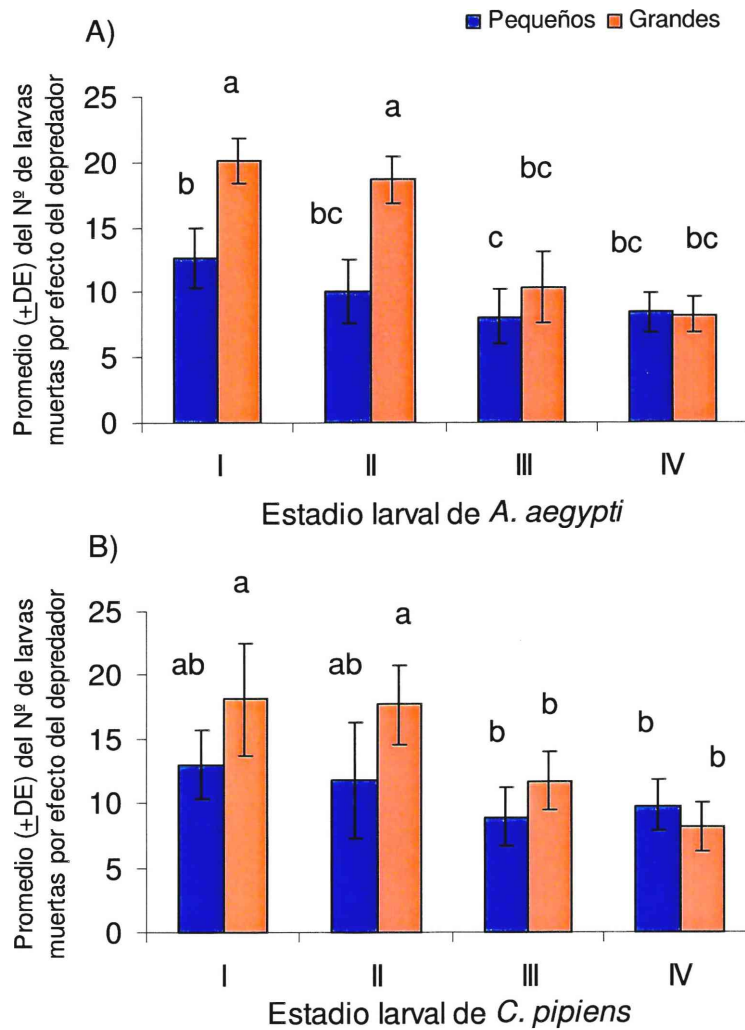


Figura 32. Promedio del número de larvas (de primer a cuarto estadio) de A) *A. aegypti* y B) *C. pipiens*, consumidas por *G. anceps* “pequeños” y “grandes”. Grupos de letras diferentes sobre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el promedio de larvas muertas por efecto del depredador entre los cuatro estadios y ambos tamaños de turbelario.

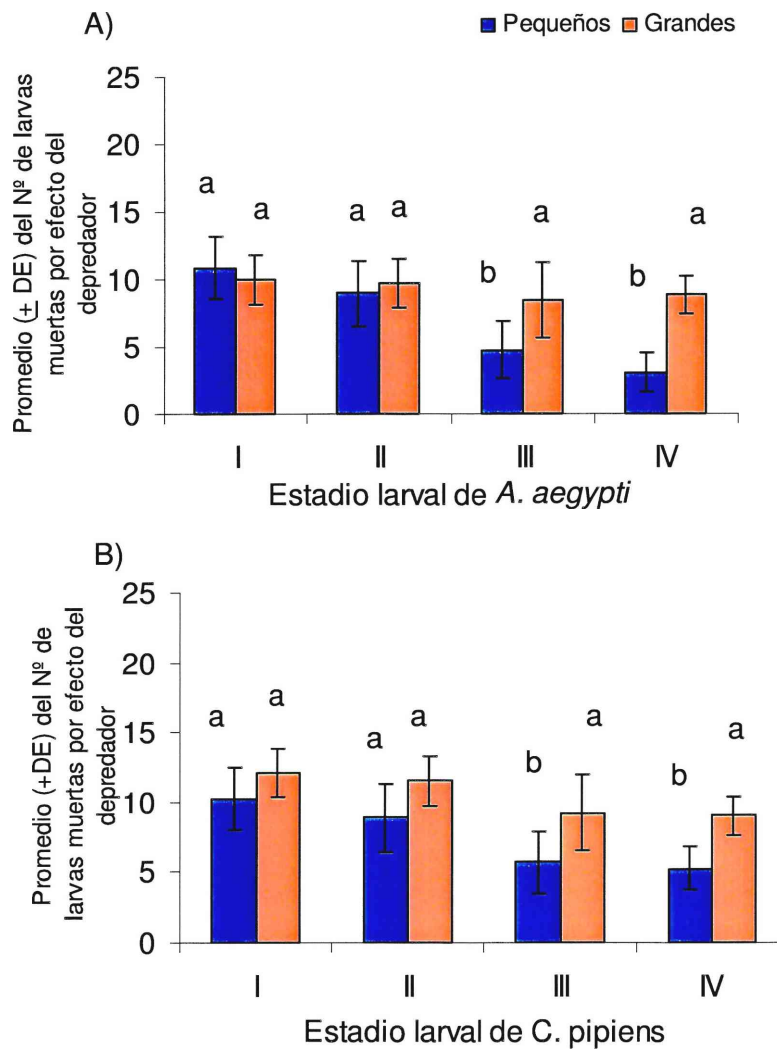


Figura 33. Promedio del número de larvas (de primer a cuarto estadio) de A) *A. aegypti* y B) *C. pipiens*, consumidas por *M. ehrenbergii* “pequeños” y “grandes”. Grupos de letras diferentes sobre las columnas, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el promedio de larvas muertas por efecto del depredador entre los cuatro estadios y ambos tamaños de turbelario.

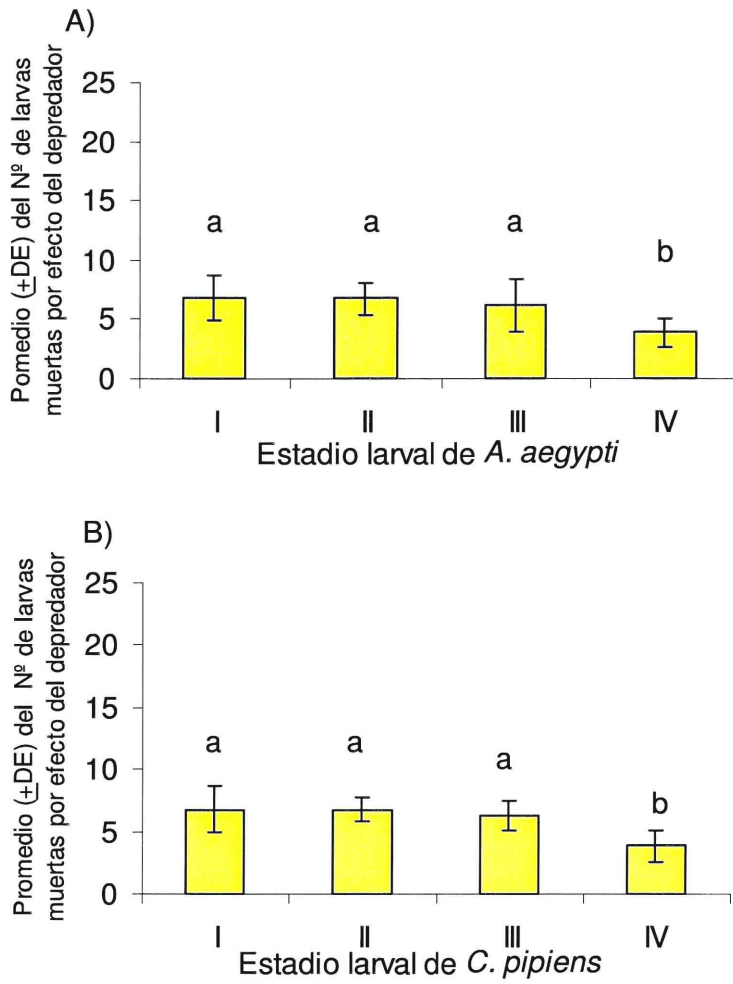


Figura 34. Promedio del número de larvas (de primer a cuarto estadio) de (A) *A. aegypti* y (B) *C. pipiens*, consumidas por individuos de *B. cf. evelinae*. Las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los promedios de larvas muertas por efecto del depredador en cada estadio larval.

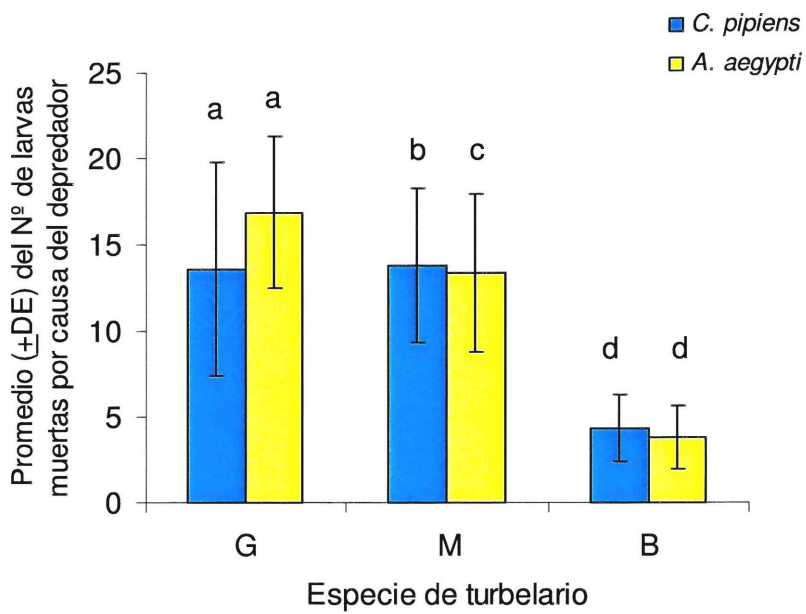


Figura 35. Promedio de larvas consumidas de *A. aegypti* y *C. pipiens*, cuando ambas especies fueron expuestas a G (*G. anceps*), M (*M. ehrenbergii*), B (*B. cf eveleinae*) en un mismo contenedor. Letras iguales en un mismo tratamiento, indican que no hubo diferencias significativas entre promedios ($p > 0,05$) para el test de Student.

Tabla 7. Resultado del test de ANOVA de Medidas Repetidas en el Tiempo para evaluar la capacidad depredadora a lo largo del tiempo de *B. cf. evelinae*, y de individuos pequeños y grandes de *G. anceps* y *M. ehrenbergii* sobre larvas de *A. aegypti* y *C. pipiens*. Para *B.cf evelinae* se realizó un ANOVA de una vía debido a que no se tiene en cuenta el factor “tamaño”.

| Especie turbelario | de | Especie mosquito | de | Factores | gl | F | P |
|-------------------------------|-------------------|------------------|----|--------------|-------|--------|--------|
| <i>G. anceps</i> | <i>A. aegypti</i> | | | Día | 4, 64 | 1.98 | 0.11 |
| | | | | Tamaño | 1, 16 | 348.92 | <0.001 |
| | | | | Día x tamaño | 4, 64 | 1.02 | 0.40 |
| | <i>C. pipiens</i> | | | Día | 4, 64 | 0.28 | 0.88 |
| | | | | Tamaño | 1, 16 | 525.43 | <0.001 |
| | | | | Día x tamaño | 4, 64 | 0.29 | 0.87 |
| <i>M. ehrenbergii</i> | <i>A. aegypti</i> | | | Día | 4, 64 | 41.51 | <0.001 |
| | | | | Tamaño | 1, 16 | 255.21 | <0.001 |
| | | | | Día x tamaño | 4, 64 | 5.77 | <0.001 |
| | <i>C. pipiens</i> | | | Día | 4, 64 | 77.98 | <0.001 |
| | | | | Tamaño | 1, 16 | 162.89 | <0.001 |
| | | | | Día x tamaño | 4, 64 | 9.12 | <0.001 |
| <i>B. cf. evelinae</i> | <i>A. aegypti</i> | | | Día | 4, 40 | 2.7 | 0.04 |
| | <i>C. pipiens</i> | | | Día | 4, 40 | 1.37 | 0.26 |

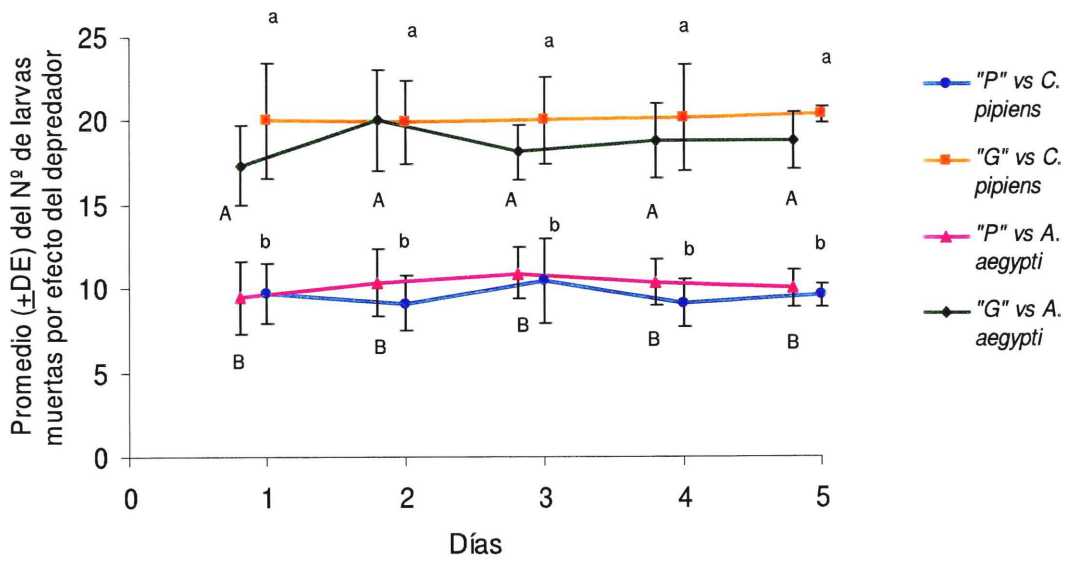


Figura 36. Promedio ($1 \pm$ DE) de la mortalidad larval diaria causada por *G. anceps* "Pequeños" (P) y "Grandes" (G) sobre *C. pipiens* y *A. aegypti*. Letras diferentes minúsculas entre días de un mismo tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para *C. pipiens*, las mayúsculas para *A. aegypti* como resultado del test de Duncan.

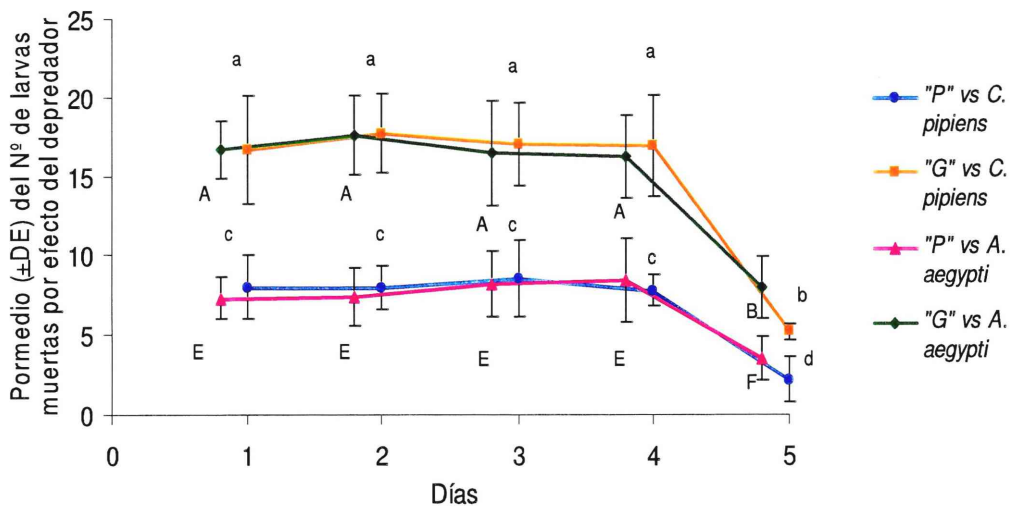


Figura 37. Promedio ($1 \pm$ DE) de la mortalidad larval diaria causada por *M. ehrenbergii* "Pequeños" (P) y "Grandes" (G) sobre *C. pipiens* y *A. aegypti*. Letras diferentes minúsculas entre días de un mismo tratamiento indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para *C. pipiens*, las mayúsculas para *A. aegypti* como resultado del test de Duncan.

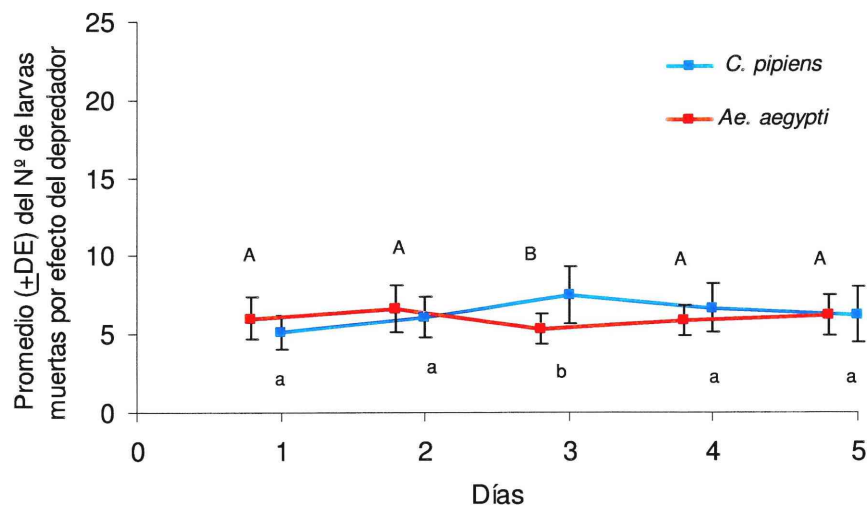


Figura 38. Promedio ($1 \pm$ DE) de la mortalidad larval diaria causada por *B. cf evelinae* sobre *C. pipiens* y *Ae. aegypti*. Letras minúsculas diferentes entre días indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para *C. pipiens* y mayúsculas para *Ae. aegypti* como resultado del test de Duncan.

Discusión

Como resultado de la prospección de turbelarios depredadores de mosquitos en el área de estudio, fueron halladas tres especies: *M. ehrenbergii* que presenta una distribución cosmopolita (Noreña-Janssen y Faubel, 1992), *G. anceps* con una distribución mucho más acotada, restringiéndose a Sudamérica, específicamente citada para la Argentina y el Paraguay (Sluys *et al.*, 2005) y finalmente, *Bothromesostoma cf. evelinae*, que se encuentra en América del Sur, y se ha registrado en Brasil, Uruguay, Argentina y Perú (Noreña-Janssen y Faubel, 1992; Noreña *et al.*, 2006). Las tres especies mencionadas en este trabajo son comunes en cuerpos de agua dulce, tanto temporarios como permanentes. Dada la presencia de estas especies en ambientes temporarios, no resultan sorprendentes nuestros resultados acerca de la capacidad de *G. anceps*, *B. cf. evelinae* y *M. ehrenbergii* de sobrevivir a condiciones adversas, como es la tolerancia a la desecación. Nuestros resultados concuerdan con los expuesto por Noreña *et al.*, (2004), quien concluyó que los platelmintos de vida libre que habitan en ambientes temporarios de agua dulce son capaces de tolerar y resistir fluctuaciones ambientales. Por otra parte, estos turbelarios no fueron encontrados en cuerpos de agua construidos por el hombre, como zanjas de desagüe domiciliario y contenedores artificiales, lo que sugiere que estos platelmintos, no serían capaces de colonizar por sus propios medios estos tipos de ambientes desde sus sitios de cría, tal vez debido a la discontinuidad de los mismos. Junto a la discontinuidad que presentan estos ambientes artificiales, la falta de vegetación de los mismos es una características que podría dificultar el acceso y la colonización de estos ambientes por parte de los turbelarios, cómo lo observaran Noreña *et al.* (2004)..Esto pone de manifiesto la posibilidad de introducir estos depredadores en sitios colonizados naturalmente por diferentes especies de mosquitos.

En este trabajo se demostró que *G.anceps* y *B. Cf. evelinae* no presentan preferencia de presa cuando *A. aegypti* y *C. pipiens* comparten el mismo espacio. Por el contrario, en condiciones de laboratorio *M. ehrenbergii*, consumió más larvas de *C. pipiens*, que de *A. aegypti*, si bien

estos números son similares, las diferencias entre ambos resultaron estadísticamente significativas. La ausencia de preferencia de presa que mostraron *G. anceps* y *B. Cf. evelinae*, tanto como la leve preferencia observada para *M. ehrenbergii*, puede deberse a que los platelmintos de vida libre son depredadores generalistas (Yu *et al.*, 1996) y agresivos de otros invertebrados en ambientes acuáticos (Blaustein y Dumont, 1990). Este comportamiento de depredador generalista, constituye una ventaja para los momentos en que no se detecte actividad de las poblaciones de mosquitos en los ambientes naturales, ya que los turbelarios podrían subsistir consumiendo otro tipo de presas como son los copépodos, otros artrópodos, nematodos y oligochaetos. Desde otro punto de vista, este comportamiento puede representar una desventaja, si la tasa de depredación sobre los estados inmaduros de culícidos se viera disminuida por el consumo de otras presas. Por ejemplo, *M. ehrenbergii* es capaz de alimentarse de copépodos (Trochine *et al.*, 2005) y en condiciones de laboratorio puede consumir larvas de quironómidos (M. C. Tranchida, observaciones personales). El conocimiento de posibles interacciones entre turbelarios, copépodos depredadores y larvas de mosquitos permitirá evaluar la capacidad de depredación de estos turbelarios en ambientes naturales, donde es posible encontrar complejas interacciones entre depredadores y presas. En los contenedores artificiales, donde los turbelarios podrían ser introducidos, fueron identificadas especies de copépodos ciclopoideos que no son depredadores de larvas de mosquitos (capítulo I), por lo que esta interacción podría ser nula; existiendo por lo tanto, solo la interacción entre los turbelarios depredadores y, los copépodos y mosquitos, como posibles presas.

La complejidad estructural del ambiente juega un papel importante en la dinámica de la depredación ya que proporciona refugios a las presas (Dutilleul, 1993), por lo que la interacción podría estar favorecida e incrementada cuando ocurre en ambientes estructuralmente simples, en donde la presa puede ser fácilmente detectada por el depredador y entonces ser más susceptible a sus ataques (Gilinsky, 1984). Por otra parte, una depredación diferencial fue atribuida al comportamiento de las presas, por Melo y Andrade (2001) quienes encontraron que, a causa de la mayor

movilidad que presentan las larvas de *C. quinquefasciatus*, estas fueron menos susceptibles que las larvas de *A. albopictus* a la depredación por *D. tigrina* en cubiertas de automóviles en desuso. En nuestros experimentos la estructura espacial simple, elimina o disminuye el efecto de huída de las presas, por lo que si alguna de las especies de turbelarios hubiese presentado un comportamiento depredador selectivo, este se habría evidenciado rápidamente mediante el consumo exclusivamente de la especie preferida. La capacidad depredadora de cada una de las especies de turbelarios se relaciona con el tamaño del cuerpo, siendo el tamaño de la faringe un factor limitante en la tasa de depredación (Noreña-Janssen y Faubel, 1992). Los adultos de *B. cf evelinae* son de menor tamaño que los adultos de las otras especies. Por lo tanto, *M. ehrenbergii* y *G. anceps*, a diferencia de *B. cf evelinae*, fueron de depredar sobre todos los estadios larvales de *A. aegypti* y *C. pipiens*. La capacidad depredadora, fue claramente más intensa sobre larvas de primer y segundo estadio que sobre las de tercero y cuarto. En oposición con estos resultados, Suprakash y Aditya (2003) detectaron una menor depredación sobre larvas de primer estadio, debido al rápido movimiento que las larvas de este estadio presentan.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que el número de larvas muertas por causa de *M. ehrenbergii*, disminuyó significativamente luego de cuatro días de experimentación, por lo que los depredadores de esta especie, no fueron capaces de matar constantemente el mismo número de larvas a lo largo del tiempo. Por el contrario, *G. anceps* fue capaz de mantener constante la mortalidad que causa en las larvas durante los cinco días.

Los miembros del género *Girardia* ponen un solo cocón con un pedúnculo adherido al sustrato mediante una sustancia cementante mientras que *M. ehrenbergii* contiene un gran número de huevos dentro de su útero. Los cocones son liberados luego de la muerte del adulto y son resistentes a la desecación. *B. cf evelinae* pone un solo cocón, que no es retenido por largo tiempo en el útero (Hyman, 1951). En el experimento 4 no fue registrado el número de cocones puesto por cada individuo, pero en los casos de *G. anceps* y *M. ehrenbergii* los hábitos de postura son coincidentes

con la información existente. En *M. ehrenbergii* el número de huevos obtenidos fue muy bajo, pudiendo haber influido en este resultado, el tiempo de vida de los individuos y la madurez sexual de los mismos, factores que eran desconocidos al momento de realizar el ensayo. Por otra parte, *M. ehrenbergii* puede reproducirse sexualmente y dejar huevos latentes o subitáneos. Estos últimos eclosionan sin pasar por un período de latencia, lo que permitiría un aumento numérico de la población, en un corto tiempo (Fiore, 1971). Este aspecto no fue estudiado en este trabajo, pero investigaciones en esta área del conocimiento del grupo, serían de gran utilidad en el futuro.

Aunque existen varias técnicas disponibles de producción masiva de turbelarios (Legner y Tsai, 1978), el hecho de que los miembros del género *Girardia*, puedan multiplicarse asexualmente regenerando sus tejidos, y reproducirse sexualmente mediante la producción de cocones, hace que *G. anceps* pueda ser producida masivamente en el laboratorio por métodos artificiales (Callahan y Morris, 1989), de manera más eficiente y simple que las otras especies de turbelarios estudiadas en este capítulo.

En conclusión, se propone a *G. anceps* como el turbelario más adecuado de los aquí estudiados, para el control de *A. aegypti* y *C. pipiens*, especies que se desarrollan en contenedores artificiales. *Girardia anceps* es capaz de consumir todos los estadios larvales de ambas especies de culícidos y mantener una tasa de depredación constante a lo largo del tiempo. Esta especie puede ser producida masivamente mediante métodos artificiales y resistir las condiciones ambientales a las que están sometidos los recipientes artificiales donde crían estos culícidos. A pesar de sus ventajas, este tipo de enemigos naturales presenta restricciones en cuánto al momento y lugar de su aplicación, para que el control resulte exitoso. Uno de los posibles lugares de elección para el uso de estos depredadores son los cementerios, puesto que resulta difícil aplicar una estrategia efectiva para el control de poblaciones de mosquitos, que crían en lugares como los cementerios donde los hábitos culturales son difíciles de revertir en el corto plazo. También podrían ser empleados, con mayor éxito, en contenedores artificiales de mayor tamaño donde el recambio de la misma es menos frecuente que en los jarrones de los cementerios, como tanques o barriles,

en los cuales no sería necesario incorporar continuamente turbelarios. Por lo tanto, es recomendable la evaluación a campo, en pequeña escala, de estos turbelarios depredadores como paso previo a la utilización de los mismos dentro de un programa de manejo integrado que combine métodos culturales con métodos tradicionales como insecticidas químicos y biológicos.

| |
|--------------|
| CAPÍTULO III |
|--------------|

***Girardia anceps* como agente de control biológico de *A. aegypti* y *C. pipiens* en condiciones de campo.**

Justificación del estudio

Con el objetivo de evaluar la potencialidad de *G. anceps* como agente biológico de control de mosquitos, se realizaron experimentos a campo en el Jardín Zoológico Municipal de la ciudad de La Plata.

El primero de estos experimentos fue realizado con el objetivo de evaluar si el tipo de ambiente, la densidad de estados inmaduros y la especie de presa, influyen en la capacidad depredadora de las planarias, en condiciones de campo controladas. La depredación fue evaluada en cubiertas de automóviles en desuso y en recipientes artificiales, hábitat donde comúnmente crían *A. aegypti* y *C. pipiens* en condiciones naturales. En cuanto al tipo de hábitat, la diferencia en el volumen de agua que pueda contener, puede influir en la posibilidad de encuentro entre presa y depredador. El estudio sobre la preferencia de presa fue realizado debido al comportamiento diferente que presentan las dos especies de mosquitos evaluadas. *Aedes aegypti* se alimenta en el fondo de los recipientes, mientras que *C. pipiens* suele pasar más tiempo en la interfase agua-aire, principalmente cuando está alimentándose en la columna de agua. Un mayor número de encuentros entre este depredador y las larvas de *A. aegypti* es esperable debido a que estas larvas permanecen más tiempo en el fondo del recipiente al igual que *G. anceps*. Además fue evaluada si la densidad de la presa condiciona el comportamiento del depredador.

El segundo experimento fue realizado con el objetivo de evaluar el potencial del depredador en condiciones naturales. En este ensayo, los contenedores fueron colonizados naturalmente por ambas especies de mosquitos durante su estación de cría y el depredador fue introducido al inicio del mismo.

Por otra parte, fueron realizados tres experimentos en condiciones de laboratorio, con el objetivo de conocer ciertas características biológicas de la

especie que contribuyan a la utilización del mismo como controlador biológico.

Materiales y Métodos

Experimento 1

Para evaluar si el hábitat, la densidad y la especie de la presa, influyen en la capacidad depredadora de las planarias en condiciones de campo controladas, se emplearon dos tipos de contenedores donde comúnmente crían *A. aegypti* y *C. pipiens*. Estos ambientes de cría fueron: cubiertas de automóviles en desuso (neumáticos) y recipientes artificiales (ovitrampas).

Las ovitrampas (Fig. 39), consistieron en recipientes plásticos de 750 ml de capacidad, colocados en el interior de un recipiente de color negro, para simular una ovitrampa, ya que se considera que este tipo de recipientes es el ideal para el desarrollo de los estados inmaduros de ambas especies. En cada una de estas ovitrampas se colocaron 500 ml de agua declorada y 4 g de materia orgánica seca. En los neumáticos (cubiertas de automóviles cortadas a la mitad y colocadas verticalmente) fueron colocados 3000 ml de agua declorada y 24 g de materia orgánica (Fig. 40). La materia orgánica fue agregada como fuente de alimento para las larvas y consistió en hojas caídas de los árboles, luego de la abscisión foliar; las cuales fueron colectadas durante un mes en 16 ovitrampas y 16 neumáticos colocados previamente en el sitio del ensayo. Antes de la incorporación en los contenedores, las hojas se secaron al aire y se cortaron en trozos pequeños, se promedió la cantidad de materia orgánica colectada en cada tipo de contenedor y se determinó así la cantidad a incorporar para el ensayo.

De manera aleatoria, en cuatro neumáticos se colocaron 100 larvas de *A. aegypti* (densidad alta de presas) y en otros cuatro 20 larvas (baja densidad de presas). Se repitió el procedimiento con ocho neumáticos, en donde se colocaron larvas de *C. pipiens*. En un total de ocho neumáticos (dos neumáticos por cada condición estudiada) fueron introducidos artificialmente 10 ejemplares de *G. anceps* seleccionados al azar. En 16 ovitrampas se combinaron de igual forma, las especies de mosquitos y las

densidades larvarias. Para cada contenedor tratado (neumático u ovitrampa) se mantuvo un control (sin planarias, n=16). En total se utilizaron 32 recipientes (unidades experimentales).

Las larvas de ambas especies de mosquitos, fueron obtenidas a partir de las colonias del CEPAVE y separadas por densidades en el laboratorio, antes de su incorporación en los recipientes. Las larvas empleadas en este ensayo tenían entre 24 y 48 horas desde la eclosión de los huevos.

Los ejemplares de *G. anceps* (Fig. 41) fueron obtenidos de colonias mantenidas en el laboratorio, a partir de las colectas y ensayos realizados previamente; los mismos fueron seleccionados al azar y no se les proporcionó ninguna fuente de alimento durante los 3 días previos al inicio del experimento.

Ambos tipos de recipientes se cubrieron con una tela mosquitera para evitar la oviposición de hembras de mosquitos que pudieran estar presentes en el sitio del experimento.

Este ensayo se inició en abril de 2006. El número de individuos que alcanzó el estado de pupa fue registrado cada 48 horas. Para ello, el contenido de cada recipiente, fue colocado en una bandeja plástica en donde se realizó la cuantificación de los estados inmaduros retirándose las pupas. Finalizado cada muestreo, las larvas fueron colocadas nuevamente en los recipientes correspondientes. El ensayo finalizó en el momento en que todos los ejemplares de los mosquitos empuparon o murieron. Las larvas ausentes fueron consideradas como consumidas por los depredadores.

La presencia de *G. anceps* en los contenedores fue registrada solo al final del experimento, ya que la manipulación que debe realizarse en este tipo de contenedores para registrar la presencia del depredador, podría generar un disturbio en el ambiente alterando los resultados finales.

Análisis estadístico: la homogeneidad de varianzas fue comprobada mediante Análisis de Residuales y la normalidad de los datos mediante el cálculo de la simetría y la curtosis. Los resultados de este experimento fueron analizados mediante un test de ANOVA multifactorial, en el cual los factores de variación fueron: tipo de contenedor (ovitrampas y neumáticos), especie de presa (*C. pipiens* y *A. aegypti*), densidad larvaria (alta y baja),

presencia o ausencia de planarias y las interacciones entre esos factores (primer a cuarto orden).



Figura 39. Ovitrapa cubierta con tela mosquitera.



Figura 40. Neumático cubierto con tela mosquitera



Figura 41. Ejemplar de *G. anceps*.

Experimento 2

Para evaluar el efecto de la introducción de las planarias depredadoras sobre las poblaciones naturales de *A. aegypti* y *C. pipiens* localizadas en el zoológico de la ciudad de La Plata, se utilizaron 20 recipientes (ovitrampas). De manera aleatoria, en 10 de ellos, se liberaron 10 ejemplares de *G. anceps*. Otros 10 recipientes se mantuvieron como controles (libres de depredadores).

Al principio del experimento se colocó 500 ml de agua corriente en cada ovitrampa (Fig. 42) y 4 g de materia orgánica, obtenida de la misma manera que para el experimento 1, como fuente de alimento para las larvas. Las ovitrampas no fueron cubiertas por tela mosquitera, para que fuesen colonizadas naturalmente por las especies de mosquitos del lugar.

Una vez colocadas las trampas en el zoológico de la ciudad de La Plata, fueron introducidos en las ovitrampas ejemplares de *G. anceps* obtenidos en colonias mantenidas en el laboratorio, los cuales no fueron expuestos a ayuno previo. A partir del momento de la introducción de los depredadores (septiembre de 2006), se realizó un seguimiento semanal, con el fin de registrar el número de estados inmaduros y las especies de mosquitos presentes en dichas ovitrampas.

La presencia de *G. anceps* en los recipientes donde fue introducida, fue registrada en cada muestreo, con la finalidad de corroborar su supervivencia. El número total de ejemplares en cada contenedor fue registrado al final del experimento.

Análisis estadístico: Los datos fueron analizados mediante un test de Medidas Repetidas en el Tiempo, con un factor que es la presencia del depredador, siendo el tiempo el factor intrasujeto y la variable medida el número de estados inmaduros de mosquitos (*A. aegypti* + *C. pipiens*) por recipiente tratado (con depredadores y sin depredadores) a lo largo del tiempo. La homogeneidad de varianzas fue analizada mediante Análisis de Residuales, y los datos fueron transformados utilizando la función logarítmica ($\log n+1$).

El número de larvas de los recipientes tratados con *G. anceps* y no tratados fue graficado en función del tiempo, para observar la dinámica de la población de los mosquitos en el sitio del experimento, en ausencia y presencia del depredador.



Figura 42. Ovitrapa sin cubrir para permitir la ovipostura de *A. aegypti* y *C. pipiens*.

Experimento 3

Este experimento fue realizado con el objetivo de conocer si existe asociación entre el tamaño del cocón (Fig. 43) y el tiempo de desarrollo hasta la emergencia de los juveniles, y entre el tamaño del cocón y el número de individuos que nacen de ellos.

Cocones de la colonia de *G. anceps* mantenida en el laboratorio (descripción del mantenimiento de la colonia, página 70) fueron colectados diariamente durante 2 meses. Cada cocón fue colocado individualmente en una cápsula de petri de 5 cm de diámetro, con 10 ml de agua deionada. Se estableció como tiempo cero para cada cocón, el momento en que fue colectado. El tamaño fue medido mediante un ocular micrométrico bajo microscopio estereoscópico. Las cápsulas fueron revisadas diariamente hasta que se registró en ellas la presencia de individuos jóvenes, momento que fue tomado como finalización del experimento para cada cocón individual. Fue registrado el número de ejemplares jóvenes emergidos de cada cocón.

Análisis estadísticos: para evaluar si existe una asociación entre los parámetros estudiados, se analizó la correlación de los mismos.

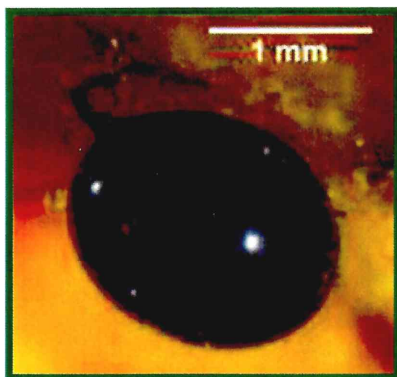


Figura 43. Cocón de *Girardia* sp. (Fuente Universidad de Iowa)

Experimento 4

Este experimento fue diseñado para comprobar si *G. anceps* es capaz de detectar a la presa y liberar mucus para producir mortalidad larvaria,

aunque no exista contacto directo entre depredador-presa. Se utilizaron tres grupos de recipientes plásticos de 8 cm de diámetro, adjudicados a cada tratamiento. En uno de los tratamientos, 10 larvas de *A. aegypti* fueron colocadas en un recipiente cuyo fondo fue reemplazado por tela de malla fina (35- μ m). Este recipiente fue colocado dentro de otro de igual diámetro donde se colocaron 5 ejemplares de *G. anceps*. El segundo tratamiento fue realizado de la misma manera, pero en los recipientes modificados (sin fondo plástico) se agregó una capa de tela de malla fina (35- μ m) adicional, de manera que el espacio que separó depredadores y presas, fue mayor que el del tratamiento 1, evitando el contacto entre ambos (Fig. 44). El tercer tratamiento consistió en recipientes donde los ejemplares de *G. anceps* y las larvas de *A. aegypti* estuvieron en contacto. En los tres tratamientos fueron colocados 100 ml de agua declorinada. El número de larvas muertas fue registrado a las 48 horas. Se realizaron 9 réplicas para cada tratamiento.

Análisis de datos: Los datos obtenidos de los tres tratamientos, fueron analizados mediante un test de ANOVA de una vía. Previamente los datos fueron transformados mediante la función: $\log(x+1)$, seguido por un test de Duncan para comparaciones múltiples.

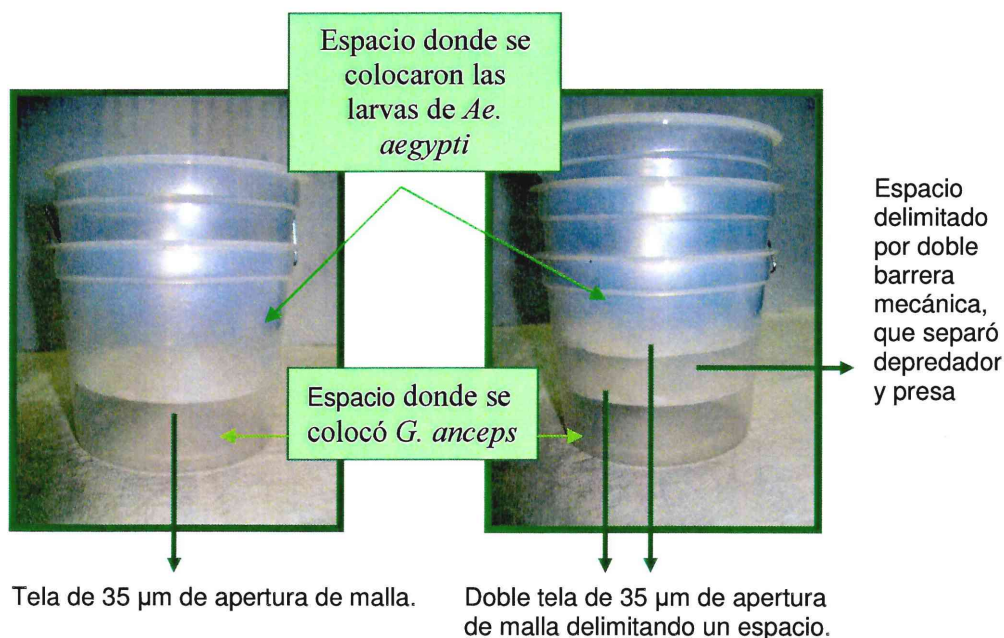


Figura 44. Disposición de los recipientes empleados en el experimento 4, indicando el sitio donde fueron colocados los depredadores y las presas.

Resultados

Experimento 1

Este experimento duró aproximadamente 30 días desde la introducción de las larvas y la liberación de los ejemplares de *G. aniceps*, hasta que se registraron sólo pupas en los contenedores. Entre 7 y 10 ejemplares de *G. aniceps* fueron registrados en el 100% de los contenedores al final de la experiencia. También fue registrada la presencia de cocones en el 70% (N=10) de los contenedores donde fue liberada *G. aniceps*.

En los neumáticos *G. aniceps* fue capaz de controlar el 75 % de las larvas de *A. aegypti*, cuando fueron introducidas altas densidades de larvas (N=100). En las ovitrampas, donde se liberaron 100 larvas de *A. aegypti*; *G. aniceps* sólo logró el control del 50% de las mismas. En neumáticos y ovitrampas, donde fueron introducidas 20 larvas de *A. aegypti*, se logró la eliminación de las mismas en ambos tipos de recipientes. En los controles, la mortalidad registrada fue baja (Fig. 45)

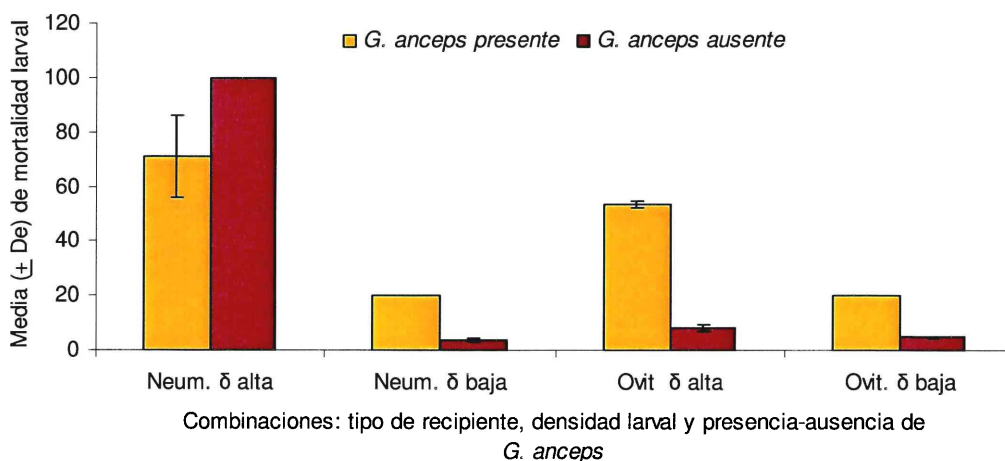


Figura 45. Promedio (\pm De) de mortalidad larval para *A. aegypti* en cada combinación de contenedor, presencia-ausencia de *G. aniceps* y densidad de larvas introducidas. Neu= Contenedor tipo neumático., Ovit= Contenedor tipo ovitrampa., δ = densidad larval introducida en el recipiente.

Girardia anceps, fue un eficaz agente de control para bajas densidades de *C. pipiens* en neumáticos a pesar de que no logró eliminar el total de las larvas introducidas. El control realizado por este depredador en ovitrampas con bajas densidades de *C. pipiens*, fue del 100 %. A altas densidades larvarias, la reducción fue de 80 % (N=100) en neumáticos y 100% en ovitrampas (Fig. 46).

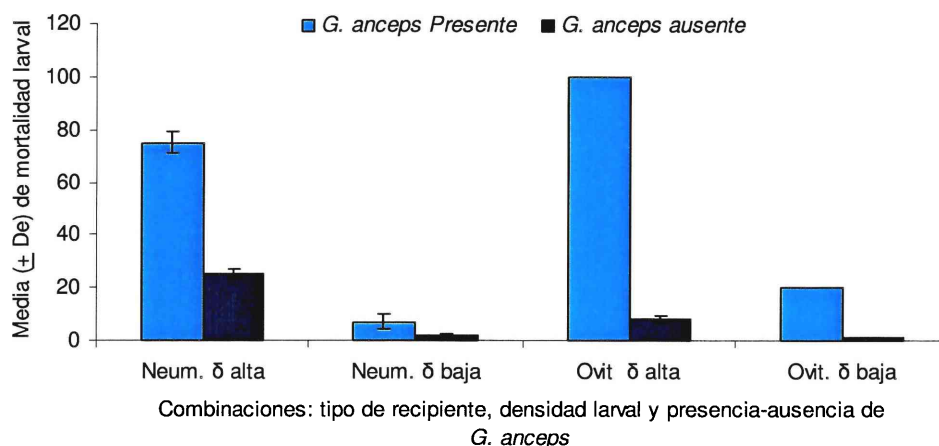


Figura 46. Promedio (\pm De) de mortalidad larval para *C. pipiens* en cada combinación de contenedor, presencia-ausencia de *G. anceps* y densidad de larvas introducidas. Neu= Contenedor tipo neumático., Ovit= Contenedor tipo ovitrampa., δ = densidad larval introducida en el recipiente.

El test de ANOVA multifactorial mostró un efecto significativo ($p < 0,05$) para los factores “presencia de depredador” y “densidad larval”, siendo no significativo el efecto de los otros factores principales y sus interacciones ($p > 0,05$) (Tabla 8).

Tabla 8. Resultado de ANOVA multifactorial. En rojo se observa el efecto significativo de los factores.

| Factores (Interacción) | gl | F | P |
|-----------------------------|------|---------|----------|
| Tipo de contenedor (1) | 1,16 | 3,0861 | 0,098083 |
| Densidad larval (2) | 1,16 | 12,8423 | 0,002484 |
| Especie de Presa (3) | 1,16 | 0,3188 | 0,580157 |
| Presencia de depredador (4) | 1,16 | 26,3891 | 0,000099 |
| 1 x 2 | 1,16 | 0,1773 | 0,679327 |
| 1 x 3 | 1,16 | 1,4766 | 0,241934 |
| 2 x 3 | 1,16 | 1,3006 | 0,270883 |
| 1 x 4 | 1,16 | 2,1974 | 0,157673 |
| 2 x 4 | 1,16 | 0,1278 | 0,725387 |
| 3 x 4 | 1,16 | 0,3474 | 0,563801 |
| 1 x 2 x 3 | 1,16 | 0,0237 | 0,879578 |
| 1 x 2 x 4 | 1,16 | 0,0000 | 0,995378 |
| 1 x 3 x 4 | 1,16 | 3,5488 | 0,077893 |
| 2 x 3 x 4 | 1,16 | 0,2677 | 0,611933 |
| 1 x 2 x 3 x 4 | 1,16 | 0,0177 | 0,895778 |

Experimento 2

El 70% (N=20) de los recipientes empleados en este ensayo, fueron colonizados simultáneamente por culícidos en la tercera semana del muestreo. La presencia de estados inmaduros de *C. pipiens* y *A. aegypti* en una misma ovitrampa, fue observada en 8 oportunidades durante los meses de diciembre y febrero, de un total de 22 muestreos realizados.

En la Figura 47 se observa la dinámica poblacional de *A. aegypti* y *C. pipiens* en los contenedores tratados y no tratados.

El resultado del test de Medidas Repetidas en el Tiempo, mostró que la presencia o no del depredador en los contenedores, el tiempo y la interacción de estos dos factores tiene un efecto significativo ($p < 0,01$) en las poblaciones de *A. aegypti* y *C. pipiens* presentes en el área de estudio (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados del test de Medidas Repetidas en el Tiempo del experimento 2.

| Factores | F | gl | p |
|---|-------|---------|-------|
| Presencia del depredador en los recipientes (1) | 361,1 | 1,18 | <0,01 |
| Tiempo (2) | 9,98 | 21, 378 | <0,01 |
| 1x2 | 9,087 | 21, 378 | <0,01 |

Los resultados del test de comparaciones múltiples de Duncan (Tabla 10), mostró que los promedios contrastados se pueden agrupar en 8 grupos homogéneos para los cuales las diferencias no resultaron significativas ($p>0,01$). Estos resultados ponen de manifiesto que la presencia de *G. anceps* en los contenedores reduce de manera significativa los ejemplares inmaduros de *A. aegypti* y *C. pipiens*, ya que los promedios de larvas registrados en ellos para todas las fechas de muestreo se encuentran en el primer grupo (G1), y en pocas oportunidades de muestreo con los promedios registrados en los contenedores no tratados. El efecto del tiempo se observa con mayor claridad entre los promedios de estados inmaduros registrados en los contenedores donde *G. anceps* no fue introducida.

Tabla 10. Resultados del test de Duncan aplicado luego del Test de Medidas Repetidas en el Tiempo. Las columnas muestran: Dep (depredador) P= Presente, A= Ausente. T= tiempo de muestreo, que van desde el tiempo 1 (T1) al tiempo 22 (T22). G1 a G8= grupos homogéneos de promedios contrastados.

| Dep. | T | G 1 | G 2 | G 3 | G 4 | G 5 | G 6 | G 7 | G 8 |
|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| P | T4 | **** | | | | | | | |
| P | T22 | **** | | | | | | | |
| P | T3 | **** | | | | | | | |
| P | T11 | **** | | | | | | | |
| P | T19 | **** | | | | | | | |
| P | T9 | **** | | | | | | | |
| P | T8 | **** | | | | | | | |
| P | T10 | **** | | | | | | | |
| P | T14 | **** | | | | | | | |
| P | T2 | **** | | | | | | | |
| P | T20 | **** | | | | | | | |
| P | T1 | **** | | | | | | | |
| P | T7 | **** | | | | | | | |
| P | T15 | **** | | | | | | | |
| P | T18 | **** | | | | | | | |
| P | T5 | **** | | | | | | | |
| P | T6 | **** | | | | | | | |
| P | T21 | **** | | | | | | | |
| P | T16 | **** | | | | | | | |
| P | T17 | **** | | | | | | | |
| P | T13 | **** | | | | | | | |
| A | T22 | **** | | | | | | | |
| A | T6 | **** | **** | | | | | | |
| A | T4 | **** | **** | | | | | | |
| A | T9 | **** | **** | | | | | | |
| P | T12 | **** | **** | | | | | | |
| A | T2 | **** | **** | | | | | | |
| A | T7 | **** | **** | | | | | | |
| A | T10 | **** | **** | **** | | | | | |
| A | T1 | **** | **** | **** | | | | | |
| A | T5 | **** | **** | **** | **** | | | | |
| A | T3 | **** | **** | **** | **** | **** | | | |
| A | T11 | **** | **** | **** | **** | **** | | | |
| A | T8 | | **** | **** | **** | **** | **** | | |
| A | T14 | | **** | **** | **** | **** | **** | **** | |
| A | T18 | | | **** | **** | **** | **** | **** | |
| A | T21 | | | | **** | **** | **** | **** | |
| A | T13 | | | | | **** | **** | **** | |
| A | T19 | | | | | | **** | **** | |
| A | T20 | | | | | | **** | **** | |
| A | T12 | | | | | | | **** | |
| A | T17 | | | | | | | | **** |
| A | T15 | | | | | | | | **** |
| A | T16 | | | | | | | | **** |

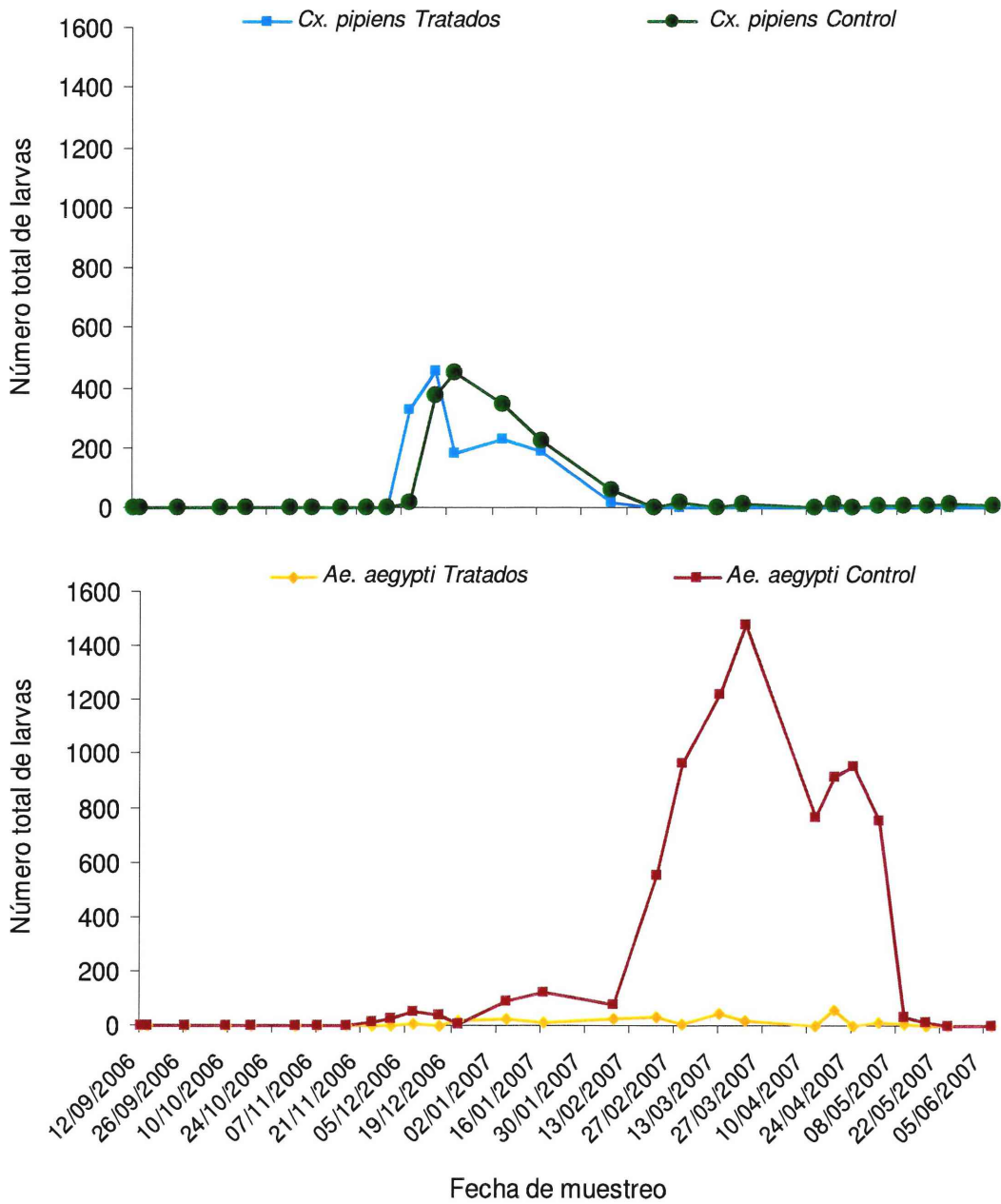


Figura 47. Número total de larvas de *C. pipiens* y *A. aegypti* por fecha de muestreo, en los recipientes tratados (donde fue introducida *G. anceps* y no tratados).

La presencia de *G. anceps* fue registrada en el 100% de los contenedores durante el ensayo. Una vez finalizada la experiencia se

registraron cocones en 8 de las 10 ovitrampas donde fue introducida *G. anceps*. El número de ejemplares por ovitrampa varió entre 6 y 15.

Experimento 3

El coeficiente de correlación entre las variables “tamaño del cocón” y el tiempo de desarrollo de los cocones fue: -0,37, p: 0,008, por lo que existe una correlación negativa estadísticamente significativa. Es decir, que a mayor tamaño del cocón, menor tiempo de desarrollo para la emergencia de los juveniles (Fig. 48).

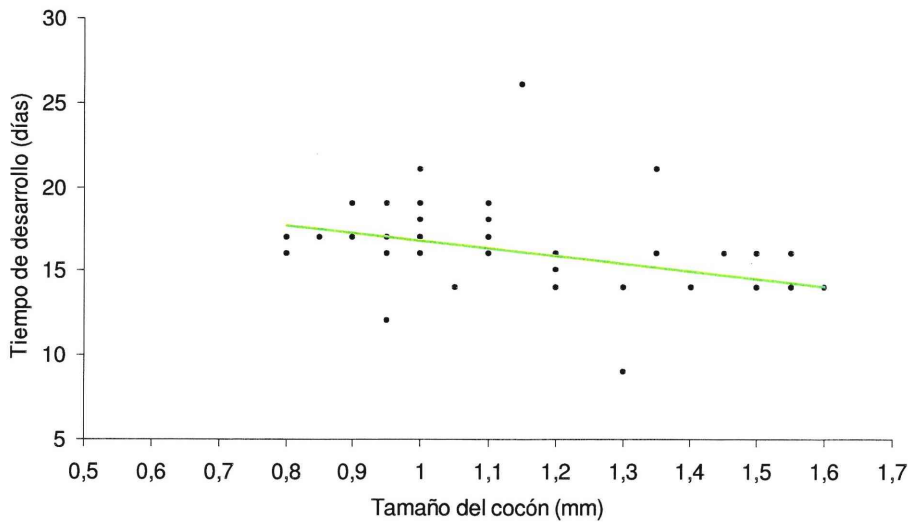


Figura 48. Tiempo de desarrollo en días de los cocones de *G.anceps* en función del tamaño (mm), registrado para cada uno de ellos.

Entre el tamaño del cocón y el número de juveniles que emergen de ellos, el coeficiente de Correlación obtenido fue: 0,23 p: 0,084, por lo que estas variables no presentan asociación (Fig. 49).

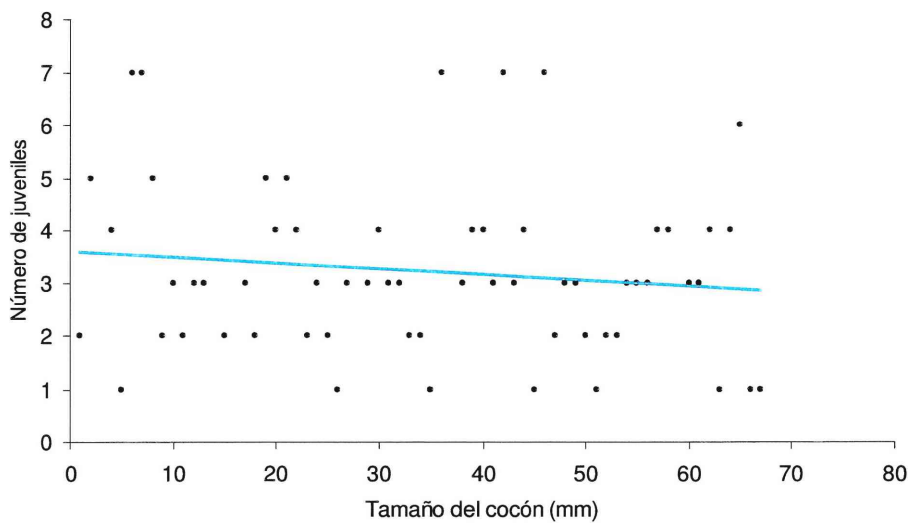


Figura 49. Número de juveniles emergido de cada cocón de *G. anceps* en función del tamaño de los mismos.

Experimento 4

Luego de 48 horas de iniciado el experimento, el número de larvas muertas en los recipientes con doble fondo fue nulo, mientras que en aquellos con fondo simple el promedio (\pm De) de larvas muertas fue de 8.66 ± 0.58 y 10 ± 0 cuando depredador y presa estuvieron en contacto directo. El resultado del test de ANOVA, mostró diferencias estadísticamente significativas ($F=1061,33$; $gl= 2,24$; $p<0.001$). Mediante el test de Duncan se observó que existen diferencias significativas ($p<0,01$) entre los tres tratamientos.

Discusión

El tipo de hábitat en los que la especie *G. anceps* puede ser aplicada como agente de control de *A. aegypti* y *C. pipiens*, no resultó ser un factor de variación importante en la capacidad depredadora de esta especie, ya que no se registraron diferencias entre el número de larvas consumidas en neumáticos y ovitrampas. Asimismo, la especie de la presa considerada (*A. aegypti* y *C. pipiens*) tampoco tuvo un efecto significativo en la depredación por parte de este turbelario. La densidad larval de mosquitos por recipientes, resultó ser un factor importante en la depredación de *G. anceps*, como se puede observar en los resultados del experimento 1, en los cuales *G. anceps* resultó un eficiente controlador de ambas especies de mosquitos en ovitrampas cuando se introdujeron en los contenedores tanto altas como bajas densidades larvales. El efecto de este depredador sobre altas densidades larvales, fue de 75% para *A. aegypti* y 80% para *C. pipiens* en neumáticos, mientras que en ovitrampas fue 50% y 100 % respectivamente. Si bien estos resultados muestran un efecto importante de este depredador sobre las densidades poblacionales de culícidos, debemos tener en cuenta lo mencionado por George *et al.* (1983), quienes observaron que con densidades poblacionales superiores a 100 larvas por litro, la depredación de *D. tigrina* en la naturaleza, promueve como efecto final, la supervivencia del mosquito, mediante la disminución de la competencia intraespecífica al reducir la densidad de las larvas por la depredación. A altas densidades larvales el efecto depredador de *D. tigrina* se redujo al mínimo, obteniéndose un número de mosquitos adultos semejante al de la población en ausencia de depredadores. A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, George *et al.* (1983) registraron ausencia de control a bajas densidades larvales y lo atribuyeron a la baja frecuencia de encuentros entre depredador y presa.

En condiciones de campo, se observó una reducción significativa del número de larvas en los contenedores donde *G. anceps* estuvo presente comparados con aquellos donde no fue introducida, siendo el efecto del tiempo más notorio en los contenedores donde el depredador estuvo ausente. En estudios previos, Melo y Andrade (2001) observaron en

cubiertas de automóviles, que las larvas de *C. quinquefasciatus* presentaban un comportamiento de huida frente a la depredación de *D. dorotocephala* mucho más eficiente que el de las larvas de *A. albopictus*. En este caso, la depredación sobre larvas de *C. quinquefasciatus* fue menor que la depredación sobre *A. albopictus*, cuya lenta respuesta de huida, le permitió al depredador una mejor manipulación de la presa y un tiempo mayor para la secreción de gran cantidad de mucus para la captura de la misma. En este trabajo *G. anceps* resultó un eficaz controlador de *A. aegypti* y *C. pipiens* cuando ambas especies compartieron los sitios de cría, no habiéndose comprobado una respuesta diferencial de los culícidos a la presencia del depredador, ni preferencia de este por alguna especie de presa, coincidiendo con los resultados del capítulo II para ensayos de laboratorio.

Según Meyer y Learn (1981), la depredación por parte de los miembros del género *Dugesia*, es causado por el contacto directo entre el depredador y la presa, y sostienen que no aparecen larvas atrapadas y muertas en el mucus pegajoso en la superficie de los contenedores. En este trabajo comprobamos que *G. anceps* detecta el movimiento de las presas e inicia la liberación de mucus para su captura, aún cuando depredador y presa no se encuentran en contacto directo, ya que se observó mortalidad larval cuando *G. anceps* y *A. aegypti* estuvieron separados por una barrera mecánica constituida por una tela simple, reemplazando el fondo del recipiente. Por el contrario, no se observó mortalidad larval cuando depredador y la presa estuvieron separados por un espacio mayor, delimitado por dos barreras mecánicas (doble tela). Por este motivo se especula que si bien no es necesario el contacto directo entre depredador y presa, el movimiento de la larva debe ser detectado por *G. anceps* para que se inicie el mecanismo de captura, efecto que fue anulado al someterlos a una separación por doble barrera mecánica.

El tamaño del cocón de *G. anceps* no mostró estar asociado con el número de individuos juveniles que de él emergen, por lo tanto cocones más grandes no indican un potencial aumento poblacional respecto de cocones pequeños. Por el contrario, se observó una correlación negativa entre el tamaño del cocón y el tiempo que tardan en desarrollarse, es decir, cuantos más pequeños sean, más tardarán en emerger los juveniles. Por lo tanto,

cocones más pequeños podrían indicar un crecimiento poblacional de *G. anceps* más lento, aunque no estaría relacionado con el número de individuos.

En conclusión, *G. anceps* es un potencial agente de control de *A. aegypti*, que puede ser incorporado como parte de un programa de control integrado, en el cual se lleve a cabo un monitoreo adecuado de las poblaciones del culícido y del turbelario una vez introducido.

| |
|--------------------|
| CAPÍTULO IV |
|--------------------|

Evaluación de peces larvívoros autóctonos como agentes de control de estados inmaduros de *Culex pipiens*

Introducción

Los peces larvívoros han sido empleados como controladores biológicos de mosquitos por más de cien años y en los casos que fueron aplicados en condiciones apropiadas, como parte de un programa de manejo integrado, resultaron ser eficaces en el control de las poblaciones de insectos plaga. En las últimas décadas, el interés hacia los peces larvívoros como agentes de control ha aumentado enormemente, debido a que cada vez más estudios han revelado su capacidad de control y su uso no perjudicial para el ambiente. Numerosos estudios sobre la aplicación de peces nativos como sustitutos de otros tipos de control se han llevado a cabo en diferentes partes del mundo (Bay, 1985; Meisch, 1985). Los datos publicados por Hass y Pal, (1984), Gerberich y Laird (1985), Ahmed *et al.* (1988), Legner (1995) y Swanson *et al.*, (1996), hacen mención al papel que cumplen en el control de mosquitos y en la posibilidad de producirlos masivamente. Actualmente, la producción de estos depredadores se realiza mediante acuicultura comercial, cultivos en cuerpos de agua al aire libre y cultivo controlado en acuarios (Walton, 2007). Los datos publicados señalan a los peces de agua dulce como eficientes enemigos naturales de larvas de mosquitos ya que poseen una serie de atributos que los ubican entre los mejores candidatos, de acuerdo a los criterios convencionales de selección de enemigos naturales. Entre estos atributos podemos mencionar: su capacidad de reducir significativamente las poblaciones naturales de larvas de mosquitos, la factibilidad de alimentarse de otros organismos cuando no se encuentran larvas en el ambiente y la posibilidad de un control de mosquitos a largo plazo en el campo, porque pueden persistir y reciclarse en el ambiente (Torrente *et al.*, 1993; Lee, 2000; Martínez-Ibarra *et al.*, 2002, Van Dam y Walton, 2007). Por otro lado, ictiólogos y ecólogos destacan los posibles aspectos negativos que puede producir su introducción en los

organismos no blanco y en los ecosistemas naturales (Gratz *et al.*, 1996). Estos investigadores consideran que la liberación de peces no nativos en los distintos ambientes, puede tener consecuencias dramáticas sobre la fauna de los hábitat acuáticos (Goodman, 1991; Adams *et al.*, 2003), principalmente en aquellos lugares en donde no se encuentren naturalmente (Wellborn *et al.*, 1996; Hamer *et al.*, 2002).

Los peces larvívoros más estudiados, mencionados en la bibliografía pertenecen a la especie *G. affinis*, la cual ha sido introducida en más de 60 países, en continentes como Europa, África y Asia, desde su lugar nativo, el sur de los Estados Unidos. En estos países se ha aplicado como agente de control en los programas de lucha contra el paludismo (Gerberich y Laird, 1985; Sala *et al.*, 1985, Komak y Crossland, 2000; Ayala *et al.*, 2007).

En las zonas tropicales y subtropicales del continente americano está presente la familia Poeciliidae, que incluye a todos los peces autóctonos, como *Gambusia*, *Cnesterodon*, *Poecilia*, *Xiphophorus* y *Phalloceros*. Estos son pequeños peces de agua dulce o salobre, ovovivíparos, adaptados para la cría en pequeños cuerpos de agua con escasa o ausente vegetación y con un bajo nivel de oxígeno disuelto. Presentan dimorfismo sexual, los machos adultos presentan un tamaño corporal más pequeño que las hembras adultas y un cuerpo más delgado. En el extremo posterior del cuerpo, la aleta anal modificada en gonopodio es utilizada como órgano intromitente para la cópula. La morfología de este órgano reviste carácter taxonómico que permite diferenciar especies (Rivas, 1963; Moyle, 2002). A diferencia de las hembras de otras especies de peces, que detienen su crecimiento al alcanzar la madurez sexual, las hembras de estos peces larvívoros presentan un crecimiento corporal indeterminado, retrasándose en los períodos reproductivos, cuando los recursos son utilizados principalmente para la reproducción (Cabral y Marques, 1999).

En la Argentina, la información existente acerca de peces larvívoros para el control de mosquitos vectores se limita al estudio de dos especies, *C. decemmaculatus* y *J. multidentata*, ambas halladas en zanjas de desagües domiciliarios (Marti *et al.*, 2006). Estos peces están presentes exclusivamente en la parte meridional de la región Neotropical. Ambas

especies fueron mencionadas anteriormente por Ringuelet *et al.* (1967) como especies larvívoras.

En este trabajo se evaluó el potencial a largo plazo de *C. decemmaculatus* (Fig. 50) como agente de control de los estados inmaduros de *C. pipiens*. La elección de esta especie se ha basado en su mayor abundancia en las zanjas de desagüe domiciliario de la ciudad de La Plata (Marti *et al.*, 2006).

Los objetivos planteados en este capítulo fueron los siguientes:

- * Determinar el porcentaje de depredación por *Cnesterodon decemmaculatus* sobre estados inmaduros de *C. pipiens* luego de su introducción en ambientes naturales.

- * Evaluar la instalación de este depredador en el ambiente introducido y su capacidad de reproducción.

- * Estudiar en el laboratorio, la preferencia de sitio de ovipostura de los adultos de *C. pipiens*, considerando recipientes con presencia o ausencia de peces.

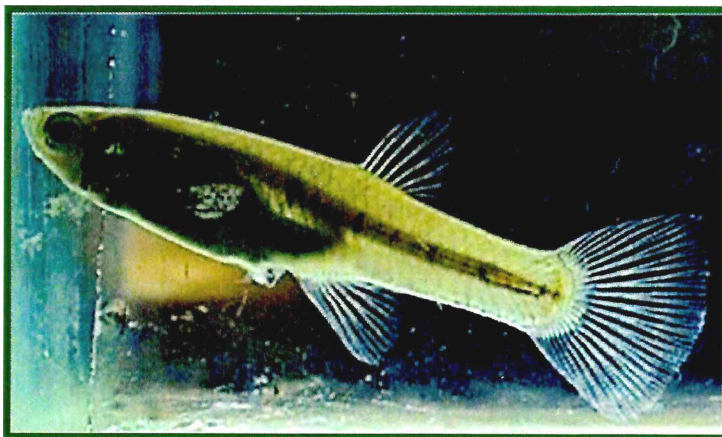


Figura 50. *Cnesterodon decemmaculatus*

Materiales y Métodos

Área de estudio y selección del sitio del ensayo

El área de estudio se ubicó en los alrededores de la ciudad de La Plata, específicamente en Hernández, Romero, La Granja y La Cumbre. Estas zonas presentan gran cantidad de zanjas de desagüe domiciliario (Fig. 51) que son criaderos importantes de estados inmaduros de *C. pipiens*. Fueron relevadas alrededor de 600 zanjas durante los meses de septiembre a diciembre de 2005, en las cuales se evaluaron los siguientes parámetros: dimensiones de la zanja (ancho, largo y profundidad en metros), presencia-ausencia de larvas de mosquitos, presencia-ausencia de peces larvívoros, presencia de desechos (papeles, plásticos, latas), cantidad de agua presente al momento del relevamiento (seca, escasa o abundante), presencia de algas y vegetación.

Para realizar el estudio se seleccionaron 12 zanjas en las cuales, los parámetros mencionados anteriormente, fueron similares, y en donde se encontraron estados inmaduros de *C. pipiens* y ausencia de peces larvívoros. En estas 12 zanjas se tomaron datos de pH y temperatura del agua durante el pre-tratamiento.

En 9 de estas zanjas seleccionadas, se realizó la liberación de peces y tres de ellas fueron utilizadas como controles (presencia de larvas y ausencia de peces depredadores). El número de estados inmaduros en las 12 zanjas seleccionadas fue comparado en el pre-tratamiento, mediante un análisis de ANOVA de una vía. Previamente los datos fueron transformados mediante la función $\log x + 1$.



Figura 51. Zanja de desagüe domiciliario donde fueron liberados ejemplares de *C. decemmaculatus*

Recolección y liberación de peces larvivos

Para realizar la liberación de peces en los sitios de cría de *C. pipiens*, fueron recolectados ejemplares de *C. decemmaculatus* a partir de su ambiente natural. Estos peces fueron capturados mediante el uso de redes de acuario de malla de 100- μm , colocados en recipientes plásticos de 3 litros de capacidad con agua del lugar y transportados al laboratorio.

En el laboratorio, fueron separados en parejas formadas por un macho y una hembra. Estas parejas fueron mantenidas en el laboratorio durante 24 horas hasta su liberación en los ambientes.

Para la liberación fueron establecidas tres densidades de depredadores, que consistieron en 1 pez por m^2 , 7 peces por m^2 y 13 peces por m^2 lo que corresponde a 10, 50 y 100 parejas de peces por zanja respectivamente. Se realizaron tres réplicas para cada una de las densidades evaluadas y un control. Durante el pre-tratamiento se realizaron 4 muestreos durante dos semanas previo a la liberación, en donde se cuantificó el número de estados inmaduros de *C. pipiens* presentes en cada una de las zanjas. La unidad de muestreo consistió en un cucharón de 250 ml de capacidad y se tomaron tres cucharones en cada oportunidad para

obtener un promedio de larvas por cucharón. La introducción de los peces se realizó, en las zanjas seleccionadas, en enero de 2006.

Seguimiento de la población natural de estados inmaduros de C. pipiens posterior a la liberación

Las poblaciones de estados inmaduros de *C. pipiens* sometidas al efecto depredador de *C. decemmaculatus* y las poblaciones control, fueron monitoreadas tomando una muestra (3 cucharones de 250-ml de capacidad) de cada tratamiento, dos veces por semana, durante el primer año de muestreo (enero 2006- mayo 2007). Durante el segundo año (junio 2007-enero 2008), el monitoreo se realizó utilizando la misma unidad muestral en intervalos de quince días. Las muestras tomadas fueron colocadas en recipientes plásticos de 3 litros de capacidad y llevadas al laboratorio en donde fue registrado el número de estados inmaduros (larvas y pupas) presentes en cada tratamiento, por fecha de muestreo.

Análisis estadístico: Para detectar diferencias significativas entre los tratamientos y el control, se aplicó un modelo de ANOVA de medidas repetidas en el tiempo. La variable a analizar fue el número promedio de larvas por cucharón. Lo primero que se determinó es la estructura de covariancia más adecuada para estas mediciones repetidas no equiespaciadas. Ésta fue la estructura de covariancia “*spatial power law*” (*SP POW*), cuya expresión matemática es $\sigma^2 \rho^{|t_i - t_j|}$, donde σ^2 es la variancia de una observación, ρ es la correlación entre observaciones de una misma unidad experimental y el exponente mide la distancia entre dos tiempos. Esta estructura se detectó como la mejor en todos los análisis teniendo en cuenta los criterios de Akaike (AIC) y Schwarz’ Bayesian (BIC). Se consideró sólo el primer período de muestreo (enero 2006-mayo 2007) debido a que en esa etapa dos de los tratamientos (50 y 100) no presentaban larvas. Por este motivo, si bien los datos originales son no equiespaciados, al considerar el primer período sí lo son. Por lo tanto, la mejor estructura de covariancia es la autorregresiva de primer orden AR(1), la cual es equivalente a la anterior para el caso particular de datos equiespaciados.

El modelo empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j \cdot t + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} : variable respuesta: número de larvas por cucharón.

μ : media general o intercepto

α_i : efecto del tratamiento i (0-10-50-100 parejas de peces)

β_j : coeficiente para el efecto tiempo

El porcentaje de reducción de las larvas de mosquitos, en los distintos tratamientos, fue comparado utilizando la siguiente fórmula (Kim *et. al*, 2002):

$$\% \text{ reducción} = \frac{(A \times b/a - B)}{(A \times b/a)} \times 100$$

Donde:

A= N° de larvas de mosquitos obtenido en los controles en el post-tratamiento.

a= N° de larvas registradas en los controles en el pre-tratamiento.

B= N° de larvas registradas en cada tratamiento, durante el post-tratamiento.

b= N° de larvas registradas en cada tratamiento, durante el pre-tratamiento.

Capacidad de adaptación del depredador al ambiente introducido

Para establecer si el depredador se adaptó al ambiente donde fue liberado, se tomó mensualmente durante los dos años de seguimiento, una muestra al azar de 10 ejemplares de *C. decemmaculatus* de las zanjas tratadas. Se realizó la disección de los mismos y se registró la presencia de partes esclerotizadas (restos del exoesqueleto larvario) en el contenido del tubo digestivo para confirmar sus hábitos alimenticios en condiciones naturales. El número de crías presentes en las hembras disecadas fue

determinado como parámetro del establecimiento y reproducción de la población (Fig. 52).

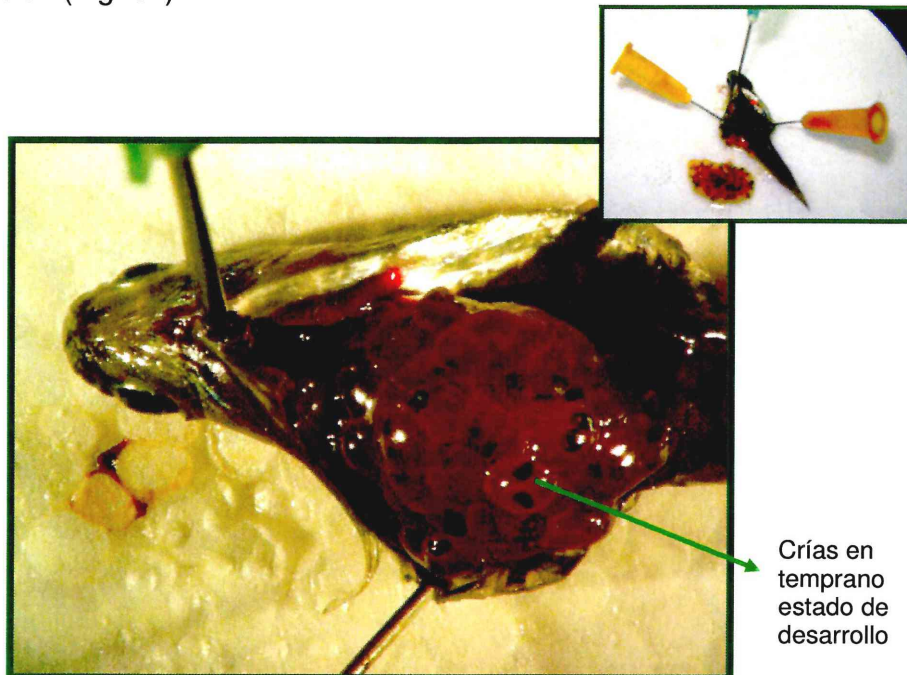


Figura 52. Disecación de una hembra de *C. decemmaculatus* en la cual se observan las crías en temprano estado de desarrollo.

Evaluación de la capacidad depredadora de C. decemmaculatus sobre balsas de C. pipiens

Un ensayo de laboratorio fue diseñado para evaluar si *C. decemmaculatus* es capaz de consumir balsas de huevos de *C. pipiens*. En recipientes plásticos con 250 ml de agua de clorada, se colocó un ejemplar de *C. decemmaculatus* y una balsa de *C. pipiens* obtenida de la colonia instalada en el CEPAVE. A las 24 horas se registró la presencia de los huevos en el contenedor. Ambos sexos de *C. decemmaculatus* fueron evaluados. Se realizaron 3 réplicas con 3 repeticiones para cada sexo (18 contenedores en total).

Evaluación en el laboratorio de la preferencia del sitio de ovipostura de hembras de C. pipiens en presencia-ausencia de C. decemmaculatus

La evaluación de la preferencia del sitio de ovipostura fue realizada utilizando jaulas con tela mosquitera en donde se colocaron hembras adultas de *C. pipiens* 24 horas después de haber sido alimentadas con sangre, 4 recipientes de 250-ml de capacidad, con agua de cloro contenido cada uno 3 peces y otros 4 recipientes con agua de cloro sin depredadores. Los recipientes empleados para este ensayo presentaron un compartimiento inferior donde se colocaron los peces, separados de uno superior por una tela mosquitera, para evitar que los depredadores consumieran los huevos colocados por las hembras, pero permitiendo a la vez, que la presencia y el movimiento de los peces pudiesen ser detectados por las hembras de *C. pipiens* adultas (Fig. 53).

Se registró la presencia-ausencia de balsas del culícido en cada contenedor, 24 horas después de incorporar las hembras alimentadas a la jaula. Esta experiencia fue repetida 3 veces en distintos tiempos (número total de recipientes: 12, para cada condición).

Análisis estadístico: Para determinar si la frecuencia de aparición de balsas difiere entre los recipientes con y sin peces, se utilizó el Procedimiento GENMOD de SAS.

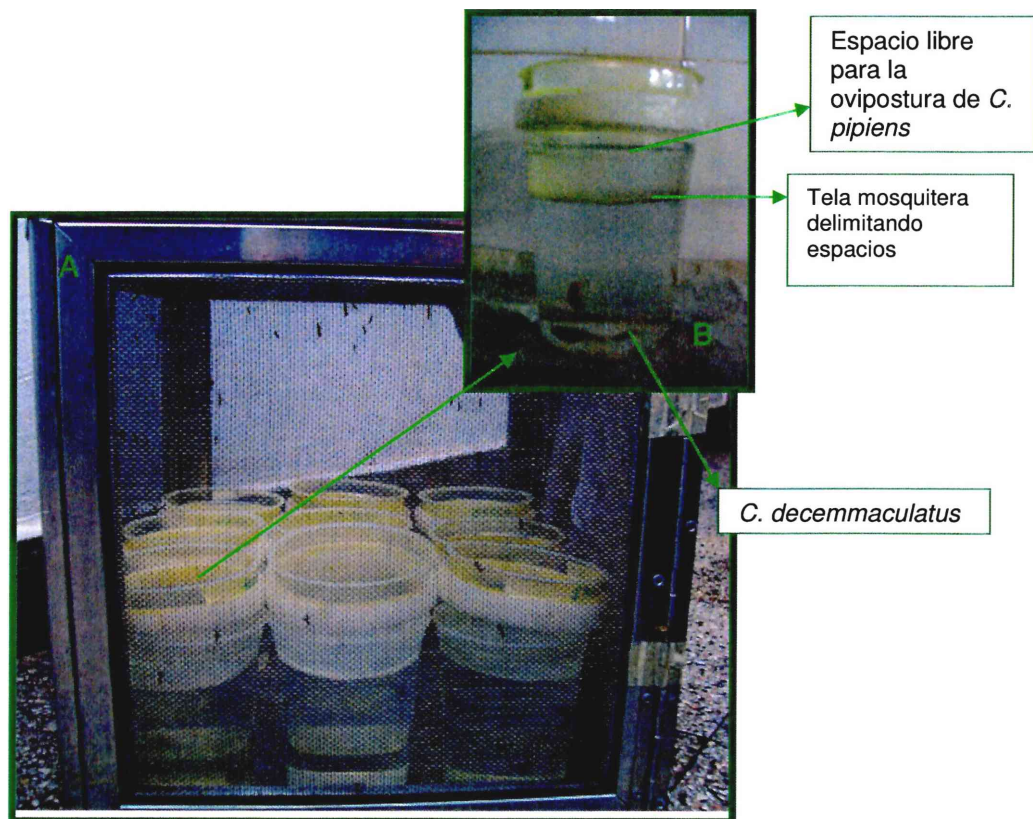


Figura 53. A) Jaula con tela mosquitera empleada para el ensayo. B) Recipiente mostrando el compartimento donde se colocaron los ejemplares de *C. decemmaculatus* y el espacio libre para que las hembras de *C. pipiens* depositen sus huevos.

Resultados

Área de estudio y selección del sitio del ensayo

Como resultado del relevamiento de 600 zanjas del área de estudio, se registró 32 % de las zanjas con presencia de peces larvivoros de la especie *C. decemmaculatus*, 11% no presentaban agua, 5% presentaban un gran desarrollo del alga *Oscillatoria brevis* (Kütz) conjuntamente con la ausencia de larvas del culícido, y en el 52 % se observó la presencia de estadios inmaduros de *C. pipiens*. En todas ellas se observó la presencia de diferentes clases de residuos, como latas, vidrios, papeles, cartones, jabón, detergente y lavandina.

Las 12 zanjas seleccionadas para el estudio pertenecieron al 52% en donde fueron detectados estados inmaduros del culícido. Las dimensiones promedio de las mismas fueron 25 m de largo x 0,60 m de ancho x 0.25 m de profundidad. Los valores promedio de pH fueron registrados en un rango de 8.1 a 8.5 y la temperatura del agua en muestreos previos a la liberación fue de 20 ± 1.333 ° C.

Seguimiento de la población de estados inmaduros del mosquito

No se observaron diferencias significativas ($F= 1,76$; $gl= 11,37$; $p= 0.097$) en la densidad de estados inmaduros registrados en las 12 zanjas, antes de la liberación de *C. decemmaculatus*, siendo el promedio de $343,59 \pm 63,6$ (media \pm De) inmaduros/cucharón.

En el mes de abril de 2006, quince semanas posteriores a la introducción de los depredadores, no se registraron estados inmaduros de *C. pipiens* en las zanjas donde fueron liberadas 100 parejas de *C. decemmaculatus* (13 peces por m²), siendo 99,3 % el porcentaje de reducción calculado para ese tratamiento. En los tratamientos donde se liberaron 7 peces por m² (50 parejas) y 1 pez por m² (10 parejas), el promedio de larvas/cucharón fue de $169,33 \pm 28,66$ y $260,77 \pm 15$ respectivamente, en ese momento del estudio, y en los controles se registraron $396,46 \pm 18$ larvas/cucharón. Los porcentajes de reducción

fueron, 72,7 % para las zanjas donde se liberaron 50 parejas y 47,1 % para aquellas tratadas con 10 parejas. En el mes de junio de 2006 (veintidós semanas post-liberación) en las zanjas donde se liberaron 50 parejas, el número de estados inmaduros de culícidos fue prácticamente nulo ($0,66 \pm 0,33$) y el porcentaje de reducción fue de 99,2%. En los tratamientos con 10 parejas fue registrado un promedio de $47 \pm 13,33$ larvas/cucharón (% de reducción: 40,6) y de $79,44 \pm 9,47$ en los controles. Durante los meses de invierno-primavera (julio- octubre), en los tratamientos con 50 y 100 parejas no se detectaron estados inmaduros de *C. pipiens*, mientras que la cantidad de estados inmaduros registrados en las zanjas donde se liberaron 10 parejas varió entre un mínimo de $0,66 \pm 1,15$ larvas/cucharón en el mes de julio y un máximo de $22 \pm 5,4$ larvas/cucharón en el mes de octubre. En este mismo período, el menor número de larvas/cucharón en las zanjas control fue de $1 \pm 0,33$ en el mes de julio y la máxima cantidad de larvas/cucharón ($29,55 \pm 7,33$) fue registrada en el mes de septiembre. A mediados del mes de octubre de 2006, el número de larvas de *C. pipiens* fue aumentando progresivamente en las zanjas control, desde $6,83 \pm 0,66$ larvas/cucharón hasta alcanzar promedios de $335 \pm 39,52$ a principios de enero de 2007. Este número promedio fue similar al registrado en enero de 2006 (pre-tratamiento). Finalmente, en las zanjas donde se liberaron originalmente 10 parejas de peces se registró un aumento del número de larvas, pero con excepción del comienzo de este segundo período de muestreo, aquel incremento no alcanzó el promedio registrado en los controles: los promedios registrados en octubre 2006 y enero 2007 fueron de $6,22 \pm 1,57$ y $143,33 \pm 25,96$ larvas/cucharón respectivamente; mientras que en los controles, los promedios registrados fueron $6 \pm 2,64$ en y $335 \pm 39,3$ para octubre 2006 y enero 2007 respectivamente. En enero de 2007 el porcentaje de reducción en las zanjas tratadas con 10 parejas fue de 55,7%. En los tratamientos con 50 y 100 parejas no se volvieron a registrar estados inmaduros durante el resto de los muestreos (Fig. 54).

En las 9 zanjas tratadas, fue registrada la presencia de ejemplares de *C. decemmaculatus* a partir de su liberación en enero de 2006 y hasta fines del experimento, en enero de 2008. La densidad poblacional de *C. decemmaculatus* no fue cuantificada luego de la liberación.

Con el análisis de Medidas Repetidas, se pudo constatar que el número de larvas halladas en las zanjas control difiere significativamente con el número registrado en los tratamientos con 10, 50 y 100 parejas, el número de estados inmaduros en tratamientos con 10 parejas de peces difiere significativamente de los tratamientos con 50 y 100 parejas, mientras que entre estos dos últimos tratamientos, no se detectaron diferencias significativas en el número de larvas (Tabla 11 y 12).

Tabla 11. Resultados del test de ANOVA de Medidas Repetidas.

| Factores | gl | F | p |
|-------------|-------|--------|---------|
| Tratamiento | 3,8 | 12,23 | 0,0023 |
| Tiempo | 1,683 | 174,94 | <0,0001 |

Tabla 12. Resultados del test de Medidas repetidas.

| Factores | gl | F | p |
|------------------------------------|-----|-------|--------|
| Control vs. 10 parejas | 1,8 | 3,49 | 0,0986 |
| Control vs. 50 parejas | 1,8 | 17,93 | 0,0029 |
| Control vs. 100 parejas | 1,8 | 30,95 | 0,0005 |
| Tratamiento con 10 vs. 50 parejas | 1,8 | 5,60 | 0,0456 |
| Tratamiento con 10 vs. 100 parejas | 1,8 | 13,65 | 0,0061 |
| Tratamiento con 50 vs. 100 parejas | 1,8 | 1,77 | 0,221 |

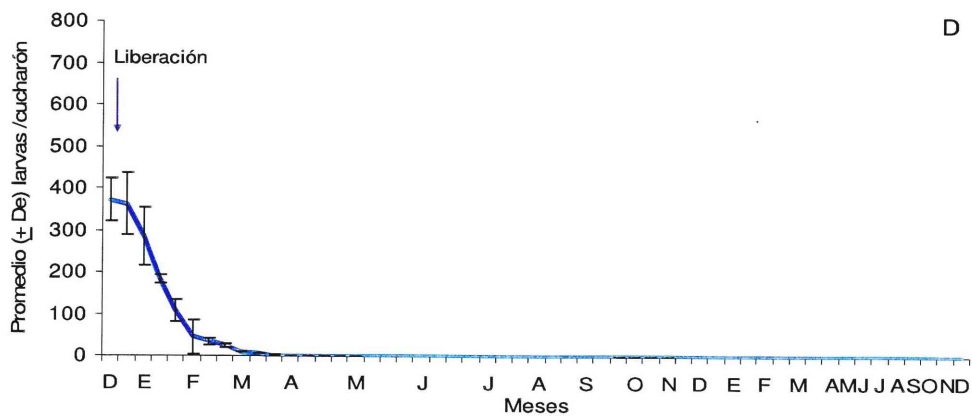
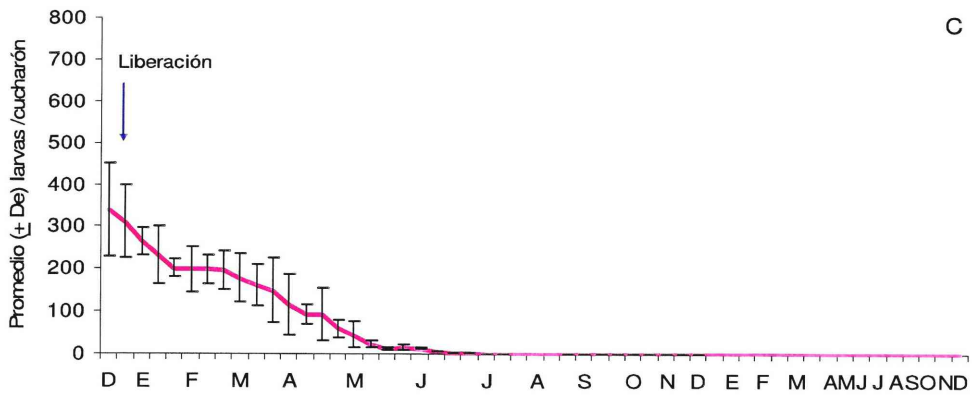
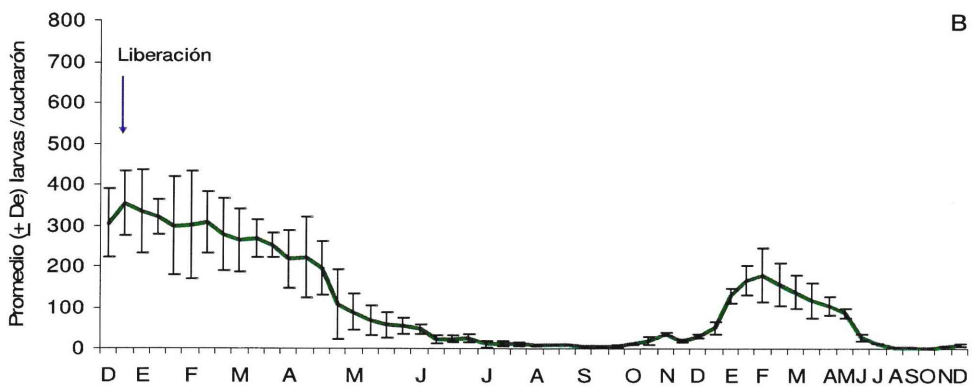
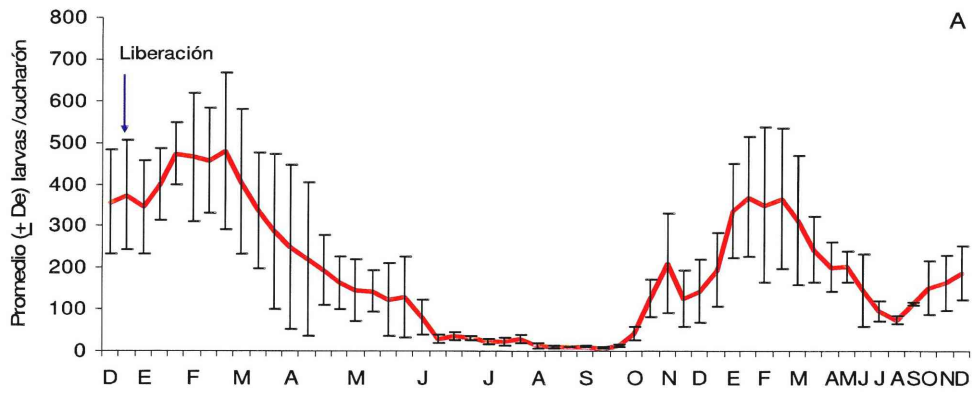


Figura 54. Promedio (\pm De) de larvas por cucharón a lo largo de los dos años de muestreo, en el control (A) y en los tratamientos con 10 (B), 50 (C) y 100 (D) parejas de *C. decemmaculatus*. Se indica el momento de la liberación.

Capacidad de adaptación del depredador en el ambiente introducido

En el contenido del tubo digestivo de los ejemplares disecados se observaron algas, crustáceos y restos del exoesqueleto larvario (principalmente sifones). Restos de larvas de culícidos fueron detectados en ejemplares de *C. decemmaculatus* colectados en los meses de enero, febrero, marzo, junio y septiembre de 2006 (Tabla 13).

El número de crías registrado por hembra adulta de *C. decemmaculatus* varió entre $4 \pm 1,41$ (Media \pm De) y $7,4 \pm 0,89$ a lo largo de los dos años de muestreos (Tabla 14).

Tabla 13. Recolección mensual, a lo largo de los 2 años de estudio, de 10 ejemplares de *C. decemmaculatus*. En cada colecta se registró el sexo de los peces y el material hallado en el contenido del tracto digestivo.

| Fecha de colecta | Número de ejemplares disecados | Sexo de los ejemplares disecados | Contenido del tubo digestivo |
|------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Enero 2006 | 10 | 6 ♀ | Algas |
| | | 4 ♂ | Algas y Crustáceos |
| Febrero 2006 | 10 | 5 ♀ | Algas y Sifón de larvas |
| | | 5 ♂ | Algas y Sifón de larvas |
| Marzo 2006 | 10 | 2 ♀ | Algas y Sifón de larvas |
| | | 8 ♂ | Algas y Crustáceos |
| Abril 2006 | 10 | 7 ♀ | Algas |
| | | 3 ♂ | Algas |
| Mayo 2006 | 10 | 4 ♀ | Algas y Crustáceos |
| | | 6 ♂ | Algas |
| Junio 2006 | 10 | 9 ♀ | Algas |
| | | 1 ♂ | Algas y Sifón de larvas |
| Julio 2006 | 10 | 3 ♀ | Algas |
| | | 7 ♂ | Algas |
| Agosto 2006 | 10 | 5 ♀ | Algas y Crustáceos |
| | | 5 ♂ | Algas |
| Septiembre 2006 | 10 | 8 ♀ | Algas y Crustáceos |
| | | 2 ♂ | Algas y Sifón de larvas |
| Octubre 2006 | 10 | 1 ♀ | Algas |
| | | 9 ♂ | Algas |
| Noviembre 2006 | 10 | 7 ♀ | Algas |
| | | 3 ♂ | Algas |
| Diciembre 2006 | 10 | 0 ♀ | Algas |
| | | 10 ♂ | Algas |
| Enero 2007 | 10 | 4 ♀ | Algas |
| | | 6 ♂ | Algas |
| Febrero 2007 | 10 | 7 ♀ | Algas |
| | | 3 ♂ | Algas |
| Marzo 2007 | 10 | 8 ♀ | Algas |
| | | 2 ♂ | Algas y Crustáceos |
| Abril 2007 | 10 | 5 ♀ | Algas |
| | | 5 ♂ | Algas y Crustáceos |
| Mayo 2007 | 10 | 9 ♀ | Algas |
| | | 1 ♂ | Algas |
| Junio 2007 | 10 | 7 ♀ | Algas |
| | | 3 ♂ | Algas |
| Julio 2007 | 10 | 3 ♀ | Algas y Crustáceos |
| | | 7 ♂ | Algas |
| Agosto 2007 | 10 | 2 ♀ | Algas |
| | | 8 ♂ | Algas |
| Septiembre 2007 | 10 | 5 ♀ | Algas |
| | | 5 ♂ | Algas y Crustáceos |
| Octubre 2007 | 10 | 2 ♀ | Algas |
| | | 8 ♂ | Algas |
| Noviembre 2007 | 10 | 6 ♀ | Algas |
| | | 4 ♂ | Algas y Crustáceos |
| Diciembre 2007 | 10 | 3 ♀ | Algas |
| | | 7 ♂ | Algas |

Tabla 14. Número de *C. decemmaculatus* hembras colectadas mensualmente durante los dos años de estudio. Registro del promedio de crías halladas en cada oportunidad.

| Fecha de colecta | Número de hembras examinadas | Promedio (\pm De) del número de crías por hembra |
|------------------|------------------------------|---|
| Enero 2006 | 6 (N= 10) | 5.4 \pm 1.14 |
| Febrero 2006 | 5 (N= 10) | 6.8 \pm 0.44 |
| Marzo 2006 | 2 (N= 10) | 6 \pm 0.00 |
| Abril 2006 | 7(N= 10) | 7.4 \pm 0.89 |
| Mayo 2006 | 4(N= 10) | 4.8 \pm 1.3 |
| Junio 2006 | 9(N= 10) | 5.44 \pm 1.7 |
| Julio 2006 | 3(N= 10) | 7 \pm 1 |
| Agosto 2006 | 5(N= 10) | 6.4 \pm 1.51 |
| Septiembre 2006 | 8(N= 10) | 6.11 \pm 1.3 |
| Octubre 2006 | 1(N= 10) | 6 \pm 0 |
| Noviembre 2006 | 7(N= 10) | 5.71 \pm 2.23 |
| Diciembre 2006 | 0(N= 10) | 0 |
| Enero 2007 | 4(N= 10) | 6.33 \pm 0.57 |
| Febrero 2007 | 7(N= 10) | 6.14 \pm 1.5 |
| Marzo 2007 | 8(N= 10) | 6.33 \pm 0.83 |
| Abril 2007 | 5(N= 10) | 5.4 \pm 1.14 |
| Mayo 2007 | 9(N= 10) | 5.66 \pm 1.81 |
| Junio 2007 | 7(N= 10) | 6.57 \pm 1.34 |
| Julio 2007 | 3(N= 10) | 4.66 \pm 0.57 |
| Agosto 2007 | 2(N= 10) | 4 \pm 1.41 |
| Septiembre 2007 | 5(N= 10) | 5.8 \pm 1.48 |
| Octubre 2007 | 2(N= 10) | 6.5 \pm 0.70 |
| Noviembre 2007 | 6(N= 10) | 5.57 \pm 0.83 |
| Diciembre 2007 | 3(N= 10) | 6.66 \pm 0.57 |

Evaluación de la capacidad depredadora de C. decemmaculatus sobre balsas de C. pipiens.

En los 9 contenedores (100%) con hembras de *C. decemmaculatus* no se registraron balsas de *C. pipiens* luego de 24 horas. Por el contrario en 2 de los recipientes (18%) con machos de este depredador, se registró la presencia de balsas luego de 24 horas de iniciar el ensayo.

Evaluación de la preferencia del sitio de ovipostura de hembras de Cx. pipiens en presencia-ausencia de C. decemmaculatus

Durante este ensayo fueron registradas 18 balsas en total, de las cuales 11 fueron halladas en los contenedores sin *C. decemmaculatus* y 7 en los contenedores donde *C. decemmaculatus* estuvo presente. Mediante el análisis estadístico, se pudo comprobar que existen diferencias significativas ($X^2=13,20$; $gl=1$; $p=0,0003$) en cuanto al tratamiento con y sin *C. decemmaculatus*, es decir que la probabilidad de hallar balsas difiere según el tratamiento. No se detectaron diferencias significativas ($X^2=2,23$; $gl=4$; $p= 0,69$) en cuanto a las repeticiones de este ensayo.

Una medida útil en este modelo que permite cuantificar el efecto de cada factor, es la *Razón de Odds* (RO). La misma se emplea para comparar tratamientos (con y sin pez), en este caso su valor es 11, es decir que la probabilidad de encontrar balsas cuando *C. decemmaculatus* esta ausente en los recipientes es 11 veces mayor que cuando está presente.

Discusión

Los peces larvívoros han sido utilizados con éxito como controladores de varias especies de culícidos vectores que crían en distintos cuerpos de agua, tanto naturales (charcos permanentes y temporales) como aquellos que son consecuencia de la acción del hombre (aguas residuales, estanques, canales, zanjas de drenaje) (Meisch, 1985; Downs, 1991; Scott, 2006; Howard y Omlin, 2008).

La introducción de 13 ejemplares de *C. decemmaculatus* por m² en los ambientes de cría, permitió la reducción de un 99.3 % de los estadios larvales de *C. pipiens* presentes en las zanjas de desagüe domiciliario, luego de 15 semanas de haber sido introducidas. Estos resultados concuerdan con los de Howard *et al.* (2007), quienes introdujeron ejemplares de *Oreochromis niloticus* L. en cuerpos de agua colonizados por *Anopheles gambiae* (Giles), *Anopheles funestus* (Giles) y varias especies de la subfamilia Culicinae. Luego de 15 semanas de haber introducido estos depredadores, la densidad poblacional de las especies de *Anopheles* mencionadas se redujo un 94 % y, la de los ejemplares de la subfamilia Culicinae, un 75 %. En nuestro trabajo, la liberación de 50 parejas de peces resultó efectiva para eliminar las larvas de *C. pipiens* 22 semanas luego de la introducción en los sitios de cría. Marti *et al.* (2006), lograron reducir la población de *C. pipiens*, en una zanja de drenaje situada en el mismo sitio de estudio, luego de 17 días de haber liberado 1.700 ejemplares de *C. decemmaculatus*, lo que corresponde a una densidad aproximada de 113 peces por m², obteniendo una reducción de la población en un período menor que el registrado en este estudio al aplicar 16 ejemplares por m². El tiempo durante el cual, 100 y 50 parejas de peces (densidades de 13 y 7 peces por m²) resultaron efectivas para eliminar las larvas de sus sitios de cría, fue menor que el tiempo en el que la población del mosquito en las zanjas control disminuyó su densidad debido a las condiciones climáticas. En los sitios tratados con 100 y 50 parejas de peces no volvieron a registrarse estadios larvales de mosquitos hasta el momento de la finalización del ensayo. La capacidad de *C. decemmaculatus* de depredar balsas, registrada en ensayos de laboratorio, no descarta la posibilidad de que hayan existido nuevas incorporaciones de estados

inmaduros de este culícido en los sitios tratados, no registradas debido al consumo de los huevos por el depredador antes de la eclosión de los mismos. A partir de estos resultados se concluye que no es necesario, durante el período de tiempo considerado en este estudio, incorporar nuevos ejemplares para lograr la reducción de los estados inmaduros de este culícido. Un resultado semejante fue obtenido por Howard *et al.* (2007) en su ensayo con *O. niloticus* en Kenya.

Cabe destacar que en este estudio, no fue determinada la densidad poblacional de *C. decemmaculatus*, por lo que no podemos asegurar que la densidad de peces por zanja, se hubiese mantenido, durante y al final del estudio en los mismos valores (1, 7 y 13 peces/m²) de la liberación.

En las 12 zanjas monitoreadas, los estados inmaduros de *C. pipiens* estuvieron prácticamente ausentes o en bajos niveles durante el invierno, sin embargo en la primavera siguiente, el número de larvas, en las zanjas control, aumentó alcanzando los niveles poblacionales registrados en investigaciones previas en el área de estudio (Campos *et al.*, 1993). En las zanjas tratadas con 10 parejas de depredadores, el número de estadios inmaduros del culícido se mantuvo por debajo del número registrado en las zanjas control, por lo que se concluye que una densidad de 1 ejemplar de *C. decemmaculatus* por m² es útil para mantener este vector en densidades poblacionales bajas, pero no es suficiente para su control.

El hallazgo de restos de larvas de mosquitos en el tracto digestivo de los ejemplares disecados, como también de algas filamentosas y unicelulares, copépodos y quironómidos, ha sido mencionado previamente por Marti *et al.* 2006. Los autores encontraron además restos de esqueletos y escamas de peces, los cuales no fueron registrados en los ejemplares disecados en este estudio. La identificación de restos de larvas en el tubo digestivo de los peces y la presencia de crías en las hembras adultas, permiten concluir que *C. decemmaculatus* es capaz de adaptarse y reproducirse en los sitios donde fue liberado. Por tratarse de una especie nativa para la Argentina, la liberación de ejemplares en los sitios de cría de *C. pipiens* no resultaría perjudicial para el ambiente. La ventaja de utilizar especies nativas, radica en que el agente biológico es liberado en ambientes con características similares a sus sitios de cría habitual, por lo que es más

factible su reproducción y supervivencia, dando como resultado un control eficaz de los estados inmaduros del mosquito, a lo largo del tiempo. Por otra parte, la fauna considerada no blanco, no resultaría perjudicada por su introducción (Chandra *et al.*, 2008). Se puede mencionar como ejemplo de los inconvenientes que se pueden presentar al liberar un depredador en un ambiente ajeno al habitual, y por los cuales el control puede fracasar, a *G. affinis*. Esta especie no resultó eficaz para el control de diferentes especies de mosquitos cuando fue introducida en sitios de cría no habituales, como lo sucedido en campos de arroz en Italia, para el control de *Anopheles*, o en zanjas de drenaje y canales en Sudan para el control de este mismo vector (Rupp, 1996; Gratz *et al.*, 1996). Otro punto importante para el éxito de los peces como controladores de mosquitos cuando se introducen en ambientes no habituales, son las características químicas, físicas y biológicas de los cuerpos de agua, a las que deben adaptarse para poder reproducirse y sobrevivir. En este trabajo, los valores de pH y temperatura registrados en el momento de la liberación, en las zanjas en las cuales se capturaron los peces y en las que fueron liberados, presentaban valores similares entre sí, por lo que no representó un problema para la adaptación de los depredadores. Los efluentes domésticos que se vierten en las zanjas, sugieren que esta especie de pez podría tolerar la contaminación del agua que a menudo es un factor limitante para la distribución de los peces depredadores (Weiser, 1991, de la Torre *et al.*, 1997).

En la selección del sitio de oviposura por parte de las hembras de mosquitos, tienen una gran influencia la aptitud individual, la dinámica de la población y la estructura de la comunidad (van Dam y Walton, 2008). Varios depredadores acuáticos han demostrado que representan un beneficio en la supervivencia de la especie presa (Petranka y Hayes, 1998; Binckley y Resetarits, 2003, Blaustein *et al.*, 2004), como es la existencia de mensajes químicos transmitidos por el medio acuático, que actúan como señal para la huida de la presa (Dodson *et al.*, 1994; Wisenden 2000, Blaustein *et al.*, 2004, van Dam y Walton, 2008). Los mosquitos utilizan productos químicos y detectan señales químicas en o alrededor de los ambientes acuáticos (Bentley y Day, 1989; McCall, 2002; Blaustein *et al.*, 2004) a fin de evitar oviponer en los sitios que contengan depredadores conocidos para la

especie (Tietze y Mulla, 1991; Stav *et al.*, 2000; Blaustein *et al.*, 2004). Petranka y Fakhoury (1991) encontraron que la abundancia de larvas de mosquitos en los estanques que contenían peces fue menor que la densidad larval en estanques sin peces, pero estos autores no midieron directamente la ovipostura. En este estudio se comprobó que la probabilidad de encontrar balsas en un contenedor depende de la presencia o ausencia de peces en él. Por lo tanto las hembras de *C. pipiens*, evitarían oviponer en presencia de *C. decemmaculatus*.

En conclusión, *C. decemmaculatus* es una especie de depredador con los atributos apropiados para ser aplicado como agente biológico de control a largo plazo de *C. pipiens*, ya que, este depredador presenta buen potencial reproductivo en este tipo de ambiente, y también, en ausencia de estados inmaduros de *C. pipiens* puede sobrevivir alimentándose de fauna y flora presente en el medio, como quedó demostrado al examinar el contenido del tracto digestivo. A partir de este estudio se concluye que la incorporación y mantenimiento de estos depredadores en zanjas de desagüe domiciliario, complementado con la limpieza y la conexión del sistema de zanjas, puede ser un mecanismo apropiado para el control de *C. pipiens* en zonas suburbanas de la ciudad de La Plata.

| |
|-------------------|
| CAPÍTULO V |
|-------------------|

Bacterias patógenas de mosquitosIntroducción

Las bacterias son organismos unicelulares de pequeñas dimensiones, por lo general miden menos de 1 μm , carecen de núcleo definido (Procariotas), poseen una pared celular rígida que les confiere diferentes formas, entre ellas cocos, bacilos o espirilos. Aquellos grupos que carecen de pared celular rígida (Mollicutes) son pleomórficos. Estos organismos pueden encontrarse de forma individual, formando agregados celulares de forma irregular o estar organizados formando cadenas; pueden ser móviles o inmóviles. Su reproducción es por fisión binaria y en algunos casos por conjugación. Las diferentes especies poseen distintos requerimientos de oxígeno, existiendo especies aeróbicas hasta estrictamente anaeróbicas. Pueden producir endosporas como formas de resistencia y suelen tener la capacidad de incorporar genes foráneos debido a la presencia de plásmidos, por transferencia horizontal de ADN plasmídico y en algunos casos cromosómico.

Este tipo de microorganismos suelen estar asociados a insectos, algunos de los cuales causan patologías, por lo que han sido citados como importantes patógenos (Tanada y Kaya, 1993).

La clasificación de las bacterias se realiza según criterios fisiológicos, serológicos, genéticos, morfológicos, reacciones a colorantes, requerimientos nutricionales, patogenicidad y tipo de hábitat. Lysenko en 1958, estableció tres grupos de características para la clasificación de bacterias asociadas a insectos, los cuales incluían 1) aspectos relacionados con los cultivos, 2) patogenicidad y 3) ecología.

El primer grupo incluye características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y de crecimiento en cultivos.

La patogenicidad, por otro lado, no es una característica simplemente del patógeno, depende también de la adaptabilidad, la variabilidad genética y

de las respuestas y reacciones del hospedador. Los insectos poseen eficientes mecanismos de defensa contra la invasión de un patógeno, como pueden ser: 1- resistencia específica, mediante la cual el hospedador no es susceptible a determinada especie de patógeno. 2- Edad y el estado del hospedador, por ejemplo los estadios larvales de mosquitos son más susceptibles a las infecciones bacterianas que los adultos. 3- Defensas morfológicas y fisiológicas, como son el tegumento, el tracto digestivo (mediante la pared intestinal, la matriz peritrófica y la flora intestinal), y las secreciones glandulares. 4- Inmunidad celular que se activa una vez que el patógeno alcanza el hemocele. En la hemolinfa están presentes los hemocitos, de los cuales se conocen cinco tipos morfológicos: prohemocitos, plasmatocitos, células granulares, adipohemocitos y oenocitos. Cada uno cumple una función específica en la defensa, pero las reacciones en general son de fagocitosis, encapsulación, nodulación y coagulación. 5- Inmunidad humoral, la que puede ser innata como hemaglutininas y encapsulación humoral o adquirida como compuestos antibacterianos y toxinas, lisozimas y proteínas bacteriolíticas. (Alves, 1998; Hall, 1983; Lello *et. al.* 1987; Faraldo y Lello, 2003)

Si las bacterias logran evadir estas respuestas de defensa de su hospedador, provocan infecciones que se clasifican como bacteremia, septicemia y toxemia. La bacteremia ocurre cuando las bacterias se multiplican en la hemolinfa del insecto invadiéndola por completo, sin producir toxinas. Esta situación suele ocurrir en casos de bacterias simbiotes, pero no con bacterias patógenas. La septicemia ocurre comúnmente con bacterias patógenas, que invaden el hemocele, se multiplican en él, producen toxinas y terminan provocando la muerte del insecto. Por último, la toxemia ocurre cuando, estando las bacterias confinadas al lumen del tubo digestivo, producen toxinas que son capaces de invadir el resto de los tejidos afectando los órganos del insecto.

Los insectos son infectados por las bacterias, siendo la principal vía de ingreso al organismo, la ingestión. Menos comunes son las infecciones que se producen por el acceso de las bacterias a través de huevos, tegumento y tráqueas.

A partir del síndrome producido por diferentes variedades de bacterias, se puede describir un tipo generalizado de infección, en el cual, la bacteria patógena es ingerida por el insecto susceptible junto con el alimento. Una vez en el lumen del tubo digestivo se multiplica y produce enzimas tóxicas (lecitinasas, proteinasas y quitinasas) que actúan en las células del tubo digestivo medio, permitiendo a la bacteria acceder al hemocele. En esta etapa de la infección, el insecto pierde el apetito, deja de alimentarse, las heces adquieren consistencia líquida, y se manifiestan como diarreas. El paso de las bacterias al hemocele resulta en una septicemia que lleva al insecto a la muerte.

Estos patógenos son en general extracelulares, excepto los grupos de las Riketsias y Mollicutes.

Los insectos suelen ser más susceptibles a la infección por las bacterias en los estadios larvales. Una vez infectadas las larvas, su cuerpo adquiere rápidamente una coloración oscura y se vuelve flácido y flexible. Los tejidos y órganos internos se rompen y toman consistencia viscosa, acompañada algunas veces de un olor putrefacto. El tegumento suele permanecer intacto, creando un lugar propicio para la reproducción masiva y rápida del patógeno, dejando al cadáver seco y endurecido.

Si bien la ingestión es la vía más común de infección, se conocen algunos casos de invasión directa a través de la tráquea y el tegumento. *Micrococcus nigrofascens* (Northrup), invade escarabajos juveniles a través de articulaciones, espiráculos y porciones blandas del tegumento, tornándolo oscuro y oloroso (Tanada y Kaya, 1993). Otras invasiones bacterianas ocurren por heridas y lesiones del tegumento, cuando las larvas se encuentran en condiciones de hacinamiento como ocurre en el escarabajo *Scolytus multistriatus* (Marham) con varias especies bacterianas (Bucher, 1963a). Los parasitoides también pueden ser una vía por la cual se transmiten bacterias a los insectos. En algunos casos, el parasitoide adulto lesiona el tubo digestivo del insecto hospedador, colocando las bacterias en el lumen, pasando desde ese sitio al hemocele, como lo hace *Itopectis conquistator* (Say) (Hymenoptera: Ichneumonidae), que con su ovipositor inocula *Serratia marcescens* y *Proteus mirabilis* en larvas de *Galeria mellonella* (Bucher, 1963a). La transmisión mediante huevos, ocurre cuando

las bacterias se encuentran sobre el huevo o dentro de él, por ejemplo *S. marcescens* es transmitida con los huevos de *Locustana pardalina* (Walk) (Orthoptera: Acrididae) (Prinsloo, 1960). La mayoría de las bacterias que infectan a través de estos mecanismos resultan poco patogénicas si son ingeridas por el hospedador.

Se conocen un gran número de especies de bacterias asociadas a insectos, pero son realmente pocas las que poseen características que las hacen útiles para el control de insectos perjudiciales. Las especies de mayor importancia como agentes de biocontrol, se encuentran en las familias Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Streptococaceae y Micrococaceae. La diferenciación de estas bacterias por su patogenicidad resulta dificultosa, ya que existen entre ellas patógenos obligados, facultativos y potenciales. Las especies que son patógenos obligados, no crecen en medios artificiales y tienen un número reducido de especies hospedadoras. Las especies patógenas facultativas son capaces de invadir y destruir tejidos susceptibles, y crecen en medios de cultivos. Aquellas que se comportan como patógenos potenciales, normalmente causan septicemia y no tienen especificidad alguna por el hospedador.

Una característica relevante que permite la diferenciación de las bacterias entomopatógenas es la producción de esporas de resistencia; característica que ha sido ampliamente estudiada, debido a que son la base de los insecticidas biológicos comerciales. Las bacterias patógenas de insectos que no producen esporas han sido menos estudiadas como potenciales agentes de control, puesto que a pesar de que pueden acceder al tubo digestivo de los insectos, poseen escasa capacidad invasora intrínseca. Estas bacterias suelen reproducirse en un amplio rango de sustratos, pero al no producir esporas, tienen una baja resistencia a la radiación solar. A esta categoría pertenecen, en su gran mayoría, las bacterias patógenas facultativas y *S. marcescens*, que es un patógeno potencial.

Dentro de las bacterias esporulantes, son pocas las que poseen una alta virulencia y capacidad de producir toxinas que mediante toxemia provoquen la muerte de los insectos. La familia Bacillaceae ha sido ampliamente estudiada, a ella pertenecen los géneros *Bacillus* y *Clostridium*,

entre los que existen buenos candidatos para el control de insectos tanto plagas como vectores de enfermedades. Ambos géneros poseen células vegetativas con formas de bastón que a veces forman cadenas, y son diferenciados entre sí por sus requerimientos de oxígenos (Cato *et al.*, 1986; Claus y Berkeley, 1986).

Entre los *Bacillus* se encuentran las bacterias más utilizadas para el control de insectos, como *B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *B. lentimorbus*, *B. larvae* y *B. thuringiensis*. Esta última especie, es la más estudiada del género y se caracteriza por formar una espora de posición central a terminal sin distender el esporangio. Su espectro de hospedadores está limitado a especies de los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera. Los parasitoides, invertebrados no blanco y depredadores, no son afectados por esta bacteria. Tampoco hay evidencias hasta el momento, de que esta especie sea patógena para los vertebrados a través de la ingestión o aplicación tópica, sólo se sabe que algunas cepas resultan tóxicas cuando son inyectadas en mamíferos (Tanadada y Kaya, 1993), por esto es que la manipulación de esta especie, por el hombre, es relativamente segura.

Durante su ciclo de vida, sobre todo al comienzo de la esporulación, *B. thuringiensis* produce una serie de compuestos secundarios. Muchos de ellos presentan actividad insecticida. Entre ellos podemos mencionar, las α -exotoxinas que son de naturaleza proteica y altamente tóxicas para algunos insectos por vía oral o inoculación intrahemocélica, lugar donde produce la lisis de los hemocitos (Ikezawa *et al.*, 1989); la β -exotoxina o thuringiensina, inhibe la actividad de la ARN-polimerasa, por lo que posee un amplio espectro de acción (Espinasse *et al.*, 2004), la toxicidad de estas moléculas es inespecífica, pudiendo afectar incluso a mamíferos, motivo por el cual los biopesticidas comerciales no la incluyen en sus formulados (Levinson *et al.*, 1990); la fosfolipasa C o lectinasa, inhibe el crecimiento celular (Ikezawa *et al.*, 1989); las proteínas Vip secretadas solo por algunas cepas (Crickmore *et al.*, 2004); la toxina Cyt con actividad citolítica y mosquitocida (de menor actividad que las proteínas Cry) (Guerchicoff *et al.*, 2001; Crickmore *et al.*, 2004), y la δ -endotoxina, también denominada proteína cristal (Cry) o cuerpo parasporal cuya estructura varía con el gen *cry* que la codifica. Los genes *cry* I, codifican proteínas que forman inclusiones cristalinas

bipiramidales, tóxicas para lepidópteros; los *cry* II codifican proteínas en forma de inclusiones cuboidales que son tóxicas para lepidópteros y dípteros; los *cry* III producen cristales romboidales específicos contra coleópteros. Por último, los genes *cry* IV forman inclusiones cristalinas ovoides tóxicas para dípteros (Tanada y Kaya, 1993; Crickmore *et al.*, 2004; de Maagd *et al.*, 2001).

Otro buen candidato en el control de dípteros acuáticos, es *B. sphaericus*, por su alta especificidad de hospedador. Es una bacteria aeróbica obligatoria que forma una spora de posición terminal produciendo la distensión del esporangio. La patogenicidad de esta bacteria se debe a una toxina binaria, formada por proteínas de 51 y 42 kDa, que resulta letal para las larvas de mosquitos cuando es ingerida. La toxina es codificada por los genes *bin* A y B, es expresada por las células vegetativas durante la esporulación, y se encuentra en inclusiones parasporales. Cuando estas inclusiones son ingeridas por el insecto, producen fragmentos tóxicos, debido al pH alcalino del intestino. Estos fragmentos, se unen a las células del epitelio del intestino medio y ciego gástrico, causando la formación de poros (permeabilización) que provocan un desbalance osmótico produciendo lisis celular. La célula bacteriana permanece restringida a la luz del intestino, registrándose septicemia hasta que finalmente la larva muere (Davidson, 1988, 1990; Charles, 1997; Silva-Filha *et al.*, 1997; Darboux *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2001).

Los formulados de *Bti*, superan ampliamente a los de *B. sphaericus*, siendo el insecticida biológico predominante para el control de mosquitos, en varios países. Pero las investigaciones acerca de la toxicidad de diferentes cepas de *B. sphaericus* se encuentra en progreso. Son muy numerosas las cepas de *B.t.i* y *B. sphaericus* aisladas y reportadas a nivel mundial, como los diferentes estudios realizados acerca de las características de estos aislamientos (Lacey, 2007). Por otro lado, se han realizado estudios tendientes a aumentar la patogenicidad y ampliar el rango de hospedador de diferentes especies de este género, mediante modificaciones genéticas (Lacey, 2007).

Los objetivos específicos planteados en este capítulo fueron:

- * Aislamiento, identificación, caracterización morfológica, bioquímica y genética de bacterias entomopatógenas.
- * Estudio de vías de transmisión, patogenicidad y rango de hospedador, de los aislamientos obtenidos.

Bacterias patógenas de mosquitos I
Aislamiento e identificación de bacterias a partir del hemocele de larvas de *C. pipiens*

Objetivos específicos

- Aislamiento e identificación de bacterias a partir del hemocele de larvas de *C. pipiens*.
- Estudio de la prevalencia del patógeno en poblaciones naturales de *C. pipiens* y su modo de transmisión.

Materiales y Métodos

Recolección de las muestras

Con la finalidad de aislar entomopatógenos que infectan naturalmente poblaciones de *C. pipiens*, se realizaron colectas de estados inmaduros en distintas zanjas de desagüe domiciliario, ubicadas en los alrededores de la ciudad de La Plata, en el período comprendido entre octubre de 2004 y diciembre de 2007. Una vez en el laboratorio, los ejemplares fueron observados bajo microscopio estereoscópico, con el fin de detectar síntomas producidos por la presencia de patógenos.

Aislamiento e identificación del patógeno

El primer paso para la identificación del patógeno, causante de una coloración diferente en el cuerpo de las larvas, detectada como sintomatología de infección, fue la observación de preparaciones en fresco de estas larvas, con el empleo de un microscopio óptico de contraste de fases. Con el objetivo de conocer la localización de la infección en los tejidos del hospedador, se realizaron cortes histológicos con micrótopo de 4 μm de espesor de distintas larvas fijadas en Bouin durante 24 horas, incluidas en parafina y coloreadas con hematoxilina-eosina.

Con el objetivo de aislar el patógeno, una vez conocida su localización, se tomaron al azar, en distintos momentos y en los diferentes sitios, un total

de 20 larvas de color blanco opaco (síntomatología de infección por bacterias) y 20 sin dicha sintomatología (coloración marrón) de cuarto estadio, las cuales se desinfectaron externamente bajo condiciones ambientales estériles (en cámara de flujo laminar). Las mismas fueron sumergidas primero en etanol 96%, luego en hipoclorito de sodio al 30% y finalmente en agua destilada estéril, 15 segundos en cada solución. Posteriormente a la desinfección, las larvas fueron colocadas sobre un portaobjetos estéril y se realizó una punción en el tórax con el empleo de una aguja estéril. La hemolinfa obtenida fue colectada usando 10 µl de agua destilada estéril. Las diluciones fueron conservadas en heladera a 4°C. Posteriormente estas diluciones fueron resuspendidas en 500 µl de Tris-EDTA buffer pH 7. Cuatrocientos µl de la solución obtenida en los pasos anteriores, fueron usados para extracción de ADN bacteriano y alícuotas de 100 µl para el cultivo del aislamiento bacteriano en dos medios diferentes. Un medio rico, TY agar modificado con rojo congo (Tryptona 5 g, extracto de levadura 3 g, Cl_2Ca 0.35 g, Manitol 1 g, KNO_3 0,1 g, Fructosa 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, agua destilada 1 l., pH 7.0), y un medio EMB (peptona 10 g/l, lactosa 5 g/l, sacarosa 5 g/l, fosfato dipotásico 2 g/l, agar 13.5 g/l, eosina 0.4 g/l, azul de metileno 0.065 g/l, pH final 7.2 ± 0.2) para bacterias de bajos requerimientos nutricionales.

Caracterización biológica del patógeno: Estudios de transmisión

Para el estudio de las vías de transmisión, se realizaron experimentos de laboratorio para los cuales se utilizó un cultivo bacteriano con crecimiento en fase logarítmica (1×10^{10} ; A_{600} :1,6) en medio TY líquido modificado y larvas de *C. pipiens* sanas provenientes de las colonias mantenidas en el CEPAVE.

Para cada experiencia se colocaron, 25 larvas de segundo estadio y 150 ml de agua destilada estéril, en contenedores plásticos de 8 cm de diámetro a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 12:12 horas (L:O). Se usaron concentraciones de 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 y 1×10^9 (organismos/ml) a partir del cultivo original, realizando diluciones seriadas en agua destilada estéril. Se realizaron 3 repeticiones con 3 réplicas por cada experiencia y para cada concentración

del patógeno. Las larvas tratadas fueron observadas diariamente bajo microscopio estereoscópico de luz para detectar síntomas de la infección (coloración blanca opaca) hasta que alcanzaran el cuarto estadio.

Estas experiencias consistieron en la exposición de larvas sanas, sin lesiones en la cutícula, a las diferentes concentraciones del patógeno, para evaluar si la infección es producida mediante la ingestión del mismo. Por otra parte, se realizaron lesiones artificiales en la cutícula de las larvas, previamente a la exposición a las diferentes concentraciones del patógeno. Estas lesiones las podemos agrupar en:

Mecánicas

1) Remoción de las setas del cuerpo. Un grupo de setas elegidas al azar, fueron retiradas mediante el uso de pinzas de punta fina previamente desinfectadas con alcohol 96°.

2) Remoción de papilas anales: la larva fue sujeta por su extremo anterior a la altura del tórax, mediante pinzas de punta fina; una papila anal, elegida al azar, fue removida utilizando otra pinza de las mismas características.

3) Punciones torácicas: una punción en el tórax de la larva fue realizada con un alfiler entomológico estéril, mientras era sostenida con pinzas de puntas finas por su extremo posterior.

Biológicas

1) Nemátodos: fueron realizadas infecciones larvales con *S. spiculatus*; parásitos de mosquitos que penetran al hospedador perforando la cutícula. En el mismo recipiente fueron colocadas larvas de segundo estadio de *C. pipiens* (n=25), con individuos juveniles de *S. spiculatus* (n=125) (J₂/L₂), expuestas a las concentraciones del patógeno a evaluar.

Siguiendo los postulados de Koch (un insecto sano e inoculado con el agente patogénico, deberá reproducir la sintomatología debiéndose aislar nuevamente el patógeno del hospedador susceptible), el patógeno fue aislado e identificado a partir de las larvas que en los experimentos descritos anteriormente, mostraron sintomatología.

Prevalencia del patógeno en poblaciones naturales de C. pipiens

Con el fin de evaluar la prevalencia de estas infecciones bacterianas en las poblaciones de *C. pipiens* de los alrededores de la ciudad de La Plata, se seleccionaron cuatro sitios de muestreo, localizados en las afueras de la ciudad y separados aproximadamente por 2 km entre sí. Los muestreos fueron realizados semanalmente durante el período comprendido entre octubre 2004- diciembre 2007. Se tomaron tres cucharones al azar de 250 ml de capacidad, por fecha de muestreo. Se registró el número total de estados inmaduros en cada sitio, distinguiendo entre larvas de diferentes estadios (tempranos: L1 más L2, tardíos: L3 más L4 y pupas). Fue registrado el número y estadio de las larvas infectadas.

Caracterización morfológica y bioquímica del aislamiento bacteriano.

Este patógeno fue aislado y cultivado en medio agar TY modificado, previamente descrito, e incubado a 25°C durante 24 horas. Las colonias se repicaron en un medio EMB y se preservaron en TY- glicerol a -80 °C. La morfología fue examinada, a partir de preparaciones teñidas con la coloración de Gram, bajo microscopio óptico. La estructura flagelar fue observada mediante microscopía electrónica de transferencia (MET). El requerimiento de oxígeno para su crecimiento en condiciones de aerobiosis fue determinado mediante la incubación durante toda la noche a 25° C, en medio TY modificado, agitación a 180 rpm y lectura mediante espectrofotómetro. La tolerancia al Cloruro de Sodio fue determinada en 1.5, 2, 3 y 5 % w/v NaCl, respectivamente. La actividad catalasa fue determinada por métodos estándar (Thiery y Frachon, 1997). La esterilidad de todos los reactivos fue verificada durante todo el procedimiento.

Identificación molecular del patógeno

Extracción de ADN

La extracción del ADN a partir del hemocele de larvas con sintomatología de infección y larvas sanas de *C. pipiens*, se realizó en base a procedimientos modificados para preparaciones de ADN genómico total, descrito previamente por Aguilar *et al.*, (2001): 1) Las diluciones de células bacterianas, obtenidas a partir de la hemolinfa de 20 larvas con sintomatología de infección seleccionadas al azar, fueron centrifugadas a 14.000 rpm durante 10 minutos, luego fueron resuspendidas en 0,5 ml 1 M de NaCl por 10 minutos. El pellets con células en dilución fue centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos, resuspendido en 0,5 ml de agua bidestilada estéril y centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos, realizándose tres lavados con agua bidestilada en total. 2) A partir de la hemolinfa de 4 larvas infectadas en el laboratorio con bacterias crecidas en cultivo.

Para completar la extracción del ADN bacteriano total, los pellets fueron resuspendidos en 150 µl 6 % de resina quelante Chelex de Bio- Rad (IntaGene DNA Purification Matriz). Siguiendo las instrucciones del fabricante se sometió a 56 °C 15 min. y a 99 °C, pasando por vortex antes de cada paso. Se conservó a – 20 °C, para su uso posterior.

Amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA

A partir del ADN extraído según las técnicas descritas previamente, se realizó la amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una zona del gen que codifica para la subunidad 16S ribosomal, el cual es usado en la identificación taxonómica de bacterias. Luego de centrifugar 30 segundos, se tomaron 2 µl de la extracción de ADN bacteriano obtenido en la resina chelex (aproximadamente 100 nm), para realizar la reacción de amplificación en las siguientes condiciones finales: 0,2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl, 1 µM de cada oligonucleótido o cebador, el buffer 5X correspondiente a la Taq polimerasa, una unidad de la misma, y agua bidestilada hasta completar el volumen final. La secuencia parcial de 1,3-

kilobases del gen 16S rRNA fue amplificada a partir del ADN cromosomal de las muestras, y se utilizó el primer específico y universal para Eubacterias 16S rD1 (5´- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC-3´) y 16S fD1 (5´-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3´). La amplificación por PCR y secuenciación del gen 16 S rRNA (rDNA) fue realizada según Weisburg *et al.*, (1990). Las condiciones de PCR utilizadas para la desnaturalización inicial fueron 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante un minuto, hibridación por un minuto a 58°C y extensión a 72°C por 2 minutos. El extendido final se realizó a 72°C durante 3 minutos. Los productos de amplificación, por PCR, del gen 16S rRNA de los aislamientos, fueron corridos previamente en un gel de agarosa al 0,8 % teñidos con bromuro de etidio, luego de la purificación con GeneClean II Kit (Bio 101) y secuenciados por Macrogen Company Service en Korea. Los cebadores utilizados para obtener la secuenciación completa del gen 16S rRNA fueron los mismos que los empleados para la amplificación por PCR.

Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias 16S rRNA, disponibles en bases de datos obtenidas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information database) usando búsqueda BLAST como lo describe Altschul *et al.*, (1997).

La alineación de todas las secuencias de los genes 16S rRNA obtenidas de las diferentes muestras a partir de la hemolinfa de 3 ejemplares (n= 20) infectados y de la hemolinfa de 4 larvas re infectadas en laboratorio, fueron realizadas utilizando CLUSTAL V (Higgins *et al.*, 1992), programa del servidor European Bio Informatics server (European Bioinformatics Institute).

Resultados

Recolección de larvas de C. pipiens e identificación de posibles patógenos.

Entre las larvas observadas bajo el microscopio estereoscópico, se detectó una coloración en el cuerpo de las larvas diferente a la comúnmente hallada en el campo (Fig. 55). Esta coloración fue atribuida como sintomatología, correspondiente a la presencia de una bacteria que invade el hemocele. Las larvas con dicha sintomatología no alcanzaron el estado de pupa, muriendo en cuarto estadio larval.

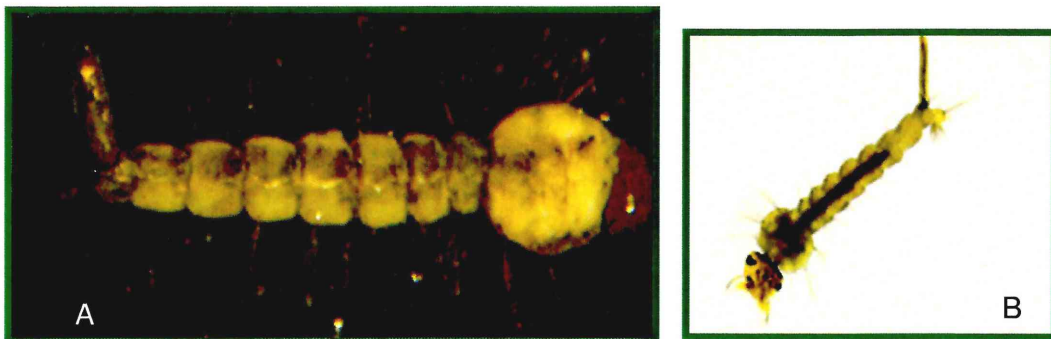


Figura 55. A) larva de *C. pipiens* con coloración blanca opaca que evidencia sintomatología de infección. B) Larva de *C. pipiens* con coloración normal del tegumento.

Estudio de transmisión del patógeno

Cuando las larvas de *C. pipiens*, fueron expuestas a la suspensión del aislamiento bacteriano en las distintas concentraciones empleadas, sin lesiones en la cutícula, los resultados de infección fueron negativos para todas las concentraciones.

En las infecciones realizadas utilizando las distintas concentraciones bacterianas junto a juveniles de *S. spiculatus*, se obtuvo un 36 % (n=225) de larvas con sintomatología de infección bacteriana cuando fueron expuestas a

1×10^9 bacterias/ml y 16 % (n=225) al exponerlas con una concentración de 5×10^8 bacterias/ml.

Cuando se emplearon métodos para causar lesiones en la cutícula de las larvas, se obtuvieron diferentes porcentajes de infección cuando la lesión fue causada por punción con agujas en el tórax: 10 % (n=225) de larvas infectadas (1×10^8 bacterias/ml), 12 % (n=225) (5×10^8) y 18.6 % (n=225) (1×10^9 bacteria/ml). El porcentaje de infección a través de la remoción de papilas anales fue de 8 % (n=225) cuando fueron expuestos a 1×10^8 bacterias/ml y 13.7 % (n=225) cuando se expusieron a altas dosis (1×10^9 bacterias/ml). Porcentajes similares fueron obtenidos cuando las setas del cuerpo fueron removidas.

No se obtuvieron resultados positivos de infección mediante lesiones mecánicas, cuando se utilizaron concentraciones de 1×10^7 y 5×10^7 bacterias/ml.

Prevalencia del patógeno en poblaciones naturales de C. pipiens

En el sitio 1, las larvas de *C. pipiens* fueron colectadas desde octubre hasta junio durante el primer año de estudio, siendo 0.8% (n= 285) el mayor porcentaje de infección observado en febrero de 2005. En el segundo año de muestreo, las larvas fueron encontradas entre noviembre y junio, registrándose en febrero de 2006 el mayor porcentaje de larvas con sintomatología producida por el patógeno durante este período (1,6%, n= 80). Los estados inmaduros de *C. pipiens* fueron colectados desde agosto de 2006 hasta junio de 2007, no registrándose nuevamente hasta octubre de 2007; en noviembre de 2007 se registró el mayor porcentaje de infección para este período, 2,1% (n= 63). El número de estados inmaduros se incrementó durante el período de diciembre a febrero durante los tres años de estudio (Fig. 56).

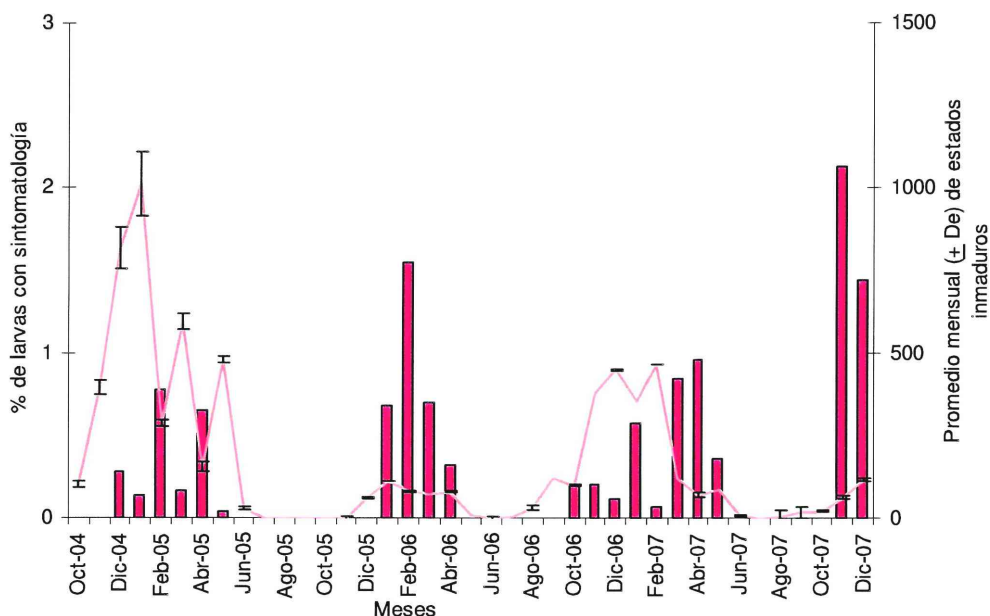


Figura 56. Las barras indican el porcentaje de larvas con sintomatología de infección. La curva indica el promedio (\pm De) mensual de estados inmaduros de *C. pipiens* colectados en el sitio 1.

En el sitio 2 no se observaron estados inmaduros de *C. pipiens* durante los períodos marzo a diciembre de 2005, junio a septiembre de 2006 y junio a agosto de 2007. El mayor número de estados inmaduros de *C. pipiens* fue registrado en enero de 2007 ($n= 1235$), momento en el cual el porcentaje de infección resultó ser 0%. El mayor porcentaje de larvas con sintomatología de infección fue registrado en noviembre de 2007 correspondiendo al 8.0% ($n= 747$) de las larvas colectadas. Durante el primer año de muestreo (2004-2005) se registraron estados inmaduros de *C. pipiens* de octubre a marzo, período en el cual el porcentaje de larvas con sintomatología presentó un pico en diciembre de 2004, correspondiente a 3,8% ($n= 779$) de las larvas colectadas. En el segundo período de muestreo (2005-2006), el mayor porcentaje de infecciones se registró en marzo de 2006, momento en el que 5,6% ($n= 88$) de las larvas presentó sintomatología de infección. En el tercer período de muestreo (2006-2007), se registraron dos momentos con altas

prevalencias de larvas con sintomatología de infección: 7,6 % (n=670) en marzo de 2007 y 8% (n=747) en noviembre del mismo año (Fig. 57).

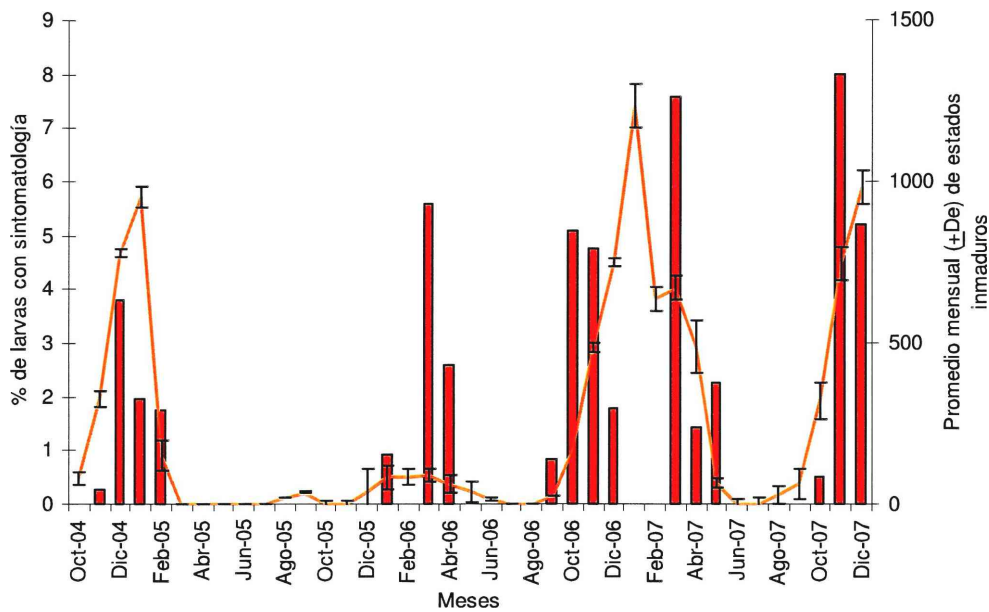


Figura 57. Las barras indican el porcentaje de larvas con sintomatología de infección. La curva indica el promedio (\pm De) mensual de estados inmaduros de *C. pipiens* colectados en el sitio 2.

En el sitio 3, los estados inmaduros de *C. pipiens* fueron registrados de un modo continuo durante los tres años de muestreo, a excepción del período agosto-septiembre de 2005. Se observó un 4% (n= 13) de larvas con sintomatología de infección por el patógeno, en septiembre de ese año. Este porcentaje de infección fue el máximo registrado para este sitio. En los restantes muestreos, los porcentajes de infección variaron entre 0,03% (n= 1685) en enero de 2006 y 0,6 (n=167) en marzo del mismo año (Fig. 58).

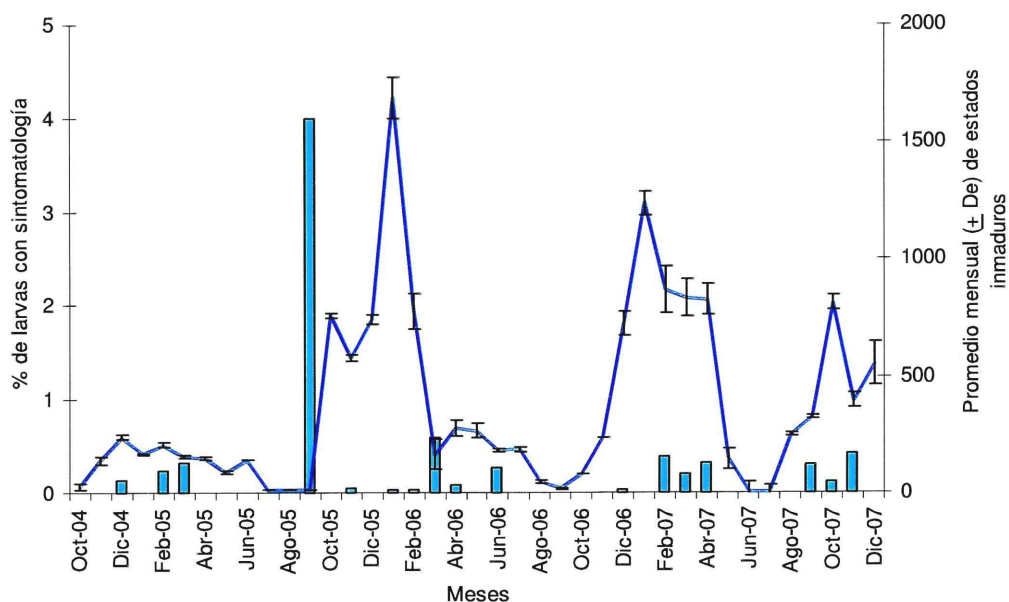


Figura 58. Las barras indican el porcentaje de larvas con sintomatología de infección. La curva indica el promedio (\pm De) mensual de estados inmaduros de *C. pipiens* colectados en el sitio 3.

En el sitio 4, las larvas de *Cx pipiens* fueron registradas durante todo el período de muestreo (2004-2007), excepto durante los meses de junio y julio de 2007. Los porcentajes de infección durante el primer año variaron entre 0,4 % (n=1468) en octubre de 2004 y 0,9 % (n=616) en marzo de 2005. Durante el segundo año, estos porcentajes variaron entre 0,1 % (n= 1570) en abril de 2006 y 8,2 % (n=76) en agosto de 2006. Para el tercer período el porcentaje de larvas con sintomatología de infección varió entre 0.4 % (n=574) en abril de 2007 y 1,3% (n= 212) en mayo de dicho año (Fig. 59).

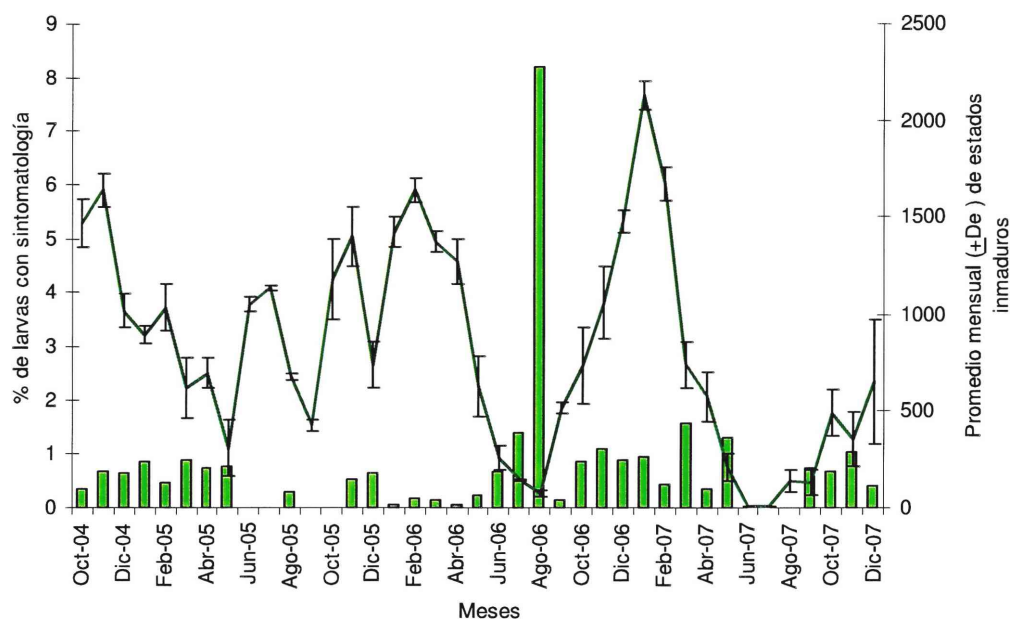
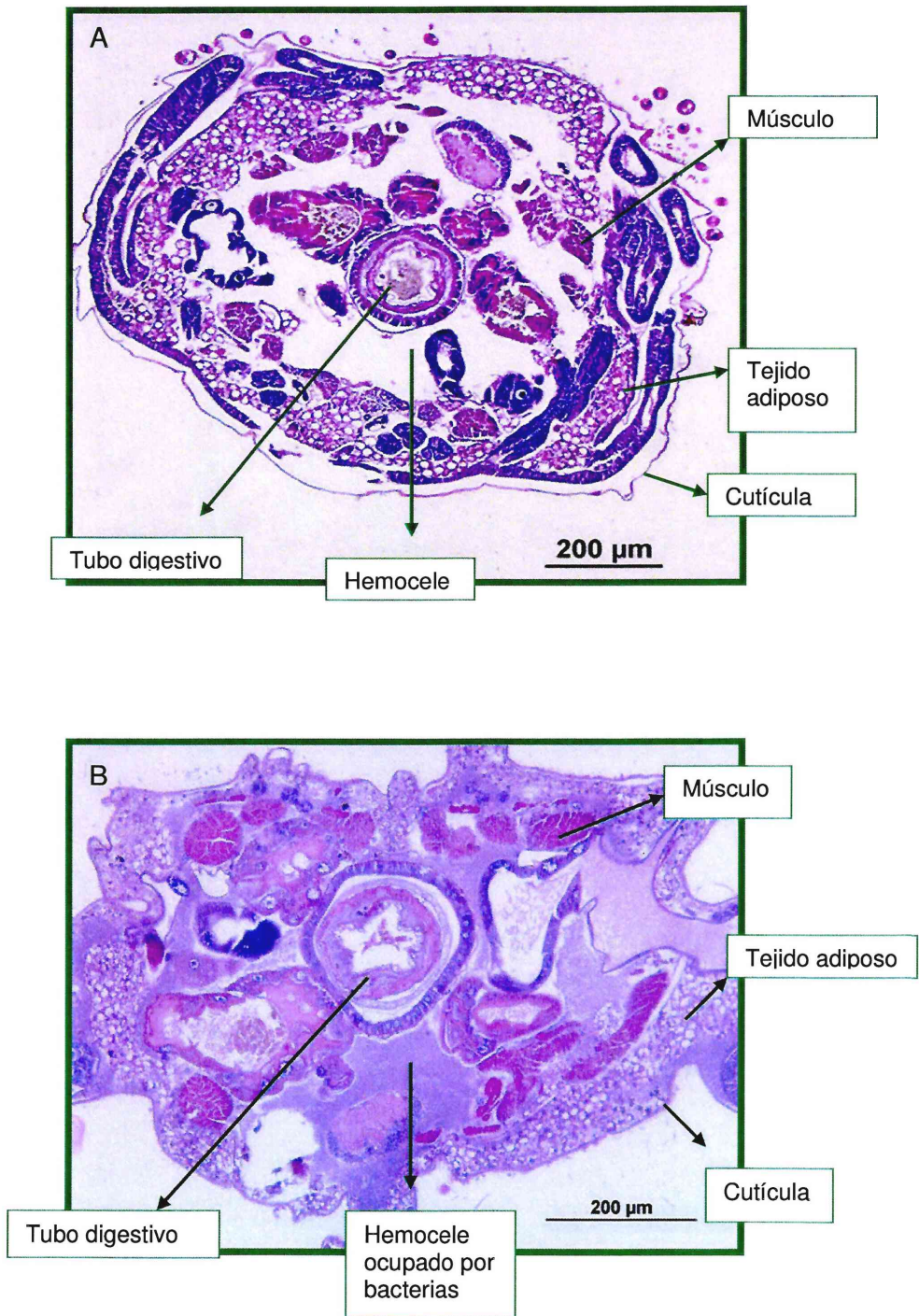


Figura 59. Las barras indican el porcentaje de larvas con sintomatología de infección. La curva indica el promedio (\pm De) mensual de estados inmaduros de *C. pipiens* colectados en el sitio 4.

Caracterización morfológica y bioquímica del patógeno. Localización histológica

Mediante los cortes histológicos de las larvas con sintomatología de infección, se observó la presencia de bacterias en el hemocele de las mismas (Fig. 60).

Las observaciones al microscopio electrónico de transmisión (MET), confirmaron la presencia de bacterias con forma de espirilo, con flagelos bipolares y cuerpos de inclusión en la hemolinfa de las larvas seleccionadas por su sintomatología (Fig. 61 A y B). Aislamientos realizados en EMB agar tomados al azar, fueron usados para infectar larvas sanas obtenidas de la colonia mantenida en el CEPAVE. Las bacterias de estas colonias fueron negativas para la coloración de Gram (Fig. 62), presentaron crecimiento en condiciones aeróbicas a una temperatura de 28 ± 2 °C, actividad catalasa positiva, degradación de la urea negativa y la tolerancia al NaCl fue menor al 3 % p/v.



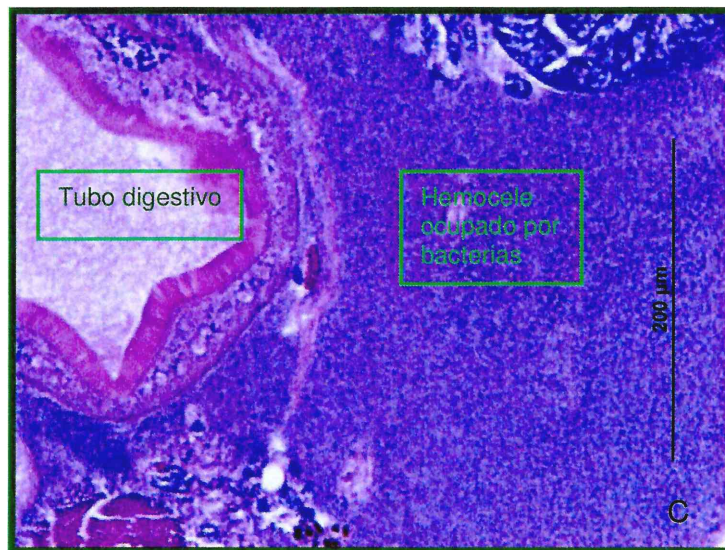


Figura 60. Corte transversal de una larva de *C. pipiens*. Coloración hematoxilina-eosina. A) Sección transversal de una larva sana. B) Vista entera de la sección transversal de una larva infectada por bacterias. C) Detalle del hemocele ocupado por bacterias.

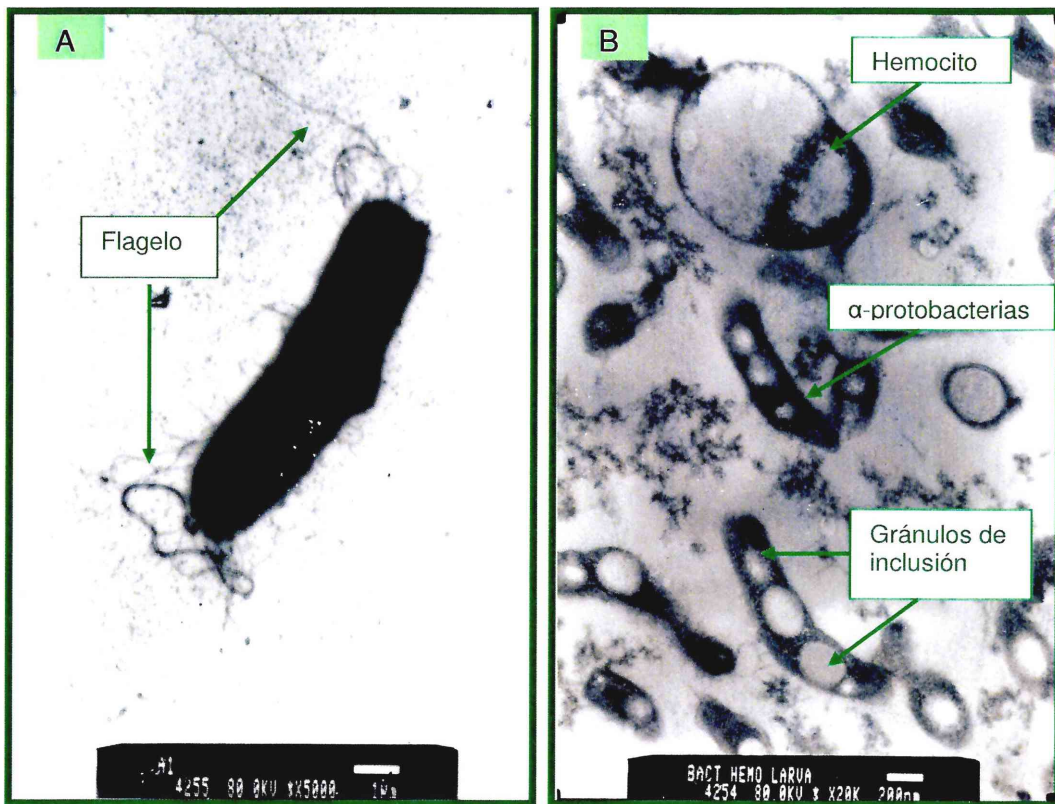


Figura 61. Fotografía tomada al MET (microscopio electrónico de transmisión) de A) una α -protobacteria del género *Aquaspirillum* sp. donde se puede observar la forma de espirilo y los flagelos bipolares. B). Detalle de la hemolinfa de una larva de *C. pipiens* infectada, donde se observan elementos de la hemolinfa y α -protobacterias con gránulos de inclusión.

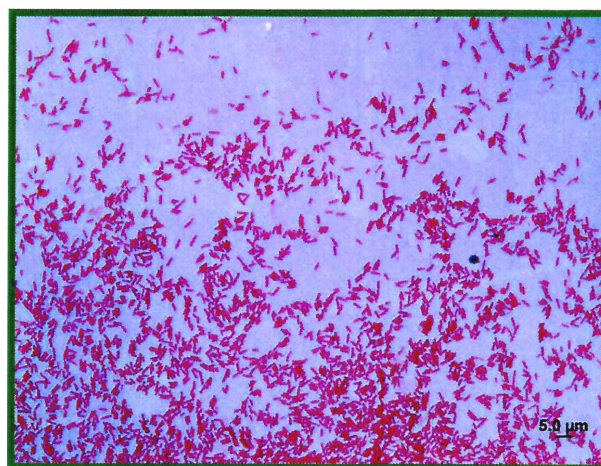


Figura 62. Cultivo de *Aquaspirillum* sp. con coloración de Gram negativa.

Identificación molecular basada en la secuencia del gen 16Sr RNA.

El gen 16S rADN fue clonado a partir de la amplificación por PCR usando ADN total bacteriano extraído de dos fuentes diferentes: 1) hemolinfa de larvas obtenidas en el campo y 2) de la hemolinfa de larvas infectadas en el laboratorio con bacterias crecidas en cultivo. Estos clones del gen, fueron analizados mediante las enzimas de restricción *EcoRI*, *PstI* y *HinIII* para obtener los perfiles de digestión de la región parcial del gen 16S rADN utilizando geles agarizados de 0,8%.

El gen 16 S rADN de muestras provenientes de las dos fuentes antes mencionadas fueron secuenciadas. Sus secuencias nucleotídicas se compararon con el total de genes ribosomales, correspondientes a otras cepas bacterianas cuyas secuencias se encuentran depositadas en el banco de datos NCBI. El análisis de la secuencia parcial de fragmentos, de aproximadamente 1320 pares de bases, del gen 16S rADN de 3 (n=20) de las amplificaciones del ADN extraído de la hemolinfa larval, denominadas TMC807, TMC707, y TMC907, mostraron un nivel de similitud de 93 %, 90 % y 88 %, respectivamente (mediante BLAST), con una α -Protobacteria, perteneciente al genero *Aquaspirillum*. La secuencia del gen 16S rDNA de las bacterias extraídas de la hemolinfa de larvas re infectadas en el laboratorio, denominadas TMC109, TMC209, TMC309 y TMC409, presentaron una similitud de 93%, 95%, 94 y 93% con *Bacillus subtilis* respectivamente.

Discusión

Durante la prospección de entomopatógenos en poblaciones naturales de *C. pipiens* se observó la presencia de larvas con una sintomatología caracterizada por una coloración del tegumento blanco opaco. En cada sitio de muestreo se observó que esta sintomatología correspondía a la presencia de una bacteria localizada en el hemocele de las larvas del culícido. Los estudios bioquímicos, morfológicos y moleculares realizados a partir de aislamientos de la hemolinfa de los ejemplares estudiados nos permitieron identificar una α -proteobacteria, que presentó un alto porcentaje de similitud con el género *Aquaspirillum*. Esta bacteria pudo ser mantenida en cultivos *in Vitro*, aunque no se pudo comprobar la reinfección de hospedadores sanos por el mismo agente patogénico.

Las bacterias que pertenecen al género *Aquaspirillum*, se encuentran distribuidas ampliamente en diferentes ambientes acuáticos, relacionadas entre otras cosas, a rizósfera (Weir *et al.*, 2004) y a fangos activados (Thomsen *et al.*, 2006), pero no existen datos publicados sobre la relación de simbiosis o patogenicidad con insectos acuáticos.

Los resultados de este trabajo permiten concluir que las infecciones causadas por esta bacteria no ocurren mediante ingestión de las mismas, sino por penetración de la cutícula cuando presenta lesiones mecánicas, causadas tanto artificialmente mediante objetos, como biológicamente mediante parásitos como *S. spiculatus*. Si bien no tenemos registros de cómo se produce en la naturaleza esta relación hospedador-patógeno, basándonos en los experimentos realizados, inferimos que en el ambiente que ambos organismos comparten, se encuentra presente un agente capaz de producir lesión en la cutícula, mediante la cual el patógeno accede al cuerpo de la larva. Por otra parte existen registros de larvas de *C. pipiens* infectadas por *S. spiculatus* en zanjas de desagües domiciliarios de la ciudad de La Plata (Campos *et al.*, 1993).

Este patógeno origina una enfermedad crónica en larvas de *C. pipiens*; se reproduce en el hemocele del hospedador, hasta que alcanza el cuarto estadio de desarrollo larval, permaneciendo en este estado por un período de tiempo más prolongado que las larvas sanas, no alcanzando el estado de

pupa y muriendo como larva. Este aspecto de la infección, fue observado también por Campos *et al.* (1993), quienes mencionaron la presencia de larvas de *C. pipiens*, con una sintomatología similar a la descrita en este trabajo. Estos autores atribuyeron la sintomatología de la coloración blanca del cuerpo de las larvas, a la presencia de una bacteria. En este estudio, la prevalencia de infección varió entre 1% y 2% en la mayoría de los muestreos alcanzando sólo valores notoriamente más altos cuando los niveles poblacionales de los estados inmaduros del mosquito fueron bajos. En el sitio 2 se observa un patrón diferente a los restantes, ya que las prevalencias superan el 2%, observándose un máximo de prevalencia de 9%. Análisis de parámetros físicos y químicos del agua serían una herramienta útil para poder explicar estas diferencias biológicas. Por otro lado, no se evidencia estacionalidad de las infecciones a lo largo de los tres años de muestreo. Campos *et al.*, (1993) también reportaron prevalencias bajas por bacteriosis, que no superaron el 10% y una ausencia de las mismas durante los meses de agosto, septiembre y octubre. Estos autores también mencionan que los mayores porcentajes de larvas infectadas por bacterias, fueron registrados cuando *C. pipiens* presentó bajos niveles poblacionales.

En este trabajo no se ha evaluado el mecanismo de acción que el sistema inmune de las larvas pone en actividad frente a la invasión bacteriana. Es sabido que el sistema inmune de los insectos del orden Diptera, presenta un mecanismo de reconocimiento de lipopolisacáridos, componente característico de las paredes bacterianas, que es eficiente en el reconocimiento de estos cuerpos extraños, mediante hemocitos que los fagocitan. Tainai *et al.* (1997) sugieren que los lipopolisacáridos de las paredes bacterianas, inducen la secreción de cecropin B, como proteína antibacterial en insectos. Esta proteína antibacterial es sintetizada por el cuerpo graso y los hemocitos para luego ser secretada a la hemolinfa donde ataca a las bacterias que en ella pudieran encontrarse (Gillespies *et al.*, 1997). En nuestro caso, sería interesante evaluar si específicamente si esta α -protobacteria una vez ingresada al hemocele, es capaz de multiplicarse debido a una falla inmunológica del individuo o si la bacteria es capaz de sortear, mediante algún mecanismo, el sistema inmunológico y multiplicarse en la hemolinfa de ejemplares inmuno-competentes.

La presencia de la especie *B. subtilis* en los aislamientos obtenidos a partir de larvas infectadas experimentalmente podría deberse a la dificultad que presenta la esterilización de la superficie de las larvas vivas antes de exponerlas al aislamiento de *Aquaspirillum* sp. o a una posible contaminación en los cultivos. Por lo tanto, es importante realizar el aislamiento y secuenciación de bacterias provenientes de la hemolinfa de un mayor número de larvas con esta sintomatología, debido a la dificultad de confirmar la presencia de *Aquaspirillum* sp. en infecciones experimentales, a pesar del desarrollo de la misma sintomatología. La coloración blanca opaca reconocida como síntoma de infección por bacterias podría ser el resultado de una bacteriosis causada por otra clase de bacterias diferente a una α -protobacteria del género *Aquaspirillum* sp. Estudios posteriores acerca de la especificidad de las α -protobacterias, en general y *Aquaspirillum* sp. en particular, por la hemolinfa de *C. pipiens* nos permitirá profundizar aspectos inmunológicos de estas relaciones hospedador-patógeno, dado que la existencia de especificidad reflejaría estrechas relaciones fisiológicas entre *Aquaspirillum* sp. y *C. pipiens*.

Bacterias patógenas de mosquitos II
Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* a partir de larvas infectadas de *C. pipiens*.

Objetivos específicos

- Aislamiento, caracterización fenotípica y molecular de cepas nativas de *Bacillus*, con capacidad de controlar estados inmaduros de *C. pipiens*.
- Determinación de la toxicidad y rango de hospedador de los aislamientos locales.
- Identificación de los genes que codifican las proteínas tóxicas Bin y Mtx.

Materiales y Métodos

Recolección de las muestras y obtención de cepas de Bacillus

La colecta de las larvas de *C. pipiens* se realizó según la metodología descrita en la sección anterior de este capítulo en el ítem “colecta de muestras”. En una oportunidad, en la muestra colectada en el sitio 3, se observó la mortalidad del 100% de las larvas en el laboratorio, luego de 6 horas de haber sido colectadas. Los cadáveres de estas larvas fueron observados mediante preparados en fresco bajo microscopio de contraste de fases.

Aislamiento de cepas nativas de bacilos

Las larvas muertas fueron esterilizadas colocándolas primero en agua destilada estéril durante 20 segundos; luego se realizaron dos lavados en alcohol 70° durante 20 segundos cada uno y por último nuevamente 20 segundos en agua destilada estéril. Posteriormente fueron homogeneizados en solución fisiológica estéril, según Días *et al.* (1992). El homogenato obtenido fue diluido en 10 ml de solución fisiológica, suspendido en tubos de ensayo con perlas de vidrio estériles, y agitado en “vortex” durante 1 minuto.

Las suspensiones fueron pasteurizadas en estufa a 65° C por 30 minutos y enfriadas sobre cubos de hielo durante 5 minutos. De cada muestra se hizo una dilución de 0.5 ml en 10 ml de agua destilada estéril y se sembraron 100 µl de la dilución, en cajas de Petri conteniendo Agar Nutritivo. Se incubaron a 25° C en oscuridad durante 72 horas (Lacey, 1997). Finalmente fueron reaisladas en NYSN agar (10 g glucosa/l, 5 g NaCl/l, 0.3 g extracto de carne/l, 0.5 g extracto de levadura/l, 0.203 g MgCl₂/l, 0.102 g CaCl₂/l, 0.01 g MnCl₂/l, pH 7) (Yousten y Meyers, 1985), para la posterior caracterización fenotípica.

Para estudiar las cepas nativas de los bacilos aislados de larvas de *C. pipiens*, fueron utilizadas como cepas de referencia, las cepas SPH88 y 2362 de *B. sphaericus*, y la cepa K7865 de *B. fusiformis*, facilitadas por el instituto Pasteur de Francia y por Nacional Institute of Agricultural Biotechnology- Seoul, Korea, respectivamente. Las cepas de referencia fueron sometidas a las mismas pruebas y ensayos que las cepas nativas.

Caracterización fenotípica

Las cepas fueron reaisladas en medio NYSN agar (Yousten *et al.*, 1985). Se realizaron análisis citomorfológicos bajo microscopio óptico, empleando las técnicas de coloración de Gram para bacterias libres (Thiery y Frachon, 1997) y de verde de malaquita para esporos bacterianos (Piest *et al.*, 1988). Para una primera caracterización de los aislamientos nativos, se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas, como la capacidad de crecer en medios mínimos, con glucosa, arabinosa, manitol, xilosa o almidón, como únicas fuentes de carbono; crecimiento en gelatina (Britania); capacidad de utilizar caseína, acetoina, tirosina, lecitina (Thiery y Frachon, 1997).

Los aislamientos se cultivaron paralelamente en NYSN agar y en este mismo medio con distintas concentraciones de antibióticos: estreptomycin 100 y 200 µ.ml⁻¹, eritromicina 1 y 2 µ.ml⁻¹, tetraciclina 2 y 5 µ.ml⁻¹, cloranfenicol 8 µ.ml⁻¹; en diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl): 5,7, 10 % p/v y en ácido bórico a concentraciones de 50, 60 y 75 µ.ml⁻¹. La actividad catalasa fue comprobada según Thiery y Frachon (1997).

La capacidad de hidrolizar la urea, fue evaluada mediante el crecimiento de las bacterias en tubos conteniendo 5 ml de medio agar Christensen (Britania Lab) más 5 ml de urea al 40 % p/v. La capacidad de producir hemólisis se ensayó en medio NYSN agar con 5 % sangre ovina estéril (Britania).

Para estudiar la fermentación de 49 sustratos de la familia de los carbohidratos (glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, L-xilosa, D-adonitol, metil- β D-xilopiranosido, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbosa, L-rhamnosa, dulcitol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, metil- α D-Manopiranosido, metil- α D-glucopiranosido, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina con citrato férrico, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa bovina, D-melobiosa, D-sacarosa, D-trehalosa, inulina, D-melezitosa, D-rafinosa, Almidón, xilitol, genitiobiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato potásico, 2- cetogluconato potásico, 5- cetogluconato potásico), fue utilizado el API 50 CH (bioMérieux laboratory) según instrucciones del fabricante. Una vez inoculadas las suspensiones de las cepas nativas y de referencia en el medio CHB/E (bioMérieux) con una turbidez igual al patrón 2 de McFarland equivalente a 6×10^8 UFC/ml, se incubó durante 24 y 48 horas a 30° C. El catabolismo de glúcidos produce ácidos orgánicos que cambian el color del indicador de pH (rojo fenol).

Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico total, a partir de las cepas nativas fue realizada según procedimientos modificados, descritos previamente por Aguilar *et al.*, (2001): colonias de bacterias crecidas en medio Triptona fosfato (TY) agar modificado, o NYSN agar (Yousten *et al.*, 1985), fueron suspendidas en 0.5 ml 1M de NaCl por un período de 15 minutos. Las células fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos, y se realizaron tres lavados consecutivos, resuspendiendo el pellet en 0,5 ml de agua destilada estéril. El último pellet obtenido se usó para preparar el ADN total bacteriano, resuspendiéndolo en 150 μ l de una resina quelante Chelex al 6 %, IntaGene

DNA Purificación Matrix (Bio-Rad), de acuerdo a las instrucciones descritas por el fabricante.

Secuenciación de genes 16S rRNA

Se secuenció una región parcial del gen 16 S rDNA, de 1.3-kilobases, amplificada previamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir del ADN cromosómico de las muestras. Para ello se utilizaron los cebadores específicos para Eubacterias descritos previamente por Lane (1991): 16S rP3 (5'- TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3') y 16S fD1 (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3').

La amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA (rDNA) fue realizada según lo descrito anteriormente por Weisburg *et al.*, (1991). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, 10 µl de buffer 5 X, 0,5 µM de cada oligonucleótido, 200 µM de dntps, 2 mM de MgCl, una unidad de taq polimerasa y 100 ng de ADN total. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo inicial de 95° C durante 5 minutos para desnaturalización de las cadenas, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 minuto, hibridación a 55° C por 1 minuto, extensión a 72° C durante 2 minutos y un ciclo de extensión final a 72° C durante 3 minutos.

Los productos de la amplificación de los genes 16S rDNA de los aislamientos bacterianos, fueron secuenciados por el Servicio de Secuenciación Macrogen, Korea. Los cebadores empleados para obtener las secuencias parciales del gen 16S rRNA de los aislamientos, fueron los mismos que los empleados para la amplificación por PCR.

Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias 16S rRNA disponibles en la base de datos BLAST del Centro Nacional de información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI), como lo describe Altschul *et al.*, (1997).

El alineamiento de las secuencias obtenidas correspondiente al fragmento de 1,3 kb del gen 16S rRNA de los aislamientos locales y de las cepas de referencia *B. sphaericus* SPH88 y *Bacillus fusiformis* (Priest) K7865, fueron realizadas mediante el programa Bioinformático Europeo CLUSTAL V (European Bioinformatics Institute) (Higgins *et al.*, 1992). Se realizó el análisis filogenético, para lo cual, se extrajo del banco de datos GenBank las secuencias de 16S rDNA de las cepas tipo de las especies, *Bacillus sphaericus*, *B. fusiformis*, *B. licheniformis* y de la especie *Alycydobacillus cycloheptaricus* como outgroup (Nakamura, 2000). La distancia genética fue analizada usando un modelo de dos parámetros de Kimura, 1980, el cual también fue empleado para el análisis neighbour-joining. El árbol filogenético fue construido mediante el método Neighbour-Joining (NJ), provisto por el programa PAUP 4.0 (Swofford, 2003).

Análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de genes que codifican toxinas en las cepas nativas

Para la amplificación de los genes que codifican toxinas específicas de *B. sphaericus*, se utilizó la misma extracción de ADN bacteriano realizada en el análisis de la secuencia del gen 16S rDNA. Para la reacción de PCR se tomó como templado 1 µl del sobrenadante de la resina Chelex con el ADN bacteriano (aproximadamente 50 ng) en un volumen final de 20 µl, que incluía 4 µl de buffer 5 X, 1 µM de cada oligonucleótido, 200 µM de dntps, 2,5 mM de MgCl₂, 1,25 U de taq polimerasa. Para detectar el operón de la toxina binaria, fueron empleados los cebadores BSN1/BSN2, BS1/BSN2; y BSN3/BSN4, BS3/BS4 (Tabla 15), correspondientes a los genes *bin B* y *A* respectivamente, diseñados por Otsuki *et al.*, 1997 (Tabla 15). Los cebadores 100.1 y 100.2, se utilizaron para detectar genes *mtx1*. La mezcla de reacción fue sometida a las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo inicial de 94° C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 55° C y 30 segundos a 72° C de desnaturalización, hibridación y extensión respectivamente, y un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72° C. Luego de la primera PCR con los pares de cebadores BSN1/BSN2 y BSN3/BSN4, 1 µl de dicha reacción fue tomado como

templado para la PCR anidada (nested PCR) con oligonucleótidos internos BS1/BSN2 y BS3/BS4 (Tabla 15), bajo las mismas condiciones de la primera PCR. Estos amplifican fragmentos internos de los genes *bin B* y *bin A*, respectivamente. Los mismos se utilizan en el caso que en la primera ronda de PCR, la amplificación no resulte eficiente (es decir, que no se alcance a ver el producto de amplificación) con los cebadores externos.

Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1% TBE buffer teñido con bromuro de etidio, en una concentración final de 0,5 µg/ml.

Tabla 15. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR y PCR anidada para detectar los genes que codifican para proteínas con actividad mosquitocida en *B. sphaericus*. Los Oligonucleótidos BSN1/BSN2 y BSN3/BSN4 fueron usados en la primer PCR para detectar los genes que codifican las proteínas de 51 y 42 kDa respectivamente, los BS1/BS2 y BS3/BS4 en la PCR anidada. Los cebadores 100.1 y 100.2, fueron empleados para amplificar genes *mtx*

| Oligonucleótido | Secuencia 5'-3' | Posición | Gen blanco |
|-----------------|----------------------|-----------|------------|
| BSN1 | CACGGAATGGTTATGGTT | 0640-0658 | 51.4 kDa |
| BSN2 | AGGTGCATTAGGATACGA | 1675-1693 | 51.4 kDa |
| BSN3 | GTACATTGCGTTATGG | 2060-2077 | 41.9 kDa |
| BSN4 | GTATCATAGGTGAACC | 2846-2862 | 41.9 kDa |
| BS1 | GTAGGGCGCTTGACAGTAGG | 0977-0996 | 51.4 kDa |
| BS2 | GGCCTATTTAGCCCCCTTG | 1474-1473 | 51.4 kDa |
| BS3 | GGCATAATGGGTCCGT | 2221-2237 | 41.9 kDa |
| BS4 | GAGCGCGGACCACATGC | 2683-2700 | 41.9 kDa |
| 100.1 | CCAGGGGAATTTCGTC | 1807-1822 | 100 kDa |
| 100.2 | GAGCTACTGTTCTCAC | 2483-2498 | 100 kDa |

Caracterización biológica: Rango de hospedador

Se realizaron bioensayos para conocer el rango de culícidos susceptibles a este patógeno. Las diluciones utilizadas en los bioensayos, se realizaron a partir de las bacterias mantenidas en cultivo durante 10-15 días, en medio AN (agar nutritivo). Las mismas fueron colocadas en tubos de ensayo con 10 ml de Tween (polisorbato de sodio 0,01%) y perlas de vidrio,

agitadas mediante vortex para posibilitar el conteo de las esporas. Las esporas fueron cuantificadas en cámara de Neubauer. Esta solución fue utilizada como solución madre a partir de la cual, mediante el método de diluciones seriadas, se obtuvieron 7 concentraciones diferentes (1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 esporas/ml). Estas concentraciones se emplearon primero para infectar larvas de *C. pipiens* y poder aislar nuevamente el patógeno.

Luego se realizaron ensayos con 6 especies diferentes de mosquitos. También se evaluó el rango hospedador de las cepas de referencia SPH88 y K7865.

El rango de hospedador de los aislamientos nativos y cepas de referencia, fue evaluado sobre larvas de tercer estadio de *C. pipiens* (obtenidas de campo y de colonia), *C. dolosus*, *Culex apicinus* (Philipi), *A. albitarsis*, *O. albifasciatus* y *A. aegypti* (obtenidas de campo y de colonia) según el protocolo estándar del Instituto Pasteur.

Para cada hospedador se realizaron 3 repeticiones en distintos tiempos con 3 réplicas cada uno, y en cada caso se empleó un control en el cual los ejemplares no fueron expuestos al efecto del patógeno. Dependiendo de la especie hospedadora a evaluar, se colocaron de forma independiente entre 10 y 25 larvas de tercer estadio, en recipientes plásticos de 8 cm de diámetro, con 100 ml de agua destilada y 1ml de la concentración del patógeno a evaluar. No fue agregada ninguna fuente de alimento, y los recipientes fueron colocados en cámaras de cría a 25° C. El número de larvas muertas en cada recipiente, fue registrado luego de 24 horas.

Análisis de los datos: fue calculada la concentración letal 50 (CL₅₀) para cada especie de hospedador evaluada, mediante análisis PROBIT (Chi, 1997).

Resultados

Obtención de Cepas nativas de Bacillus

Mediante la observación de los preparados en fresco al microscopio óptico de contraste de fases, se constató la presencia de bacilos. Luego de pasteurizar el extracto larval- bacteriano y crecerlo en Agar Nutritivo, las colonias de bacilos fueron reaisladas en medio NYSN agar, y a partir de estos cultivos, se seleccionaron tres aislamientos, que fueron denominados: C107, C207 y C307.

Caracterización fenotípica

Los análisis citomorfológicos realizados, dieron como resultado una reacción Gram positiva, sin presencia de cuerpo paraesporal en los tres aislamientos; las cepas C107 y C207 resultaron ser células aisladas móviles con esporangio esférico, terminal y deformante de 0,6 por 1,2 a 2,5 μm , y esporos libres esféricos; la cepa C307 presentó células móviles con espora en esporangio cilíndrico, subterminal, no deformante de 0,6 por 2,5 a 3,8 μm y esporos libres también cilíndricos. La morfología de los esporos fue observada mediante la tinción con verde de malaquita.

Los resultados de la caracterización fenotípica de los tres aislamientos nativos y las cepas de referencia SPH88 y K7865, mediante las diferentes reacciones bioquímicas realizadas, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 16. Buen crecimiento (+), Crecimiento nulo (-), poco crecimiento (±).
*concentración antibióticos expresada en µg.ml⁻¹

| Características Bioquímicas y Fisiológicas | <i>Bacillus</i> C107 | <i>Bacillus</i> C207 | <i>B. sphaericus</i> SPH88 | <i>B. fusiformis</i> K7865 | <i>Bacillus</i> C307 |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Crecimiento en | | | | | |
| Glucosa | - | - | - | - | + |
| Arabinosa | - | - | - | - | - |
| Manitol | - | - | - | - | - |
| Xilosa | - | - | - | - | + |
| Almidón | - | - | - | - | + |
| Gelatina | + | + | + | + | + |
| NaCl 5 % | + | + | + | + | + |
| NaCl 7% | ± | + | + | + | + |
| NaCl 10% | - | ± | - | + | - |
| Acido bórico 50 | + | + | + | + | + |
| Acido bórico 60 | + | - | + | - | - |
| Acido bórico 75 | ± | - | ± | - | - |
| *Estreptomicina 100 | + | + | + | + | + |
| *Estreptomicina 200 | + | + | + | + | + |
| *Eritromicina 1 | + | + | + | + | + |
| *Eritromicina 2 | - | + | - | + | ND |
| *Tetraciclina 2 | - | - | - | - | - |
| *Tetraciclina 5 | - | - | - | - | - |
| *Cloranfenicol 8 | + | - | + | - | - |
| Acetoina | - | - | - | - | + |
| Citrato | + | + | + | + | + |
| Tirosina | - | - | - | - | - |
| Lecitinasa | - | - | - | - | + |
| pH en VP | 6< | 6< | 6< | 6< | 6> |
| Reacciones enzimáticas | | | | | |
| Hemólisis | - | + | - | + | + |
| Catalasa | + | + | + | + | + |
| Hidrólisis de la urea | ± | ± | ± | ± | - |

Mediante las pruebas bioquímicas y fisiológicas se pudo determinar que el aislamiento C307 pertenece a la especie *Bacillus licheniformis* (Weigmann), y los aislamientos C107 y C207 a la especie *Bacillus sphaericus*. Sin embargo, algunas características diferenciales entre las dos cepas de *B. sphaericus*, nos llevó a continuar con la caracterización molecular y biológica. La cepa C307, *B. licheniformis* aparentemente es una infección secundaria, no responsable de la mortalidad larval.

Las diferencias fenotípicas que encontramos entre los aislamientos C107 y C207 fueron respecto a la resistencia y/o sensibilidad frente a diferentes antibióticos, tolerancia al ácido bórico y, específicamente en la mayor tolerancia al ClNa y la capacidad de producir hemólisis de la cepa C207 (Tabla16). Las características observadas en la cepa C207, coinciden con las descripciones realizadas por From *et al.*, (2005) y Ahmed *et al.* (2007) para *B. fusiformis*.

En la cepa de referencia de *B. sphaericus* SPH88, se observó una reacción levemente positiva en la hidrólisis de la urea.

Mediante la reacción de fermentación de 49 azúcares de la galería API 50 CH (bioMérieux. Fig. 63) pudimos observar el perfil bioquímico de las cepas nativas de *Bacillus* y de sus cepas de referencia. Tanto las cepas SPH88 y 2362 de *B. sphaericus*, como los aislamientos locales C107 y C207 fueron capaces de degradar glicerol y N-acetilglucosamina, mientras que la cepa K7865 de *B. fusiformis* dio una reacción positiva solamente para la N-acetilglucosamina.

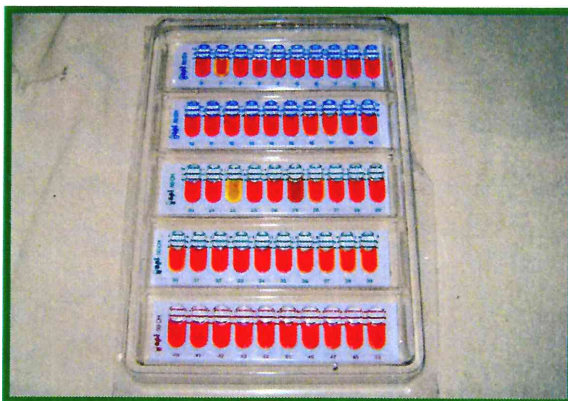


Figura 63. Galería API empleado para evaluar la posibilidad de los aislamientos nativos de fermentar hidratos de carbono.

Análisis de las secuencias del gen 16S rRNA

La comparación de las secuencias de 16S rRNA mediante análisis BLAST (NCBI), obtenidas a partir de ADN de los aislamientos locales C107, C207 y las cepas de referencia de *B. sphaericus* SPH88 y *B. fusiformis* K7865, mostró una similitud del 99% de la cepa C107 con *B. sphaericus*, mientras que la cepa C207, presentó el mismo porcentaje de similitud (99%) con *B. fusiformis*. Las cepas de referencia utilizadas presentaron también máxima similitud (99 %), con sus respectivas especies.

Al mismo tiempo, en la búsqueda BLAST (NCBI) algunas cepas de *B. fusiformis* (*Lysinibacillus fusiformis* X-9) aparecieron con una similitud del 99 % con la cepas SPH88 de *B. sphaericus* y la cepa nativa C107. Por el contrario, algunas cepas de *B. sphaericus* (*Lysinibacillus sphaericus* C3-41) también mostraron una similitud de 99 % con la cepa K7865 de *B. fusiformis* y la cepa nativa C207. Por este motivo se intentó determinar mediante relaciones filogenéticas, la cercanía de nuestros aislamientos con las diferentes especies de *Bacillus*.

En la Figura 64, se observa el árbol Neighbour–Joining (NJ), mostrando las relaciones filogenéticas entre las secuencias de 16S rDNA obtenidas en nuestro laboratorio y las secuencias de las cepas tipo obtenidas del GenBank. Se observa una relación cercana entre las cepas C107 y su cepa de referencia *Bs* SPH88, mientras que el aislamiento C207 se encuentra relacionado con el grupo 1 conformado por las cepas AF169496 y AF169505. La cepa de referencia K7865, se encuentra relacionada con el grupo 2, al cual pertenecen cepas de *B. fusiformis*.

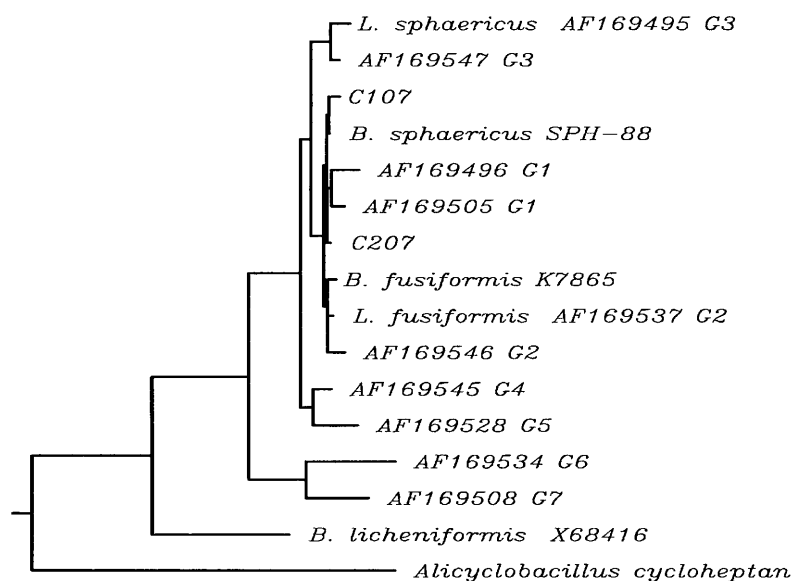


Figura 64. Árbol Neighbour-Joining (NJ) donde se muestra las relaciones filogenéticas, usando las secuencias del 16S rRNA, entre especies similares a *Bacillus sphaericus*: los aislamientos locales C107 y C207; las cepas de referencia SPH-88 y K7865, pertenecientes a *B. sphaericus* y *B. fusiformis*, respectivamente; y cepas pertenecientes a cada grupo de los descritos por Nakamura L.K. 2000. *Alicyclobacillus cycloheptanicus* fue designado como grupo externo (outgroup) para el análisis. Las secuencias nucleotídicas obtenidas del GenBank usadas para el análisis filogenético fueron las siguientes: *Alicyclobacillus cycloheptanicus* 1457 (X51928); DSM-1867 (AF169496); IEBC-S05.110 (AF169505); NRS-350 (AF169537) cepa tipo *B. fusiformis*; NRS-866 (AF169546); DSM-28, cepa tipo *B. sphaericus* (AF169495); NRS-967 (AF169547); NRS- 800(AF169544); NRS-1198 (AF169528); NRS-1694 (AF169534); 22.B.7 (AF169508); *B. licheniformis* (X68416).

Análisis de la presencia de genes que codifican proteínas tóxicas en B. sphaericus

Con el cebador BS1/BS2, el fragmento obtenido fue de 523 pares de bases y el obtenido con BSN1/BSN2 fue de 1053 pares de bases, ambos fragmentos corresponden al gen de la toxina de 51.4 kDa. Los cebadores BS3/BS4 y BSN3/BSN4, amplificaron fragmentos de 478 y 720 pares de bases respectivamente, ambos fragmentos corresponden al gen que codifica la toxina de 41.9 kDa. El par de cebadores 100.1/100.2 son homólogos al gen *mtx*, con un producto de amplificación de 700 pares de bases (Fig. 65 A, B, C, D y E).

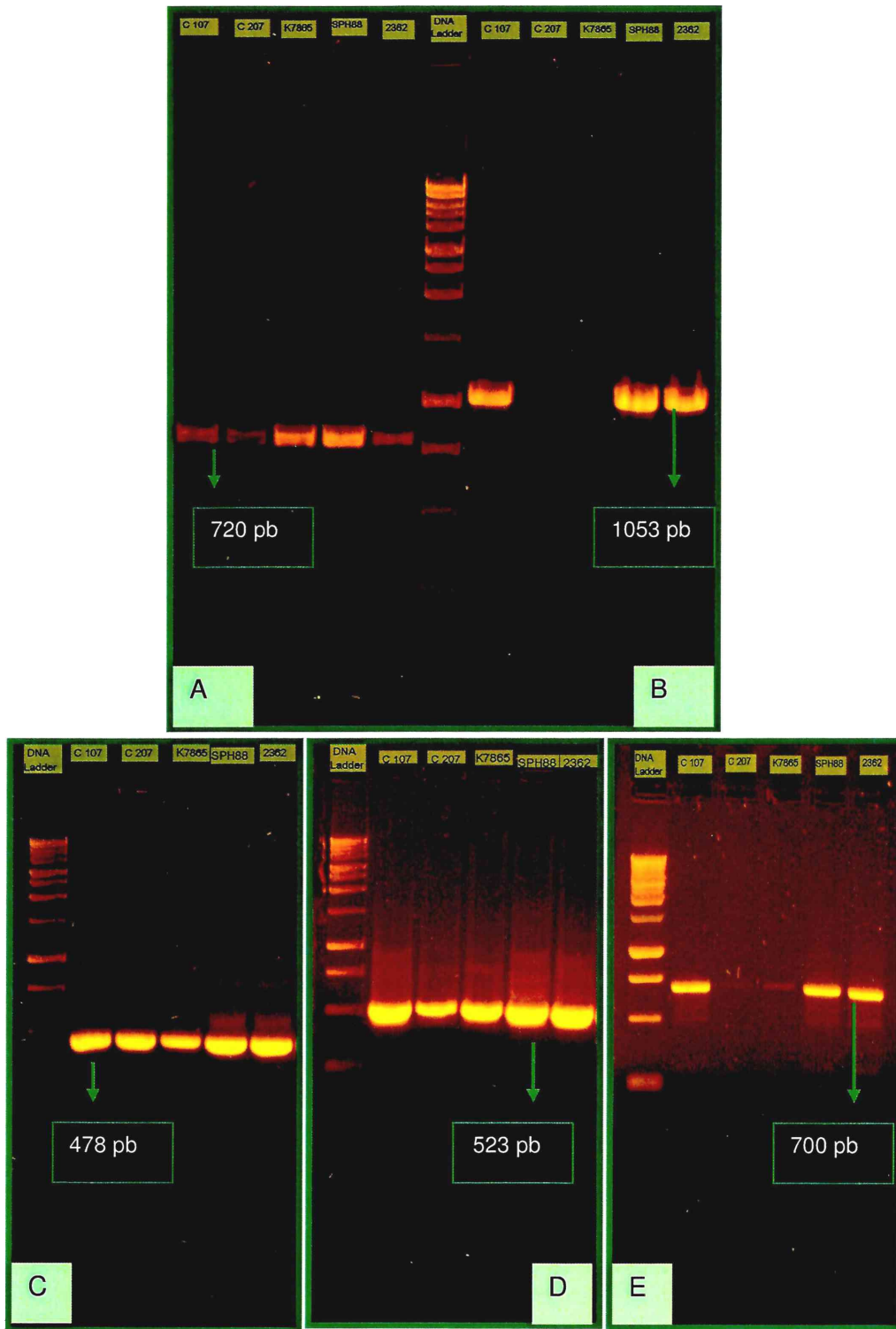


Figura 65. Electroforesis en un gel de agarosa (1%) de productos de amplificación de ácidos nucleicos de diferentes cepas de *Bacillus* como templado. Con los siguientes oligonucleótidos: A) BSN3/BSN4; B) BSN1/BSN2; C) BS3/BS4; D) BS1/BS2; E) 100.1/100.2.

Caracterización biológica de los aislamientos

Mediante ensayos de laboratorio se comprobó la susceptibilidad de *C. pipiens* (obtenidos de campo y colonia), *Cx. apicinus*, *C. dolosus*, *A. albitalarsis*, *O. albifasciatus* y *A. aegypti* (obtenidos de campo y colonia); hacia las cepas C107, C207, SPH88 (*B. sphaericus*) y K7865 (*B. fusiformis*).

Las larvas de *C. pipiens* obtenidas de colonia, fueron más susceptibles a la cepa C107, en la cual se obtuvo una CL_{50} de 4×10^4 esporas/ml, que a la cepa tipo con la que se comparó (SPH88), para la cual la CL_{50} fue de 1×10^6 esporas/ml, mientras que las larvas colectadas en el campo, mostraron ser levemente menos susceptibles a estas cepas, siendo $1,1 \times 10^5$ LC_{50} para C107 y $2,2 \times 10^7$ para SPH88. Las larvas obtenidas de colonia mostraron mayor susceptibilidad al ser expuesta al aislamiento nativo C207 (CL_{50} 1×10^7 esporas/ml), que frente a la cepa de referencia para este cultivo (CL_{50} 1×10^{10} esporas/ml). Las larvas obtenidas del campo resultaron ser menos susceptibles frente a estos aislamientos siendo la CL_{50} 1×10^9 para C207, y $9,9 \times 10^9$ para *B. fusiformis* K7865 (Tabla 17).

Culex apicinus mostró susceptibilidades similares frente a los cultivos nativos y sus cepas de referencias, siendo las CL_{50} para C107 y *B. sphaericus* SPH88, $2,1 \times 10^6$ y $3,1 \times 10^6$ esporas/ml respectivamente. Para el aislamiento C207 y la cepa K7865, tampoco se encontraron diferencias ya que las CL_{50} para ambas estuvieron en el rango de 10^7 esporas/ml (Tabla 17).

Por otra parte, *C. dolosus* presentó mayor mortalidad cuando las larvas fueron tratadas con la cepa de referencia SPH88 obteniéndose una concentración letal dos ordenes de magnitud menor que la obtenida cuando en los recipientes del ensayo se inoculó el aislamiento nativo C107, siendo las CL_{50} $8,2 \times 10^3$ y $2,6 \times 10^5$ esporas/ml respectivamente. Por el contrario, esta especie de mosquito resultó ser menos susceptible al aislamiento C207 y su cepa de referencia K7865, que a los ya mencionados (C107 y SPH88), para ambos la CL_{50} estuvo en el orden de 1×10^8 esporas/ml (Tabla 17).

Aedes aegypti, no mostró susceptibilidad a los aislamientos nativos C107, C207 y a la cepa SPH88, por lo que no fue posible calcular la CL_{50}

para el tercer estadio de esta especie en larvas obtenidas de colonia y campo.

La especie *O. albifasciatus* no presentó diferencias de susceptibilidad frente al aislamiento nativo C107 y su referente SPH88, encontrándose para ambos aislamientos la CL_{50} en el orden de 10^7 esporas/ml. Para el aislamiento nativo C207 la susceptibilidad fue mayor que para su cepa de referencia (CL_{50} $3,4 \times 10^6$ y $2,8 \times 10^9$ esporas/ml respectivamente) (Tabla 17).

Por último, para la especie *A. albitarsis*, las CL_{50} para las cepas SPH88 y K7865, no pudieron ser calculadas para el tercer estadio, por la baja susceptibilidad que presentaron hacia estas cepas. Cuando las larvas de tercer estadio fueron tratadas con los aislamientos nativos C107 y C207, se obtuvieron $6,6 \times 10^7$ y $1,4 \times 10^9$ esporas/ml respectivamente para obtener el 50% de mortalidad larval.

Tabla 17. Análisis de la concentración de cada cepa bacteriana, que es capaz de producir la muerte del 50% de los individuos tratados, mediante el análisis PROBIT.

| Especie de mosquito | Cepa Bacteriana | Intercepto | Pendiente | CL ₅₀ (limites fiduciales) | X ² (gl) | P |
|--------------------------------|-------------------------------|------------|-----------------------------------|--|---------------------|-----------|
| <i>C. pipiens</i> (Colonia) | BC107 | 2,633 | 0,51 ± 2,19 · 10 ⁻² | 4,4x10 ⁴ (1,2x 10 ⁴ -1,4x10 ⁵) | 17,77 (6) | 0,006 |
| | BC207 | 2,82 | 0,31 ± 1,9 · 10 ⁻² | 1,03 x10 ⁷ (2,3x10 ⁵ -1,1x10 ⁸) | 20,87 (5) | 0,001 |
| | <i>B. sphaericus</i> SPH88 | 1,47 | 0,56 ± 2,3 · 10 ⁻² | 1,1 x10 ⁶ (7,5x10 ⁵ -5,4x10 ⁶) | 7,00 (3) | 0,071 |
| | <i>B. fusiformis</i> K7865 | 3,1 | 0,19 ± 1,59 · 10 ⁻² | 1,5x10 ¹⁰ (6,1 x10 ⁸ 1,6x10 ¹⁴) | 12,16(4) | 0,016 |
| <i>Cx. apicinus</i> | BC107 | 2,81 | 0,35 ± 1,6 · 10 ⁻² | 2x1 x10 ⁵ (7,3 x10 ⁵ -7,2x10 ⁶) | 28,36 (4) | 1,054E-05 |
| | BC207 | 2,82 | 0,31 ± 2,3 · 10 ⁻² | 2,4 x10 ¹⁰ (4,8 x10 ⁹ 2,4x10 ¹¹) | 2,4 (2) | 0,301 |
| | <i>B. sphaericus</i> SPH88 | 2,59 | 0,36 ± 3,01 · 10 ⁻² | 3,1x 10 ⁶ (1,9x10 ⁶ -5,4 x10 ⁶) | 0,64 (3) | 0,887 |
| | <i>B. fusiformis</i> K7865 | 2,17 | 0,26 ± 3,7 · 10 ⁻² | 4,3x10 ¹⁰ (3,7 x10 ⁹ 2,3x10 ¹²) | 1,57 (4) | 0,814 |
| <i>C. dolosus</i> | BC107 | 2,56 | 0,45 ± 4,16 · 10 ⁻² | 2,6 x10 ⁵ (1,4 x10 ⁵ -4,6x10 ⁵) | 1,443 (4) | 0,837 |
| | BC207 | 1,97 | 0,37± 3,72 · 10 ⁻² | 1,5 x10 ⁸ (1,0 x10 ⁸ - 2,4x10 ⁸) | 3,55 (5) | 0,615 |
| | <i>B. sphaericus</i> SPH88 | 3,7 | 0,33 ± 2,8 · 10 ⁻² | 8,2 x10 ³ (3,2x10 ³ -1,8x10 ⁴) | 3,58 (6) | 0,733 |
| | <i>B. fusiformis</i> K7865 | 3,46 | 0,19 ± 2,48 · 10 ⁻² | 1,1 x10 ⁸ (4,6 x10 ⁷ - 3,2x10 ⁸) | 1,1 (6) | 0,981 |
| <i>A. aegypti</i> (colonia) | BC107 | NC | NC | NC | NC | NC |
| | BC207 | NC | NC | NC | NC | NC |
| | <i>B. sphaericus</i> SPH88 | NC | NC | NC | NC | NC |
| | <i>B. fusiformis</i> K7865 | NC | NC | NC | NC | NC |
| <i>A. albicans</i> | BC107 | NC | NC | NC | NC | NC |
| | BC207 | 2,03 | 0,32 ± 0,11 | 1,4x10 ⁹ (3,5x10 ⁸ -2,4x10 ¹⁰) | 2,27 (3) | 0,518 |
| | <i>B. sphaericus</i> SPH88 | 1,49 | 0,19 ± 7 · 10 ⁻² | NC | 0,2 (3) | 0,977 |
| | <i>B. fusiformis</i> K7865 | 1,61 | 0,14 ± 8,6 · 10 ⁻² | NC | 0,12 (3) | 0,9893 |
| <i>O. albifasciatus</i> | BC107 | 2,99 | 0,18 ± 2,9 · 10 ⁻² | 7,7 x10 ⁷ (2,1 x10 ⁷ - 2,4x10 ⁹) | 3,32 (5) | 0,651 |
| | BC207 | 2,47 | 0,39 ± 3,33 · 10 ⁻² | 3,4 x10 ⁶ (2,2 x10 ⁵ -5,2 x10 ⁶) | 2,65 (4) | 0,618 |
| | <i>B. sphaericus</i> SPH88 | 1,58 | 0,48 ± 4,43 · 10 ⁻² | 1,07 x10 ⁷ (4,8x10 ⁶ -2,5 x10 ⁷) | 3,3 (4) | 0,509 |
| | <i>B. fusiformis</i> K7865 | 2,55 | 0,26 ± 3,5 · 10 ⁻² | 2,8 x10 ⁹ (6,0x10 ⁸ -2,8x10 ¹⁰) | 3,87 (5) | 0,568 |
| <i>A. aegypti</i> campo | BC107 | NC | NC | NC | NC | NC |
| | BC207 | NC | NC | NC | NC | NC |
| | <i>B. sphaericus</i> SPH88 | NC | NC | NC | NC | NC |
| | <i>B. fusiformis</i> K7865 | NC | NC | NC | NC | NC |
| <i>C. pipiens</i> campo | BC107 | 2,69 | 0,45 ± 3,5 · 10 ⁻² | 1,12x10 ⁵ (4,5 x10 ⁴ -2,7 x10 ⁵) | 5,97(5) | 0,309 |
| | BC207 | 2,35 | 0,29 ± 4,1 · 10 ⁻² | 1,10 ⁹ (4,1 x10 ⁸ -3,7x10 ⁹) | 0,79 (4) | 0,939 |
| | <i>B. sphaericus</i> SPH88 | 3,3 | 0,41 ± 3,1 · 10 ⁻² | 1,2x10 ⁵ (6,9 x10 ⁴ -2x10 ⁵) | 2,24 (6) | 0,896 |
| | <i>B. fusiformis</i> K7865 | 2,28 | 0,7 ± 4 · 10 ⁻² | 9,1x10 ⁹ (1,4 x10 ⁹ 32x10 ¹¹) | 1,63 (4) | 0,803 |

Discusión

Bacillus sphaericus es uno de los grupos más heterogéneos del género *Bacillus*, como fue demostrado por Vandamme *et al.*, (1996); Miteva *et al.*, (1999) y Nakamura (2000). Son varias las características que definen a este grupo, como la producción de la toxina binaria formada por proteínas de 41,9 y 51,4 kDa que le confiere actividad mosquitocida, la habilidad de fermentar hidratos de carbono y la capacidad de formar esporas que persisten en el ambiente. La actividad mosquitocida y la persistencia de las esporas por períodos prolongados en el ambiente, la convierten en una especie apta para introducir como controlador biológico en sitios naturales de cría de culícidos (Mulligan *et al.*, 1980; Davidson *et al.*, 1984; Mulla *et al.*, 1984 a; Karch *et al.*, 1988; Arredondo-Jimenez *et al.*, 1990; Siegel *et al.*, 2001).

Los aislamientos identificados en este estudio, fueron hallados en ambientes donde habitualmente se desarrollan los estados inmaduros de *C. pipiens*. Diferentes aislamientos de *B. sphaericus* con buena capacidad mosquitocida han sido encontrados en diversos ambientes de cría de culícidos, como zanjas, ambientes salinos, huecos de árbol, charcos, recipientes artificiales y humedales (Park *et al.*, 2008). Varios de estos aislamientos y formulados han sido utilizados en ambientes naturales, contra un gran número de especies de mosquitos y sus resultados han sido publicados como exitosos. Entre los ejemplos de aplicaciones exitosas desde el punto de vista del control, podemos mencionar la inoculación en ambientes artificiales contra *C. pipiens* (Berry *et al.*, 1987); en cubiertas en desuso para el control de *O. triseriatus* (Siegel *et al.*, 1999); en ambientes de inundación contra *Psorophora columbiae* (Dyar y Knab) y en recipientes artificiales contra *Culex restuans* (Theobald) y *C. pipiens* (Siegel y Novak, 1997).

Experimentos de laboratorio y ensayos a campo contra diferentes especies de invertebrados confirman la especificidad de *B. sphaericus* para larvas de mosquitos, descartando la existencia de riesgo para vertebrados, como peces, pájaros y mamíferos (Shaddock *et al.*, 1980, Saik *et al.*, 1990; Walton y Mulla, 1991; Lacey y Merrit, 2003), como también para invertebrados “no blanco” como la mayoría de los mosquitos depredadores,

quironómidos y otras especies de Nematocera (Yousten *et al.*, 1991, 1992; Lacey and Merrit, 2003; Brown *et al.*, 2004). La desventaja para el control de mosquitos es que la toxina puede ser destruida al pasar por el tracto digestivo de organismos no blanco, pudiendo eliminarla de este modo del ecosistema si no encontrase a un hospedador adecuado (Alves, 1998).

Los resultados de este trabajo mostraron que las cepas C107 y C207, presentan buena capacidad para controlar estados inmaduros de mosquitos. En particular la cepa C107, resultó tóxica para todas las especies del género *Culex* evaluadas. Sin embargo, *C. pipiens* fue la especie más susceptible, lo cual no resulta sorprendente teniendo en cuenta que el aislamiento fue obtenido de larvas de esta especie. Por otra parte, el origen de este aislamiento nos permitiría explicar la mayor susceptibilidad de este culicido a C107 que a la cepa de referencia SPH88. La susceptibilidad de larvas de *C. pipiens* obtenidas a partir de la colonia fue mayor respecto de las larvas de esta especie colectadas en el campo. Este resultado puede relacionarse con las condiciones controladas bajo la cual son mantenidos los hospedadores en las colonias. Resultados similares a los encontrados para la cepa C107, fueron publicados por Wraight *et al.* (1987) con las cepas 1593, SSII-1 y 2013-4 de *B. sphaericus* contra distintas especies del género *Culex*, incluyendo a *C. pipiens*.

La cepa C207, mostró menor toxicidad que la cepa C107 para las especies del género *Culex*, siendo *O. albifasciatus* la especie más susceptible a este aislamiento. Para *O. albifasciatus*, la CL_{50} de C207 fue de $3,4 \times 10^6$ esporas/ml, similar a las obtenidas por Wraight *et al.* (1987) para otras especies de este género tratadas con las cepas SSII-1 y 1593 de *B. sphaericus*. A su vez, esta misma especie, presentó una CL_{50} de $7,7 \times 10^7$ esporas/ml para la cepa C107. Aislamientos de *B. sphaericus* hallados en Florida fueron tóxicos para *Ochlerotatus taeniorynchus* (Wiedemann) (Park *et al.*, 2008) aunque por otra parte, *B. sphaericus* fue citado como una especie no tóxica para el género *Ochlerotatus* (Federici *et al.* 2003, 2006, 2007).

Las concentraciones letales para *A. aegypti*, utilizando los aislamientos nativos (C107 y C207) y las cepas de referencias, no pudieron ser calculadas, por la baja mortalidad que se registró en el tercer estadio de esta

especie cuando fueron utilizadas concentraciones inferiores a 1×10^{10} esporas/ml. Estos resultados se contraponen a los obtenidos para otras cepas de *B. sphaericus* en donde se registraron CL_{50} para *A. aegypti* entre $1,6 \times 10^5$ y 1×10^6 esporas/ml, (Wraight *et al.*, 1987).

Federici *et al.* (2003, 2006, 2007), refieren a *B. sphaericus* como una especie tóxica contra *Anopheles*, pero nuestros aislamientos mostraron una toxicidad baja para *A. albipennis*, ya que las concentraciones letales medias para dicha especie de mosquito, fueron de $6,6 \times 10^7$ para C107 y $1,4 \times 10^9$ para C207.

La cepa C307 no presentó actividad mosquitocida. Esta cepa mostró una similitud del 99% con *B. licheniformis*, que es una especie de bacterias encontradas comúnmente en suelo, saprofítica y patógeno oportunista. *Bacillus licheniformis* se ha utilizado en la industria de la fermentación para la producción de proteasas, amilasas, antibióticos y productos químicos especiales. Sin embargo, la manipulación de esta especie, debe realizarse cuidadosamente, ya que puede ser perjudicial para el hombre y otros vertebrados (Ghaly *et al.*, 2007). Consideramos que el hallazgo de esta especie en nuestro estudio, se debe a una infección secundaria de las larvas de *C. pipiens*, puesto que el ambiente en el que se produjo la infección es propicio para la supervivencia de esta bacteria.

Ha sido demostrado que la alta toxicidad de cepas de *B. sphaericus* contra estados inmaduros de mosquitos, se debe a la expresión de un par de proteínas de 41,9 y 51,4 kDa que componen la toxina binaria. Esta toxina es codificada por los genes *bin A* y *bin B*, los cuales están distribuidos mayormente entre las cepas de alta toxicidad, y expresada predominantemente al inicio de la esporulación (Broadwell y Baumann, 1986; Thanabalu *et al.*, 1992). Ambos fragmentos de la toxina, son necesarios para producir la muerte de las larvas de mosquitos (Broadwell *et al.*, 1990; Davinson, 1990). Otra toxina de 100 kDa, denominada MTX, se encuentra indistintamente en cepas de *B. sphaericus* de baja y alta toxicidad, pero el gen *mtx* que la codifica, fue aislado y clonado por Thanabalu *et al.* (1992) a partir de una cepa de baja toxicidad. Según Thanabalu *et al.* (1991), la presencia de los genes *mtx*, no le confiere a las cepas toxicidad contra las larvas de mosquitos. Por lo tanto, la baja toxicidad en determinadas cepas,

puede deberse a la baja expresión o la poca estabilidad de las toxinas binarias durante la esporulación. La presencia de los genes que codifican la toxina binaria y la MTX, fue comprobada en las cepas nativas C107 y C207, y resultaron similares a los observados en las cepas de referencia utilizadas en este estudio (*B.s.* 2362 y SPH88). Las cepas producen mortalidad en las larvas de las diferentes especies de mosquitos evaluadas, lo que significa que las proteínas tóxicas se expresan y presentan actividad mosquitocida. Debido a la presencia y actividad de las toxinas, deberían realizarse estudios que permitan explicar las diferentes susceptibilidades de las especies y por lo tanto el rango de hospedador de los aislamientos nativos.

Una característica que es utilizada en la descripción clásica de la especie *B. sphaericus*, es la incapacidad de utilizar azúcares (como pentosas y hexosas) como única fuente de carbono, debido a la ausencia de genes *pgi* que codifican enzimas capaces de degradarlos y transportarlos (Hu *et al.* 2008). Por el contrario, es conocida la capacidad de esta especie de metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos y aminoácidos (Russell *et al.*, 1989; Berry *et al.*, 1991; Charles 1996). Por otra parte, en algunas cepas de *B. sphaericus* (como la cepa 2362 y C3-41), se observó, la capacidad de metabolizar N-acetilglucosamina y acetato. Esta capacidad fue identificada por diferentes investigadores, quienes comprobaron la presencia de transportadores de glucosa, actividad 6- fosfofructoquinasa, operones responsables del transporte de estos compuestos en el genoma y otras enzimas que intervienen en su metabolismo (Logan y Berkley, 1984; Ingle *et al.*, 2006; Hu *et al.* 2008); lo que llevó a una revisión de este carácter como valor sistemático. Los resultados obtenidos de la caracterización del perfil bioquímico, mediante la fermentación de diferentes azúcares de la galería API (test de Biomerieux), indican que los aislamientos locales C107 y C207, al igual que la cepa de referencia usada en este caso, *B. s.* 2362, presentan la capacidad para fermentar N-acetilglucosamina y glicerol. Este resultado sugiere que no solo existiría una variabilidad entre las cepas de *B. sphaericus* en cuanto a la toxicidad como fue observado previamente en otros estudios (Broadwell *et al.*, 1990; Davinson, 1990; Thanabalu *et al.*, 1992), si no también en cuanto a otras actividades metabólicas importantes para la supervivencia bacteriana en el ambiente.

El resultado levemente positivo para la reacción de hidrólisis de la urea en la cepa SPH88 de *B. sphaericus* no era esperable. Sin embargo Hu *et al.* (2008) reportaron la localización de genes que codifican para la ureasa estructural, proteínas accesorias y transportadores ABC en el genoma de *B. sphaericus* C3-41.

El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, es un método eficaz para la identificación y la ubicación filogenética. Su utilidad se ha vuelto evidente debido al gran número de secuencias disponibles en el Genbank (Wose, 1987; Ludwig *et al.*, 1998 b), pero a pesar de ello, algunos investigadores en el tema, como Fox *et al.* (1992) y, Stackebrandt y Goebel (1994) mencionan que dicho método no resulta sensible para diferenciar especies muy cercanas, y que si la similitud de la secuencia de los 16S rRNA entre cepas, es superior al 97%, deben utilizarse relaciones de ADN para determinar a cuál de las especies pertenece la cepa. En nuestros resultados, el empleo del método BLAST no fue suficiente para diferenciar especies cercanas, por lo cual fue necesario realizar el alineamiento de las secuencias mediante el programa CLUSTAL V y evaluar la distancia genética de dichas secuencias según Nakamura (2000), para poder establecer con qué especie de *Bacillus* están más relacionados los aislamientos nativos C107 y C207.

El estudio de la secuencia del gen 16S rRNA realizado por Nakamura (2000) muestra que *B. sphaericus sensu lato* es un taxón heterogéneo y en ese estudio se divide a las cepas de *B. sphaericus* y *B. fusiformis* en siete grupos. El grupo 1 corresponde a cepas con actividad mosquitocida, el grupo 2 a *B. fusiformis*, el 3 representa a *B. sphaericus sensu stricto* y los grupos 4, 5, 6 y 7 representan nuevos taxones. Este autor sostiene que la división entre los grupos 1 y 2, no ha podido ser estadísticamente sustentada, y que debido a sus características bioquímicas, morfológicas y genéticas, las cepas de estos grupos (1 y 2), son parte de un mismo grupo, o de una misma especie. Siguiendo los postulados de Nakamura (2000), conjuntamente con la altas similitudes encontradas mediante la búsqueda en BLAST, las pruebas bioquímicas y el estudio de rango hospedador, podemos concluir que el aislamiento C107, estaría genéticamente relacionado con la cepa de referencia SPH88 de *B. sphaericus* y el aislamiento C207 estaría relacionado genéticamente con *B. fusiformis*.

Para establecer con certeza si el aislamiento C207 es una cepa de la especie *B. fusiformis*, deberían realizarse otros estudios, incluyendo los perfiles de ácidos grasos que componen la pared bacteriana.,

En base a las controversias existentes respecto de la ubicación taxonómica de este grupo, recientemente, Ahmed *et al.* (2007) mediante un estudio basado en características bioquímicas y genéticas, proponen la incorporación de *B. sphaericus* y *B. fusiformis*, en un nuevo género (*Lysinibacillus*).

La naturaleza presenta una amplia gama de organismos con actividad pesticida, siendo una fuente estratégica para la obtención de nuevos y eficaces enemigos naturales con capacidad para controlar poblaciones de insectos vectores. Las cepas identificadas en este trabajo, representan aislamientos nativos, que si bien no presentaron mayor toxicidad respecto de las cepas de *B. sphaericus* estudiadas hasta el presente, ponen de manifiesto la posibilidad de emplear aislamientos autóctonos, contra mosquitos en ambientes naturales, resaltando la importancia y necesidad de estos estudios.

La alta toxicidad hallada en algunas cepas de *B. sphaericus* como en la 2362 (Weiser, 1984) y la IAB59 (de Barjac *et al.*, 1988) ha llevado a la comercialización de las mismas, para su empleo contra mosquitos. Sin embargo, debido a la variabilidad que presentan los diferentes aislamientos, y al mecanismo específico de las toxinas binarias, imprescindible para el control duradero y eficaz de larvas de mosquitos, es que resulta importante el hallazgo y estudio de nuevas cepas nativas de *B. sphaericus*, así como también el estudio y la descripción de nuevas toxinas que puedan influir en la actividad mosquitocida.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN GENERALES

El control biológico se define como la reducción poblacional de especies plagas mediante la acción de un agente biológico. El agente de control biológico, puede ser depredador, patógeno, parásito, competidor, microorganismo o toxinas producidas por estos últimos.

Como fue mencionado en la introducción de este trabajo, el control biológico tiene la ventaja de actuar de manera específica sobre el organismo blanco, provocar baja o nula perturbación en el ambiente y ofrecer un control a largo plazo, mientras que el control convencional realizado con insecticidas químicos de amplio espectro no son específicos y actúan también sobre fauna no blanco.

Los primeros métodos empleados para el control de mosquitos se basaban en la remoción a gran escala, o en la modificación de los sitios de cría naturales, y el tratamiento de los restantes hábitat larvales con aceites o toxinas inorgánicas. Recién en los años '50, toma importancia el control biológico, cuando el pez larvívoro *G. affinis*, fue introducido en varios países para el control de larvas de mosquitos. El interés en el empleo de controladores biológicos para mosquitos creció aun más en la década del '60, cuando se vio que los insectos vectores desarrollaban resistencia a los insecticidas convencionales, momento en el cual comenzó a emplearse el nematodo *R. culicivora* y varios protozoos para el control de larvas. Posteriormente en la década del '70 fue descubierta la bacteria *Bti*, microorganismo ampliamente usado cuyas propiedades como agente de control siguen aun siendo ampliamente estudiadas (Woodring y Davidson, 1996).

Para lograr un control biológico exitoso debe conocerse previamente la ecología del vector y del agente de control. Las poblaciones de mosquitos, se caracterizan por tener explosiones demográficas como también por declinar rápidamente, y los adultos se desplazan de manera constante colonizando nuevos ambientes. Los hábitat en los que crían, abarcan un amplio rango que va desde ambientes temporarios hasta permanentes y de artificiales a completamente naturales, como fueron descritos en este estudio. En cada tipo de ambiente, predominan diferentes factores que

causan mortalidad de los estados inmaduros de mosquitos, además de los físicos y químicos. Los enemigos naturales, representan uno de los factores de mortalidad que pueden afectar a los mosquitos, usualmente en el estado larval y, debido a las características tan variadas que presentan las distintas especies de culícidos, en cuanto a los sitios de cría, al comportamiento de alimentación y a su fisiología en general, proporcionan un desafío al momento de seleccionar al agente de control adecuado. Por ejemplo, es probable que un mismo agente biológico no pueda ser empleado en el control de *C. pipiens*, que vive en aguas poluidas como la de los desagües domiciliarios, y a la vez ser un eficaz controlador de *A. aegypti* que cría en contenedores artificiales donde se acumula agua potable para consumo humano. Mediante los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que el pez larvívoro *C. decemmaculatus* es un agente de control adecuado para poblaciones naturales de *C. pipiens* por tratarse de una especie que habita naturalmente esos cuerpos de aguas poluidas, lugares complejos para la aplicación de otros métodos de control biológico. La introducción de este agente conjuntamente con la limpieza y el apropiado drenaje de los desagües sería sumamente eficaz para la reducción poblacional de *C. pipiens*. Por otra parte, dentro de las bacterias entomopatógenas identificadas en este estudio, el asilamiento C107, correspondiente a *B. sphaericus*, podría ser considerado como candidato para el control de estados inmaduros de *C. pipiens*, en el contexto de un plan de manejo integrado de este insecto vector posterior a una evaluación de este agente en condiciones de campo.

Girardia anceps, *D. uruguayensis* y *A. robustus*, resultaron candidatos interesantes para el control de poblaciones naturales de *A. aegypti* y *C. pipiens* en contenedores artificiales, debido a su capacidad para tolerar las condiciones extremas que este tipo de ambientes presentan. La capacidad de *G. anceps* para controlar estados inmaduros de mosquitos en recipientes artificiales quedaron demostradas en el capítulo III, y sumadas la facilidad de producirla masivamente en el laboratorio, es considerada como el agente de control más apropiado en aquellos sitios donde el control cultural no pueda ser aplicado, como recipientes de gran volumen usados para almacenar

agua para consumo humano y donde la tasa de recambio de la misma es baja.

Debido a lo expuesto, podemos decir que no existe un único agente de control que pueda ser aplicado para cualquier especie de mosquito, ni para cualquier tipo de ambiente, y que el agente seleccionado, debe ser integrado en un programa de control más amplio, ya que no hay un enemigo natural que reúna todas las cualidades esperadas, como reproducirse en el ambiente de manera eficaz, adaptarse a una amplia diversidad de hábitat y ser capaz de colonizarlos, ser activo en la búsqueda de los vectores y sobrevivir a la ausencia de los mosquitos.

A lo largo de este estudio, se ha demostrado que el empleo de enemigos naturales en momentos y lugares adecuados, proporciona una buena alternativa para el control de insectos vectores, que resulta segura para el medio y eficaz en el mediano y largo plazo. Para concluir, debemos resaltar la importancia de futuros estudios, profundizando el conocimiento acerca de los enemigos naturales conocidos, como también la búsqueda de nuevos candidatos, sobre todo patógenos y parásitos. La naturaleza ofrece una amplia gama de posibles agentes para el control biológico de *C. pipiens* y *A. aegypti*, quedando de esta manera a nuestro alcance, la posibilidad de evitar la propagación de enfermedades transmitidas por estos culícidos. Este logro podrá alcanzarse, si se aumenta el esfuerzo en la investigación sobre estos organismos para emplearlos adecuadamente. El avance de todos estos estudios, nos permitirá obtener como resultado, un control duradero y eficaz de insectos vectores de enfermedades.

| |
|-----------------------------|
| PERSPECTIVAS FUTURAS |
|-----------------------------|

> Liberación a pequeña escala de las especies *A. robustus* y *D. uruguayensis*, para evaluar el efecto sobre poblaciones naturales de mosquitos y, determinar la utilidad de estos depredadores como integrantes de un programa de control integrado de especies de mosquitos vectores, que crían en recipientes artificiales, en nuestra región.

> La producción a gran escala y liberación de *G. anceps*, especie que puede ser utilizada como controladora de *A. aegypti* en contenedores artificiales en cementerios y gomerías.

> Evaluar el impacto de *C. decemmaculatus* sobre la fauna no-blanco (vertebrados e invertebrados). Determinar las fluctuaciones de la densidad poblacional de este pez larvívoro, a lo largo del tiempo, una vez introducido en los ambientes de cría de los culícidos. Conocer las interacciones interespecíficas e intraespecíficas que influyan en la dinámica poblacional de este depredador.

> Profundizar conocimientos de la respuesta inmune en larvas de *C. pipiens* ante la presencia de diferentes bacterias, incluyendo las α -protobacterias como *Aquaspirillum* sp, para determinar si esta respuesta es generalizada o específica para los determinados grupos bacterianos.

> Evaluar diferentes formas de esterilización externa de larvas vivas para obtener infecciones con *Aquaspirillum* sp. en laboratorio.

> Evaluar los efectos de concentraciones subletales de los aislamientos nativos C107 y C207, sobre la capacidad vectorial y longevidad de *A. aegypti*. Continuar los estudios para determinar a que especie pertenece el aislamiento C207.

> Obtener mayor cantidad de aislamientos locales, con el fin de detectar cepas nativas con alta capacidad patogénica sobre especies de mosquitos.

REFERENCIAS

- Achinelly, M.F. y Garcia, J.J. 2003. Efecto de la temperatura sobre la longevidad e infección con preparásitos del nematodo *Strelkovimermis spiculatus* (Nemata: Mermithidae), parásito de mosquitos culícidos. Rev. biol. Trop. 51, (3-4): 753-757.
- Achinelly, M.F., Micieli, M.V. & García, J.J. 2004 a. Pre-parasitic juveniles of *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino. 1986 (Nematoda: Mermithidae) predated upon by freshwater copepods (Crustacea: Copepoda). Nematology 5: 885-888.
- Achinelly, M.F., Micieli, M.V., Marti, G.A. y García, J.J. 2004 b. Suceptibility of neotropical mosquito larvae (Diptera: Culicidae) and non-target aquatic organisms to the entomoparasitic nematode *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae). Nematology 6: 299-302.
- Adams, M.J., Pearl, C.A., Bury, R.B. 2003. Indirect facilitation of an anuran invasion by non-native fishes. Ecology Ltrs. 6: 343-351.
- Aguilar, M.O., López, M.V., Ricillo, P.M. 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in North-west Argentina as a source of more efficient inoculant strains. J. Biotechnol 91: 181-188.
- Ahmed, S.S., Lindem, A.L., Cech J.J, Jr. 1988. A rating system and annotated bibliography for the selection of appropriate, indigenous fish species for mosquito and weed control. Bull. Soc. Vector. Ecol. 13: 1-59.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T., 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. Int. J. Syst and Evol. Micr. 57: 1117-1125.
- Albicócco, A.P., Vezzani, D. 2009. Further study on *Ascogregarina culicis* in temperate Argentina: Prevalence and intensity in *Aedes aegypti* larvae and pupae. J Invert. Pathol. 101 (3): 210-214.
- Altschul, S.F., Madden. T.L., Schäffer. A.A., Zhang. J., Zhang. Z., Miller. W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation

- of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402.
- Alves, S.B. 1998. Controle microbiano de insetos. FEALQ, Piracicaba, Brasil.
- Andreadis, G.T. 2007. Microsporidian parasites of mosquitoes. En: *Biorational control of mosquitoes*. Floore, T.G. (Ed.), 7: 3-28. Am. Mosq. Control Assoc., Inc.
- Andreadis, T.G. & Gere, M.A. 1992. Laboratory evaluation of *Acanthocyclops vernalis* (Thomasi) (Copepoda: Cyclopoidae) as predators of *Aedes canadiensis* and *Aedes stimulans* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 29: 974-979.
- Arredondo-Jimenez, J.I., López, T., Rodríguez, M.H., Brown, D.N. 1990. Small scale field trials of *Bacillus sphaericus* (Strain 2362) against anopheline and culicine mosquito larvae in southern Mexico. *J. Am Mosq. Control Assoc.* 6: 300-305.
- Ayala, J., Rader, R., Belk, M. 2007. Ground-truthing the impact of invasive species: spatio-temporal overlap between native least chub and introduced western mosquitofish. *Biol. Invasions* 9:857–869
- Barcat, J.A., Isidoro, R., Alume, H.S. 1999. *Dirofilariasis pulmonar*. *Medicina (Buenos Aires)* 59:218.
- Bay, E.C. 1985. Other larvivorous fishes. En: Chapman, H. (ed.) *Biological Control of mosquitoes*, Bull. No. 6, Am. Mosq. Ctorl Assoc., California, p. 18-24.
- Becnel, J.J. & Andreadis, G.T. 1999. Microsporidia in insect. En: *The microsporidia and microsporidiosis*. Wittner y Weiss (eds.), pp. 447-501. Asm. Press, Whashington.
- Becnel, J.J. & Floore, T.G. 2007. *Biorational Control of Mosquitoes*. P.1-2. Floore, T.G. (Ed). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23 (2) Bull. No 7.
- Becnel, J.J. & White, S.E. 2007. Mosquito pathogenic viruses-The last 20 years. P.36-49. En: *Biorational Control of Mosquitoes*. Floore, T.G. (Ed). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23 (2) Bull. No 7.
- Benenson, A.S. 1995. *Control of communicable diseases manual*, 16 th. Am. Public Health Assoc.

- Bentley, M.D. & Day, J.F. 1989. Chemical ecology and behavioural aspects of mosquito oviposition. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 401 – 421.
- Berry, W.J., Novak, M.G., Khounlo, S., Rowley, W.A., Melchoir, G.L. 1987. Efficacy of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* for control of *Culex pipiens* and floodwater *Aedes* larvae in Iowa. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3: 579-582.
- Berry, C. & Hindley, J., Oei, C. 1991. The *Bacillus sphaericus* toxins and their potential for biotechnological development. En: Maramorosch, K. (Ed.). *Biotechnology for Biological Control of Pests and Vectors*. Boca Raton, FL: CRC Press. P 35-51.
- Binckley, C.A. & Resetarits, W.J. 2003. Functional equivalence of non-lethal effects: generalized fish avoidance determines distribution of grey treefrog, *Hylachryoscelis*, larvae. *Oikos* 102: 623 – 629.
- Blaustein, I. & Dumont, H., 1990. Typhloplanid flatworms: mechanisms of predation and evidence that they structure aquatic invertebrate communities. *Hydrobiologia* 198: 61-77.
- Blaustein, L., Kiflawi, M., Eitman, A., Mangel, M. y Cohen, J.E. 2004. Oviposition habitat selection in response to risk of predation in temporary pools: mode of detection and consistency across experimental venue. *Oecologia* 138: 300 – 305 .
- Brendonck, L., Michels, E., De Mester, L., 2002. Temporary pools are not «enemy-free». *Hydrobiologia* 486: 147-159.
- Brodwell, A.H. & Baumann, P. 1986. Sporulation-associated activation of *Bacillus sphaericus* larvicide. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (4): 758-764.
- Brodwell, A.H., Baumann L., Baumann, P. 1990. The 42- and 51-kilodalton mosquitocidal proteins of *Bacillus sphaericus* 2362: construction of recombinants with enhanced expression and in vivo studies of processing and toxicity. *J. Bacteriol.* 172(5): 2217-23.
- Brown, M.D., Kay, B.H., Hendrikz, J.K. 1991. Evaluation of Australian *Mesocyclops* (Cyclopoidea: Cyclopoidae) for mosquito control. *J. Med. Entomol.* 28: 618-623.

- Brown, M.D., Watson, T.M., Caeter, J., Purdie, D.M., Kay, B.H. 2004. Toxicity of VectoLex (*Bacillus sphaericus*) products to select Australian mosquito and non-target species. J. Econ. Entomol. 97: 51-58.
- Bucher, G.E. 1963a. Transmisión of bacterial pathogens by the ovipositor of hymenopterous parasite. J. Insect Pathol. 5: 227-283.
- Caballer, B., Pérez, N., Elsner, B., Esteva, H. y Eyheremendi, E. 1994. Dirofilariasis pulmonar: presentación de dos casos. Rev. Arg. de cirugía 67: 172-174.
- Cabral, J.A., Avila, S., Meques, J.C. 1999. Acute and sublethal effects of a non-ionic surfactante, *Genpol OXD-080*, on mosquitofish *Gambusia holbrooki* (Girard). Ecotoxicology 8: 245-252.
- Callahan, J.L. & Morris, C.D., 1989. Production and maintenance of large numbers of *Dugesia tigrina* (Turbellaria: Tricladida) for the control of mosquitoes in the field. J. Am. Mosq. Control Assoc. 5: 10-14.
- Camino, N.B. & Reboredo G.R. 1994. Biología de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae) parásito de mosquitos (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Neotrópica 40: 45-48.
- Camino, N.B. & Reboredo G.R. 1996. Producción de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino, 1986 (Nematoda: Mermithidae). Neotrópica 42: 47-50.
- Camino, N.B. & Reboredo G.R. 2000. Efecto de la temperatura en la infección de tres especies de culicidae (Diptera) por *Strelkovimermis spiculatus* (Nematodo: Mermithidae). Iheringia, série zoología 88:3-6.
- Campos, R.E., Maciá, A., García, J.J. 1993. Fluctuaciones estacionales de culícidos (Diptera) y sus enemigos naturales en zonas urbanas de los alrededores de La Plata, Provincia de Buenos Aires. Neotrópica 39: 55-56.
- Campos, R.E. & Sy, V. 2003. Mortality in immature of the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and effects of parasitism by *Strelkovimermis spiculatus* (Nematodo: Mermithidae) in Buenos Aires province, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (2): 199-208.

- Campos, R.E., Fernández, L.A., Sy, V.E. 2004. Associated Insects and Predators of the Floodwater Mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae). *Hydrobiología* 524 (1): 91-102.
- Cato, E.P., George, W.L., Finegold, S.M. 1986. Genus *Clostridium* (Prazmowski 1880). En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath, P.H.A. (Ed.), vol. 2, pp. 1141-1200. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Cavalier-Smith, T. 2000b. What are fungi?. En: *The Mycota*, vol VII. Parte A. (Ed. McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.J. y Lemke, P.), pp 3-37. Berlin: Springer.
- Chandra, G., Bhattacharjee, I., Chatterjee, S.N. y Ghosh, A. 2008. Mosquito control by larvivorous fish. *Indian J. Med. Res.* 127: 13-27
- Chapman, H.C. 1974. Biological control of mosquito larvae. *Ann. Rev. Entomol.* 19: 33-59.
- Chapman, H.C. 1985. Biological control of Mosquitoes. En: Chapman, H. (ed.) *Biological Control of mosquitoes*, Bull. No. 6, Am. Mosq. Control Assoc., California.
- Charles, J-F., Nielsen-LeRoux, C., Delécluse, A. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 451-472.
- Charles, J-F., Silva-Filha, M. H., Nielsen-Le Roux, C., Humphryes, C.M.J., Berry, C. 1997. Binding of the 51 and 42 KDa individual components from the *Bacillus sphaericus* crystal toxin to mosquito larval midgut membranes from *Culex* and *Anopheles* sp. (Diptera: Culicidae). *FEMS microbiol. Ltr.* 156: 153-159.
- Chi, H. 1997. Computer program for the probit analysis. National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.
- Claus, D. & Berkley, R.C. 1986. Genus *Bacillus* (Cohn, 1872). En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath, P.H.A. (ed.), vol 2, pp. 1105-1141. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Connell, J.H. & Orias, E. 1964. The ecological regulation of species diversity. *Am. Nat.* 98: 399-414.

- Corliss, J.O., Coast, D.W. 1976. A new cuticular cyst-producing tetrahymenid ciliate, *Lambornella larkin* sp., and the current status of ciliatosis in culicine mosquitoes. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 95: 725-739.
- Correa, M. & Yousten, A.A. 1995. *Bacillus sphaericus* espore germination and recycling in mosquito larval cadavers. *J. Invert. Pathol.* 66:76-81.
- Crickmore, N., Zeigler D.R., Schnepf, E., Van Rie J., Lereclus D., Basum J., Bravo A., Dean, D.H. 2004. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html (date site accessed).
- Cuda, J.P., Hornby, J. A., Cotterilli, B., Cattell, M. 1997. Evaluation of *Coelomomyces* for biocontrol of *Mansonia* mosquitoes in Florida (Diptera: Culicidae). *Biol. Control* 8: 124-130.
- Curto, S.F., Boffi, R., Carbajo A. E., Plastina, R., Schweigmann, N. 2002. Reinfestación del territorio argentino con *Aedes aegypti*. Distribución geográfica (1994-1999). En: Actualizaciones en artropodología sanitaria. D. Salomón (ed.), pp. 127-137. Serie de enfermedades Transmisibles RAVE.
- Dantur Juri, M.J., Zaidenberg, M., Almirón, W. 2003. Fluctuación Estacional de *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) en un área palúdica de Salta, Argentina. *Entomol. Vect.* 10 (4): 457-468.
- Darboux, I., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J-F, Pauron, D. 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 31: 981-990.
- Darsie, R.F. 1985. Mosquitoes of Argentina. Part I. Keys for identification of adult females and fourth stages larvae in English and Spanish (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 17: 153-253.
- Das, P.B. 2003. *Chilodonella uncinata* – a protozoa pathogenic to mosquito larvae. *Current Science*, 85(4): 483-489.
- Davey, R.B. & Meisch, M.V. 1997. Control of dark rice field mosquito larvae, *Psorophora columbiae*, by mosquitofish *Gambusia affinis* and green

- sunfish, *Leponis cyanellus*, in Arkansas rice fields. Mosquito News 37: 258-262.
- Davidson, E.W. 1988. Binding of the *Bacillus sphaericus* (Eubacteriales: Bacillaceae) toxin to midgut cells of mosquito (Diptera: Culicidae) larvae: relationship to host range. J. Med. Entomol. 25: 151-157.
- Davidson, E.W., Urbina, M., Payne, J., Mulla, M.S., Darwazeh, H., Dulmage, H.T., Correa, J.A. 1984. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol. 47: 125-129.
- Davidson, E.W., Oei, C., Meyer, M., Bieber, A.L., Hindley, J., Berry, C. 1990. Interaction of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal proteins. Can. J. Microbiol. 36 :870-878.
- de Barjac, H., Thiery, I., Cosmao-Dumanoir, V., Frachon, E., Laurent, P., Charles, J.F., Hamon, S., Ofori, J. 1988. Another *Bacillus sphaericus* serotype harbouring strains very toxic to mosquito larvae: serotype H6. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 139(3): 363–377
- de la Torre, F.R., Demichelis, S.O., Ferrari, L., Salibián, A. 1997. Toxicity of Reconquista River Water: Bioassays with Juvenile *Cnesterodon decemmaculatus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58: 558-565
- Dellapé, M.E., Marti, G.A., Tranchida, M.C., García, J.J. 2005. First record of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Infected by the parasite *Ascogregarina culicis* (Ross) (Aplicomplexa: Lecudinidae) in Argentina. Entomol. Vectores 12: 111-115.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., Schenepf, H.E. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insects world. Trends in Genetics 17: 193-199.
- Dias, J.M.C.S., Gomes Monnerat, R., Silva-Werneck, J.O. 1992. Aulas prácticas de bacteriología. En: Segundo curso de Controle Microbiano de Insetos. Brasília. Brasil. pp 23.
- Dieng, H., Boots, M., Tuno, N., Tsuda, Y., Takagi, M. 2003a. Life history effects of prey choice by copepods: implications for biocontrol of vector mosquitoes. J. Am. Mosq. Control Assoc. 19: 67-73.

- Ding, L. & Yokota, A. 2002. Phylogenetic analysis of the genus *Aquaspirillum* based on 16S rRNA gene Sequences. FEMS Microbiol. Letrs. 212(2): 165-169.
- Dodson, S.I., Crowl, T.A., Peckarsky, B.L., Kats, L.B., Covich, A.P., Culp, J.M. 1994. Non-visual communication in fresh-waterbenthos– an overview. J. North Am. Benthological Soc. 13: 268 – 282 .
- Doucet, M.M.A., Bertolotti, M.A., Giayetto, A.L., Miranda, M.B. 1999. Host Range, Specificity, and Virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. J. Invert. Pathol. 73: 237–242.
- Downs, C.W. 1991. Fishes En: California mosquito control. Sacramento, CA. Downs, C.W (ed.), Mosq. Vect. Contr. Assoc. Calif. (Citado en Swanson *et al.*, 1996)
- Dutilleul, P. 1993. Spatial heterogeneity and the design of ecological field experiments. Ecology 74: 1646-1658.
- Dzerzhinskii, V.A., Dubitskii, A.M. 1977. A new host of *Tetrahymena stegomyiae*. Parazitología 11:189.
- Eitam, A., Noreña, C., Blaustein, L., 2004. Microturbellarian species richness and community similarity among temporary pools: relationships with habitat properties. Biodiver. Conser. 13: 2107-2117.
- Espinasse, S., Gohar, M., Lereclus, D., Sanchos, V. 2004. An Extracytoplasmic-Function Sigma Factor is Involved in a Pathway Controlling (beta)-Exotoxin I Production in *Bacillus thuringiensis* subsp *thuringiensis* Strain 407-1. J. Bacteriol. 186: 3108-3116.
- Faraldo, A.C. & Lello, E. 2003. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) larval hemocytes. Biocell 27(2): 197-203.
- Federici, B.A. 1995. The future of microbial insecticides as vector control agents. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 11: 260-268.
- Federici, B.A., Park, H.-W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C., Johnson, J.J., 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. J. Exp. Biol. 206: 3877–3885.
- Federici, B.A., Park, H.-W., Sakano, Y. 2006. Insecticidal protein crystals of *Bacillus thuringiensis*. En: Shively, J.M. (Ed.), Microbiology Monographs

- Series, Volume I. Inclusions in Prokaryotes. Springer, Berlin – Heidelberg, pp. 195–236.
- Federici, B.A., Park, H.W., Bideschi, D.K., Wirth, M.C., Johnson J.J., Sakano, Y., Tang, M. 2007. Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. En: Biorational control of mosquitoes. Floore, T.G. (Ed.), 7: 164-175. Am. Mosq. Control Assoc.
- Fiore, L. 1971. A mechanism for self-inhibition of population growth in the flatworm *Mesostoma ehrenbergii* (Focke). *Oecologia* 7: 356-360.
- Focks, D.A. 2007. *Toxorhynchites* as biocontrol agents. En: Biorational Control of Mosquitoes. Floore, T.G. (Ed). J. Am. Mosq. Control Assoc. Bull. No. 7, 23 (2): 118-127.
- Follet, P.A., Duan, J.J. 2000. Non target effects of biological control. Kluwer Academ. Publishers, Boston, Dordrecht, London.
- From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazábal, V., Granum, P.E. 2005. Toxin-Producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (3): 1178-1183.
- García, J.J. 1989. Primer registro de microsporidiosis en culícidos (Diptera: Culicidae) de la República Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 47: 100-108.
- García, L.S. 2001. Diagnostic medical parasitology. *Asm Press*, Washington.
- García, J.J. & Becnel, J.J. 1994. Eight new species of microsporidia (Microspora) from argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Invert. Pathol.* 64:243-252.
- García, J.J. & Camino, N.B. 1990. Primera cita para la Argentina de infecciones naturales en larvas de *Culex pipiens* (L.) (Diptera: Culicidae). *Neotrópica* 36:83-86.
- García, J.J. & López Lastra, C.C. 1989. Infecciones por microsporidios y hongos en *Culex dolosus* (Lynch Arribalzaga, 1891) (Diptera: Culicidae) en Argentina y Uruguay. *Neotropica* 35 (93): 9-14.
- García J.J., Campos, R.E. & Maciá, A. 1994 a. Prospección de enemigos naturales de Culicidae (Diptera) de la Selva Marginal de Punta Lara,

- Provincia de Buenos Aires, República Argentina. Rev. Coloma. Cs Exactas, Físicas y Naturales XIX: 209-215.
- Gaudino, N. 1916. El dengue. Algunas consideraciones sobre la epidemia de Entre Rios de 1916. Rev. Sanid. Mil. At. 15: 617-627.
- Gene, C.M., Rosa, J.R., Rea, M.J.F., Borda C.E. 1999. Control Biológico de Mosquitos- I. Ensayos Preliminares con Peces Autóctonos. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas del Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, UNNE, Corrientes, Argentina.
- George, J.A., Magy, B.A.L., Stewart, J.W. 1983. Efficacy of *Dugesia tigrina* (Tricladida: Turbellaria) in reducing *Culex* numbers in both field and laboratory. Mosq News 43: 281-284.
- Georghiou, G.P., y Saito, T. 1983. Pest resistance to pesticides. Plenum press, New york and London.
- Gerberich, J.B., Laird, M. 1985. Larvivorous fish in the biocontrol of mosquitoes, with a selected bibliography of recent literature. In: Laird M., Miles J.W. eds. Integrated mosquito control methodologies. Vol. 2. Biocontrol and others innovative components and future directions. London: Academic Press. p 47-76.
- Ghaly, A.E., F. Arab, N.S. Mahmoud and J. Higgins 2007. Production of Levan by *Bacillus licheniformis* for Use as a Soil Sealant in Earthen Manure Storage Structures. Am. J. Biotechnol. Biochem. 3 (2): 47-54.
- Gilinsky, E., 1984. The role of fish predation and spatial heterogeneity in determining benthic community structure. Ecology 65: 455-468.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., Trenczek, T. 1997. Biological mediators of insect immunity. Ann. Rev. Entomol. 42: 611-643
- Giri, F., Collins, P. 2003. Evaluación de *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Natantia) en el Control biológico de larvas de *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) en condiciones de laboratorio. Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 93(3): 237-242.

- Gleiser, R.M, Gorla, D.E & Ludueá Almeida, F.F. 1997. Monitoring the abundance of *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Macquart 1838) (Diptera: Culicidae) to the south of Mar Chiquita Lake, central Argentina, with the aid of remote sensing. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91: 917-926.
- Goddard, J. 2000. *Infections diseases and arthropods*. Humana press, Totowa, New Jersey.
- Goodman, B., 1991. Keeping anglers happy has a price: ecological and genetic effects of stocking fish. *Bioscience.* 41: 294-299.
- Gorochotegui-Escalante, N., Fernandez-Salas, I. & Gomez-Dante, H. 1998. Field evaluation of *Mesocyclops longisetus* (Copepoda: Cyclopoidea) for the control of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Northeastern Mexico. *J. Med. Entomol.* 35: 699-703.
- Grassmick, R.A. & Rowley, W.A. 1973. Larval mortality of *Culex tarsalis* and *Aedes aegypti* when reared with different concentrations of tetrahymena pyriformis. *J. Invert. Pathol.* 22: 86-93.
- Gratz, N.S., Legner E.F., Meffe G.K., Bay E.C., Service M.W., Swanson C., Cech J.J., Laird, M. 1996. Comments on "Adverse assessments of *Gambusia affinis*". *J.Mos. Control Assoc.* 12, 160-166.
- Guerchicoff, A., Delécluse, A., Rubinstein, C.P. 2001. The *Bacillus thuringiensis cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1090-1096.
- Hack, W.H, Torales, G.J, Bar, N.E. & Oscherov, B. 1978. Observaciones etológicas sobre culícidos de Corrientes. *Rev. Soc. Entomol. Arg.* 37: 137-151.
- Hamer, A.J., Lane, S.J., Mahony, M.J. 2002. The role of introduced mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) in excluding the native green and golden bell frog (*Litoria aurea*) from original habitats in south-eastern Australia. *Oecologia* 132: 445-452.
- Hall, D.W.1983. Mosquito hemocytes: a review. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 1-12

- Hass, R., Pal, R. 1984. Mosquito larvivorous fishes. Bull. Entomol. Soc. Am. 30: 17-25.
- Higgins, D.G., Bleasby, A.J., Fuchs, R. 1992. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. Comput. Appl. Biosci. 8: 189-191.
- Howard, A.F., Zhou, G., Omlin, F.X. 2007. Malaria mosquito control using edible fish in western Kenya: preliminary findings of a controlled study. BMC Public Health 7: 199-204.
- Howard, A.F. & Omlin, F.X. 2008. Abandoning small-scale fish farming in western Kenya leads to higher malaria vector abundance. Acta Trop. 105(1): 67-73
- Hoy, J.B & Reed, D.E. 1971. The efficacy of mosquitofish for control of *Culex tarsalis* in California ricefields. Mosq. News 31: 567-572.
- Hu, X., Fan W., Han B., Liu H., Zheng D., Li Q., Dong W., Yan J., Gao M., Berry C., & Yuan, Z. 2008. Complete genome sequence of the mosquitocidal bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41 and comparison with those of closely related *Bacillus species*. J. Bacteriol. 190 (8): 2892-2902.
- Humber, R.A. 1997. Fungi: Identification. En: Manual of techniques in insect pathology. Lacey, L. (Ed.), pp 153-185. Academic Press, San Diego.
- Hyman, L.H., 1951. The invertebrates. II. Platyhelminthes and Rynchocoela. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Ikezawa, H., Hashimoto, A., Taguchi, R., Nakabayashi, T., Himeno, M. 1989. Release of PI-anchoring enzymes and others effects of phosphatidylinoditol-specific phospholipase C from *Bacillus thuringiensis* on TN-368 cells from a moth ovary. Toxicon 27: 637-645.
- Ingle, S.S., Panchal, V. & Chhatpar, H.S.. 2006. Studies on carbohydrate metabolism in *Bacillus sphaericus* 1593. African J. Biotechnol 5 (19): 1770-1774
- Jaronski, S.T., Axtell, R.C., Fagan, S.M., Domnas, A.J. 1983. In vitro production of zoospores by *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) from solid media. J. Invert. Pathol. 41: 305-309.

- Jenkins, D.W. 1964. Pathogens, parasites and predators of medically important arthropods. Suppl. Vol. 30, Bulletin World Health Organization 150 pp.
- Jennings, J.B., 1957. Studies on feeding, digestion and food storage in free living flatworms. Biol. Bull. 112, 63-80.
- Jennings, C.D., Greenwood, J.G., Kay B.H. 1993. Evaluation of rainwater tanks with respect to control of larval *Aedes* mosquitoes by *Mesocyclops* (cyclopoida). Arbovirus Research Australia 6: 111-114.
- Jennings, C.D., Greenwood, J.G., Kay, B.H. 1994. Response of *Mesocyclops* (Cyclopoidea: Copepoda) to biological and physicochemical attributes of rainwater tanks. Environ. Entomol. 23: 479-486.
- Karch, S., Monteny, N., Coz, J. 1988. Persistence de *Bacillus sphaericus* dans une gite à mosquitoes 4 ans après son introduction en vue de lutte biologiques. Cah ORSTOM Entomol. Med. Parasitol. 25:121-125.
- Kay, B.H. y Nam, V.S. 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. Lancet 365: 613-617
- Keeling, P.J., Fast, N.M. 2002. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Ann. Rev. Microbiol. 56: 93-116.
- Kerwin, J.L. 2007. Oomycetes: *Lagenidium giganteum*. En: Biorational control of mosquitoes. Floore, T.G. (Ed.), 7: 50-58. Am. Mosq. Control Assoc., Inc.
- Kerwin, J.L. & Washino, R.K. 1986. Ground and aerial application of the sexual and asexual stages *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) for mosquito control. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2:182-189.
- Kim, H.C., Lee, J.H., Yang, K.H. & Yu, H.S. 2002. biological Control of *Anopheles sinensis* with Native Fish Predators (*Aplocheilus* and *Aphyocypris*) and Herbivorous Fish, *Tilapia* in Natural Rice Fields in Korea. J. Entomol. 32 (4): 247-250.

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kolasa, J. 1984. Predation on mosquitoes by juveniles of *Mesostoma* sp. (Turbellaria). *Freshwater invert. Biol.* 3: 42-47.
- Komar, N., Clark, G.G. 2006. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev. Panam. Salud Publica* 19 (2):112-117.
- Komak, S. & Crossland, M.R. 2000. An assessment of the introduced mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) as a predator of eggs, hatchlings and tadpoles of native and non-native anurans. *Wildlife Res.* 27: 185–189.
- Kosiyachinda, P., Bhumiratana, A., Kittayapong, P. 2003. Enhancement of the efficacy of a combination of *Mesocyclops aspericornis* and *Bacillus thuringiensis* var. *iraelensis* by community-based products in controlling *Aedes aegypti* larvae in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69: 206-212.
- Lacey, L.A. & Lacey, J.M. 1981. The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (h-14) against mosquitoes of the central amazon basin. *Mosq. News* 41: 266-270.
- Krieg, A. 1987. Diseases caused by bacteria and other prokaryotes. En: *Epizootiology of Insects Diseases*. Fuxa, J.R. & Tanada, Y, (Eds.), pp: 323-355. John Wiley and Sons, New York.
- Lacey, L.A., Day, J., Heitzman, C.M. 1987. Long term effects of *Bacillus sphaericus* on *Culex quinquefasciatus*. *J. Invert. Pathol.* 49: 116-123.
- Lacey, L.A. & Kaya, H. 2000. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Lacey, L.A. & Kaya ,H. (Eds), pp 911. Kluwer Academic Publishers.
- Lacey, L.A, Merrit, R.W. 2003. The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito control in aquatic environments. En: *Hokkanen, H.M.T. & Hajek, A.E. (Eds). Assessment of Environmental Safety of Biological Insecticides*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Netherlands.

- Lacey, L.A. & Singer, S. 1982. Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against anopheline and culicine mosquitoes. *Mosq. News* 44: 26-32.
- Lacey, L.A. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus shaericus* for mosquito control. P 133-163. En: *Biorational Control of Mosquitoes*. Floore, T.G. (Ed). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23 (2) Bull. No 7.
- Lacey, L.A. & Brooks, W.M. 1997. Initial handling and diagnosis of diseased insect. En: "Manual of techniques in insect pathology", pp 1-12. Academic Press, San Diego.
- Lacey L.A., Undeen, A.H. 1986. Microbial control of black flies and mosquitoes. *Ann. Rev. Ent.* 31: 265-296.
- Laird, M. 1988. Larval mosquito habitats. Academic. Press. London, England pp. 443.
- Lane, J. 1953. Neotropical Culicidae. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo 2: 633-729.
- Lane, D.J.1991. 16S-23S rRNA sequencing, p 125-175. En: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (Ed), *Nucleic acid in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kindong.
- Lead, A.E. & Pedroso, M.C. 1964. Nova especie do genero *Coelomomyces* parasito de ovos de phlebotomus. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 26: 305-307.
- Lecuona, R.E. 1996. *Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga*. Buenos Aires, Argentina.
- Lee, D.K. 2000. Predation efficacy of the fish muddy loach, *Mysgurnus mizolepis*, against, *Aedes* and *Culex* mosquitoes in laboratory and small rice plots. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 16: 258-261.
- Legner, E.F. 1985. Invertebrate predators other than insects. In: Chapman H.C. (Ed.) *Biological control of mosquitoes*. *Am. Mosq. Control Assoc. Bull.* No.6: 46-50.

- Legner, E.F. 1995. Biological control of Dipetra of medical and veterinary importance. J. Vector Ecol. 20: 59-120.
- Legner, E.F., Tsai, S.C. 1978. Increasing fission rate of the planarian mosquito predator, *Dugesia dorotocephala*, through biological filtration. Entomophaga 23: 293-298.
- Legner, E.F., Yu, H.S. 1975. Larvicidal effects on mosquitoes of substance secreted by the planarian *Dugesia dorotocephala* (Woodworth). Proceedin of California Mosqu. Control Assoc. 43: 128-131.
- Lello, E., Toledo, L.A., Gregorio, E.A. 1987. Elemntos figurados da hemolinfa de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). Caracterizaçao ao nivel de microscopia óptica, em larvas de 2º e 3º instares. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 82 (3): 351-358.
- Levinson, B.L., Kasyan, K.J., Chiu, S.S., Currier, T.S., Gonzalez, J.J. 1990. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. J. Bacteriol. 172: 3172-3179.
- Lighthowler, C.H., Sirl, F., Bökenhan, R. & Mercado, M.C. 1992. Investigación de la prevalencia de *Dirofilaria imitis* en caninos de Capital Federal y conurbano bonaerense. Pet´s 40 (8): 9-12.
- Lischetti, A.B., 1919. Un verme del género Planaria, enemigo natural de las larvas del mosquito. Physis 4: 591-595.
- Loh, P.Y., Yap H.H., Chong N.L., Ho, S.C. 1992. Laboratory studies on the predatory activity of a turbellarian *Dugesia* sp. (Penang) on *Aedes aegypti*, *Anopheles maculatus*, *Culex quinquefasciatus* and *Mansonia uniformis*. Mosquito-Borne Dis Bull. 9: 55-59.
- López Lastra, C.C. 1990 a. Primera cita de *Smittium morbosum* var. *rioplatensis* nov (Trichomycetes: Harpellales) patógeno de 5 especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) en la República Argentina. Rev. Arg. Micol. 13: 14-18.
- López Lastra, C.C. 1990b. Primer registro de *Aphanocladium album* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) como patógeno de insectos en la República Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot. 26: 259-260.

- López Lastra, C.C., García, J.J., Reboredo, G. 1992. Efecto comparativo de la virulencia de los hongos *Aphanocladium album* (Preuss) Gams y *Tolypocladium cylindrosporum* Gams (Deuteromycotina: Hyphomycetes) contra larvas de mosquito (Diptera: Culicidae). Serie: Boletín Micológico. v. 7(1-2): 13-16.
- López Lastra, C.C., García, J.J. 1997. Presencia del hongo *Coelomomyces ilensis* var. *indus* como patógeno de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae) en la República Argentina. Rev. Iberoam. Micol. 14: 69-71.
- López Lastra, C.C., García, J.J. & Reboredo, G.R. 1991. Efecto de la temperatura y la sanidad sobre la viabilidad y producción de conidios en los hongos entomopatógenos: *Tolypocladium cylindrosporum* y *Aphanocladium album* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Bol. Micol. 6: 43-47.
- López Lastra, C.C., Steciow, M.M. & García, J.J. 1999. Registro más austral del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales) como patógeno de larvas de mosquitos (Diptera: Culicidae). Rev. Iberoam. Micol. 16: 143-145.
- López Lastra, C.C., Scorsetti, A.C., Marti, G.A. & García, J.J. 2004. Host range and specificity of an Argentinean isolate of the aquatic fungus *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales), a pathogen of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). Mycopathologia 158: 311-315.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleinter, M., & Schleifer, K.H. 1998b. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis 19: 554-568.
- Lysenko, O. 1958. Contribution to the taxonomy of *Coccobacillus acridiorum* d'Herelle. Folia Biol. 4: 342-347.
- Maly, M.J., Shoenholtz, S., Arts, M.T. 1980. The influence of flatworm predation on zooplankton inhabiting small ponds. Hydrobiologia 76: 233-240
- Manrique-Saide, P., Ibañez-Bernal, S., Delfín-González, H. & Parra, V. 1998. *Mesocyclops longisetus* effects on survivorship of *Aedes aegypti* immature stages in car tyres. Med. Vet. Entomol. 12: 386-390.

- Marquardt, W.C., Demaree, R.S. & Grieve, R.B. 2000. Parasitología and vector biology. Academic press, San Diego.
- Marten, G.G. 1984. Impact of the copepod *Mesocyclops leuckarti* pilosa and the green alga *Kirchneriella irregularis* upon larval *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Bull. Soc. Vector Ecol. 9: 1-5.
- Marten, G.G. 1989. A survey of cyclopoid copepods for control of *Aedes albopictus* larvae. Bull. Soc. Vector Ecol. 14: 232-236.
- Marten, G.G. 1990a. Elimination of *Aedes albopictus* from tire piles by introducing *Macrocyclus albidus* (Copepoda, Cyclopoidae). J. Am. Mosq. Control Assoc. 6: 689-693.
- Marten, G.G. 1990b. Evaluation of cyclopoid copepods for *Aedes albopictus* control in tires. J. Am. Mosq. Control Assoc. 6: 681-688.
- Marten, G.G., Astaiza R., Suarez, M.F., Monje, C. & Reid, J.W. 1989. Natural control of larval *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) by the predator *Mesocyclops* (Copepoda: Cyclopoida). J. Med. Entomol. 26: 624-627.
- Martén, G.G., Cush, M., Fernández, E., Borjas, G., Portillo, H. 1992. *Mesocyclops longisetus* and other forms of biological control for *Aedes aegypti* larvae in the Integrated Dengue Control Project, El Progreso. En: Halstead S.B., Gómez-Dantes, H. eds. *Dengue- a Worldwide Problem, a Common Strategy, Proc. International Conference on Dengue and Aedes aegypti Community-based Control*. Mexican Ministry of Health and Rockefeller Foundation, Mexico pp. 133-137.
- Marten, G.G., Bordes, E.S., Nguyen, M. 1994a. Use of cyclopoid copepods for mosquito control. Hidrobiología 292/293: 491-496.
- Marten, G.G., Borjas, G., Cush, M., Fernández, E. & Reid, J.W. 1994b. Control of larval *Aedes aegypti* in peridomestic breeding containers. J. Med. Entomol. 31: 36-44.
- Marten, G.G., Nguyen, M., Thompson, G., Bordes, E.S. 1997. Copepod production and application for mosquito control. New Orleans, LA: New Orleans Mosquito and Termite Control Board. 43 p. (Available on request).

- Marten, G.G., Nguyen, M., Ngo, G. 2000a. Copepod predation on *Anopheles quadrimaculatus* larvae in rice fields. J. Vector Ecol. 25: 1-6.
- Marten, G.G., Nguyen, M., Manson, B., Ngo, G. 2000b. Natural control of *Culex quinquefasciatus* larvae in residential ditches by copepod *Macrocyclus albidus*. J. Vector Ecol. 25: 7-15.
- Marten, G.G. & Reid, J. W. 2007. Cyclopid Copepods. En Biorational Control of Mosquitoes. Floore T.G. (Ed). J. Amer Mosq Ctrol Assoc. Bull. No 7, 23 (2): 65-92
- Marti, G.A., Micieli, M.V., Scorsetti, A.C., Liljeström, G. 2004. Evaluation of *Mesocyclops annulatus* (Copepoda: Cyclopidae) as Control Agent of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Argentina. Mem. Inst. Oswaldo cruz. 99 (5): 535-540.
- Marti, G.A., Azpelicueta, M.M., Tranchida, M.C., Pelizza, S.A., García J.J. 2006. On The predatory capacity of two native larvivorous fish on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in Argentina. J. Vector Ecol. 31 (1): 102-106.
- Martinez-Ibarra, J.A., Grant-Guillen, J.I., Arredondo-Jimenez, J.I and Rodriguez-López, M.H. 2002. Indigenous fish species for the control of *Aedes aegypti* in water storage tank in Southern Mexico. Biocontrol 47: 481-486.
- McCall, P.J. 2002. Chemoecology of oviposition in insects of medical and veterinary importance. Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition. Hilke, M. r & Meiners, T. (Eds.) pp . 265 – 290 . Blackwell ,Berlin .
- McClelland, G. A.H. 1984. Medical Entomology. University of California, Davis.
- Mckee, M.H., Wrona, F.J., Scrimgeour, G.Y., Culp, J. 1997. Importance of consumptive and non-consumptive prey mortality in a coupled predator-prey system. Freshwater Biol. 38 (1): 193-201.
- McConnell, J.V. 1967. On the procuring and the care of planarians. En: Manual of Psychological Experimentation on Planarians, 2nd ed. J. V. McConnell (Ed.) Section II. Planarian Press, Ann Arbor, Michigan 128 p.

- Mc Laughlin, R.E. & Billodeaux, J. 1983. Effectiveness of *Bacillus Thuringiensis* var. *israelensis* against *Psorophora columbiae* Breeding in rice fields. Mosq. News 43: 30-33.
- Meish, M.V. 1985. *Gambusia affinis*. En: Chapman, H. (Ed.) Biological Control of mosquitoes, Bulletin No. 6, Am. Mosq. Control Assoc, California, p. 3-17.
- Melo, A.S. & Andrade, C.F.S. 2001. Differential predation of the planarian *Dugesia tigrina* on two mosquito species under laboratory conditions. J. Am. Mosq. Control Assoc. 17: 81-83.
- Menu-Marque, S. 2001. Datos biogeográficos y nuevas localidades de copépodos de la Familia Cyclopidae (Copepoda, Cyclopoida) de la Argentina. Physis 58: 37-41.
- Menu-marque, S., Micieli, M.V. 2007. On the presence of *Diacyclops uruguayensis* (Copepoda: Cyclopoida) in Argentina. Crustaceana 80 (11): 1393-1396
- Merrian, T.L., Axtell, R.C. 1982. Salinity tolerance of two isolates of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales), a fungal pathogen of mosquito larvae. J. Med. Entomol. 19: 388-393.
- Meyer, H.J. & Learned, L.W. 1981. Laboratory studies on the potential of *Dugesia tigrina* for mosquito predation. Mosq. News 41:760-764.
- Meyer, P. & Milanda, G. 1997. Evolución explosiva de la filariasis canina en Argentina. Período 1982-1985. Pet's 70(13): 224-225.
- Micieli, M.V., García, J.J. & Becnel, J.J. 1998. Horizontal transmisión of *Amblyospora dolosi* (Microsporidia: Amblyosporidae) to the copepod *Metacyclops mendocinus* (Wierzejski 1982). J. Invert. Pathol. 72: 330-335.
- Micieli, M.V., García, J.J. & Becnel, J.J. 2000a. Life cycle and description of *Amblyospora camposi* N. sp. (Microsporidia: Ambyosporidae) in the mosquito *Culex renatoi* (Diptera: Culicidae) and the copepod *Paracyclops fimbriatus* (Copepoda: Cyclopidae). J. Euk. Microbiol. 47: 575-580.

- Mieli, M.V., García, J.J. & Becnel, J.J. 2000b. Horizontal transmission of *Amblyospora albifasciatus* García and Becnel, 1994 (Microsporidia: Amblyosporidae) to a copepod intermediate host and the neotropical mosquito, *Aedes albifasciatus* (Macquart, 1837). J. Invert. Pathol. 75:76-83.
- Mieli, M.V., García, J.J. & Andreadis, T.G. 2001. Epizootiological studies of *Amblyospora albifasciati* (Microsporidia: Amblyosporidae) in natural populations of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Mesocyclops annulatus* (Copepoda: Cyclopidae) in a transient floodwater habitat. J. Invert. Pathol. 77: 68-74.
- Mieli, M.V., Marti, G.A., García, J.J. 2002. Laboratory Evaluation of *Mesocyclops annulatus* (Wierzejski, 1892) (Copepoda: Cyclopidae) as Predator of Container-breeding Mosquitoes in Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97 (6): 835-838.
- Ministerio de Salud de la Nación. 2009. <http://www.msal.gov.ar/htm/Site/dengue.asp>
- Mitchell, R.W., 1974. The cave adapted flatworm of Texas; systematic, natural history and responses to light and temperature. En: Biology of Turbellaria. Riser, N.W. & Morse, M.P. (Eds), ch. 16, McGraw-Hill Book Co., New York.
- Miteva, V., Selenska-Pobell, S., Mitev, V. 1999. Random and repetitive primer amplified polymorphic DNA analysis of *Bacillus sphaericus*. J. Appl. Microbiol. 86: 928-936
- Mogi, M. 2007. Insect and other invertebrate predators. En: Biorational control of mosquitoes. Floore, T.G. (Ed.), Bull No. 7: 93-109. Am. Mosq. Control Assoc., Inc.
- Montada Dorata, D., Castex Rodriguez, M., Suárez Delgado, S., Figueredo Sánchez, D., Leyva Silva, M. 2005. State of the resistance to insecticides in adult *Aedes aegypti* mosquitoes from playa municipality, Havana City, Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. 57(2): 137-42.
- Motoyoshi, M. 2007. Introduction. En: Biorational Control of Mosquitoes. Floore, T.G. (Ed.), Bull. No. 7,23 (2): 93-109. J. Am. Mosq. Control Assoc.

- Moyle, P.B. 2002. Inland fishes of California. Berkeley, CA: Univ Calif Press
- Mulla, M.S., Darwazeh, H.A., Davidson, E.W., Dulmage, H.T. 1984 a. Efficacy and persistence of the microbial agent *Bacillus sphaericus* againsts mosquito larvae in organically enriched habitats. Mosq. News 44: 166-173.
- Mulligan, F.S.I, Schaefer, C.H., Wilder, W.H. 1980. Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* H.14 againsts mosquitoes under laboratory and field conditions. J. Econ. Entomol. 73: 684-688.
- Nakamura, L.K. 2000. Phylogeny of *Bacillus sphaericus*-like organisms. Internat. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1715-1722.
- Nam, V.S., Kay, B.H. 1997a. New directions for dengue vector surveillance and control in Vietnam. Arbovirus Res. Aust. 7:197-200.
- Nam, V.S., Marchand, R., Phong, T.V., Nguyen, V.B. 1997b. Dengue vector control in Vietnam using *Mesocyclops* through community participation. Dengue Bull. 21: 96-104.
- Nam, V.S., Ngnyen, T.Y., Kay, B.H., Marten, G.G., Reid, J.W. 1998. Eradication of *Aedes aegypti* from a vilage in Vietnam, using copepods and community participation. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59: 657-660.
- Nam, V.S., Yen, N.T., Holynska, M., Reid, J.W. & Kay, B.H. 2000. National progress in dengue vector control in Vietnam: Survey for *Mesocyclops* sp. (Copepoda), *Micronecta* sp. (Corixidae), and fish as biological control agents. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62: 5-10.
- Nam, V.S., Nguyen, T.Y., Phong, T.V., Truong, U.N., Le, Q.M., Le, V.L., LeT.N, Bektas A., Biscoombe, A., Aaskov, J.G., Ryan P.A., Kay, B.H. 2005. Elimination of dengue by community programs using *Mesocyclops* (Copepoda), againsts *Ae. aegypti* in central Vietnam. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72: 67-73.
- Noreña-Janssen, C., Faubel, A., 1992. Revision of the Subfamily Mesostominae, Rhabdocoela, Platyhelminthes. Mitt. Hamb. Zool. Museum Inst. 89: 7-47.
- Noreña, C., Damborenea, C., Brusa, F., 2004. Platyhelminthes de vida libre – Microturbellaria – dulceacuícolas en Argentina. Temas de la

- Biodiversidad del Litoral Fluvial Argentino. INSUGEO, Miscelánea 12: 225-238.
- Noreña, C., Damborenea, C., Brusa, F., Escobedo, M. 2006. Free-living Platyhelminthes of the Pacaya-Samiria National Reserve, a Peruvian Amazon floodplain. *Zootaxa* 1313, 39-55.
- O.M.S. 2004. www.who.int/infectiousdisease-report/idr99-spanish/pages/ch3text
- O.P.S. 1987. *Aedes albopictus* en las Américas. *Bol Of Sanit Panam* 1987; 102(6): 624-33.
- O.P.S. 1999. <http://new.paho.org/hq>
- O.P.S. 2009. <http://new.paho.org/hq>
- Otsuki, K., Guaycurús, T.V., Vicente, A.C. 1997. *Bacillus sphaericus* entomocidal potencial determined by Polymerase Chain Reaction. 1997. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92 (1): 107-108.
- Park, H.W., Hayes, S.R., Magnum, C.M. 2008. Distribution of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* from sediment samples in Florida. *J. Asia-Pacific Entomol.* 11: 217-220.
- Patterson, P. 2004. The mosquitoes wars: a history of mosquitoes control in Florida. *Florida Entomol.* 87(3): 417-418.
- Pelizza, S.A., López Lastra, C.C., Bizarro, V., Becnel, J.J., & García, J.J. 2007. Biotic and abiotic factors affecting *Leptolegnia chapmanii* infections in *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23(2): 177-181.
- Pelizza, S.A, López Lastra, C.C, Becnel, J.J, Bisaro, V. & Garcia, J.J. 2007. Effects of temperature, pH and salinity on the infection of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Peronosporomycetes) in mosquito larvae. *J. Invert. Pathol.* 96(2): 133-137.
- Pelizza, S. A., López Lastra, C.C., Becnel, J.J., Humber, R. A. & García, J.J. 2008. Further research on the production, longevity and infectivity of the zoospores of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Oomycota: Peronosporomycetes). *J. Invert. Pathol.* 98: 314-319.

- Petranka, J.W., Fakhoury, K. 1991. Evidence of a chemically mediated avoidance response of ovipositing insects to bluegills and green frog tadpoles. *Copeia* 234 – 239 .
- Petranka, J. & Hayes, L. 1998. Chemically mediated avoidance of a predatory odonate (*Anax junius*) by American toad (*Bufo americanas*) and wood frog (*Rana sylvatica*) tadpoles. *Behavioral Ecol Sociobiol* , 42: 263 – 271 .
- Pettersen, J.J. 1985. Nematode parasites. En: *Biological Control of Mosquitoes*. H. C. Chapman, (Ed.), Am. Mosq. Control Assoc. 6: 110-122.
- Platzer, G.E. 2007. Mermithid nematodes. En: *Biorational control of mosquitoes*. Floore, T.G. (Ed.) Bull No. 7: 58-64. Am. Mosq. Control Assoc., Inc.
- Poinar, G.O.Jr. & Camino, N.B. 1986. *Strelkovimermis spiculatus* n. sp. (Mermithidae: Nematodo) Parasiting *Aedes albifasciatus* Mac. (Culicidae: Diptera) in Argentina. *J. Nematol.* 18: 317-319.
- Prabakaran, G., Balaraman, K., Hoti, S.L., Manonmani, A.M. 2007. Acost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus sphaericus* H5a5b (VCRC B42) for mosquito control. *Biol Control* 41: 379-383.
- Priest, F.G., Goodfellow, M. & Tood, C. 1988. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1847-1882.
- Prinsloo, H.E. 1960. Parasite mikro-organismes by die bruinsprinkaan *Locustana pardalina* (Walk). *S Afr. Tydskr. Landbouwet.* 3: 551-560.
- Prosen, A.F., Martínez, A. & Carvalho, R.V. 1960. La Familia Culicidae de la Rivera fluvial de la provincia de Buenos Aires. *Ann. Inst Med. Reg.* 5: 101-113.
- Reid, J.W. 1985. Clave de identificação e lista de referencias bibliográficas para as espécies continentais sudamericanas de vida livre da ordem Cyclopoida (Crustacea, Copepoda). *Boletim de Zoologia, Universidade de Sao Paulo* 9: 17-143

- Reid, J.W. 1998. Redescription and first records from Brazil of *Diaicyclops uruguayensis* Kiefer (Crustacea, Copepoda, Cyclopoidae). Rev. Brasileira de Zool. 15: 757-766.
- Reynoldson, T.B., Young, J.O. 1963. The food of four species of lake dwelling triclads. J. Animal Ecol. 32: 175-191.
- Ricci, M. & Padín, S. 2007. Dengue en la Provincia de Buenos Aires: Medidas de prevención y control para *Aedes aegypti* y otros mosquitos vectores de enfermedades.
www.agro.unlp.edu.ar/novedades/noticias/llegoElDenge.pdf
- Ringuelet, R.A. 1958. Los crustáceos copépodos de las aguas continentales de la República Argentina. Sinopsis Sistemática, Contribución Científica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires, departamento de Zoología. 1: 35-126.
- Ringuelet, R.A., Aramburu, R.H & Alonso de Aramburu, A. 1967. Los peces argentinos de agua dulce. Com. Invest. Cient. Prov. Bs. As. 602 pp.
- Rivas, R. 1963. Subgenera and species groups in the Poeciliid fish genus *Gambusia* Poey. Copeia. 1963: 331-347.
- Rivière, F., Thirel, R. 1981. La prédation du copépode *Mesocyclops leuckarti pilosa* (Crustacea) sur les larves de *Aedes (Stegomyia) aegypti* et *Ae. (St) polynesiensis* (Diptera: Culicidae): essais préliminaires d'utilisation comme agent de lutte biologique. [Predation of the copepod *Mesocyclops leuckarti pilosa* (Crustacea) on the larvae of *Ae. (St) polynesiensis* (Diptera: Culicidae): preliminary trials of its use as a biological control agent]. Entomophaga 26: 427-439.
- Rivière, F., Kay B.H., Klein, J.M., Séchan, Y. 1987a. *Mesocyclops aspericornis* (Copepoda) and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the biological control of *Aedes* and *Culex* vectors (Diptera: Culicidae) breeding in crab holes, tree holes, and artificial containers. J. Med. Entomol. 24: 425-430

- Roberts, D.W. 1970. *Coelomomyces*, *Entomophthora*, *Beauveria*, and *Metarhizium* as parasites of mosquitoes. Misc. Publ. Entomol. society Am. 7: 140-155.
- Roberts, D.W. 1974. Fungal infections of mosquitoes. En: Le controle des moustiques. Aubin, A., Belloncik, S., Bourassa, J.P., Lacoursiere, E. & Pellissier, M. (Eds.), pp 143-193. Presses de l' Université du Québec.
- Roberts, D.W. & Strand, M.A. 1977. Pathogens of medically important arthropods. World health organization Bull. 55 (1): 419.
- Roberts, D.W. & Castillo, J.M. 1980. Bibliography on pathogens of medically important arthropods. World health Organization Bull. 58:197.
- Roberts, D.W., Daoust, R. A. & Wraight, S.P. 1983. Bibliography on pathogens of medically important arthropods: 1981. World Health Organization Bull. 83 (1): 137.
- Rossi, G.C., Pascual, N.T. & Kristicevic, F.J. 1999. First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. J. Am. Mosq. Control Assoc. 15 (3): 422.
- Rossi, G.C., Almirón, W.R. 2004. Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. Serie Enfermedades Transmisibles. Publicación Monográfica 5. Fundación Mundo Sano.
- Rossi, G.C., Lestani, E.A., D'Oria, J.M. 2006. Nuevos registros y actualización taxonómica de mosquitos de la Argentina. Rev. Soc. Entomol. Arg. 65 (3-4): 51-56.
- Rupp, H.R. 1996. Adverse assessment of *Gambusia affinis*: an alternative view for mosquito control practitioners. J. Am. Mosq. Control Assoc. 12: 155-156.
- Russell, B.L., Jelley, S. A., & Yousten, A. A. 1989. Carbohydrate metabolism in the mosquito pathogen *Bacillus sphaericus* 2362. Appl. Environ. Microbiol. 55: 294-297.
- Sabattini, M.S., Monath, T.P., Mitchell, C.J., Daffner, J.F., Bowen, G.S., Pauli, R. & Contigiani, M.S. 1985. Abovirus investigations in Argentina,


- 1977-1980. I. Historical aspecto and descriptions on study sites. J. Trop. Med. Hyg. 34: 937-944.
- Saik, J.E., Lacey, L.A., Lacey, C.M. 1990. Safety of microbial control agents to domestics animals and vertebrate wildlife. In: Laird M, Lacey L.A. & Davidson E.W. (Eds). Safety of microbial Insecticides. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 115-132.
- Sala, H., El Safi, A. A., Haridi, M., & El Rabaa, F.M.A. 1985. The impact of the exotic fish *Gambusia affins* (Baird and Girard) on some natural predators of immature mosquitoes. J. Trop. Med. Hyg. 88: 175-178.
- Salvatella Agrelo, R. 1996. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. Rev. Med. Urug. <http://www.smu.or.uy/publicaciones/rmv/1996v1/salvat.htm>.
- Schereiber, E.T., Turner, W.L., Lopez, A.M., Hallmon, C.F., Marten, G.G. 1993. Evaluation of two cyclopoid copepoids for *Aedes albopictus* control in tires in the Panhandle of Florida at low introduction rates. J. Fla. Mosq. Control Assoc. 64: 73-74
- Schereiber, E.T., Hallmon, C.F., Eskridge, K.M., Marten, G.G. 1996. Effects of *Mesocyclops longisetus* (Copépoda:Cyclopoidae) on mosquitoes that inhabit tires: influence of litter type, quality, and quantity. J. Am Mosq. Control Assoc. 12: 688-694.
- Schuartz J-L., Potvin, L., Coux, F., Charles, J-F., Berry, C., Humphreys M.J., Jones A. F., Bernhart, I., Dalla Serra, M., Menestrina, G. 2001. Permeabilization of model lipid membranes by *Bacillus sphaericus* mosquitocidal binary toxin and its individual components. J. Membrane Biol. 184: 171-183.
- Scott, J.J. 2006. Gone fishin': a survey of mosquitofish use and production in California. Proc. Calif Mosq Vector Control Assoc. 74:121-123.
- Seymour, R.L. & Briggs, L.D. 1985. Occurrence and control of *Aphanomyces* (Saprolegniales: Fungi) infections in laboratory colonies of larval *Anopheles*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 1: 100-102.

- Shadduck, J.A., Singer, S., Lause, S. 1980. Lack of mammalian pathogenicity of entomocidal isolates of *Bacillus sphaericus*. *Env. Entomol* 9: 403-407.
- Siegel, J.P., Novak, R.J. 1997. Field trials of Vectolex CG[®], a *Bacillus sphaericus* larvicidae, in Illinois waste tires and catch basins. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 305-310.
- Siegel, J.P., Novak, R.J. 1999. Duration of activity of the microbial larvicide Vectolex CGReg. (*Bacillus sphaericus*) in Illinois catch basins and waste tires. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15:366-370.
- Siegel, J.P., Smith, A.R., Novak, R.J. 2001. Recovery of commercially produced *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus* from tires and prevalence of bacilli in artificial and natural containers. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 17: 33-41.
- Silva-Filha, M.H., Nielsen-LeRoux, C., Charles, J-F. 1997. Binding kinetics of *Bacillus sphaericus* binary toxin to midgut brush-border membranes. *Eur. J. Biochem.* 247: 754-761.
- Skovmand, O., Thiery, I., Benzon, G.L., Sinigre, G., Montey, N. & Becker, N. 1998. Potency of product base don *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* interlaboratory variations. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 14: 298-304.
- Sluys, R., Kawakatsu, M., Ponce de León, R., 2005. Morphological stasis in an old and widespread group of species: contribution to the taxonomy and biogeography of the genus *Girardia* (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 40: 155-180.
- Sokal, R.R. & Rohlf F.J. 1980. *Introducción a la Bioestadística*. Reverté, Barcelona, España.
- Soumare, M.K., Cilek, J.E. & Schreiber, E.T. 2004. Prey and size preference of *Mesocyclops longisetus* (Copepoda) for *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 20: 305-310.
- Spinsanti, L.A., Basquiera, A.L., Bulacio, S., Somale, V., Kim, S.C.H., Ré, V., Rabbat, D., Zárate, A., Zlocowski, J.C., Quiroga Mayor, C., Contigiani, M. y Palacio, S. 2003. Encefalitis de San Luis en la Argentina: El primer

- caso comunicado en los últimos 17 años. *Emerging Infect Diseases* 9 (2).
- Sprague, V. 1977. Systematics of the microsporidia. *Comparative pathobiology*, Vol. 2. Plenum Press, New York.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. 1994, Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stav, G., Blaustein, L. y Margalith, Y. 2000. Influence of nymphal *Anax imperator* (Odonata: Aeshnidae) on oviposition by the mosquito *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae) and temporary pool community structure. *J. Vector Ecol.* 25: 190 – 202.
- Stock, S.P. & Camino, N.B. 1996. Nematodos entomopatógenos. En: *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas*. Lecuona, R.E. (Ed.), 7: 105-107. Buenos Aires, Argentina.
- Suarez, M.F., Ayala, D., Nelson, M.J. & Reid, J.W. 1984. Hallazgo de *Mesocyclops aspericornis* (Daday) (Copepoda: Cyclopoidae) depredador de larvas de *Aedes aegypti* en Anapoima, Colombia. *Biomédica* 4: 74-76.
- Suárez, M.F., Marten, G.G., Clark, G.G. 1992. A simple method for cultivating freshwater copepods used in biological control of *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 8: 409-412.
- Suprakash, K., Aditya, A.K. 2003. Biological control of mosquitoes by aquatic planaria. *Tiscia* 34: 15-18.
- Swanson, C., Cech, J.J. Jr., Piedrahita, R.R. 1996. Mosquitofish: biology, culture and use in mosquito control. Sacramento: Mosq. Vector Control Calif and Univ Calif Mosq. Research program.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP* 4.00: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tainai, K., Wago, H., Yamakawa, M. 1997. In vitro phagocytosis of *Escherichia coli* and release of lipopolysaccharide by adhering

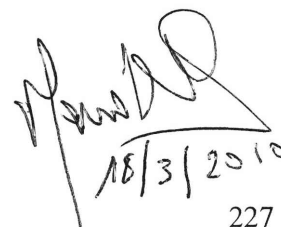
- hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochem Biophys Res. Commun 231(2): 623-627.
- Tanada, Y. & Kaya, H.K. 1993. Fungal infections. En: Insect pathology. Tanada, Y. & Kaya, H.K. (Eds.), pp 318-366. Academic Press.
- Thanabalu, T., Hindley, J., Jackson-Yap, J., Berry C. 1991. Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. J. Bacteriol 173(9): 2776-2785
- Thanabalu, T., Hindley, J., Berry, C. 1992. Proteolytic processing of the mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. J. Bacteriol. 174(15): 5051-5056.
- Thiery, I. & Frachon, E. 1997. Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria. En: Manual of techniques in insect pathology. Lacey, L.A. (Ed.), pp. 55-90. Academic Press.
- Thomsen, T.R., Kragelund, C., Nielsen, P.H. 2006. Identity, abundance and physiology of *Aquaspirillum*-related filamentous bacteria in activated sludge. Water Sci. Technol. 54 (1): 237-245.
- Tietze, N.S. & Mulla, M.S. 1991. Biological control of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) by the tadpole shrimp, *Triops longicaudatus* (Notostraca: Triopsidae). J. Med. Entomol. 28: 24-31.
- Torrente, A., Rojas, A., Durán, A. Kano, T & Orduz, A. 1993. Fish species from mosquitoes breeding ponds in northwestern Colombia: evaluation of feeding habits and distribution. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88: 625-627.
- Trochine, C., Modenutti, B., Balseiro, E. 2005. When mating increases predation risk: the relationship between the flatworm *Mesostoma ehrenbergii* and the copepod *Boeckella gracilis*. Arch. Hydrobiologia 163: 555-569.
- Tseng, M. 2007. Ascogregarine parasites as possible biocontrol agents of mosquitoes. En: Biorational control of mosquitoes. Floore, T.G. (Ed.), Bull No. 7, 23 (2): 36-49. Am. Mosq. Control Assoc., Inc.

- Vandame, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kertsters, K., & Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Reviews* 60: 407-438.
- Van Dam, A.R. & Waltom, W.E. 2007. Comparison of mosquito control provided by the arroyo chub (*Gila orcutti*) and the mosquitofish (*Gambusia affinis*). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23 (4): 430-41.
- Van Dam, A.R. & Walton, W.E. 2008. The effect of predatory fish exudates on the ovipositional behaviour of three mosquito species: *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Culex tarsalis*. *Med. Vet. Entomol.* 22: 399–404
- Walton, W.E. 2007. Larvivorous fish including *Gambusia*. En: *Biorational Control of Mosquitoes*. Floore, T.G. (Ed). Bull. No. 7, 23 (2) : 184-220. J. Am. Mosq. Control Assoc., Inc
- Walton, W.E., Mulla, M.S., Darwazeh, H.A. 1991. Integrated control of *Culex tarsalis* larvae using *Bacillus sphaericus* and *Gambusia affinis*: Effects on mosquitoes and non-target organisms in field mesocosms. *Bull. Soc. Vect. Ecol.* 16: 203-221
- Weir, T., Park, S., Vivanco, J. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Plant biology* 7: 472-479.
- Weiser, J. 1984. A mosquito-virulent bacillus sphaericus in adult *Simulium damnosum* from northern Nigeria. *Zentralbl. Microbiol.* 139: 57-60.
- Weiser, J. 1991. *Biological control of vectors*. Wiley & Sons, Chichester.
- Weisburg, W., Barns S., Pelletier, D., Lane, J. 1991. 16 S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173 (2): 697-703
- Wellborn, G.A., Skelley, D.K., Werner, E.F. 1996. Mechanisms creating community structure across a freshwater habitat gradient. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27: 337-363.
- WHO. 2007. Mobilizing research to halt exponential growth of dengue. *TDR news* 77: 8-11.
- Wisenden, B.D. 2000 Scents of danger: the evolution of olfactory ornamentation in chemically – mediated predator – prey interactions.



18-3-2010

- Animal Signals: Signalling and Signal Design in Animal Communication. Espmark, Y., Amundsen, T. & Rosenqvist, G. (Eds.) pp. 365 – 386. Tapir Academic Press, Trondheim .
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.
- Woodring, J., Davidson, E. W. Biological Control of Mosquitoes 1996. En: The Biology of Disease Vectors. Ch. 31 (530-548). (Ed) Beaty B. J. and Marquardt, W. C. University Press of Colorado.
- Wraight, S.P., Molloy, D.P. & Singer, S. 1987. Studies on the Culicine Mosquito Host Range of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* with Notes on the Effects of temperature and instar on bacterial efficacy. J. Invert. Pathol. 49: 291-302.
- Wrona, F.J., Koopowitz, H. 1998. Behaviour of the rabdochoel flatworm *Mesostoma ehrenbergii* in prey capture and feeding. Hydrobiologia 383: 35-40.
- Yousten, A.A., Fretz, S.B., Jelley, S.A. 1985. Selective medium for mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. Appl. Environ. Microbiol. 49, 1532-1533.
- Yousten, A.A., Benfield, E.F., Campbell, R.P., Foss, S.S., Genthner, F.J. 1991. Fate of *Bacillus sphaericus* 2362 spores following ingestion by nontarget invertebrates. J. Invert. Pathol. 58: 427-435.
- Yousten, A.A., Benfield, E.F., Genthner, F.J. 1992. Fate of *Bacillus sphaericus* 2362 spores in nontarget invertebrates. Microb. Release 1: 161-164.
- Yu, H.S., Kim, M.S., Chung, S.T. 1996. Predation effectiveness of potential predators of rice fish (*Aplocheilichthys latipes*) and planarian (*Dugesia japonica*) by the influence of temperature, salinity and ph against *Culex pipiens pallens* in Korea. Korean J. Entomol. 26: 159-168.
- Zhen, T., Jennings, C.D. & Kay, B.H. 1994. Laboratory studies of desiccation resistance in *Mesocyclops* (Copepoda: Cyclopoida). J. Am. Mosq. Control Assoc. 10: 443-446.



18/3/2010