

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

**APORTE AL CONOCIMIENTO DE LA BIOLOGÍA
BÁSICA Y APLICADA DE *Leptolegnia chapmanii*
(Straminipila, Saprolegniales) COMO AGENTE DE
CONTROL BIOLÓGICO DE *Aedes aegypti* (Diptera,
Culicidae)**

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

TESISTA: Biólogo Manuel E. Rueda Páramo

DIRECTORES: Dr. Juan J. García y Dra. Claudia C. López Lastra

CIUDAD DE LA PLATA, 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

**APORTE AL CONOCIMIENTO DE LA BIOLOGÍA
BÁSICA Y APLICADA DE *Leptolegnia chapmanii*
(Straminipila, Saprolegniales) COMO AGENTE DE
CONTROL BIOLÓGICO DE *Aedes aegypti* (Diptera,
Culicidae)**

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES**

TESISTA: Biólogo Manuel E. Rueda Páramo

DIRECTORES: Dr. Juan J. García y Dra. Claudia C. López Lastra

CIUDAD DE LA PLATA, 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi familia que desde la distancia siempre me alentó, motivó y apoyó para no desistir desde el primer momento y cuando la situación tambaleó. A mis padres por su buen ejemplo y confianza. A mi hermano David por ser el motor de mi vida. A mi hermana Andrea, a su esposo Andrés y a mi sobrino Matías, con quien poco he compartido pero llevo siempre en mi corazón. A mis abuelos por su cariño y gran afecto, sentimientos que son recíprocos. A mi tía Gladys Peralta, en la ciudad de La Plata, quien brindó apoyo y me acompañó en este camino en tierras lejanas. A todos ellos, infinitas gracias!

A todo el personal del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), encabezado por la directora Dra. Alda González y en especial a mis directores Dr. Juan José García y Dra. Claudia López Lastra, quienes me guiaron paciente y dedicadamente, siendo más que directores grandes amigos, los extrañaré y les estaré por siempre agradecido. A mis compañeras de equipo Romina, Julieta, Evangelina, Alejandra y Marianel, al personal de apoyo, administrativos, directivas y compañeros de otras áreas, por el soporte técnico, acompañamiento y experiencias vividas.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento de mis estudios de posgrado y a la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP) por hacer posible mi capacitación profesional. Igualmente, a la Secretaría de Políticas Universitarias (SPU), Ministerio de Educación de la Nación a través de un proyecto de cooperación Capes Mercosul, por financiar mi estancia en Brasil, en donde no solo crecí profesionalmente sino también me enriquecí como persona.

Al grupo de trabajo a cargo de los Drs. Christian Luz y Éverton K.K. Fernandes en el Instituto de Patología Tropical y Salud Pública en Goiânia, Goiás, Brasil, así como al Dr. Richard Humber de la colección de hongos ARSEF en el Departamento de Agricultura de los

Estados Unidos (USDA), por su amabilidad, buena disposición y los saberes compartidos. Igualmente, al Prof. Ricardo Marreto en la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal de Goiás por la asistencia técnica y por permitirnos el acceso a la cámara fotoestática con la que se realizaron las pruebas de radiación con UV-A.

A la Dra. Gabriela Cabrera del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por su aporte en el proceso de extracción y concentración de metabolitos.

Al Dr. Sebastián Cavalitto y a su grupo de trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI) (CONICET-UNLP) en la Plata, por el apoyo y colaboración durante las pruebas de masificación con los bioreactores.

A la Ing. María Inés Urrutia en el Centro Superior para el Procesamiento de la Información (CeSPI), por la asistencia técnica estadística, por su amabilidad y buena disposición. A la Dra. Agustina Marano por la asistencia técnica en la identificación de hongos acuáticos.

A mis grandes amigos en Colombia y a todas las personas con las que coincidí en esta etapa de mi vida, en la ciudad de las diagonales.

A Dios por sobre todas las cosas.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
ANTECEDENTES	8
<i>Aedes aegypti</i> (= <i>Stegomyia aegypti</i>), (Linnaeus, 1762).....	8
Descripción general y posición taxonómica.....	8
Ciclo de vida	8
Características morfológicas	9
Ecología y distribución de <i>Ae. aegypti</i>	12
<i>Aedes aegypti</i> como vector de patógenos.....	14
Control de <i>Ae. aegypti</i>	16
<i>Leptolegnia chapmanii</i> (Seymour, 1984)	18
Clasificación taxonómica y descripción morfológica.....	18
Ciclo de vida y modo de infección	20
Trabajos previos con <i>L. chapmanii</i>	21
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPÍTULO I: Actividades de rutina	28
Mantenimiento de la colonia de cría de <i>Ae. aegypti</i>	28
Mantenimiento y manipulación de <i>L. chapmanii</i>	31
Aislamiento de <i>L. chapmanii</i> a partir de larvas infectadas de <i>Ae. aegypti</i>	31
Mantenimiento <i>in vitro</i> de <i>L. chapmanii</i>	32
Mantenimiento <i>in vivo</i> de <i>L. chapmanii</i>	33
Producción de zoosporas de <i>L. chapmanii</i>	33
CAPÍTULO II: Persistencia, patogenicidad y dispersión de <i>L. chapmanii</i>	36

Persistencia y patogenicidad de <i>L. chapmanii</i> en diferentes ambientes antrópicos en donde se cría naturalmente <i>Ae. aegypti</i> y pruebas de patogenicidad con poblaciones naturales procedentes de campo.....	36
Materiales y Métodos.....	36
Resultados y Discusión.....	39
Evaluación de la dispersión de <i>L. chapmanii</i> en ambientes antrópicos.....	44
Materiales y métodos.....	44
Resultados y discusión.....	47
CONCLUSIONES.....	50
CAPÍTULO III: Efecto de la radiación UV-A sobre la patogenicidad, producción y viabilidad de las zoosporas de <i>L. chapmanii</i>.	52
Materiales y Métodos.....	52
Ensayo I: Efecto de la radiación UV-A sobre la patogenicidad de las zoosporas de <i>L. chapmanii</i> producidas <i>in vivo</i>	54
Ensayo II: Efecto de la radiación UV-A en la producción y viabilidad de las zoosporas de <i>L. chapmanii</i> producidas <i>in vivo</i>	55
Resultados y Discusión.....	55
CONCLUSIONES.....	58
CAPÍTULO IV: Desarrollo de <i>L. chapmanii</i> <i>In vitro</i> y pruebas para su formulación.	61
Medio de cultivo a base de semilla de girasol como sustrato alternativo para la producción de <i>L. chapmanii</i>	61
Materiales y Métodos.....	61
Resultados y discusión.....	62
Pruebas de escalado con <i>L. chapmanii</i> en diferentes medios de cultivo líquido.....	66
Materiales y métodos.....	66
Resultados y discusión.....	67
Pruebas de formulación.....	71
Materiales y métodos.....	72
Resultados y discusión.....	76
Pruebas preliminares para la producción de <i>L. chapmanii</i> en un bioreactor de fermentación.....	80
Materiales y métodos.....	80
Resultados preliminares.....	82
CONCLUSIONES.....	84

CAPÍTULO V: Compatibilidad de <i>L. chapmanii</i> con otros productos larvicidas.	87
Compatibilidad de <i>L. chapmanii</i> con el regulador de crecimiento Diflubenzuron y con aceite de neem (<i>Azadirachta indica</i>)	87
Materiales y métodos	87
Resultados y discusión	88
CONCLUSIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	94

RESUMEN

Leptolegnia chapmanii (Seymour) es un Peronosporomycete (Oomycete) patógeno facultativo de larvas de mosquito. Los aislamientos conocidos de este microorganismo se restringen al continente americano, al norte en Estados Unidos y al sur en la Argentina. Por su parte, el aislamiento nativo argentino, actualmente incluido en la colección de hongos entomopatógenos del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) ha sido material de investigación desde hace dos décadas. De esta manera y previamente para el este aislamiento, se determinó un rango de mosquitos hospedadores, se confirmó su inocuidad sobre organismos “no blanco” y se determinaron algunas condiciones ambientales idóneas para su desarrollo e infectividad en condiciones de laboratorio y semi campo.

Por su parte, el mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus), de gran importancia por ser el principal vector de enfermedades tales como la fiebre amarilla, dengue, fiebre Chikungunya, entre otras, habita ambientes antrópicos, estando presente en áreas domiciliarias y peri domiciliarias, siendo el control de sus poblaciones una necesidad.

En el presente trabajo de investigación se profundizaron dos áreas fundamentales en el conocimiento de *L. chapmanii*. Por un lado se estudiaron aspectos ecológicos como son el parasitismo, la persistencia y la dispersión de este patógeno en ambientes en donde naturalmente se desarrollan poblaciones larvales del mosquito *Ae. aegypti*, así como el efecto de la radiación UV-A sobre su virulencia y su compatibilidad con otros productos insecticidas. El otro enfoque fue más práctico, al procurar una mejora en la masificación, almacenamiento y aplicación de *L. chapmanii* como agente de control biológico.

Dentro de los resultados obtenidos, encontramos que *a posteriori*, de la introducción del patógeno en recipientes en donde naturalmente se presenta el establecimiento y desarrollo de los estados acuáticos de *Ae. aegypti*, su persistencia y patogenicidad sobre las poblaciones del mosquito introducidas periódicamente, decreció a lo largo del tiempo con variaciones entre las diferentes áreas de ubicación. De esta manera, la mortalidad de las larvas fue significativamente más baja ($p < 0.05$) en los recipientes ubicados en un área peri domiciliaria (al exterior) sin protección a la radiación (89 % en la primera semana y 9 % a la sexta semana), comparada con la mortalidad en los recipientes ubicados al interior (97% a la primera semana y 42% a la sexta) y al exterior con protección solar (89% a la primera semana y 29% a la sexta),

sugiriendo esto algún tipo de influencia por parte de la radiación solar sobre la viabilidad y virulencia del entomopatógeno.

En cuanto a los ensayos realizados para evaluar la capacidad de dispersión por parte del patógeno, no se evidenció la propagación del mismo por medio aéreo o asociado a la dinámica poblacional del mosquito en sus diferentes estados. En medio acuático se encontró una baja capacidad de dispersión por parte de las zoosporas.

Tomando como base los resultados obtenidos y con el fin de elucidar cómo la radiación ambiental puede afectar la producción, virulencia y patogenicidad de las zoosporas de *L. chapmanii*, se realizaron ensayos de exposición a radiación UV-A con larvas de *Ae. aegypti* muertas por acción del patógeno, en etapa previa a la zoosporogénesis, así como con zoosporas en suspensión. Los resultados obtenidos demostraron que las larvas de *Ae. aegypti* (en donde se desarrollaron las estructuras reproductivas) protegieron a los zoosporangios y zoosporas durante la exposición a radiación UV-A, no evidenciándose diferencias en la producción de las estructuras reproductivas al menos para los tiempos de exposición manejados. Por su parte, la virulencia de las zoosporas en suspensión (sin protección ante la radiación UV-A) decreció con la creciente exposición a UV-A.

Respecto a los ensayos de cultivo *in vitro* con los medios tradicionales PYG y Emerson YPss y con el medio alternativo a base de semilla de girasol (ESG), se registró una menor tasa de crecimiento por parte de *L. chapmanii* en el medio sólido ESG en comparación a los otros dos. Sin embargo con la biomasa desarrollada en este medio (ESG) tanto en estado sólido como líquido, se obtuvo la mayor y más rápida producción de zoosporas. Otra ventaja comparativa que se encontró con el medio ESG, fue el menor costo de producción, siendo una alternativa viable para la producción masiva a futuro del patógeno. Por su parte, de la reciente prueba para la masificación de *L. chapmanii* en un bioreactor con medio PYG líquido, el microorganismo presentó un patrón de crecimiento adecuado para su posterior manipulación. Los ensayos de patogenicidad realizados con el producto cosechado y larvas de *Ae. aegypti*, presentaron buenos resultados preliminares. Cabe anotar que se requieren mayores ensayos para realizar conclusiones más acertadas en este aspecto.

Se realizaron pruebas de formulación con *L. chapmanii* en matriz de alginato de calcio, encontrando que el micelio encapsulado nunca fue infectivo; las zoosporas encapsuladas perdieron rápidamente su capacidad infectiva y el patógeno no fue capaz de atravesar la

barrera física generada por el alginato de calcio. Por su parte en las pruebas con sustratos sólidos de uso agrícola como material para el almacenamiento y aplicación de *L. chapmanii*, la vermiculita presentó los mejores resultados en comparación con la arena y mantillo de bosque, sin embargo su tiempo de vida útil no superó una semana.

Con el fin de determinar la compatibilidad de *L. chapmanii* con otros productos larvicidas, se comparó el desarrollo del mismo en medio de cultivo sólido con la adición en diferentes concentraciones de los productos mencionados. De lo anterior, se encontró una reducción en su tasa de crecimiento en los medios de cultivo con las mayores concentraciones de diflubenzuron y aceite de neem, no teniendo implicancias en la posterior viabilidad y virulencia de las zoosporas producidas.

Por último se evaluó la pérdida de virulencia por parte de *L. chapmanii* por el prolongado tiempo de mantenimiento *in vitro* en medio de cultivo sólido. Los ensayos se realizaron partiendo del aislamiento del patógeno a partir de larvas de *Ae. aegypti* infectadas, en medio PYG-agar, evaluándose cada dos semanas la producción de zoosporas así como su virulencia y patogenicidad sobre larvas de *Ae. aegypti*. En los ensayos se registró una reducción en cuanto a la producción de zoosporas a lo largo del tiempo, no siendo evidente la pérdida de viabilidad o virulencia por parte de las mismas, al menos durante el periodo de estudio.

Con esta serie de ensayos consideramos que se avanzó en el conocimiento de *L. chapmanii* como patógeno de larvas de mosquito, confirmándose su potencial como biocontrolador, quedando aún mucho por profundizar.

ABSTRACT

Leptolegnia chapmanii (Seymour) is a Peronosporomycete (Oomycete), facultative pathogen of mosquito larvae. Isolates of this microorganism are restricted to America, at north, in the USA and at southern hemisphere, in Argentine. The native isolate from Argentine, currently included in the fungal entomopathogenic collection of the CEPAVE, has been investigated since two decades ago. In this way, for *L. chapmanii* was determinate a host range also its safety against non-target species. Some optimal environmental conditions for its infection and development on mosquito larvae under laboratory and semi field conditions were also determined.

Meanwhile, the mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) of great importance for being the main vector of diseases such as yellow fever, dengue, Chikungunya fever, among others, inhabit anthropic environments, being present in domiciliary and peri- domiciliary areas. The control of their populations is a must.

In the present research work, two fundamental aspects of the knowledge of *L. chapmanii* were focused. On one hand, ecological aspects such as parasitism, persistence and dispersion in environments where naturally take place larvae of *Ae. aegypti*; the effect of UV-A radiation on its virulence, and its compatibility with other insecticides. The other view was more practical, involved the realization of assays in pro to develop products based on this entomopathogenic microorganism and also, to improve its massive production, storage and application as biocontrol agent of mosquitoes.

Among the results, we found that the persistence and pathogenicity of *L. chapmanii* against larval population of the mosquito decreased over time with variations between different location areas. Thus, larval mortality was significantly lower ($p < 0.05$) in the containers located in a peri domestic (outdoor) area without protection to radiation (89 % at first week and 9 % at sixth week) compared with mortality in the containers located inside (97 % at first week and 42 % at sixth week) and outdoor with sunscreen (89 % at first week and 29 % at sixth week), suggesting some kind of influence of solar radiation on the viability and virulence of the entomopathogenic microorganism.

From the tests performed in order to evaluate the ability of dispersion of this pathogen, were not evidenced its spread capacity by air or associated to mosquito population dynamics. In aquatic environment was observed a low dispersion capacity of zoospores.

Based on the previous results and in order to elucidate any effect of solar radiation on the production, virulence and pathogenicity of *L. chapmanii* zoospores, we performed assays exposed to UV-A radiation, dead larvae of *Ae. aegypti* by the action of *L. chapmanii* and before its zoosporegenesis, as well as free zoospores in suspension. The results obtained showed that dead larvae protected the zoosporangium structures and free zoospore during the UV-A exposure, without differences in the production of zoospores at least under our exposure times. Meanwhile, the virulence of free zoospores in suspension decreased with the increased exposure to UV-A radiation.

For *in vitro* culture tests with the synthetic medium Emerson YPss and PYG and with the alternative medium based on sunflower seed (ESG), a lower rate of growth by *L. chapmanii* occurred in the solid medium ESG compared to the other two. However a greater biomass was developed in this medium (ESG) in both solid and liquid state, and also the most rapid production of zoospores was obtained. Another comparative advantage in the use of the ESG culture medium was the lower cost of production, being an alternative for the future massive production of the pathogen. In the meanwhile, in recent assays about the mass production of *L. chapmanii* in a bioreactor with PYG liquid medium, the microorganism grew up with a suitable pattern for further manipulation. In the pathogenicity tests performed with the harvested product and *Ae. aegypti* larvae, they presented preliminary good results. It should be noted that larger trials are needed to make more accurate conclusions in this regard.

Assays of formulation in calcium alginate matrix were performed with *L. chapmanii*, finding that the encapsulated mycelium never was infective; the encapsulated zoospores lost rapidly their infective capacity and the pathogen was not able to penetrate the physical barrier generated by calcium alginate. In the tests with agriculture substrates used as material for storage and application of *L. chapmanii*, the vermiculite showed better results than sand and forest mulch, yet its lifetime failed a week.

In order to determine the compatibility of *L. chapmanii* and other larvicide products, we compared the development of this microorganism on solid culture media with different concentrations of diflubenzuron and neem oil. Results showed a reduction in the *L. chapmanii* growth rate on solid culture media with the higher concentration of diflubenzuron and neem oil, without implications in the viability and virulence of the zoospores produced.

Finally we evaluated the loss of *L. chapmanii* virulence by its prolonged maintenance in solid culture medium. Assays were performed starting from pathogen isolations on PYG agar from *Ae. aegypti* infected larvae. The production of zoospores and their virulence and pathogenicity against *Ae. aegypti* was evaluated every two weeks. Results showed a reduction in the zoospore production over time without loss of the viability and virulence of these structures at least during the study time.

With these series of assays, we expanded the knowledge about *L. chapmanii* as a pathogen of mosquito larvae, confirming its potential as biocontrol agent, although much remains to deepen.

A black and white micrograph showing a cell with a prominent, dark, circular nucleus. The cell is surrounded by numerous fine, hair-like cilia or microvilli. The background shows some fibrous or structural elements, possibly part of a larger tissue or organ.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Aedes aegypti (= *Stegomyia aegypti*), (Linnaeus, 1762)

Descripción general y posición taxonómica

El mosquito conocido vulgarmente como “mosquito del dengue” o “mosquito de la fiebre amarilla” (entre otros), corresponde a la especie *Aedes aegypti*, clasificada tradicionalmente dentro de la familia Culicidae, Género *Aedes*, Subgénero *Stegomyia*. La familia Culicidae incluye cerca de 3.500 especies pertenecientes a dos subfamilias, Anophelinae y Culicinae (Harbach, 2007). En la más reciente clasificación de mosquitos (2013), la especie *Ae. aegypti* fue reposicionada según relacionamiento filogenético elucidado por Reinert et al. (2009) y validado por Harbach, correspondiendo así a *Stegomyia aegypti*, dentro de la misma familia y tribu, variando a nivel del género (*Stegomyia*) (Fig. 1). Cabe anotar que por practicidad, a lo largo del presente documento, se utilizará el nombre científico de la clasificación tradicional (*Ae. aegypti*).

Clasificación		
	Tradicional ¹	Nueva ²
Reino	Animalia	Animalia
Filo	Arthropoda	Arthropoda
Clase	Insecta	Insecta
Orden	Diptera	Diptera
Familia	Culicidae	Culicidae
Tribu	Aedini	Aedini
Género	<i>Aedes</i>	<i>Stegomyia</i>
Sub. Género	<i>Stegomyia</i>	<i>Stegomyia</i>
Especie	<i>Ae. aegypti</i>	<i>St. aegypti</i>

Figura 1. Clasificación taxonómica de *Ae. aegypti*. Información extraída de “New mosquito classification (2013)”, Walter Reed Biosystematics Units. (1): Knight & Stone, 1977. (2): Reinert et al., 2009. <http://www.mosquitocatalog.org/>

Ciclo de vida

El ciclo de vida está compuesto por dos etapas. La fase acuática que inicia con la postura de los huevos por parte de las hembras sobre la línea de agua, el posterior desarrollo larval que comprende tres mudas del exoesqueleto, dando lugar a 4 estadios larvales y la

pupación. La fase terrestre hace referencia a los organismos adultos. Dependiendo de factores ambientales como la disponibilidad de alimento y la temperatura, la etapa acuática puede tomar entre 8 y 12 días. Por su parte, los mosquitos adultos pueden vivir varias semanas según las condiciones ambientales (Maricopa County Environmental Service, 2006), siendo más longevas las hembras que los machos (Fig. 2).

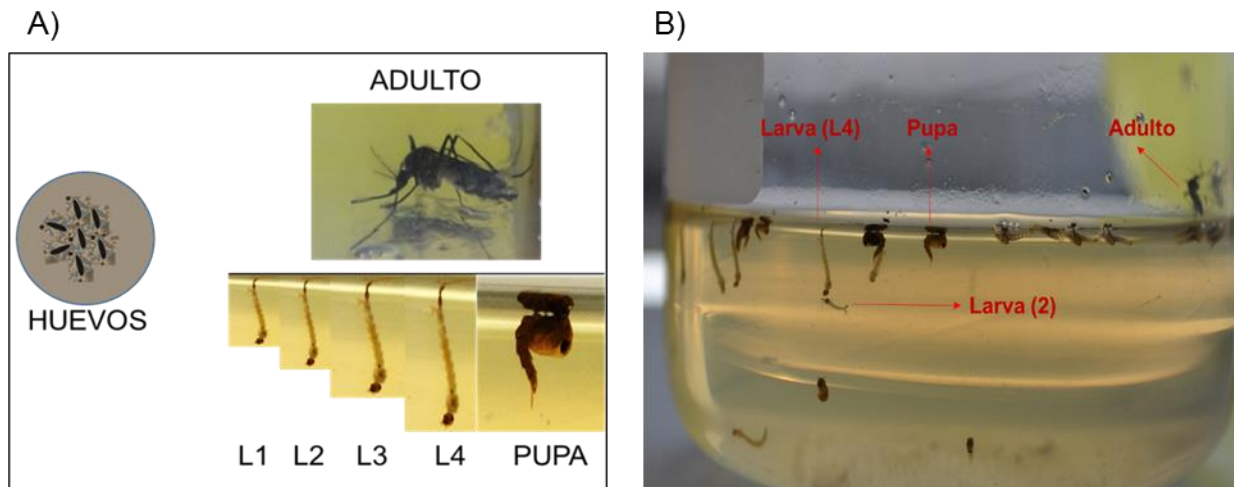


Figura 2. Ciclo de vida de *Ae. aegypti*. (A) Representación de los diferentes estados del desarrollo. (B) Diferentes estados del desarrollo en un mismo ambiente acuático.

Características morfológicas

Los individuos de *Ae. aegypti* son holometábolos, presentando metamorfosis completa. Los juveniles son de hábito acuático y atraviesan cuatro estadios larvales y una posterior pupación, siendo anatómicamente diferentes a los adultos. Igualmente presenta cambios drásticos en cuanto a su hábitat, comportamiento y alimentación (Clements, 1992), (<http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/mlifecycle.html>).

Huevo

La hembra de *Ae. aegypti* oviposita sobre la línea de agua en los contenedores, colocando entre 50 y 500 huevos por postura (Fig. 3). Los embriones se encuentran individualmente protegidos por una cutícula cerosa que en principio es blanda y maleable, endureciéndose posteriormente por esclerotización. Los huevos pueden permanecer viables por semanas o meses bajo condiciones de sequía, activándose al entrar en contacto con el agua cuando el nivel en los contenedores se incrementa. De esta manera, se inicia el

desarrollo embrionario con un aumento en el tamaño y peso de los huevos. Al eclosionar se fragmentan tanto el corion como la cutícula cerosa y las larvas inmediatamente nadan hacia la superficie del agua en busca de oxígeno atmosférico, el cual captan a través de sus espiráculos (Clements, 1992).

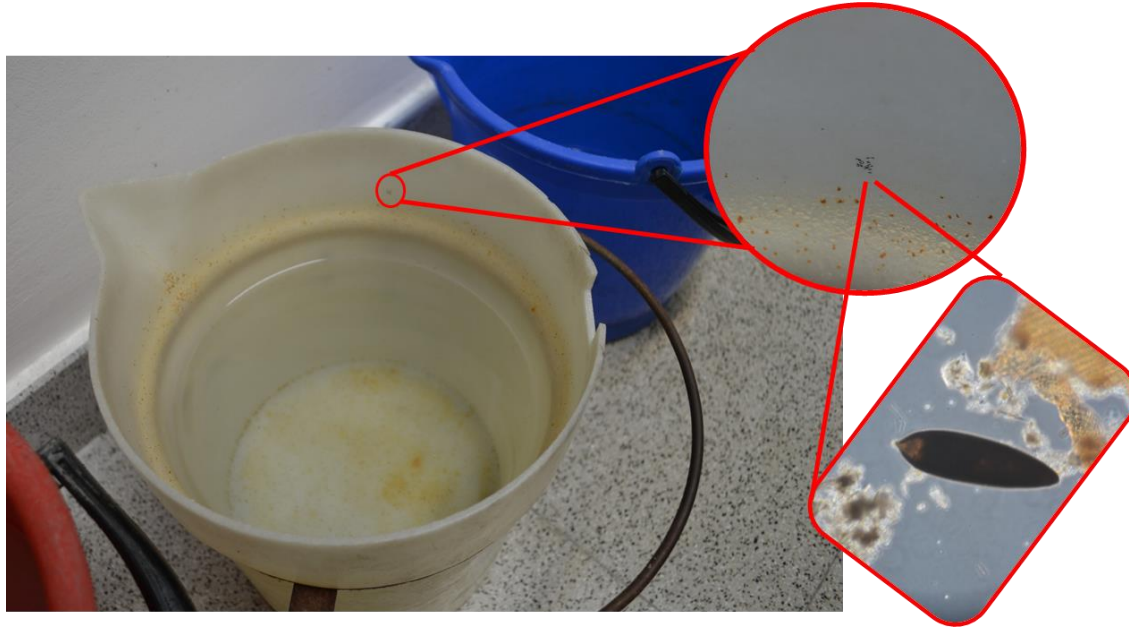


Figura 3. Huevo de *Ae. aegypti*. Ovoposición en un balde plástico con agua.

Larvas

Como se mencionó previamente, los estadios larvales se desarrollan en medio acuático, manteniéndose cerca de la línea de agua para respirar a través de los espiráculos situados al final del sifón presente en la parte posterior del abdomen. Su desarrollo comprende 4 estadios larvales (L1 a L4) en donde las estructuras corporales esclerotizadas y duras, como son la cápsula cefálica y el sifón, incrementan en talla inmediatamente después de cada ecdisis, mientras que la región corporal aumenta en tamaño lentamente y durante cada estadio, mudando el exoesqueleto una vez que se alcanza la talla del mismo. El crecimiento y desarrollo de las larvas se ve influenciado por el alimento disponible, la densidad larval en el medio y factores ambientales como temperatura y salinidad (Nelson, 1986). La dieta es basada en material particulado que incluye detritos en suspensión o adheridos a las superficies, así como bacterias y algas entre otros microorganismos (Laird, 1988). El tamaño particular del alimento depende del estadio larval y por ende de la talla de los individuos (Fig. 4).

Pupa

Este estado, totalmente acuático suele estar en superficie gracias a la flotabilidad que le da un apéndice con aire en su interior. Para su desplazamiento, cuenta con dos aletas en la parte posterior del abdomen. Su respiración se da a través de espiráculos presentes en la parte media del tórax en forma de trompeta. Durante esta fase, se destruyen algunos órganos presentes en la larva, desarrollando los órganos del adulto a partir de células embrionarias no diferenciadas (Clements, 1992).

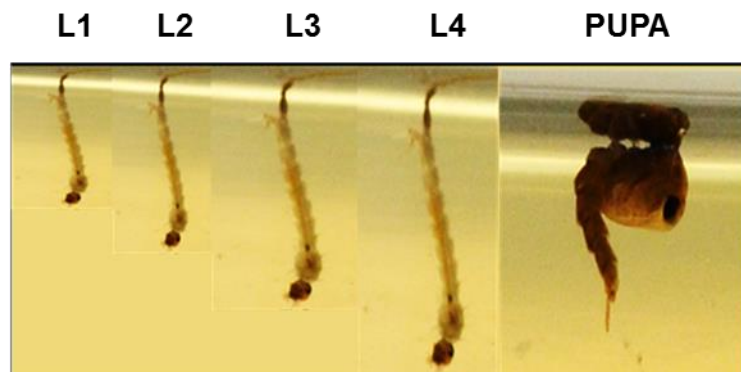


Figura 4. Estados acuáticos de *Ae. aegypti*. Los cuatro estadios larvales (L1 –L4) y el estado de pupa.

Adulto

El imago o estado adulto del insecto emerge del agua al romper el exoesqueleto de la pupa. El cuerpo es alargado con patas y alas igualmente largas. Los adultos de *Ae. aegypti* poseen un patrón de color oscuro, con manchas blancas conspicuas y bandas blancas en las patas. El escudo tiene un patrón dorsal de escamas de color blanco en forma de 'lira' con lateral curva y 2 franjas centrales en contraste con el revestimiento general de escamas oscuras estrechas (Clements, 1992). Presenta dimorfismo sexual, siendo las hembras de mayor tamaño que los machos. Se alimentan mediante una larga probóscide que sirve para alcanzar los néctares de plantas y frutos. En el caso de las hembras la probóscide esta igualmente adaptada para perforar la piel de los animales con el fin de alcanzar la sangre de los vasos periféricos. Las hembras requieren de sangre para el desarrollo del vitelo que servirá como fuente de energía para el desarrollo embrionario (Clements, 1992) (Fig. 5).



Figura 5. Estado adulto de *Ae. aegypti*.

Ecología y distribución de *Ae. aegypti*

Aedes aegypti es una especie proveniente del continente africano, con origen previo al *Homo sapiens*. Más recientemente en la historia, esta especie sufrió un proceso de domesticación a raíz del desplazamiento y asentamiento de las poblaciones humanas, existiendo actualmente poblaciones nativas remanentes en África. Los individuos de estas poblaciones remanentes pertenecen a la subespecie *formosus* (*Ae. aegypti formosus*) y presentan diferencias morfológicas y ecológicas respecto a *Ae. aegypti aegypti*, siendo los adultos de esta subespecie más oscuros, se alimentan de animales (no humanos) y sus estados acuáticos tienen lugar principalmente en huecos de los árboles y ambientes no antrópicos (Powell & Tabachnick, 2013).

Por su parte, la especie domesticada se dispersó por el mundo durante los siglos XVI y XVII a consecuencia de los viajes expansionistas y colonizadores desde el continente europeo hacia el nuevo mundo, y el tráfico de esclavos provenientes de África (Christophers, 1960). Actualmente, presenta una distribución mundial, encontrándose principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Fig. 6). Su distribución ha variado a lo largo del tiempo en respuesta a las estrategias de control y erradicación implementadas por el hombre (Gubler & Clark, 1996).

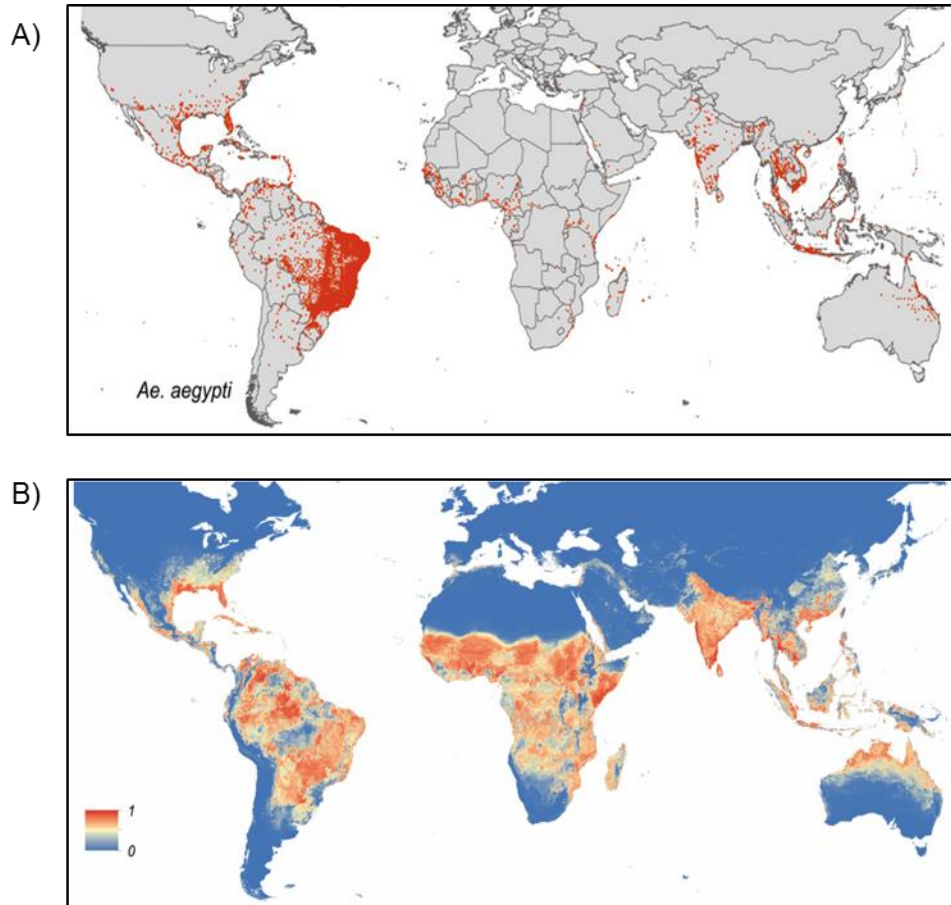


Figura 6. Distribución geográfica actual de *Ae. aegypti*. A) Registros puntuales de la presencia de *Ae. aegypti* (Kraemer et al., 2015a). B) Modelamiento de la distribución posible para *Ae. aegypti* según las condiciones climatológicas globales (Kraemer et al., 2015b).

Aedes aegypti suele mantenerse en ambientes antrópicos, siendo peri domiciliario con limitada capacidad de dispersión. El hombre así como los animales domésticos son fuente de alimento para las hembras. Recipientes como cubiertas de autos, baldes, latas y contenedores plásticos, presentes en estos ambientes y en capacidad de almacenar agua, son lugares propicios para el establecimiento y desarrollo de los estados acuáticos (Rey, 2006). Al interior de las viviendas, los adultos suelen habitar lugares oscuros y frescos como guardarropas y gavetas. Son de hábito principalmente diurno y es usual que las hembras se alimenten de múltiples individuos durante un mismo ciclo gonotrófico. Es muy difícil su erradicación por la alta resiliencia que presenta al estar tan bien adaptado a diferentes ambientes. En época de sequía, sus huevos pueden permanecer adheridos a los recipientes durante largos periodos de

tiempo, manteniéndose viables hasta que las condiciones ambientales mejoran (Clements, 1992).

***Aedes aegypti* como vector de patógenos**

Esta especie es el principal vector de arbovirosis de gran importancia por su impacto en las poblaciones humanas, en donde se destacan históricamente la fiebre amarilla y el dengue, así como más recientemente la fiebre Chikungunya (Morrison et al., 2008). Estas enfermedades comprenden una dinámica interacción entre el virus y las poblaciones del vector y huésped. El ciclo inicia cuando el vector se infecta mediante la ingesta sanguínea de un huésped virémico, multiplicándose el virus en su interior. Posteriormente, cuando la hembra se alimenta nuevamente de sangre, transmite las partículas virales a los nuevos hospederos. Aunque la transmisión de estos virus entre los individuos de una población de mosquito es usualmente de tipo horizontal, existen estudios que afirman la transmisión vertical de los mismos (Rosen et al., 1983). El riesgo de transmisión a los hospederos está en relación a la densidad poblacional del vector, el tipo de alimentación y la eficiencia con la que puedan transmitir el virus (competencia vectorial), entre otros factores (Kuno & Chang, 2005).

La fiebre amarilla es una dolencia que ha afectado mundialmente a la población humana desde hace varios siglos. Es causada por un *Flavivirus* (Fam. Flaviviridae) transmitido principalmente por *Ae. aegypti*. Durante el siglo XIX su control y prevención en el continente americano, estuvo sujeto a programas establecidos y liderados en su mayoría por la Organización Mundial de la Salud (OMS), articulando esfuerzos entre los diferentes países de la región. De esta manera, a inicios del siglo XX, las poblaciones del vector en el continente americano se redujeron considerablemente, siendo erradicada prácticamente mediante la eliminación de los criaderos. Posteriormente en la década de 1930, el desarrollo de una vacuna contra esta dolencia, generó cambios en las estrategias de control, descuidándose el manejo poblacional del vector (Rogers et al., 2006).

El dengue por su parte, es considerada la enfermedad vírica transmitida por artrópodos más importante a nivel mundial por el elevado número de personas que la padecen cada año. Existen cuatro serotipos del virus del dengue, clasificados dentro de los *Flavivirus* (Fam. Flaviviridae). El mosquito *Ae. aegypti* es el vector primario en el continente americano (García et al., 2002). La distribución de los cuatro serotipos del virus del dengue ha aumentado en las últimas décadas (Jansen & Beebe, 2010) (Fig. 7). La veracidad en su diagnóstico se dificulta

debido a que además de pruebas clínicas y serológicas, es indispensable el aislamiento del virus para su determinación. Por lo anterior, su diagnóstico es basado en el cuadro sintomático que presenta el paciente, siendo este similar al de otras enfermedades virales (Holmes et al., 1998). Puede manifestarse como **dengue clásico** con los síntomas de una “fiebre rompe huesos”, o como **dengue grave**, afectando varios órganos, llegando a ser mortal. Los esfuerzos para su control son mayormente encaminados hacia la regulación de las poblaciones del insecto vector, puesto que actualmente no existe una vacuna (OMS, <http://www.who.int/topics/dengue/es/>).

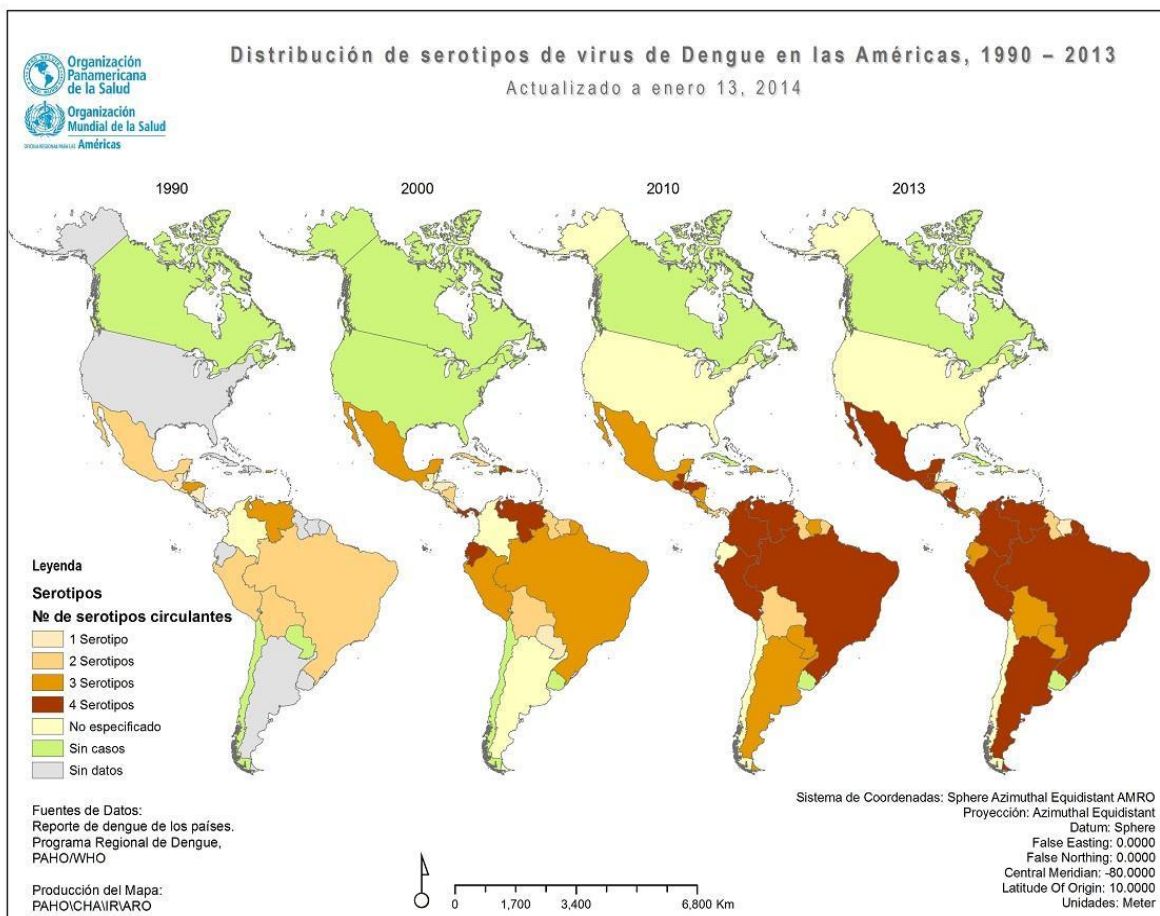


Figura 7. Distribución de los cuatro serotipos del virus del Dengue en el continente americano. Programa regional de Dengue PAHO/WHO.

En la República Argentina, luego de haber sido erradicado a fines de la década del 60, fue citada nuevamente la presencia de este mosquito en 1986. Actualmente el vector está bien establecido en por lo menos 15 provincias argentinas, constituyendo Buenos Aires y La Pampa

el límite sur de la distribución (Min. Salud, 2009a). Los cambios climáticos que ha experimentado el planeta en las últimas décadas constituye una de las principales causas de la expansión geográfica de muchos insectos vectores (Mills et. al., 2010; Tabachnick, 2010). Las consecuencias de los brotes epidémicos en la región han sido enormes, con pérdida de vidas, incrementos importantes en los gastos sanitarios, gastos en campañas de control y cuantiosas pérdidas en horas laborales. Algunos casos de dengue se registran en la Argentina desde 1997-98, habiendo alcanzado valores importantes durante el verano-otoño de 2009 (Min. salud, 2009b).

La fiebre Chikungunya es una enfermedad generada por un virus RNA perteneciente a la familia Togaviridae. Es transmitido al ser humano por los mosquitos *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Fue descrito en 1952 en Tanzania, propagándose desde allí y a lo largo de estas décadas a través del continente africano, Asia, Europa, las islas del Caribe y el continente americano. Los síntomas de esta dolencia comprende fiebre acompañada de dolores articulares y de huesos (OMS, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/>).

Control de *Ae. aegypti*

En América Latina y como se mencionó previamente, la OMS así como la Organización Panamericana de la Salud (OPS) han liderado históricamente programas para el control y prevención de enfermedades transmitidas por artrópodos, incluyendo entre las estrategias medidas para la erradicación de los vectores. A lo largo del siglo XX se presentaron tres grandes momentos en el control del dengue, durante 1948 y 1972, las poblaciones del mosquito fueron controladas en 21 países. En 1981 mediante la aplicación de productos químicos se controló la población del mosquito en Cuba y en Singapur. Sin embargo, debido a la falta de continuidad en los programas y en sumatoria a la resistencia adquirida en las poblaciones del mosquito frente a los químicos tradicionalmente utilizados, las poblaciones se restablecieron, aumentaron y se dispersaron, presentándose brotes epidemiológicos en diferentes países durante las últimas décadas (Brathwaite et al., 2012).

Por su parte, el concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP), se basa en la aplicación de diferentes métodos de control con el fin de mantener a las poblaciones de la plaga en niveles adecuados, con menores implicancias en el ambiente. De esta manera, dentro de las estrategias en el control de mosquitos vectores, se habla del control cultural o preventivo, así como control químico y biológico de las poblaciones larvales y de adultos (Floore, 2006).

Control cultural

Esta práctica hace alusión a la toma de medidas preventivas por parte de las poblaciones humanas. Mediante la eliminación de recipientes y demás posibles hábitats para el desarrollo de los estados acuáticos, se minimizan las poblaciones del mosquito. El uso de tapas y coberturas en malla para piletas y tanques de almacenamiento impiden el libre desarrollo de las larvas. Otras prácticas culturales involucran el uso de trampas para los adultos, la implementación de barreras mecánicas como mallas en ventanas y toldos al dormir así como el uso de productos repelentes aplicados al ambiente y a nivel corporal (OMS, http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/environmental_management/es/).

Control químico

Según la población a controlar, existen productos larvicidas y adulticidas, con diferente composición y principio activo. El uso de productos químicos como los piretroides y organofosforados, en el control de mosquitos es una práctica ampliamente usada por la rapidez en cuanto a sus resultados. Sin embargo el desarrollo de resistencia por parte de las poblaciones a controlar, ha generado un aumento en las dosis de aplicación y/o el uso de productos más agresivos y tóxicos, nocivos para el medio ambiente, las poblaciones animales, vegetales y humanas (Grupo de extensión (IFAS) de la Universidad de Florida, http://mosquito.ifas.ufl.edu/Integrated_Mosquito_Management.htm). Por lo anterior, desde hace unas décadas se han venido desarrollando productos menos agresivos, utilizando extractos vegetales como ingrediente activo. Es el caso y por ejemplo de productos a base de aceite de neem (*Azadirachta indica*) (Ghosh et al., 2012).

Control biológico

Esta estrategia de control, aprovecha las relaciones ecológicas existentes entre los mosquitos (en sus diferentes estados del desarrollo) y otros organismos. De esta manera, encontramos el uso de predadores, parásitos y/o patógenos en el control de larvas y adultos (OMS, http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/biological_control/es/). Para el control de los estados adultos, se ha probado la acción de hongos entomopatógenos tales como *Metarizhium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (1883) y *Beauveria bassiana* (Bals.– Criv.) Vuill. (1912), entre otros (Scholte et al., 2004). En el control de las larvas, la bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* es el microorganismo mayormente utilizado. La introducción de

predadores naturales como peces y artrópodos con estadios larvales de hábito acuático, ha sido realizada en cuerpos de agua con fines recreativos (ej. lagos de pesca) y tanques reservorios (OMS, http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/biological_control/es/). Respecto a *Lagenidium giganteum* (Couch), un Oomycete emparentado filogenéticamente con *L. chapmanii* y que presenta similitud en cuanto a su modo de acción y especificidad por las larvas de mosquitos, existe una serie de trabajos previos en laboratorio y en campo, alcanzando en una instancia al desarrollo de un producto comercial (Iaginex™, AgraQuest, David, CA; US). El uso de nematodos y virus ha sido también implementado dentro de las estrategias de control biológico. De esta manera, la implementación de estrategias con agentes de control biológico en la regulación poblacional de los organismos vectores, ha sido contemplada como amigable con el ambiente, ya que no presenta mayores riesgos para la naturaleza ni poblaciones humanas. Dentro de los inconvenientes reportados en la implementación de estrategias de control biológico, se encuentra la variabilidad en su eficiencia, efectividad y velocidad de acción, a causa de factores externos como son la presencia de sustancias tóxicas o las condiciones meteorológicas locales (Lacey et al., 2001).

***Leptolegnia chapmanii* (Seymour, 1984)**

Clasificación taxonómica y descripción morfológica

Taxonómicamente *L. chapmanii* se encuentra clasificada dentro de los Peronosporomycetes (Oomycetes) en el reino Straminipila (Fig. 8). Denominados durante mucho tiempo como Oomycetes -significando su nombre “Hongo huevo”-, por la forma de huevo que presenta el gametangio femenino u oogonio. Vulgarmente son conocidos como mohos, siendo considerados en la actualidad como “pseudo hongos” al presentar crecimiento filamentosos similar al de los hongos. A diferencia de estos últimos, no poseen quitina en su pared celular, estado ésta compuesta principalmente por celulosa. Dentro de ésta clasificación, existen especies con hábitos saprófitos así como patógenos que afectan plantas y/o animales. Carecen de cloroplastos pero evolutivamente se encuentran estrechamente emparentados con algas fotosintéticas como las diatomeas (Adl et al., 2005).

<u>Species 2000 & ITIS Catalogue of</u> <u>Life: April 2013</u> <u>view in classification</u>	Species	<u>Chromista +</u> <u>Oomycota +</u> <u>Oomycetes +</u> <u>Saprolegniales +</u> <u>Leptolegniaceae +</u> <u>Leptolegnia +</u> <i>Leptolegnia chapmanii</i> R. L. Szym. 1984
---	---------	---

Figura 8. Clasificación taxonómica de *L. chapmanii*. Tomado de la página web: “<http://eol.org/pages/1028653/names>”

Leptolegnia chapmanii es una especie monoica, con micelio difuso y extenso (Fig. 9 A). Presenta hifas delgadas, moderadamente ramificadas. Los esporangios filamentosos, son alargados a menudo ramificados. Sus esporas, denominadas como zoosporas, son dimórficas, dispuestas en una, dos o tres filas hacia la sección media de los esporangios. Su descarga y comportamiento son típicos de *Leptolegnia* sp. Las zoosporas primarias presentan forma cilíndrica, tornándose redondas cuando se enquistan (13-15 μm de diámetro) (Fig. 9 B). Las zoosporas secundarias poseen entre 10-14 μm . Puede presentar abundantes gemaciones, variables en forma, pero a menudo grande e hinchadas. Los oogonios se desarrollan principalmente en la parte lateral, raramente en la parte terminal o intercalado. Son esféricos u obovados de entre (26 -) 38-42 (-63) μm de diámetro, con ornamentaciones exclusivas en su pared. Estas ornamentaciones son proyecciones papilares pequeñas, delgadas, largas, rectas o curvas. Las hifas que sostienen al oogonio son de (0,25) 0,5 a 0,75 (-1,25) veces el diámetro del oogonio en longitud, son robustos y rectos, rara vez curvado o ramificado (Fig. 9 C, D). Las oosporas poseen diámetros entre (18 -) 36-40 (-52) μm ; raramente maduran y pueden presentar de una a tres gotas lipídica a nivel subcéntrico o excéntrico rodeada por ooplasma. De presentarse ramas anteridiales, suelen ser diclinas, monoclinas o andróginas, delgadas, ramificadas o sin ramificar, rara vez persisten. Usualmente, una sola por oogonio. Presenta células anteridiales simples, tubulares o cortas claviformes, a veces fuertemente inclinadas, raramente persisten. No se han observado tubos de fertilización. *L. chapmanii* crece en semillas de cáñamo así como en larvas de mosquito, y muy raramente produce oosporas (Seymour, 1984).

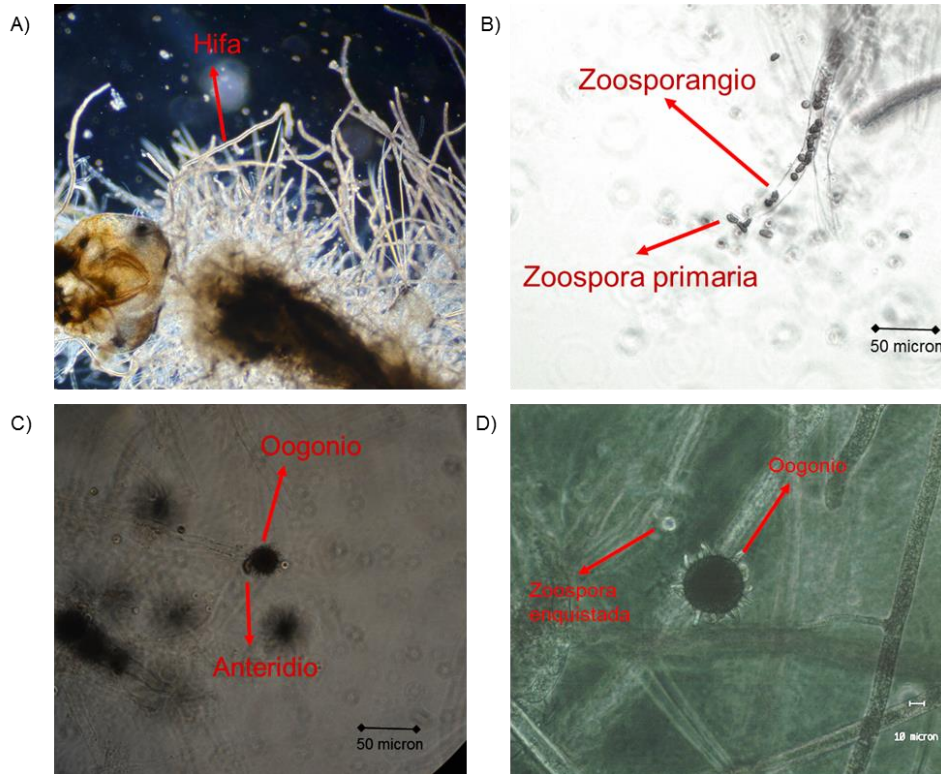


Figura 9. *Leptolegnia chapmanii*. A) Desarrollo hifal de *L. chapmanii* al interior y exterior de una larva de *Ae. aegypti*. (B, C y D) Estructuras reproductivas de *L. chapmanii*.

Ciclo de vida y modo de infección

Como entomopatógeno de mosquitos, *L. chapmanii* presenta un ciclo de vida que abarca el desarrollo vegetativo al interior de la larva y el posterior desarrollo de estructuras infectivas asexuales (zoosporas) y sexuales (oosporas) (Fig. 10). Las zoosporas ingresan a las larvas a través de la cutícula o a lo largo del tracto digestivo cuando son ingeridas por las mismas. Externamente, cuando las zoosporas se adhieren a la cutícula, se desarrolla un tubo germinativo que la atraviesa hasta llegar a la cavidad hemocélica. Desde el interior de la larva, el mismo proceso se presenta con las zoosporas primarias o secundarias enquistadas que han sido ingeridas. En ambos casos, se presenta el desarrollo de las hifas en la cavidad, siendo mortal para la larva. Durante las 12 primeras horas del desarrollo de *L. chapmanii*, las larvas continúan vivas, presentando melanización de las hifas así como de tejidos circundantes, como respuesta ante la infección. Una vez que *L. chapmanii* invade la totalidad del cuerpo, se desarrollan hifas que emergen y forman zoosporangios en donde se originan las zoosporas primarias (Zattau & McInnis, 1987; Lord & Fukuda, 1988). Las zoosporas descargadas suelen

enquistarse luego de algunos minutos, re-emergiendo luego de algunas horas como zoosporas secundarias, las cuales nadan activamente en busca de nuevas larvas que infectar (Pelizza et al., 2008).



Figura 10. Desarrollo de *L. chapmanii* en una larva de *Ae. aegypti*.

Trabajos previos con *L. chapmanii*

En 1984 fue descrita por Seymour, siendo considerada como una especie nueva. Fue nombrada *Leptolegnia chapmanii* en honor al Dr. Harold C. Chapman, por ser quien la encontró en larvas de *Aedes triseriatus* (Say) procedentes de Lake Charles en Louisiana en 1971. En 1975 se encontró nuevamente parasitando larvas de mosquito en Carolina del Sur, USA (Muehleisen, 1977). Su acción como agente de control biológico fue estudiada mediante el desarrollo de pruebas de virulencia con larvas de *Ae. aegypti* en los diferentes estadios larvales, encontrando mortalidad del 100% en larvas L1 y L2 después de 24 h así como del 40 % en larvas L3 y L4 post 72 h (McInnis & Zattau, 1982). En cuanto al rango de hospedadores, se probó la virulencia con diferentes organismos acuáticos, encontrando gran patogenicidad específica hacia los mosquitos y nula acción patogénica frente a especies no blanco pertenecientes a los órdenes Odonata, Thichoptera, Plecoptera, Coleoptera y Cladocera (McInnis & Schimmel, 1985). Adicionalmente, se evaluó su virulencia sobre 15 especies de

mosquitos, corroborando su patogenicidad entre 24 y 72 h post infección (Nnakumusana, 1986). Su ciclo de vida fue estudiado en detalle así como las vías de ingreso de sus zoosporas (a través de la cutícula y del tracto digestivo) en larvas de *Culex pipiens* (L.) (Zattau & McInnis, 1987; Lord & Fukuda, 1988). Se evaluó su tolerancia a la salinidad con el fin de determinar su potencial como patógeno de vectores con hábitats acuáticos salinos, comparando el desarrollo vegetativo así como la producción de zoosporas bajo diferentes concentraciones de sal. De esto, se encontró que concentraciones mayores de 5 partes por mil afectan el desarrollo del micelio, el cual es nulo a partir de 20 partes por mil. La producción de zoosporas es más sensible a la salinidad, siendo inhibida a concentraciones cercanas a las 4 partes por mil (Lord & Fukuda, 1988).

En América del Sur, *L. chapmanii* se aisló e identificó por primera vez en 1996 a partir de larvas del mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Macquart) procedentes el partido Melchor Romero en vecindad de la Ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires (López Lastra et al., 1999). Este aislamiento fue incluido en la colección de Hongos Entomopatógenos del CEPAVE con número de registro CEP 010 así como en la Colección de Hongos Entomopatógenos del servicio de investigación agrícola (ARSEF, Agricultural Research Services – Entomopathogenic fungi) con registro número ARSEF 5499. De manera similar a lo experimentado previamente con el aislamiento norteamericano, se confirmó la patogenicidad del aislamiento argentino en 12 especies de mosquito. Igualmente se comprobó su inocuidad sobre especies acuáticas no blanco pertenecientes a los órdenes Crustacea, Odonata, Diptera (Fam. Psychodidae, Ceratopogonidae), Coleoptera, Nematoda y Vertebrata (Pisces y Amphibia). Por su parte, *L. chapmanii* presentó bajos niveles de patogenicidad sobre organismos pertenecientes a la familia Chironomidae (López Lastra et al., 2004). En ensayos de patogenicidad con *L. chapmanii* mantenida en aguas procedentes de diferentes ambientes acuáticos, se encontró una leve variación en la mortalidad de las larvas de *Ae. aegypti* según las características de las aguas (Pelizza et al., 2008).

Desde su aislamiento, este entomopatógeno ha sido mantenido *in vivo* en larvas de *Ae. aegypti* así como *in vitro* en diferentes medios de cultivo sólidos. Con el fin de determinar su potencial como agente de control biológico, se han realizado diferentes estudios bajo condiciones de laboratorio. De esta manera se observó que el rango de temperatura en el cual *L. chapmanii* presenta actividad va entre 10 y 35°C, siendo inadecuado a menos de 5°C y más de 40°C. En otros ensayos, la mayor actividad patogénica sobre larvas de *Cx. pipiens* y *Ae.*

aegypti se presentó a 20 y 25°C respectivamente. En cuanto al pH del medio, las zoosporas presentaron actividad patogénica en valores entre 4 y 10. Respecto a la salinidad en el medio, permanecieron viables en medios con concentraciones de NaCl entre 6 y 7 partes por mil, inhibiéndose el desarrollo del micelio a concentraciones superiores a 15 partes por mil (Pelizza et al., 2007b). La relación entre la densidad de las zoosporas por larva, así como la del volumen-área de los contenedores de cría, fueron también estudiados bajo condiciones de laboratorio (Pelizza et al., 2007a). Adicionalmente se encontró que, la temperatura de preservación afecta el tiempo durante el cual las zoosporas permanecen viables, siendo de 5, 51 y 12 días para temperaturas de 10, 25 y 35 °C respectivamente. La mayor producción de zoosporas por larva, se presentó a 25 °C. A partir de material *in vitro*, se encontró que las zoosporas se enquistan entre 17 y 20 minutos después de su liberación, reactivándose o exquistándose cinco minutos post contacto con agua en presencia de larvas de mosquito. Igualmente se determinó que requieren mínimo de 2 minutos para infectar a las larvas y que pueden permanecer viables durante 5 semanas (Pelizza et al., 2008). Se encontró también que la temperatura influencia la producción de oogonios – oosporas, siendo mayor la producción de oogonios a medida que aumenta la temperatura de 0 a 35 °C y nula a partir de los 40°C. En todos los casos fue muy bajo el número de oosporas formadas (Pelizza et al., 2009).



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre el microorganismo *L. chapmanii* como agente de control biológico de mosquitos vectores, se plantearon las siguientes hipótesis:

1. En ambientes antrópicos en donde se presentan naturalmente poblaciones del mosquito *Ae. aegypti*, el microorganismo *L. chapmanii* es capaz de dispersarse así como de persistir en el medio durante varias semanas después de su introducción.
2. La radiación solar es un factor ambiental que afecta la viabilidad de *L. chapmanii* como agente de control de las larvas del mosquito *Ae. aegypti*.
3. Es posible el desarrollo de productos formulados basados en el microorganismo *L. chapmanii* al ser relativamente fácil su manipulación en condiciones de laboratorio y por la prevalencia y persistencia que presenta después de su introducción en recipientes con agua.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial de un aislamiento nativo del entomopatógeno *Leptolegnia chapmanii* como regulador biológico de la densidad poblacional del mosquito vector del dengue, *Aedes aegypti*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el parasitismo, persistencia y dispersión de *L. chapmanii* en poblaciones de *Ae. aegypti* posterior a la introducción del patógeno en hábitats donde se desarrolla naturalmente esta especie de mosquito.
2. Evaluar el impacto producido por la introducción de *L. chapmanii* en poblaciones naturales de *Ae. aegypti*
3. Determinar el efecto de la radiación UV-A en la patogenicidad y viabilidad de las zoosporas producidas por *L. chapmanii*
4. Probar algunas alternativas más económicas y eficientes para la producción masiva del entomopatógeno *L. chapmanii* bajo condiciones óptimas de cultivo *in vitro*.
5. Desarrollar y evaluar formulaciones experimentales con las diferentes estructuras de *L. chapmanii*.
6. Realizar algunas pruebas de compatibilidad entre el entomopatógeno *L. chapmanii* y otros productos larvicidas.









CAPÍTULO I: Actividades de rutina

CAPÍTULO I: Actividades de rutina.

Mantenimiento de la colonia de cría de *Ae. aegypti*

Para el desarrollo de los diferentes ensayos de mortalidad, se emplearon larvas de *Ae. aegypti* provenientes de la colonia de cría mantenida en las instalaciones del CEPAVE. La cría de mosquitos se realizó siguiendo la metodología propuesta en el manual para la cría y técnicas experimentales con mosquitos (Gerberg et al., 1994). El insectario en donde se desarrolló la colonia contó con el equipamiento necesario para el control y manipulación de la temperatura, humedad y fotoperíodo, permitiendo el buen desarrollo de las poblaciones (Tabla 1).

Tabla 1. Variables controladas en el bioterio de cría de *Ae. aegypti*.

Parámetro	Rango	Medidor	Control
<u>Temperatura (°C)</u>	26 - 30	 Sensor electrónico de temperatura y humedad.	  Radiador Estufa eléctrica (Marca: Liliana)
<u>Humedad (%)</u>	70 - 90	 Sensor electrónico de temperatura y humedad.	 Humidificador de ambiente
<u>Fotoperíodo (horas Luz:Oscuridad)</u>	12:12	-	 Timer programable mecánico (Marca: Interelec. Modelo: TS MAZ)

La cría de *Ae. aegypti* abarcó a los diferentes estados del desarrollo. De esta manera, el insectario contó con dos áreas separadas físicamente, en donde se mantuvieron por un lado los estados acuáticos y por el otro a los adultos. A continuación se describe el manejo para los diferentes estados del desarrollo:

Huevos

En las jaulas de cría, los huevos producto de la oviposición por parte de las hembras, fueron colectados mediante la ubicación de papel cartón en el contorno interno de recipientes plásticos con agua hasta el nivel medio de su capacidad. Los papeles con las posturas se dejaron secar durante 2 a 3 horas a temperatura ambiente, siendo posteriormente depositados en bolsas plásticas cerradas con cinta de papel, debidamente rotuladas con la fecha de colecta. Las bolsas se almacenaron en el insectario (Fig. 11).

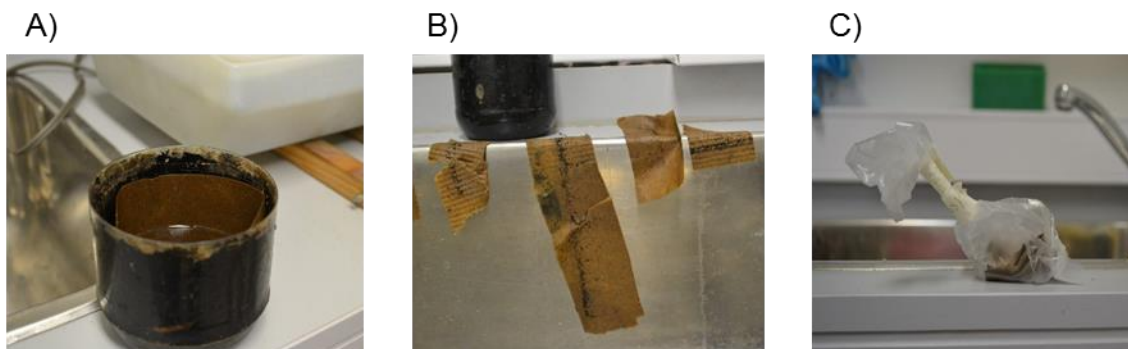


Figura 11. Recolección de los huevos de *Ae. aegypti* en papel cartón. A) Recipiente plástico con papel en su interior para colectar los huevos ovipositados, B) Secado del papel cartón con los huevos colectados, C) Almacenamiento de los huevos en bolsa plásticas rotulada con la fecha de colecta.

Una vez por semana, las posturas más viejas fueron activadas mediante la hidratación de los papeles en bandejas plásticas de 30x60x10 cm³ con agua.

Estados acuáticos

Los cuatro estadios larvales así como las pupas de *Ae aegypti*, se desarrollaron en bandejas plásticas de 1.8 l, con 1.5 l de agua corriente sin cloro. Se utilizó alimento balanceado para conejos como fuente de alimento para las larvas. El mismo fue previamente triturado con ayuda de un triturador doméstico para granos de café. Las pupas fueron extraídas

manualmente con pipetas de plástico e introducidas en recipientes de 800 ml ubicados en las jaulas de emergencia (Fig. 12).

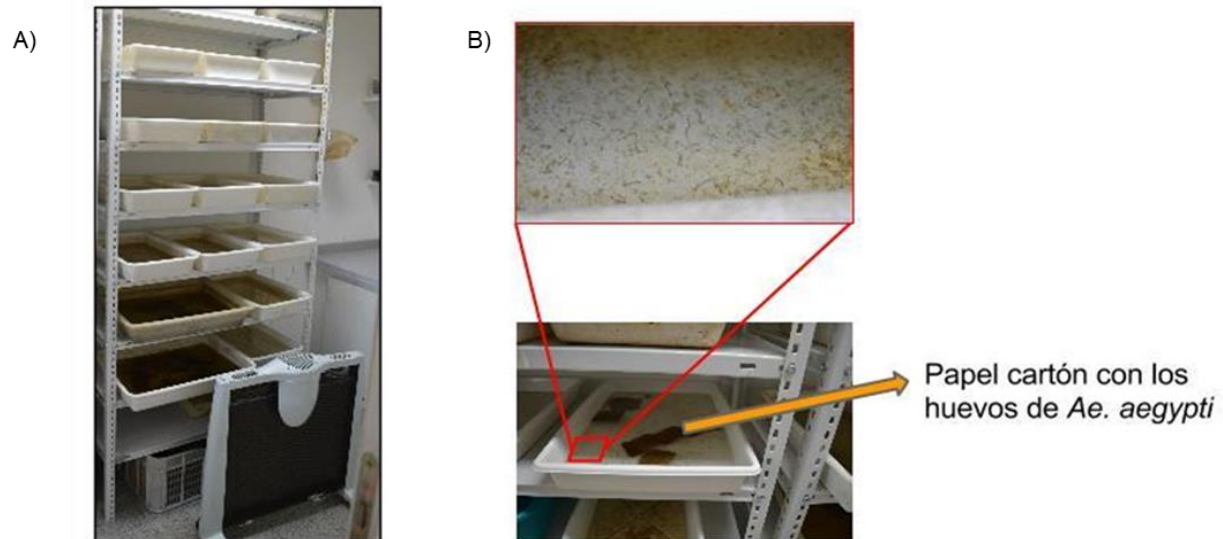


Figura 12. Sección en donde se desarrollaron los estados acuáticos de *Ae. aegypti*. A) Estante con las bandejas. B) Detalle de la bandeja con la colecta de huevos previamente activados y larvas en los primeros estadios del desarrollo. Nótese el alimento empleado.

Estados adultos

Los estados adultos de *Ae. aegypti* emergieron en las “jaulas de emergencia” y fueron posteriormente transferidos a las “jaulas de cría” en donde se les suministró pasas de uva como fuente de hidratos de carbono. Para suplir la necesidad hematófaga de las hembras, dos veces por semana se introdujo en las “jaulas de cría” una gallina inmovilizada durante 30 a 60 minutos según la densidad poblacional de mosquitos. Al retirar la gallina, se ubicaron al interior de la jaula los recipientes plásticos con papel cartón para la colecta de los huevos (Fig. 13). Pasadas 48-72 h se recolectaron los papeles con los huevos, iniciando el ciclo nuevamente.

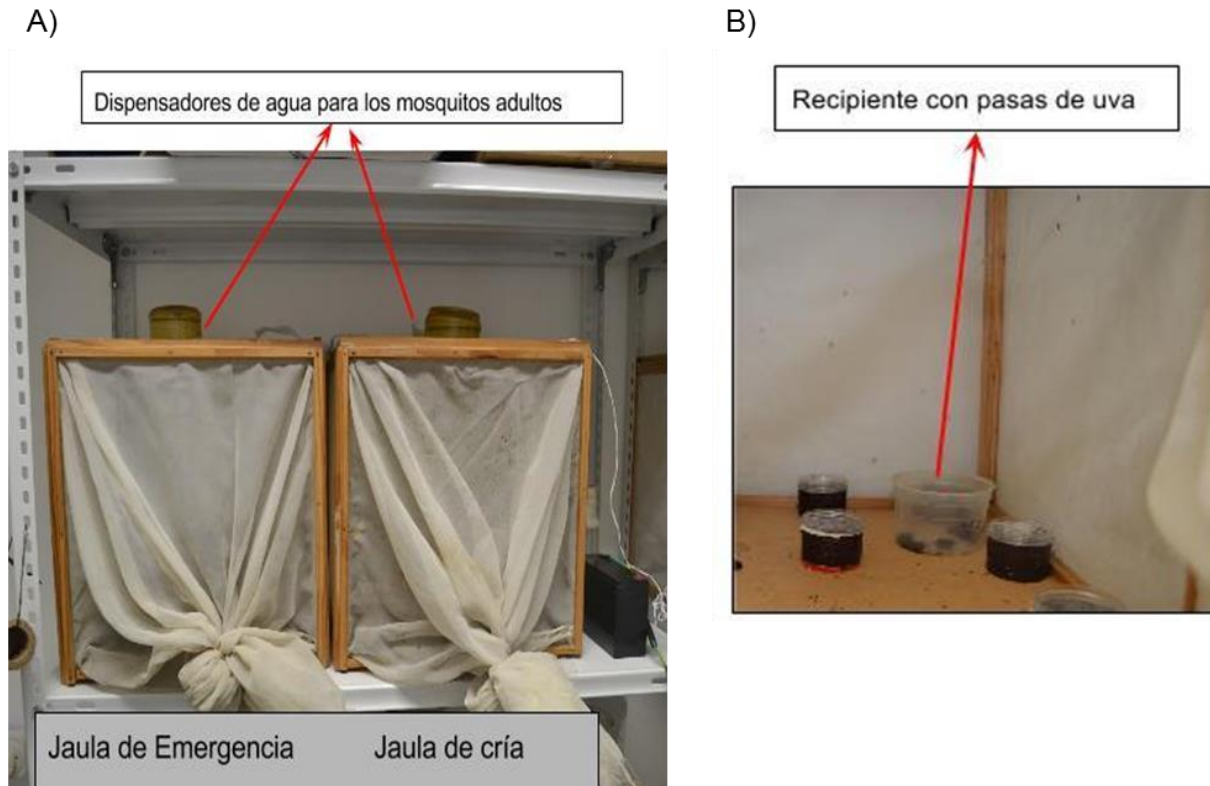


Figura 13. Sección de adultos de *Ae. aegypti*. A) Jaulas de Emergencia y Cría. B) Detalle del interior de la jaula de cría.

Mantenimiento y manipulación de *L. chapmanii*.

Leptolegnia chapmanii (CEP 010) fue mantenido en cajas de Petri de 100 mm de diámetro con medio PYG-agar (Peptona de carne 1.2 g, Extracto de levadura 1.2 g, Glucosa 3 g, Agar 15 g, agua destilada 1000 ml). Cada dos semanas se realizaron repiques bajo la cámara de flujo laminar, siendo posteriormente mantenidos en incubadora a 25 °C. Para el desarrollo de los ensayos de laboratorio, se realizan diferentes manejos de *L. chapmanii*, como son:

Aislamiento de *L. chapmanii* a partir de larvas infectadas de *Ae. aegypti*

Las larvas de *Ae. aegypti* fueron infectadas mediante inmersión en recipientes con agua y la presencia de zoosporas en suspensión. Después de 8 - 24 h, se seleccionaron las larvas

moribundas, confirmándose la infección mediante observación bajo el microscopio óptico con contrastes de fases (Fig. 14).

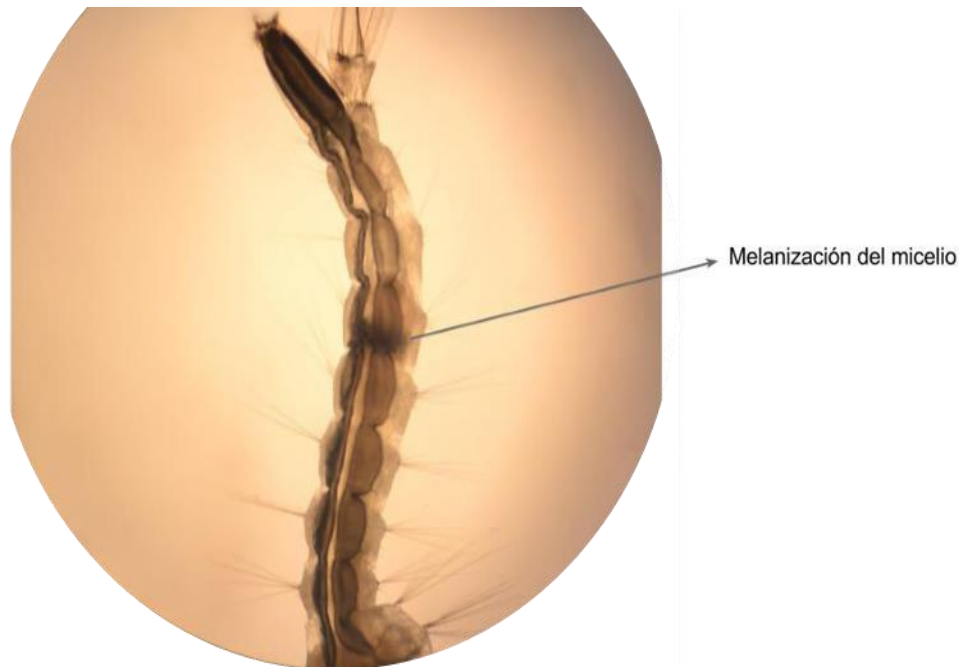


Figura 14. Larva (L3) de *Ae. aegypti* infectada con *L. chapmanii*. Nótese el micelio melanizado hacia el tracto digestivo medio.

Bajo la cámara de flujo laminar, las larvas seleccionadas fueron sometidas a un proceso de asepsia mediante baños seriales con agua destilada estéril, siendo posteriormente ubicadas de manera individual en cápsulas de Petri de 60 mm con medio de cultivo PYG-agar selectivo (PYG-agar con Cloranfenicol 0.3 ppm, Ampicilina 5 ppm, Gentamicina 5 ppm, Estreptomycinina 5 ppm) con el fin de minimizar el desarrollo de poblaciones bacterianas. Las cápsulas de Petri fueron mantenidas en incubadora a 25°C durante 48 - 72 h, realizándose posteriormente repiques con trozos de 1cm² de área, procedentes del contorno más distante del medio de cultivo con presencia de *L. chapmanii*.

Mantenimiento *in vitro* de *L. chapmanii*.

Las cápsulas de Petri (100 mm de diámetro) con medio PYG-agar y desarrollo de *L. chapmanii* procedente de los aislamientos, fueron mantenidas en incubadora a 25 °C. Con el fin de mantener material fresco y viable para los ensayos de laboratorio, se realizaron repiques

cada dos semanas. Con la misma frecuencia, se llevó una cápsula de Petri a la heladera (10 °C), siendo preservada por un par de meses como material de reserva (Fig. 15).

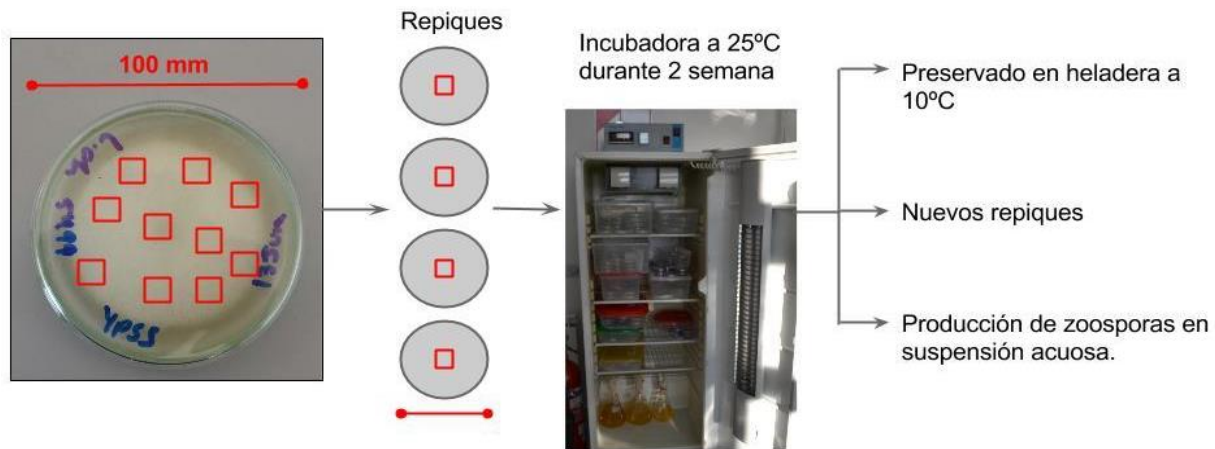


Figura 15. Procedimiento rutinario para el manejo de *L. chapmanii*, *in vitro*.

Mantenimiento *in vivo* de *L. chapmanii*.

Leptolegnia chapmanii fue mantenido *in vivo* mediante la infección periódica de larvas de *Ae. aegypti*. Para ello, se seleccionaron larvas sanas (L3) procedentes de la colonia de cría, y se infectaron mediante la inmersión en recipientes plásticos de 200 ml con 100 ml de agua y zoosporas de *L. chapmanii* en suspensión. Pasadas 8 horas, las larvas fueron enjuagadas con agua destilada y transferidas a recipientes plásticos de iguales dimensiones con tapa y 100 ml de agua destilada. Estos recipientes fueron mantenidos a 25 °C durante 48 h y posteriormente llevados a la heladera a 10 °C.

Producción de zoosporas de *L. chapmanii*

Las suspensiones de zoosporas se prepararon a partir del material mantenido *in vitro* e *in vivo*. A partir del material *in vitro*, se seleccionaron cápsulas de Petri con buen desarrollo de *L. chapmanii*. El medio fue cortado en trozos de 1 cm² de área y posteriormente dispuesto en frascos de Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de agua destilada estéril y tapa de papel aluminio. A partir de material *In vivo*, se emplearon larvas (L3) de *Ae. aegypti* con 24 horas de infección, siendo introducidas en recipientes plásticos de 200 ml con 100 ml de agua destilada (Fig. 16). En ambos casos, las suspensiones fueron mantenidas a 25 °C durante 48-72 h para el desarrollo de zoosporangios y la posterior liberación de las zoosporas. La concentración de

zoosporas se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer, siendo ajustada según las necesidades.

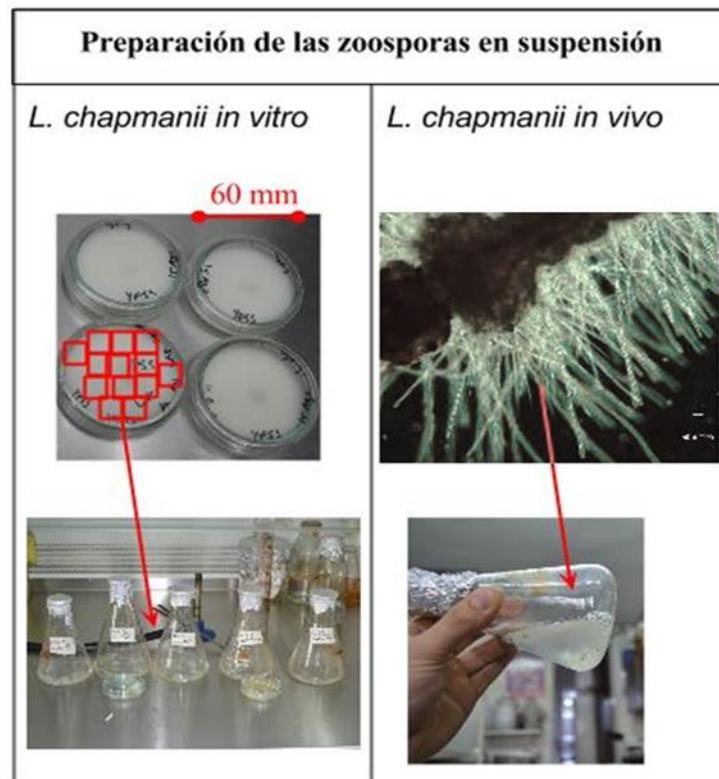


Figura 16. Zoosporas de *L. chapmanii* en suspensión, a partir del material biológico mantenido *in vitro* e *in vivo*.

A circular microscopic image showing a dense field of cells with various morphologies, including some with prominent nuclei and others appearing more elongated or fibrous. The overall color palette is muted, with shades of brown, tan, and grey. The text is overlaid on the lower portion of the image.

**CAPÍTULO II: Persistencia,
patogenicidad y dispersión
de *L. chapmanii***

CAPÍTULO II: Persistencia, patogenicidad y dispersión de *L. chapmanii*

En este capítulo se abarcan los objetivos 1 y 2 propuestos en el presente trabajo de investigación.

Persistencia y patogenicidad de *L. chapmanii* en diferentes ambientes antrópicos en donde se cría naturalmente *Ae. aegypti* y pruebas de patogenicidad con poblaciones naturales procedentes de campo.

La persistencia y patogenicidad del aislamiento nativo de *L. chapmanii* (CEP 010) fue evaluada sobre larvas (L2/L3) de *Ae. aegypti* procedentes de la colonia de cría. En las anteriores instalaciones del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores de la calle 2 no 584 en la ciudad de La Plata, se seleccionaron dos ambientes antrópicos, uno al interior del laboratorio y otro al exterior en un patio cercano en donde se evidenció la presencia natural de poblaciones de *Ae. aegypti* durante algunos meses del año. Adicionalmente, la patogenicidad de este aislamiento nativo fue confirmada mediante pruebas de mortalidad con larvas de *Ae. aegypti* procedentes de poblaciones naturales colectadas en la ciudad de La Plata, en donde se presentan picos poblacionales durante los meses de enero a marzo. Por esta razón y durante los años 2012, 2013, 2014 se realizaron colectas en ambientes en donde se desarrollan poblaciones de este mosquito.

Materiales y Métodos

Los ensayos definitivos se llevaron a cabo en época de otoño y primavera, durante los meses de mayo - junio de 2012, septiembre - octubre de 2012 y octubre - diciembre de 2013. Se seleccionaron tres locaciones diferentes para la ubicación de los recipientes. La locación **A** al interior del laboratorio, mientras que **B** y **C** al exterior, en un patio próximo al laboratorio. Previamente y con el fin de comparar la amplitud térmica diaria del agua en las diferentes locaciones, se realizó una prueba preliminar durante la primavera de 2011. De esta manera, se dispusieron recipientes plásticos realizados con botellas de gaseosa de 2 l, cortadas a 14 cm desde la base y 250 ml de agua en las tres ubicaciones seleccionadas, registrándose la

temperatura del agua a las 9 h, 12 h y 17 h. Para los ensayos definitivos con las larvas procedentes de la colonia de cría en los diferentes ambientes antrópicos, se utilizaron los recipientes plásticos realizados con botellas de 2 l. A los mismos, se les abrió una ventana de 1 cm² en la parte superior, cubriéndose con tela de voile con el fin de eliminar posibles excesos de agua sin perder las larvas de mosquitos presentes en su interior (Fig. 17). Estos recipientes con capacidad total de 500 ml, fueron llenados con 250 ml de agua del sistema de abastecimiento de agua potable de la ciudad de La Plata, posterior a su decoloración por reposo durante 48 h. El nivel de agua fue mantenido constante durante el desarrollo de los ensayos mediante la adición periódica de agua.

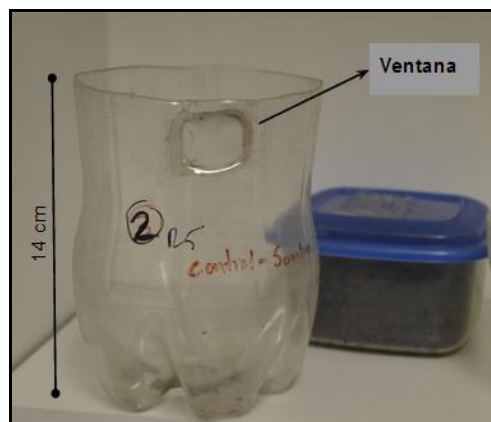


Figura 17. Recipiente tipo, construido utilizando una botella de plástico de 2 l.

En las locaciones **A**, **B** y **C**, se ubicaron grupos de 6 recipientes tratamiento y un control. Como se mencionó previamente, el grupo **A** se ubicó al interior del laboratorio, el grupo **B** al exterior sin protección y el grupo **C** al exterior con una cubierta en tela de polietileno que redujo en un 90 % la radiación incidente. Al inicio de los ensayos, cada recipiente tratamiento fue inoculado con 5 larvas de *Ae. aegypti* con 24 h de infección. Los controles no fueron inoculados. De acuerdo con Pelizza et al. (2008) este inóculo inicial fue equivalente a $3.05 \pm 1 \times 10^5$ zoosporas, para una concentración inicial de $1,2 \times 10^3$ zoosporas.ml⁻¹ (Fig. 18).

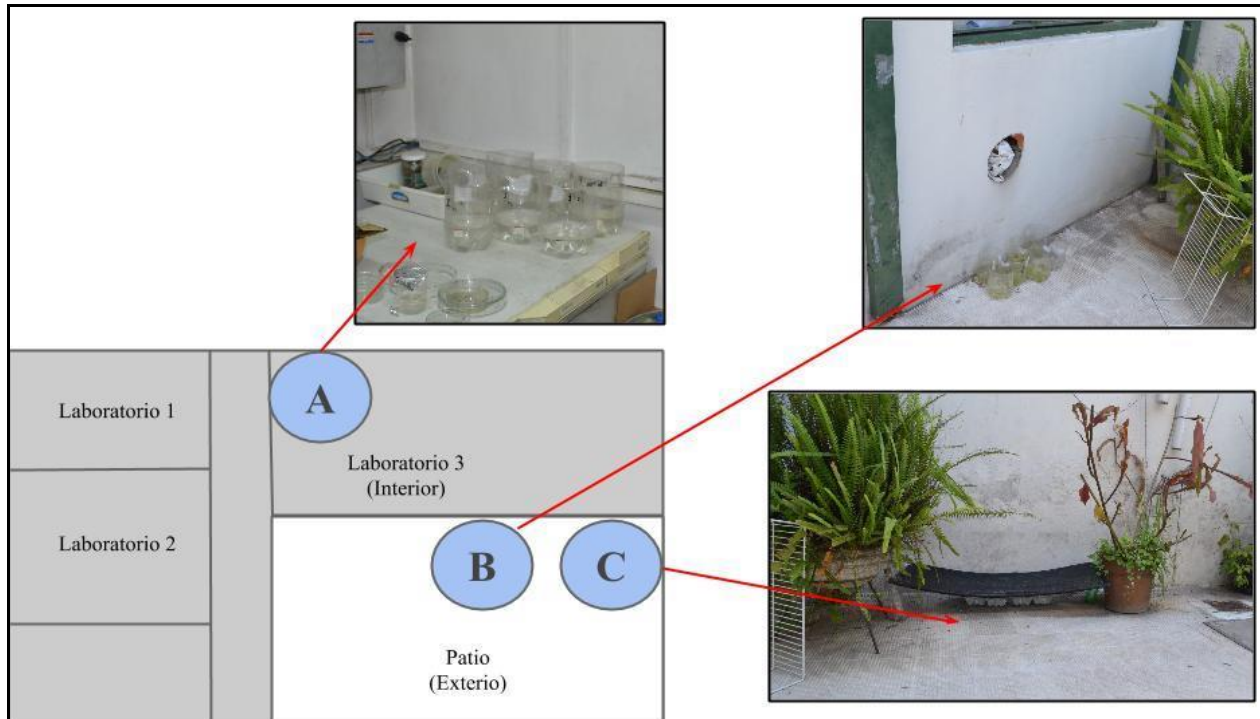


Figura 18. Ubicación de los recipientes pertenecientes a los grupos A, B y C en los ambientes antrópicos seleccionados.

En cada ensayo, la patogenicidad fue evaluada semanalmente mediante la adición de 25 larvas sanas de *Ae. aegypti* por recipiente. La mortalidad de las larvas se registró a las 24 y 48 h, confirmando la presencia de *L. chapmanii* mediante observación bajo el microscopio óptico con contraste de fases. Las larvas muertas fueron retiradas con la misma frecuencia para evitar el reciclaje del patógeno en el medio. La totalidad de las larvas (vivas y muertas) se eliminaron pasadas 48 h desde su introducción. Con el fin de realizar un mejor análisis de los datos, se contó con los registros meteorológicos de la Facultad de Ciencias Astronómicas y Geofísicas de la UNLP para el periodo de estudio.

Para el análisis estadístico, se corrigió la mortalidad mediante la aplicación de la ecuación de Abbott, modificada por Schneider-Orelli (1947). Para realizar los análisis de varianza (ANOVA), la mortalidad en porcentaje, fue transformada con el arcoseno de la raíz cuadrada. La estadística descriptiva, los análisis de varianza con un factor ($\alpha = 0.05$) y las pruebas *pos hoc* de Tukey se realizaron con el fin de evidenciar diferencias estadísticamente

significativas entre los tratamientos. Las mismas fueron realizadas utilizando el software SPSS v 20.0, de IBM.

Por otro lado, se recolectaron larvas de *Ae. aegypti* de poblaciones desarrolladas en ambientes naturales como son los floreros y recipientes con agua ubicados en el cementerio Municipal de la ciudad de La Plata. La colecta de las larvas se realizó utilizando bandejas plásticas y pipetas Pasteur. Igualmente se contó con poblaciones recolectadas por el Departamento de zoonosis de la Municipalidad de La Plata, enmarcado en el convenio establecido para el control del dengue. En la totalidad de los casos, las larvas fueron transportadas al laboratorio en recipientes plásticos para realizar las pruebas respectivas bajo condiciones de laboratorio. Los ensayos se realizaron empleando recipientes plásticos de 200 ml con 100 ml de agua destilada. Como inóculo de *L. chapmanii* se usaron 5 larvas de *Ae. aegypti* procedentes de la colonia de cría y muertas por la acción del patógeno post 72 h de infección. En cada recipiente se adicionaron 20 larvas (L2/L3) de *Ae. aegypti* procedentes del campo. Cada ensayo estuvo compuesto por tres réplicas, un control positivo con larvas de *Ae. aegypti* procedentes de la colonia de cría y un control negativo sin inóculo de *L. chapmanii*. La mortalidad se registró pasadas 48 h.

Resultados y Discusión

En el ensayo preliminar realizado durante la primavera del 2011 para las pruebas con poblaciones provenientes de la colonia de cría en diferentes ambientes antrópicos, se encontró que en los recipientes de las tres locaciones (**A**, **B** y **C**), la temperatura media del agua varió a lo largo del día, manteniéndose entre 10°C y 25 °C. Por lo anterior, se asumió que *a posteriori*, las condiciones durante las estaciones de otoño y primavera, serían adecuadas para el desarrollo definitivo de los ensayos con las poblaciones larvales de *Ae. aegypti* así como para el entomopatógeno (Fig. 19).

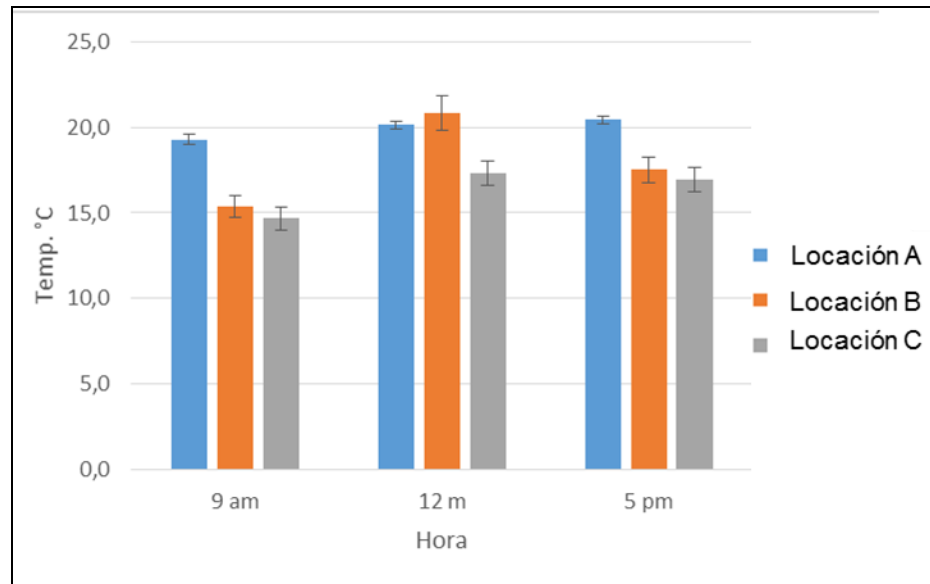


Figura 19. Variación diaria de la temperatura del agua en los recipientes ubicados en las tres locaciones.

Durante los periodos en que se desarrollaron los ensayos definitivos, la temperatura media en la ciudad de La Plata oscilo entre 11.7 y 20.1°C, de acuerdo a los registros meteorológicos de la Facultad de Ciencias Astronómicas y Geofísicas, UNLP (Fig. 20).

Indiferentemente a la ubicación de los grupos, la mortalidad de las larvas presentó una tendencia a declinar con el tiempo. Al inicio de los ensayos, se registraron mortalidades superiores al 80% en la primera semana, decreciendo por debajo de 50% para la sexta semana. La mortalidad en el grupo **B**, sin protección solar, decreció más rápido que en los grupos **A** y **C**. De esta manera, la mortalidad en los recipientes inoculados con *L. chapmanii* varió estadísticamente a lo largo del tiempo entre las diferentes locaciones, siendo inferior al 10 % en los controles (Fig. 21).



Figura 20. Registro de la temperatura atmosférica media, máxima y mínima diaria para los períodos en que se realizaron los ensayos.

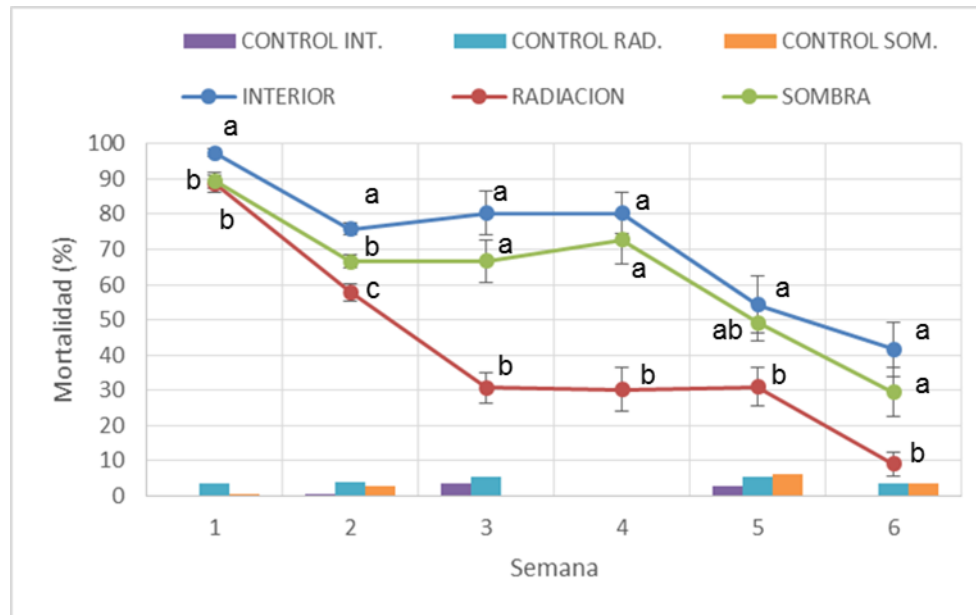


Figura 21. Mortalidad media (\pm Error estándar) de las larvas de *Ae. aegypti* por acción de *L. chapmanii*, en diferentes ambientes antrópicos y a lo largo del tiempo. Las letras agrupan a los tratamientos sin diferencias estadísticamente significativas según la prueba *pos hoc* de Tukey. Semana 1: $F_{2,33}= 9.12$, $P<0.05$; semana 2: $F_{2,33}= 19.5$, $P<0.0001$; semana 3: $F_{2,33}= 18.9$, $P<0.0001$; semana 4: $F_{2,33}= 14.07$, $P<0.0001$; semana 5: $F_{2,33}=3.79$, $P<0.05$; semana 6: $F_{2,33}=7.65$, $P<0.05$

En cuanto a las condiciones ambientales a lo largo del día, los recipientes del grupo **A** estuvieron expuestos a iluminación domestica convencional y posiblemente la temperatura diaria fue más estable que en los grupos **B** y **C**. Exceptuando la radiación incidente, los grupos **B** y **C** estuvieron expuestos a las mismas condiciones ambientales, sugiriendo esto a la radiación solar como el factor ambiental que afectó a la viabilidad de las zoosporas. En estudios previos, se reportaron mortalidades de 95% y 100% para larvas de *Ae. aegypti* tratadas con zoosporas en suspensión (1.8×10^5 zoosporas.ml⁻¹) bajo condiciones semi naturales, con luz solar y sombra respectivamente (Pelizza et al., 2010b). Igualmente, el efecto de la radiación solar sobre la estabilidad y persistencia de diferentes hongos entomopatógenos ha sido mostrado (Gardner et al., 1977; Roberts & Campbell, 1977). En otros ensayos se ha mostrado que la exposición a radiación UV-B reduce la tasa de germinación por parte de los conidios de algunos hongos entomopatógenos (Le Grand & Cliquet, 2013). Puntualmente para *M. anisopliae*, la exposición a radiación UV-A y UV-B afectó la viabilidad de los conidios, reduciendo su germinación (Braga et al., 2001).

Los resultados obtenidos en el presente ensayo en cuanto al efecto residual de *L. chapmanii* son buenos teniendo como referencia que algunos productos *Bti* han presentado actividad hasta por 7 semanas bajo condiciones de laboratorio y semi campo (Lee et al., 1986; Fansiri et al., 2006; Ritchie et al., 2010). Por su parte, se reportó la persistencia en campo durante largos periodos de tiempo por parte del entomopatógeno *L. giganteum*, al reciclarse entre las poblaciones de larvas de mosquitos (Kerwin & Washino, 1988). Por lo anterior, posiblemente sí las larvas de mosquito muertas con *L. chapmanii* se mantuvieran en los recipientes, el patógeno se reciclaría, prolongando su persistencia en el medio a lo largo del tiempo.

Igualmente importante en el análisis de estos resultados, es que la adición periódica de las larvas de *Ae. aegypti*, seguramente redujo la concentración de zoosporas viables, las cuales interactuaron en su medida con las larvas y como se mostró previamente, las densidades tanto de las larvas de mosquito, como de las zoosporas de *L. chapmanii* repercuten en las tasas de infección (Pelizza et al., 2007a).

Por otro lado, se corroboró la patogenicidad de la cepa nativa CEP 010 sobre las larvas de *Ae. aegypti* procedentes de campo, registrándose mortalidades entre 65 y 100 %. La mortalidad registrada en los controles positivos fue levemente superior, registrándose valores entre 85 y 100 %. La mortalidad registrada en los controles negativos fue mínima, salvo en marzo de 2013, en donde alcanzó un 60 %. (Fig. 22).

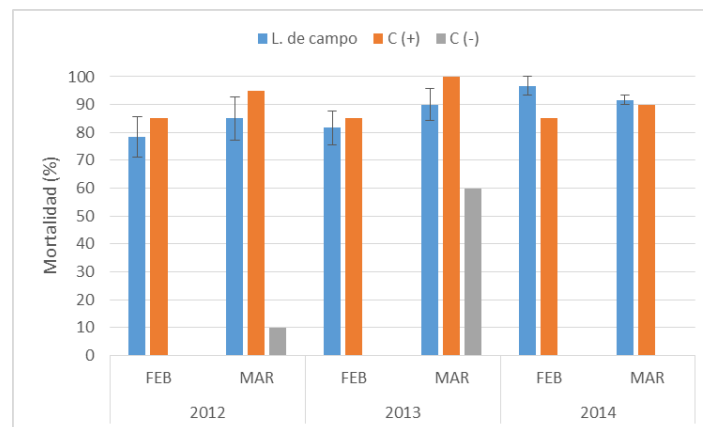


Figura 22. Mortalidad de las larvas de *Ae. aegypti* procedentes de campo, por la acción patogénica de *L. chapmanii*.

Evaluación de la dispersión de *L. chapmanii* en ambientes antrópicos

Los reportes existentes de aislamientos del entomopatógeno *L. chapmanii* se reducen a Estados Unidos en el norte del continente americano así como a la Argentina, al sur del mismo (USDA, 2013), siendo su distribución mundial prácticamente desconocida. Respecto a los mecanismos de dispersión que esta especie emplea en ambientes naturales, nada se sabe. Como se mencionó previamente, posee estructuras reproductivas móviles que le permiten desplazarse en pequeños ambientes acuático, siendo posible en parte, su dispersión a consecuencia del desplazamiento de los estadios larvales de mosquitos infectados. El desarrollo de estructuras reproductivas de resistencia (oosporas) le permite permanecer viable en condiciones adversas durante prolongados periodos de tiempo. De esta manera y con el fin de elucidar algunos aspectos de la dispersión de este microorganismo, se diseñaron varios montajes experimentales con *L. chapmanii*.

Materiales y métodos

Ensayo I

Este ensayo se realizó simultáneamente con el ensayo para determinar la persistencia y patogenicidad de *L. chapmanii* durante los años 2012 y 2013. Para esto se emplearon recipientes plásticos similares, contruidos con botellas plásticas de 2 l. La dispersión y colonización por parte de *L. chapmanii* fue evaluada mediante la ubicación de grupos de a ocho recipientes plásticos, en dos lugares diferentes dentro de las instalaciones del CEPAVE (Fig. 23). Estos correspondieron a pasillos abiertos, con flujo de viento y el tránsito libre del personal del instituto. Los recipientes de los grupos **A**, **B** y **C** (del ensayo de persistencia) fueron inoculados con *L. chapmanii* como se mencionó previamente, por lo cual se esperaba que sirvieran como fuente para la dispersión del entomopatógeno por acción del viento, de las poblaciones adultas de mosquitos, entre otras, hacia los recipientes de los grupos **D** y **E**. El nivel de agua de los recipientes se mantuvo constante a 250 ml mediante la adición semanal de agua. Para evidenciar la presencia del entomopatógeno, se adicionaron semanalmente 25 larvas (L2/L3) de *Ae. aegypti*, las cuales fueron posteriormente retiradas (post 48 h) y transportadas al laboratorio, en donde mediante observación bajo el microscopio óptico, se determinó la presencia/ausencia del patógeno.

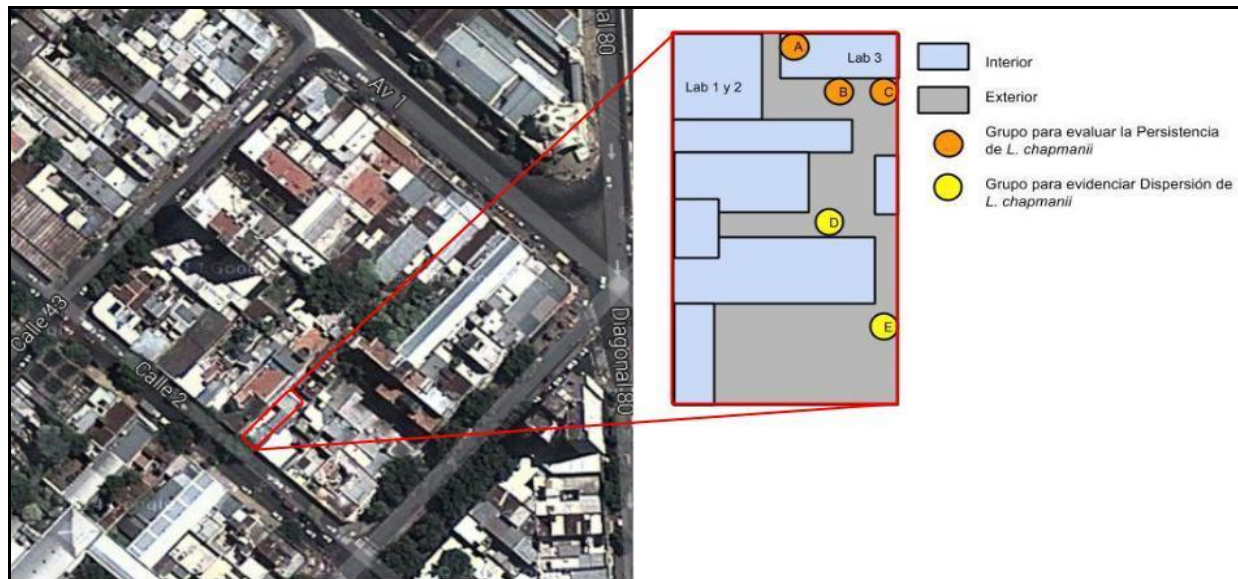


Figura 23. Esquema de la vista en planta del CEPAVE y ubicación de los diferentes recipientes empleado en los ensayos para determinar la persistencia y dispersión de *L. chapmanii*.

Ensayo II

En base a los resultados obtenidos en el **Ensayo I**, se replanteo el diseño experimental para determinar si *L. chapmanii* era capaz de dispersarse entre recipientes con la presencia y desarrollo de larvas de mosquitos. Para esto, al interior de un bioterio con condiciones ambientales adecuadas (Temperatura 28°C, humedad \geq 80%, fotoperiodo 12:12 h) se dispuso una jaula de cría de 27 l (30 cm x 30 cm x 30 cm) y se estableció una población de adultos de *Ae. aegypti*. En el interior de la misma se ubicaron 8 recipientes plásticos de 40 ml con 20 ml de agua destilada para el desarrollo de estadios larvales de *Ae. aegypti* (Fig. 24). Como fuente de hidratos de carbono para los adultos se introdujo un recipiente plástico con pasas de uvas. Para satisfacer la demanda hematófaga por parte de las hembras, dos veces por semana se realizó la introducción de un pollo inmovilizado durante 20 minutos. Después de dos semanas de iniciado el montaje, se encontró regularidad en las poblaciones de las diferentes fases del desarrollo del mosquito. En ese momento, se inoculó el recipiente ubicado en el centro del diseño experimental, con 5 larvas de *Ae. aegypti*, muertas por acción de *L. chapmanii*.



Figura 24. Diseño experimental dispuesto con el fin de evidenciar la dispersión de *L. chapmanii* en un ambiente con presencia de *Ae. aegypti* en las diferentes fases del desarrollo.

Semanalmente se completó el nivel de agua de los recipientes y se determinó la presencia/ausencia de *L. chapmanii* mediante observación directa en busca de larvas muertas. Igualmente, se corroboró mediante el desarrollo de pruebas de mortalidad con muestras tomadas de los diferentes recipientes. Estas pruebas, se realizaron en cajas de cultivo celular de 24 celdas marca Cell star® de Greiner bio-one, (Monroe, Louisiana, USA). En cada pozo se adicionaron 2 ml del agua procedente de los siete recipientes en observación así como del recipiente inoculado con *L. chapmanii*. En los ensayos, fueron utilizados 3 pozos réplica por cada recipiente. Para las pruebas de mortalidad, se adicionaron 10 larvas sanas de *Ae. aegypti* (L2/L3) por pozo. La experiencia duró 6 meses.

Ensayo III

Como consecuencia de los resultados obtenidos previamente, se realizaron pruebas más básicas con el fin de comprobar la dispersión de las zoosporas de *L. chapmanii* en medio acuático. Para esto se usaron bandejas plásticas de 2 l de capacidad (28x18x4 cm³) con 1.5 l de agua. Como inóculo se usaron 10 larvas de *Ae. aegypti* muertas por acción de *L. chapmanii* y como población testigo 25 larvas (L2/L3) sanas provenientes de la colonia de cría. La primera bandeja correspondió al control negativo, conteniendo la población de larvas sanas sin la presencia del patógeno. En esta misma bandeja, se introdujo un recipiente plástico de 250 ml adecuado con flotadores y tela de voile en vez de la base, conteniendo en su interior el mismo número de larvas sanas. En la segunda bandeja, las larvas sanas permanecieron libres en el

medio y el inóculo estuvo a disposición sin algún tipo de barrera física. En la tercera bandeja, se restringió físicamente el acceso a las larvas muertas con *L. chapmanii* por parte de las sanas, mediante su ubicación en un recipiente plástico similar al empleado en la bandeja control, con el fin de permitir el flujo de las zoosporas a través del mismo y hacia el resto del contenedor. En la cuarta bandeja tanto larvas inóculo como la población sana fueron restringidas en recipientes plástico con flotadores y tela de voile en su base, siendo ubicados en lados opuestos de la bandeja, por lo cual para realizarse la infección de las larvas sanas, las zoosporas tendrían que desplazarse una distancia aproximada de 20 cm en la horizontal y a lo largo de la columna de agua (máx. 4 cm) en la vertical (Fig. 25). La experiencia se repitió 3 veces en tiempos diferentes. Para el análisis estadístico, la mortalidad registrada fue transformada mediante el arcoseno de la raíz cuadrada, se realizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y se aplicó la prueba *pos hoc* de Student Newman Keuls (SNK).

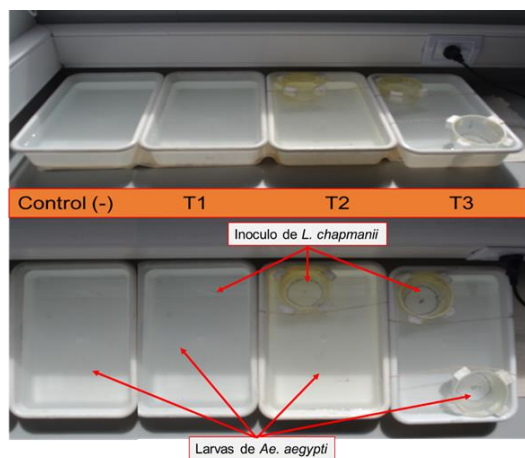


Figura 25. Diseño experimental para evaluar la capacidad de dispersión de *L. chapmanii* en medio acuático.

T1= Bandeja con las larvas de *Ae. aegypti* e inóculo de *L. chapmanii* libres.
 T2= Bandeja con larvas de *Ae. aegypti* libres e inóculo de *L. chapmanii* restringido físicamente.
 T3= Bandeja con larvas de *Ae. aegypti* e inóculo de *L. chapmanii* separadas físicamente.

Resultados y discusión

Durante los tres períodos de experimentación respectivos al **Ensayo I**, no se evidenció la presencia de *L. chapmanii* en los recipientes de los grupos **D** y **E**. Tampoco se evidenció la colonización natural por parte de poblaciones/comunidades de mosquitos. Por su parte, si fue evidente el desarrollo de comunidades de algas así como la presencia de otros organismos como rotíferos y ciliados, entre otros. Por esta razón y debido a las distancias existentes entre los grupos inóculo (**A**, **B**, **C**) y los grupos receptores (**D**, **E**), se planteó el diseño con dimensiones reducidas y la dinámica propia de la población de mosquitos, en donde los adultos pudiesen desplazarse e interactuar entre los diferentes recipientes con agua, siendo posibles dispersores de *L. chapmanii* al interior de la jaula.

En la totalidad de los recipientes empleados en el **Ensayo II**, se presentó el establecimiento y desarrollo de poblaciones larvales de *Ae. aegypti*, evidenciando esto la dinámica interacción entre los adultos así como la colonización de los contenedores con agua al interior de la jaula. Durante los 6 meses que duró el ensayo, no se encontró la presencia de *L. chapmanii* en los recipientes receptores, descartándose su dispersión. Por su parte, se notó frecuentemente el desarrollo de poblaciones larvales de *Ae. aegypti* en el “recipiente inóculo” aun cuando la presencia de *L. chapmanii* fue confirmada mediante las pruebas posteriores de mortalidad. Estos resultados sugieren que, la materia orgánica presente así como las comunidades de algas, bacterias, rotíferos, ciliados, etc, desarrolladas, posiblemente fueron fuente de alimento para las larvas, afectando así la interacción entre las mismas y las zoosporas de *L. chapmanii*; a diferencia de los ensayos rutinarios de mortalidad realizados en el laboratorio con agua fresca/destilada en donde las larvas no tienen mayor oferta alimenticia, siendo prácticamente obligada su interacción con las zoosporas de *L. chapmanii*. Esta evolución del agua en cuanto a las características fisicoquímicas y el desarrollo de comunidades acuáticas en los contenedores a lo largo del tiempo, es de gran importancia al repercutir aparentemente en la interacción entre las larvas del mosquito y las zoosporas de *L. chapmanii*, por lo cual debe contemplarse al momento de emplear al oomycete como agente de control biológico. Sería de interés profundizar a futuro el efecto que genera sobre las tasas de infección de *L. chapmanii* en poblaciones de mosquito, la presencia de materia orgánica así como de las poblaciones (bacterias, algas, protistas, etc) que tienen lugar naturalmente en estos ambientes acuáticos.

En cuanto al **Ensayo III**, se encontró una mortalidad alta en la bandeja **T1** y **T2**, confirmando así la viabilidad y patogenicidad de las zoosporas así como su dispersión desde el recipiente contenedor hacia el resto de la bandeja. El comportamiento activo de las larvas de *Ae. aegypti* en el contenedor, seguramente facilitó el contacto entre éstas y las zoosporas de *L. chapmanii*, generándose su infección. Por su parte, en la bandeja **T3** la mortalidad fue reducida, no evidenciándose la presencia y desarrollo de *L. chapmanii* en las larvas que si murieron. En el control negativo la mortalidad fue nula (**C(-)**) para las larvas que permanecieron libres y del 40% para las larvas ubicadas en el recipiente contenedor de 250 ml y base de tela (**C(-)**). Por lo anterior para el análisis, la mortalidad de la bandeja **T3** fue corregida por la fórmula de Abbott, modificada por Schneider-Orelli, asumiéndose así un 30% de la mortalidad a causa de *L. chapmanii* (**T3'**) (Fig. 26). En las bandejas **T1** y **T2** se encontró buen desarrollo de *L. chapmanii* en las larvas de *Ae. aegypti*, mientras que en la bandeja **T3** las larvas muertas no

evidenciaron signos de infección ni desarrollo del patógeno, sugiriendo esto que las zoosporas no poseen gran capacidad de desplazamiento y que en gran medida la infección de las larvas depende de su dinámica y desplazamiento al interior de los recipientes con agua (ej. Permanecer en superficie, migrar a lo largo de la columna de agua, alimentarse de los residuos depositados en el fondo, etc).

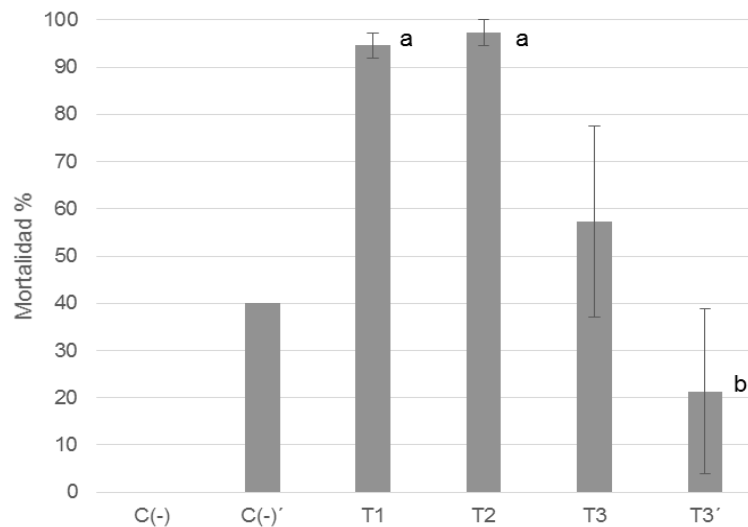


Figura 26. Mortalidad de las larvas de *Ae. aegypti* por causa de *L. chapmanii*. Las letras agrupan los resultados sin diferencias estadísticas significativas según *pos hoc* test de SNK ($F_{2,6}= 13.8$, $P<0.05$).


De esta manera y como ha sido demostrado para este oomycete, la infección de las larvas se presenta a nivel cuticular o por ingestión de las zoosporas (Zattau & McInnis, 1987), lo cual sucede posiblemente cuando las larvas se desplazan a lo largo de la columna de agua en busca de alimento suspendido o en el fondo del recipiente contenedor. Por su parte y posterior a la liberación desde el zoosporangio, las zoosporas presentan cortos periodos móviles, enquistándose y quedando a la deriva de la dinámica del agua. Su comportamiento y estado (motil-enquistado), es mediado por estímulos externos como la iluminación, presencia de compuestos orgánicos y de larvas de mosquito (Deacon, 1988). Posiblemente por esto, la dispersión del patógeno en las pruebas de formulación con *L. giganteum*, se obtuvo mejores resultados en cuanto a la mortalidad generada en larvas de mosquito, con las presentaciones flotantes respecto a las que se precipitaron (Rueda et al., 1991).

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en los ensayos de persistencia y patogenicidad, se concluye que *L. chapmanii* posee el potencial para ser usado como agente en el control biológico de las poblaciones larvales del mosquito *Ae. aegypti*, en diferentes ambientes antrópicos, siendo capaz de persistir por varias semanas. Adicionalmente los resultados nos indican que la viabilidad de las zoosporas puede declinar con la exposición a la radiación solar, reduciendo su patogenicidad contra larvas de mosquito a lo largo del tiempo.

La dispersión de *L. chapmanii* por medio terrestre-aéreo como consecuencia de la dinámica natural entre los estados adultos del mosquito *Ae. aegypti* fue negativa. Por su parte se comprobó que las zoosporas son altamente infectivas pero, aparentemente poseen una limitada capacidad de dispersión en los ambientes acuáticos. Posiblemente, la infección es consecuencia de la dinámica actividad que presentan las larvas de mosquito al interior de los contenedores, ya que migran en la vertical a lo largo de la columna de agua, en busca de alimento y/o protección.

A futuro, sería interesante estudiar la interacción entre *L. chapmanii* y la materia orgánica que se acumula y desarrolla en los recipientes con agua, así como el efecto que genera la presencia de otras especies acuáticas (bacterias, algas, etc) en la infección de las larvas de mosquito a controlar.



CAPÍTULO III: Efecto de la radiación UV-A sobre la patogenicidad, producción Y viabilidad de las zoosporas de *L. chapmanii*.

CAPÍTULO III: Efecto de la radiación UV-A sobre la patogenicidad, producción y viabilidad de las zoosporas de *L. chapmanii*.

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente, en donde se sugiere que la radiación solar afecta la viabilidad y patogenicidad de *L. chapmanii*, fue investigada la influencia de la radiación UV-A sobre las zoosporas, estructuras infectivas de este entomopatógeno. Abarcando de esta manera el objetivo 3 del presente trabajo de investigación.

La radiación solar, temperatura y humedad son los factores más críticos que afectan la persistencia de los entomopatógenos (Benz, 1987). La radiación solar por su parte, comprende a la luz visible, radiación infrarroja y radiación ultravioleta (UV). A su vez, la radiación UV se divide en UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (100-280 nm). La composición e intensidad de la radiación UV varía de acuerdo a la posición geográfica, a la variación climática diurna y estacionaria. Aunque es atenuada por su paso a través de la atmosfera, llega a la superficie terrestre con el poder suficiente para generar mutaciones o inclusive la muerte a organismos terrestres y acuáticos. En los ambientes acuáticos el efecto de esta radiación varía dependiendo del curso diario del sol, de la intensidad de la radiación, así como de las propiedades del lugar y sus alrededores, la cantidad de material particulado y en suspensión a lo largo de la columna de agua, siendo el impacto generado en los organismos dependiente de la dosis total de exposición (Häder et al., 2007).

Materiales y Métodos

Los ensayos se realizaron con el aislamiento argentino de *L. chapmanii* (CEP 010), mantenido *in vitro* en medio de cultivo PYG-agar. Igualmente, se emplearon larvas de *Ae. aegypti* procedentes de la colonia de cría del IPTSP mantenidas bajo metodologías estándar de cría. Los ensayos con radiación se realizaron en una cámara fotoestática marca CARON™ 6545-2 (Marietta, OH, USA) con radiación total de 31.514 mWm⁻² y 25°C (Fig. 27).



Figura 27. Cámara fotoestática CARON 6564-2.

La distribución espectral de las lámparas de la cámara (Fig. 28) fue medida previamente con un espectro radiómetro marca Ocean Optics USB 2000 (Dunedin, FL, USA).

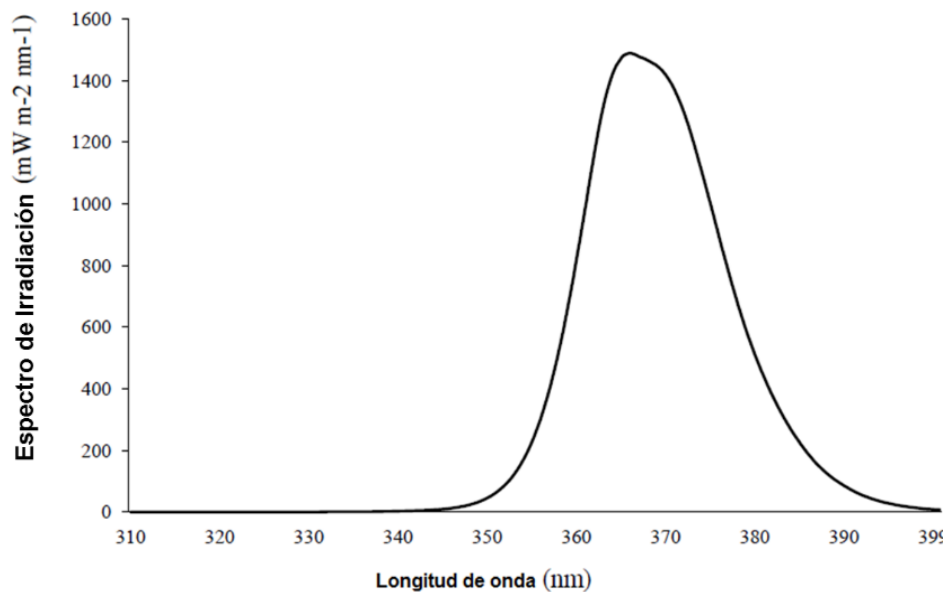


Figura 28. Distribución espectral de la irradiación generada por las lámparas de la cámara fotoestática.

Ensayo I: Efecto de la radiación UV-A sobre la patogenicidad de las zoosporas de *L. chapmanii* producidas *in vivo*.

En un vaso de precipitado con 1.000 ml de agua destilada, se preparó una suspensión de zoosporas a partir de 300 larvas (L3) de *Ae. aegypti* muertas por acción de *L. chapmanii* post 24 h de infección. Las larvas fueron mantenidas en el agua a 25°C durante 48 h con el fin obtener la máxima liberación de zoosporas en el medio. El agua fue filtrada para extraer los restos de las larvas sin retener a las zoosporas. La concentración de zoosporas en suspensión fue estimada mediante cuantificación en cámara de Neubauer, corroborando que se encontrara en el orden de magnitud 10^4 zoosporas.ml⁻¹.

Posteriormente, utilizando vasos plásticos de 25 ml, se conformaron 8 grupos con 3 réplicas por tratamiento y un control negativo. Los recipientes tratamiento fueron llenados con 10 ml de la suspensión de zoosporas y el control negativo por su parte con agua destilada. Los tiempos de exposición fueron 0 (control), 0.17, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 h, correspondientes respectivamente a 19.29, 56.72, 113.45, 226.90, 453.80, 680.70 y 907.60 kJ.m⁻² de dosis total. A medida que se fueron cumpliendo los tiempos de exposición, se fueron cubriendo los recipientes de cada grupo con papel aluminio restringiendo así su exposición. Los mismos fueron mantenidos al interior de la cámara hasta finalizada la experiencia (Fig. 29).

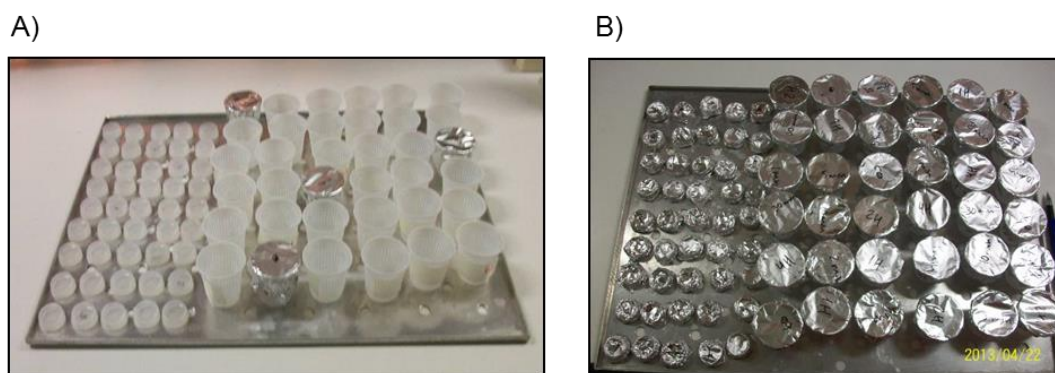


Figura 29. Recipientes utilizados en las pruebas con exposición a la radiación UV-A. A) Antes de iniciar la exposición; los recipientes tapados con papel aluminio corresponden a tiempo de exposición = 0. B) Terminada la exposición.

Una vez concluido el periodo máximo de exposición, fueron adicionadas 10 larvas (L2/L3) en cada recipiente, siendo llevados a incubadora y mantenidos a 25°C y fotoperiodo de 12:12 h (Luz: Oscuridad). La mortalidad de las larvas se registró pasadas 48 h. Este ensayo se repitió tres veces en tiempos diferentes. Para el análisis estadístico, la mortalidad en porcentaje fue transformada por el arcoseno de la raíz cuadrada. El análisis de varianza de un factor (ANOVA) así como la prueba *pos hoc* de Student-Newman-Keuls (SNK), se aplicaron para evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Ensayo II: Efecto de la radiación UV-A en la producción y viabilidad de las zoosporas de *L. chapmanii* producidas *in vivo*

Se usaron larvas (L3) de *Ae. aegypti*, moribundas por la acción de *L. chapmanii*, post 24 horas de infección. Las mismas fueron dispuestas individualmente en recipientes plásticos de 2 ml con 1.5 ml de agua destilada. Se aplicaron los mismos tiempos de exposición que en el ensayo anterior, aplicando la misma metodología para controlar la dosis de exposición. Cada ensayo comprendió 5 réplicas por dosis de exposición. Posteriormente, las larvas fueron transferidas individualmente a recipientes plásticos de 20 ml y el nivel de agua fue completado hasta los 10 ml. El material fue mantenido en incubadora a 25 °C y fotoperiodo de 12:12 h (Luz: Oscuridad). Al cabo de 24 h, la concentración de zoosporas se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer y la viabilidad de las mismas evaluadas mediante la adición de 10 larvas (L3) de *Ae. aegypti*. La mortalidad se registró a las 48 h. Para el análisis estadístico, se aplicaron las mismas transformaciones y estadísticos del ensayo anterior.

Resultados y Discusión

En el **ensayo I**, realizado con las zoosporas en suspensión, la viabilidad de las mismas, inferida a partir de la mortalidad generada en las poblaciones de larvas de mosquito, disminuyó con el aumento en la dosis de radiación UV-A por el incremento en el tiempo de exposición. De esta manera, la dosis más baja (0.17 h) no se diferenció estadísticamente del control (0 h) generando en ambos casos una mortalidad promedio del 93% en las poblaciones larvales del mosquito. Por su parte, al incrementarse la dosis de exposición, se encontró una disminución significativa en la viabilidad de las zoosporas evidenciada por la reducción en la mortalidad de las larvas de *Ae. aegypti* ((0 y 0.17 h) > (0.5 h) > (1 a 8 h); $F_{7,64} = 19.9$; $P < 0.001$). De esta

manera, la mortalidad decreció de 100 % (aprox.) a 18.9 % con 0.17 h y 8 h de exposición respectivamente. En otras palabras, no se presentó reducción en la actividad patogénica de las zoosporas durante los primeros 10 minutos (0.17 h) de exposición, disminuyendo un 19%, 44%, 52%, 60% y 80% con 0.5, 1, 2, 4 y 8 h de exposición, respectivamente (Fig. 30).

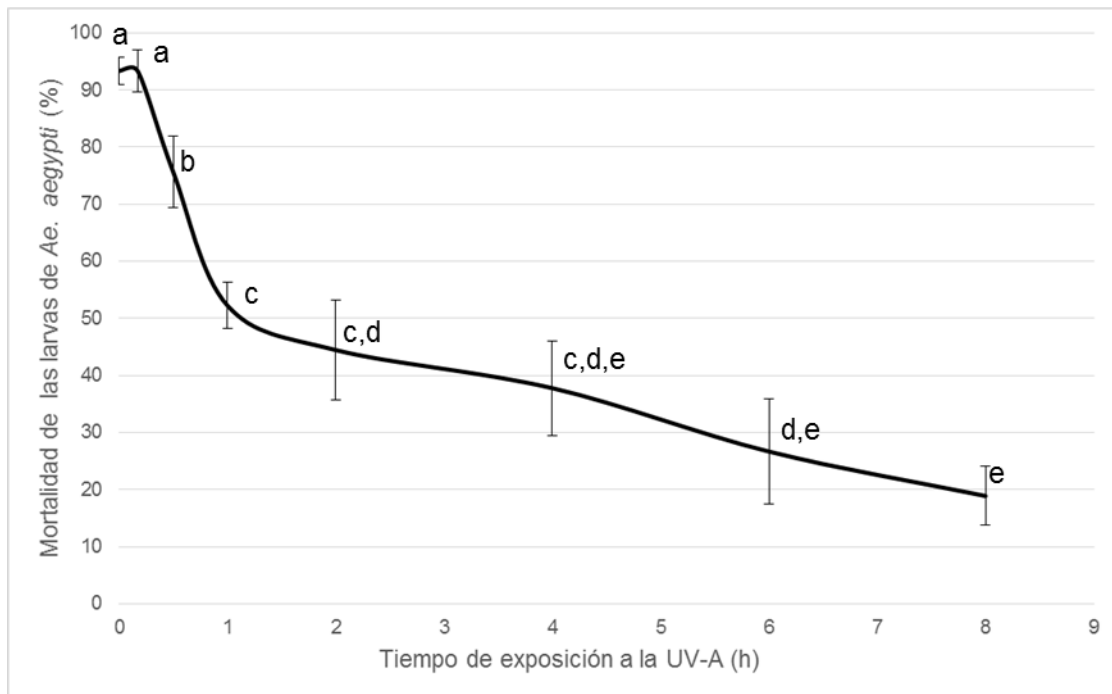


Figura 30. Mortalidad de las larvas de *Ae. aegypti* expuestas a las zoosporas de *L. chapmanii* con diferentes tiempos de exposición a la radiación UV-A. Los tratamientos con la misma letra no presentaron diferencias estadísticamente significativas según el estadístico *pos hoc* SNK.

Los resultados claramente muestran que a 25°C, las zoosporas libres y enquistadas de *L. chapmanii* suspendidas en agua, son susceptibles a la radiación UV-A, siendo afectada su viabilidad según la dosis de exposición. De esta manera, la virulencia de las zoosporas no fue afectada por exposición hasta de 10 min (0.17 h), reduciéndose su capacidad como patógeno de *Ae. aegypti* con tiempos mayores de exposición

En el **ensayo II**, en el cual las larvas de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chapmanii* fueron expuestas a las diferentes dosis de tratamiento con UV-A, no se encontró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de zoosporas ($F_{7,16} = 0.6$; $P = 0.75$; Tabla 2), variando entre 1×10^4 zoosporas/larva (control y 0.5 h de exposición a UV-A) y $5 \times$

10⁴ zoosporas/larva (0.17 y 8 h de exposición a UV-A). Por su parte, la mortalidad de las larvas de *Ae. aegypti* tratadas con estas zoosporas, varió entre 94.7% (0.17 h de exposición) y 49.3% (2 h de exposición), no encontrándose relación en la mortalidad generada respecto a la dosis de exposición, ni diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F_{7,16} = 1$; $P = 0.5$; Tabla 2). Por lo anterior, pensamos que, el cuerpo físico de las larvas muertas de *Ae. aegypti* brindó protección a zoosporangios y zoosporas producidas durante los diferentes periodos de exposición, manteniéndose viables estas estructuras infectivas al menos durante el periodo de estudio. En base a estos resultados, podría contemplarse que, la aplicación directa de las larvas muertas con desarrollo de *L. chapmanii*, serviría como estrategia para la diseminación de las zoosporas en los criaderos naturales de mosquitos, con efecto residual mayor al obtenido por la aplicación directa de zoosporas en suspensión. Igualmente, se esperaría que la introducción del patógeno en los criaderos con poca o nula exposición al sol (Ejemplo: huecos en los árboles, recipientes ubicados al interior de los hogares en lugares sombreados), generase mayores tasas de infección y mortalidad, en comparación a otros lugares con mayor exposición a radiación

Tabla 2. Efecto de la exposición a la radiación UV-A en la producción y viabilidad de las zoosporas por parte del entomopatógeno *L. chapmanii*.

Tiempo de exposición (h)	Dosis de UV-A (kJ m ⁻²)	Zoosporas/larva (x 10 ⁴) ^a	Mortalidad acumulada (%) ^b
0	0	1 ± 0.3	86.3 ± 7.3
0.17	19.3	1.5 ± 0.9	94.7 ± 3.5
0.5	56.7	1 ± 0.4	68.7 ± 7.7
1	113.5	1.3 ± 0.5	69.3 ± 16.4
2	226.9	1.1 ± 0.2	49.3 ± 16.2
4	453.8	1.1 ± 0.4	71.3 ± 16.2
6	680.7	1.3 ± 0.6	73.3 ± 13.3
8	907.6	1.5 ± 0.3	84 ± 14.1
		$F_{7,16} = 0.6$	$F_{7,16} = 1$
		$P = 0.75$	$P = 0.5$

^a La radiación UV-A fue aplicada a las larvas de *Ae. aegypti* muertas/moribundas post 12 h de contacto con *L. chapmanii*. El número de zoosporas producidas se determinó pasadas 36 h desde el inicio del ensayo con radiación UV-A.

^b La patogenicidad de las zoosporas producidas por cada larva fue probada mediante la adición de 5 larvas sanas. La mortalidad se registró pasadas 48 h.

Aunque la tolerancia frente a factores estresantes como la radiación UV varía entre las diferentes especies de hongos, e incluso entre aislamientos de una misma especie según las condiciones ambientales del lugar en donde se desarrollan, hay procesos comunes en cuanto a los daños generados así como a las estrategias desarrolladas por los hongos para su protección; de esta manera Braga et al. (2015) recopilan información que evidencia los efectos a nivel molecular que la radiación UV genera en el ADN de los hongos, presentando igualmente diferentes estrategias de protección por parte de los conidios como son: (a) acumulación de pigmentos en la pared celular para protección del contenido celular, (b) producción de enzimas y metabolitos que minimizan los procesos activados por la radiación UV y (c) activación de procesos de reparación para el ADN afectado por la radiación. Por su parte y hasta el momento, nada se sabe respecto a posibles adaptaciones o capacidades adquiridas por parte de *L. chapmanii* después de ser expuesta a radiación UV como son los mecanismos de foto reparación específica del ADN post exposición a radiación como ha sido reportado para otros entomopatógenos (Chelico & Khachatourians, 2008; Rangel et al., 2011; Fang & St. Leger, 2012). En cuanto a otras especies fúngicas, se han encontrado diferencias en la tolerancia frente a la radiación UV según la composición del medio de cultivo; el tiempo de permanencia en el mismo; las condiciones de mantenimiento previas a la exposición con radiación UV (fotoperiodo); entre otros. Igualmente se ha reportado el incremento en la tolerancia a UV como respuesta a condiciones estresantes durante el desarrollo micelial (ej. Medio de cultivo pobre) (Fernandes et al., 2015). Las condiciones de iluminación durante el crecimiento en medio de cultivo ha sido reportado igualmente como condicional en la tolerancia frente a radiación UV; encontrando que la iluminación constante con luz visible durante el desarrollo vegetativo (en comparación a condiciones de oscuridad total) promueven una mayor producción de conidios así como mayor tolerancia frente a la UV por parte de estas estructuras (Rangel et al., 2011; de Menezes et al., 2015).

CONCLUSIONES

La radiación UV-A afectó la viabilidad de las zoosporas así como su patogenicidad sobre larvas de mosquito. Estos resultados en sumatoria a los del ensayo de persistencia, corroboran la presunción acerca de la susceptibilidad de las zoosporas de *L. chapmanii* frente a la radiación UV. A su vez, esta radiación (UV-A) como componente de la radiación solar que

llega a la superficie terrestre, podría repercutir en la viabilidad y eficiencia de *L. chapmanii* como agente de control biológico.

Es necesario profundizar en los impactos generales de la radiación solar así como los impactos específicos sobre la eficiencia de *L. chapmanii* como patógeno de *Ae. aegypti*.

En base a las experiencias reportadas con otros hongos, sería de interés a futuro comparar el efecto del medio de cultivo así como diferentes condiciones ambientales (ej. variación en el fotoperiodo y exposición a diferentes tipos de radiación durante el desarrollo vegetativo) sobre la adquisición de tolerancia a radiación solar y/o simulada en cámaras con UV-A/UV-B por parte de las estructuras reproductivas de *L. chapmanii*.

Para el desarrollo de ensayos a futuro con evaluaciones a campo, sería interesante usar protectores para UV conocidos en el mercado, que hayan sido aplicados con otros entomopatógenos de hábito acuático.



**CAPÍTULO IV: Desarrollo
de *L. chapmanii* *In vitro*
y pruebas para su
formulación.**

CAPÍTULO IV: Desarrollo de *L. chapmanii* *In vitro* y pruebas para su formulación.

En este capítulo se describen los ensayos realizados con el fin de producir en forma escalada al patógeno *L. chapmanii* en diferentes medios de cultivo *in vitro*. Igualmente se exponen las pruebas de formulación realizadas, abarcando de esta manera los objetivos 4 y 5 del presente trabajo de investigación.

Medio de cultivo a base de semilla de girasol como sustrato alternativo para la producción de *L. chapmanii*

Se evaluó el crecimiento y desarrollo de *L. chapmanii* en medio de cultivo con extracto de semilla de girasol (ESG). En este primer ensayo, se comparó el crecimiento radial de *L. chapmanii* en el medio alternativo ESG-agar, respecto al mismo en los medios de cultivo tradicionales PYG-agar y Emerson YPss-agar, así como la producción de zoosporas y la patogenicidad de las mismas sobre larvas de *Ae. aegypti*.

Materiales y Métodos

Preparación de los medios de cultivo

PYG-agar: Por litro de agua destilada, se adicionaron 1.2 g de Peptona de carne, 1.2 g de Extracto de Levadura, 3 g de Glucosa y 15 g de agar.

Emerson YPss-Agar: Por litro de agua destilada, se adicionaron 4.0 g de Extracto de Levadura, 1 g de $H_2K_2PO_4$, 0.5 g de $MgSO_4$, 15 g de almidón soluble y 15 g de agar.

ESG-agar: Este medio se preparó siguiendo el protocolo de Jaronsky & Axtell (1984). De esta manera, se licuaron 10 g de semillas de girasol con 100 ml de agua destilada durante 60 s. El líquido fue filtrado y el residuo nuevamente licuado con 100 ml más de agua, siendo posteriormente filtrado. Según la bibliografía de referencia, los 200 ml del licuado contienen cerca de 11.5 mg de proteína soluble por ml (Jaronsky & Axtell, 1984). Para preparar 1 l de medio con una concentración de proteína cercana a los 2 mg/ml, se adicionaron los 200 ml del extracto, 800 ml de agua destilada y 15 g de agar.

Los medios de cultivo fueron rutinariamente esterilizados en autoclave a 120°C y 20 psi durante 25 minutos. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, fueron vertidos en cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro. Los medios que no fueron empleados inmediatamente fueron mantenidos a 10°C en la heladera hasta su uso.

Registro de resultados

Crecimiento Radial: Las cápsulas de Petri con los medios de cultivo fueron inoculados con un cubo (1 cm² de área) de medio de cultivo PYG-agar con desarrollo de *L. chapmanii* ubicado en el centro de la cápsula. El material fue mantenido en incubadora a 25°C. El radio de crecimiento de *L. chapmanii* fue medido con una regla milimetrada cada 24 h durante 4 días. Se realizaron 4 repeticiones de la experiencia en tiempos diferentes, cada una con 4 réplicas por medio de cultivo.

Producción de zoosporas: En recipientes plásticos de 200 ml, se adicionaron 100 ml de agua destilada y 5 cubos con área de 1 cm² del medio de cultivo con desarrollo de *L. chapmanii* con una semana desde la siembra inicial. El material fue mantenido en incubadora a 25°C durante 48 h, tiempo en el cual se determinó la concentración de zoosporas producidas mediante conteo en cámara de Neubauer. Se realizaron 4 repeticiones en tiempos diferentes, contando cada uno con 3 réplicas por medio de cultivo.

Pruebas de mortalidad: Con las suspensiones de zoosporas desarrolladas a partir de los diferentes medios de cultivo, se evaluó la viabilidad y virulencia de las mismas mediante pruebas de mortalidad con larvas (L2/L3) de *Ae. aegypti* procedentes de la colonia de cría.

Los resultados del crecimiento radial, producción de zoosporas y las pruebas de mortalidad, fueron analizados estadísticamente mediante Análisis de Varianza de un factor (ANOVA), aplicándose posteriormente el estadístico *pos hoc* Student–Newman–Keuls (STNK) para determinar diferencias entre los grupos. Los datos de mortalidad fueron transformados previamente a la realización del ANOVA mediante el arcoseno de la raíz cuadrada.

Resultados y discusión

El crecimiento y desarrollo de *L. chapmanii* durante las 96 h de observación fue mayor en los medios de cultivo PYG-agar y Emerson YPss-agar, diferenciándose estadísticamente del

medio ESG-agar (Fig. 31). De esta manera y como se observa en la gráfica, la tasa de crecimiento de *L. chapmanii* varió en los tres medios, siendo menor en el medio a base de semilla de girasol (0.33, 0.47, 0.47 mm/h para ESG, PYG y Emerson YPss respectivamente).

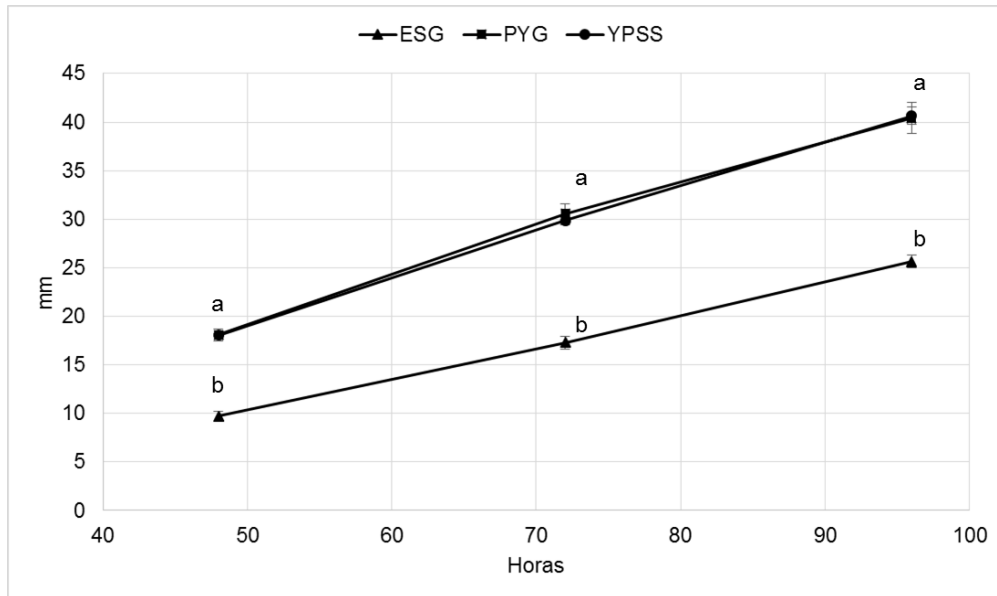


Figura 31. Crecimiento radial de *L. chapmanii* en diferentes medios de cultivo sólido. Crecimiento medio \pm Error estándar. Las letras agrupan los resultados sin diferencias estadísticamente significativas según el *pos hoc* test de SNK (48h: $F_{2,33}= 98.13$; 72h: $F_{2,33}= 97.4$; 96h: $F_{2,33}= 57.3$. En todos los casos $P<0.05$).

La segunda fase de la experiencia (Producción de zoosporas) se inició después de una semana desde la inoculación en el medio ESG. En este momento, *L. chapmanii* presentó buen desarrollo con características cualitativas como la frondosidad y color, igual o mejor respecto a los medios PYG y Emerson YPss (Fig. 32). Posiblemente el retraso inicial del desarrollo evidenciado en el medio ESG, fue debido a la adaptación metabólica del organismo frente a las características nutricionales del medio de cultivo, siendo viable su cultivo y producción en el medio alternativo ESG.

En cuanto a la producción de zoosporas, se presentó gran variabilidad en las concentraciones obtenidas no pudiéndose diferenciar estadísticamente los resultados obtenidos entre los tratamientos ($F_{2,33}=2.86$, $P=0.07$). Sin embargo, las mayores concentraciones se registraron a partir del medio ESG, seguido por el medio Emerson YPss y

el medio PYG, siendo en promedio de 2.083 ± 668 , 1.250 ± 329 y 583 ± 193 zoosp./ml, respectivamente (Fig. 33).

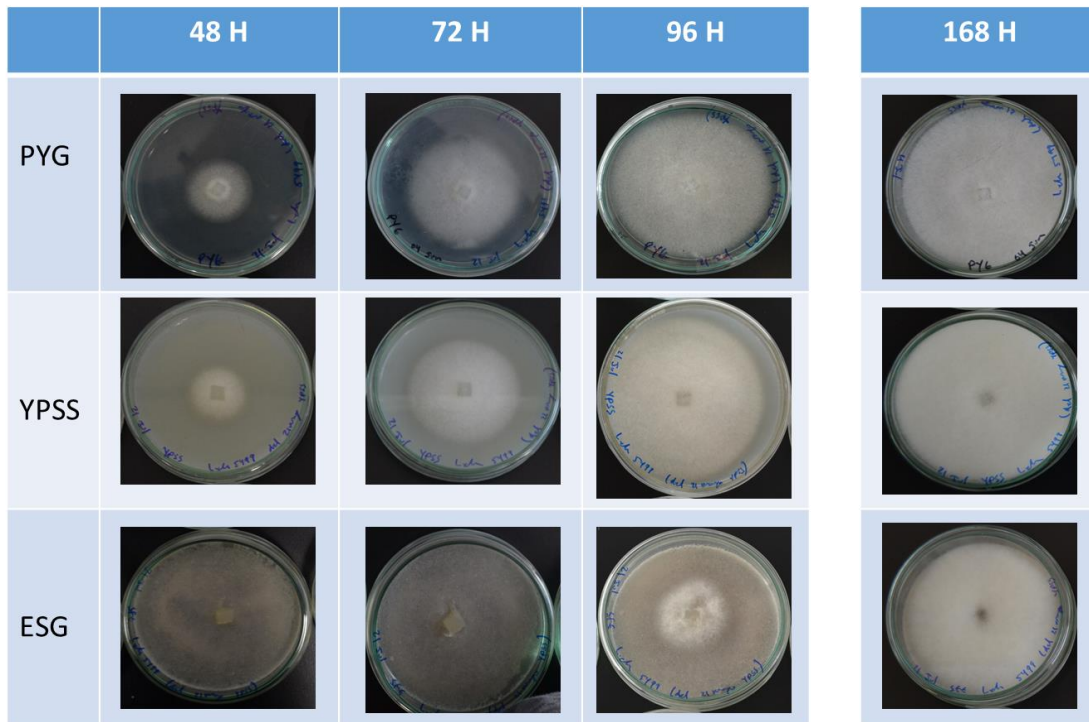


Figura 32. Crecimiento radial diario de *L. chapmanii* en diferentes medios de cultivo.

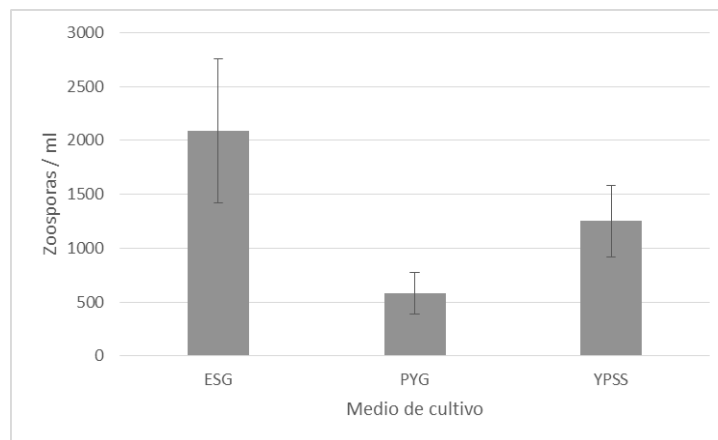


Figura 33. Producción de zoosporas (promedio \pm Error estándar) por parte de *L. chapmanii* desarrollada en diferentes medios de cultivo. Por la variabilidad presentada no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($F_{2,33}=2.86$, $P=0.07$).

Estos resultados obtenidos en la producción de zoosporas, podría sugerir a *L. chapmanii* como un organismo auxótrofo capaz de crecer vegetativamente en medios de cultivo pobres en esteroides, requiriendo de la adición de los mismos para iniciar su ciclo reproductivo sexual/asexual de manera similar a lo descrito para *L. giganteum* (Kerwin & Washino, 1983). Resultados similares fueron reportados con *L. giganteum*, en donde un mayor número de zoosporas se produjo en medio de cultivo a base de semilla de girasol y a comparación de otros medios sintéticos previamente descritos (Maldonado-Blanco et al., 2011). Unas décadas atrás, para este mismo organismo (*L. giganteum*) se encontró un incremento significativo en la producción de zoosporas al enriquecer el medio de cultivo con aceite de girasol (Balaraman & Hoti, 1986). La producción de zoosporas a partir del material obtenido en los medios Emerson YPss y PYG son coherentes con lo obtenido por Pelizza (2007), variando a modo general, las magnitudes por diferencias en la metodología.

En las pruebas de patogenicidad con las larvas de *Ae. aegypti*, la mortalidad media fue de 86 ± 5 ; 67 ± 6 ; 53 ± 6 % con las zoosporas producidas a partir de los medios ESG, Emerson YPss y PYG respectivamente (Fig. 34). Esto tuvo sentido, puesto que las suspensiones realizadas a partir del medio ESG tuvieron una mayor concentración de zoosporas y como fue reportado previamente, la tasa de infección es dependiente de la densidad de zoosporas (Pelizza, 2007a). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las mortalidades registradas ($F_{2,51}=3.17$, $P < 0.01$), diferenciándose los resultados del medio ESG de los otros dos tratamientos.

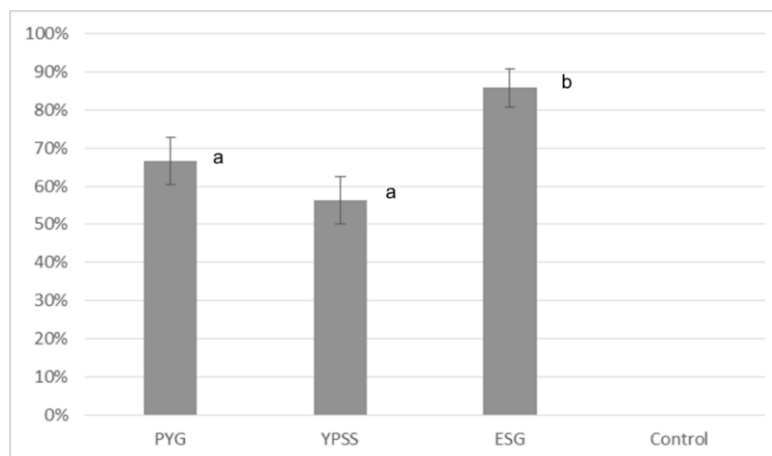


Figura 34. Mortalidad media de las larvas de *Ae. aegypti* por acción de las zoosporas de *L. chapmanii* a partir de los diferentes medios de cultivo. Los tratamientos con la misma letra no presentaron diferencias estadísticamente significativas según el estadístico de SNK.

Con *L. giganteum*, diferencias en el número de preesporangios y de zoosporas producidas a lo largo del tiempo, se reportaron a consecuencia del medio de cultivo empleado. De esta manera, con medio de cultivo a base de semilla de girasol, fueron obtenidas las mayores cantidades de estas estructuras (Maldonado-Blanco et al., 2011).

Pruebas de escalado con *L. chapmanii* en diferentes medios de cultivo líquido

Con miras al desarrollo de algún producto formulado empleando al entomopatógeno *L. chapmanii* como ingrediente activo, se realizaron pruebas para su masificación en medio de cultivo líquido.

Materiales y métodos

Se utilizó el aislamiento CEP 010 de *L. chapmanii* procedente de la colección de hongos entomopatógenos del CEPAVE. Su crecimiento y desarrollo fue probado en medio de cultivo líquido a base de semilla de girasol (ESG), siendo comparado con los medios tradicionales PYG y Emerson YPss líquidos. Para esto, se preparó un pre-inóculo en frascos de Erlenmeyer de 40 ml con contenido neto de 10 ml de medio PYG líquido. Los mismos fueron inoculados con un cubo de medio PYG sólido (área de 1cm²) con desarrollo de *L. chapmanii*. Los frascos de Erlenmeyer fueron mantenidos en observación durante 48 h a 25°C bajo condiciones de laboratorio con el fin de obtener un inóculo viable y libre de contaminación.

El escalado en medio líquido fue gradual, pasando del pre-inóculo (10 ml) a 200 y posteriormente a 400 ml en frascos de Erlenmeyer de 500 y 1.000 ml respectivamente. Cada una de las dos etapas del escalado fue mantenida durante 7 días en agitación a 180 rpm con ayuda de un agitador mecánico (Dragon Lab SKO330-Pro, Beijín, China). Pasadas las dos semanas, se tomó una muestra de los medios, obteniendo 30 ml del medio de cultivo y 10 g (peso fresco) de la biomasa desarrollada. Este material fue observado bajo el microscopio óptico con contraste de fases en busca de estructuras reproductivas. Cada muestra de micelio fue introducida en un frasco de Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de agua destilada y tapón de algodón-gasa con el fin de inducir la producción de zoosporas. Los mismos fueron mantenidos a 25°C durante 96 h y 180 rpm. Cada 24 h se determinó la concentración de zoosporas en suspensión mediante conteo en cámara de Neubauer. La patogenicidad de las suspensiones de zoosporas fue evaluada con una frecuencia de 24 h, mediante la adición de 10 larvas sanas

(L2/L3) de *Ae. aegypti* en recipientes plásticos de 50 ml con 10 ml de las suspensiones. La mortalidad fue registrada pasadas las 24 h. Por otro lado, para cada medio de cultivo se estimó la producción en fresco (biomasa) y peso seco (post secado durante 48 h a 45 °C en estufa (Dalvo, modelo BHR 1, Santa fe, Argentina)) del patógeno, calculándose adicionalmente la producción de zoosporas total. Cada prueba y tratamiento contó con 3 réplicas. La experiencia fue repetida tres veces en tiempos diferentes. Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la aplicación del test *pos hoc* de Student–Newman–Keuls (STNK). Por último se estimaron los costos de producción en los diferentes medios de cultivo probados.

Resultados y discusión

Leptolegnia chapmanii creció en los tres medios de cultivo líquido evaluados. Cualitativamente y de manera general, el mejor crecimiento se presentó en los medios ESG y Emerson YPss, generándose un gran número de pequeñas masas de micelio, mientras que en el medio PYG lo común fue el desarrollo de una sola masa entrelazada que *a posteriori* dificultó su manipulación (Fig. 35).

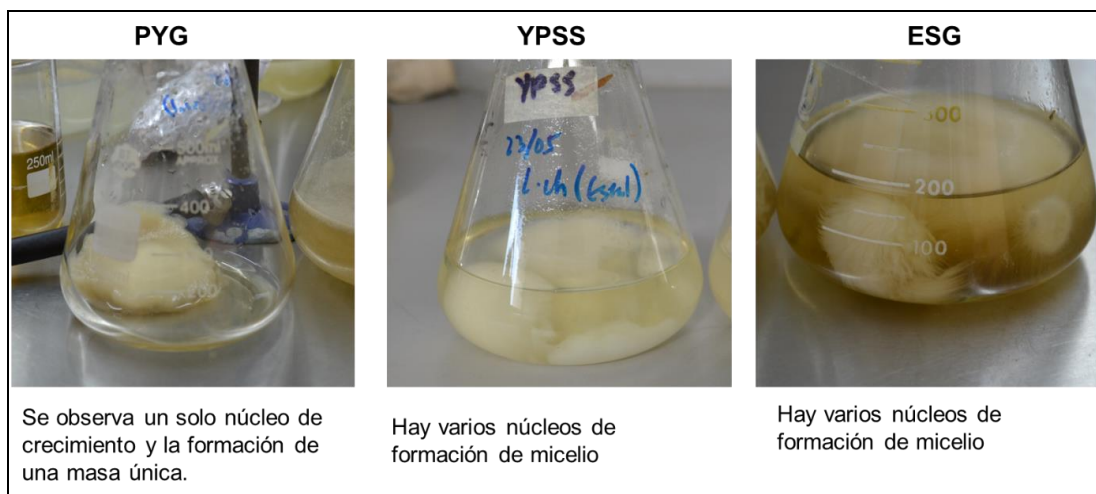


Figura 35. Patrón de crecimiento de *L. chapmanii* en los tres medios de cultivo líquido probados.

Finalizadas las dos semanas de cultivo *in vitro*, se obtuvo en promedio y respectivamente para los medios ESG, PYG y Emerson YPss, 62.4, 48.5 y 93.5 g de biomasa fresca así como 2.9, 0.6 y 3.7 g en seco. En los tres medios, el contenido de humedad de la biomasa producida fue mayor al 95 % (Fig. 36).

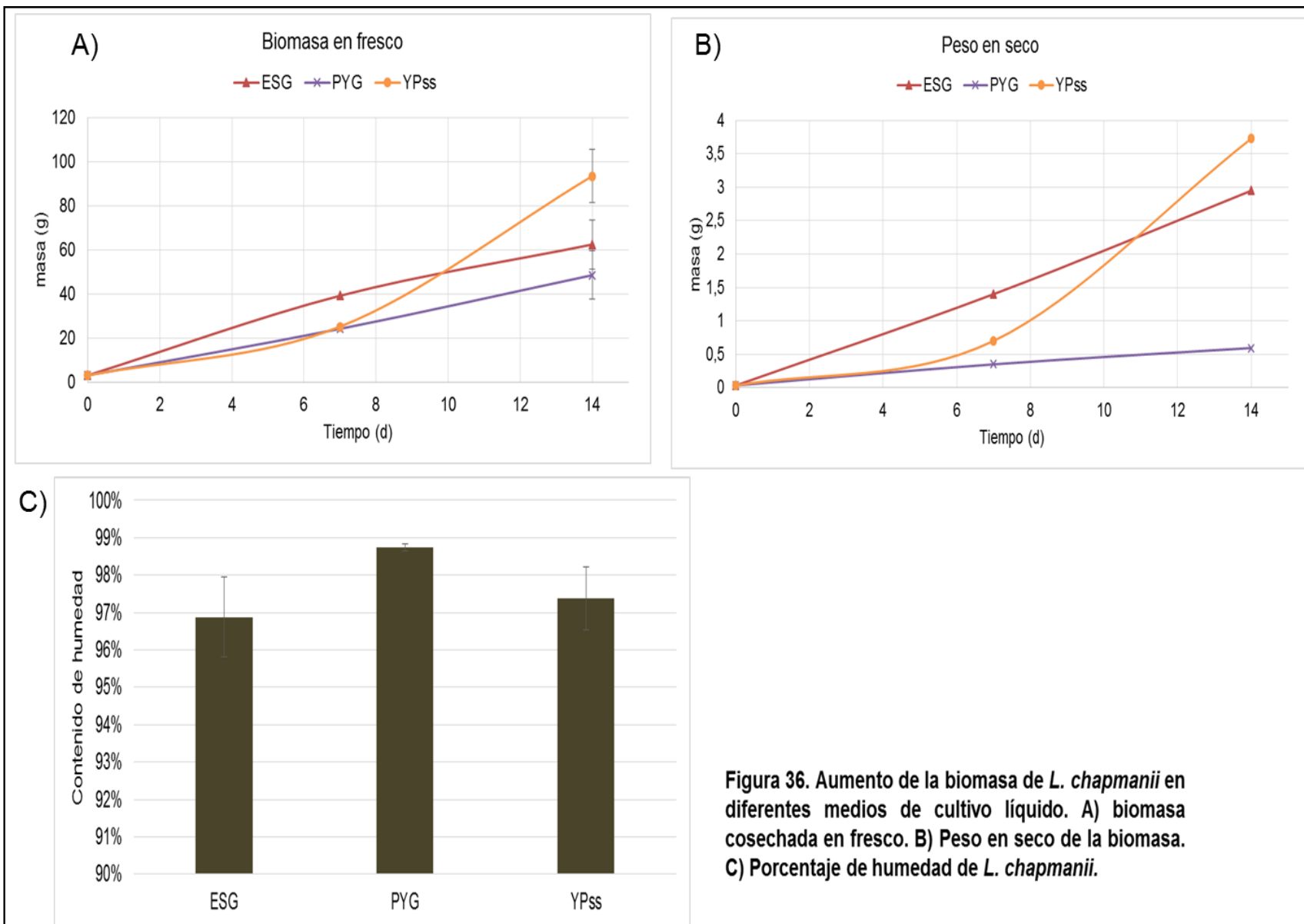


Figura 36. Aumento de la biomasa de *L. chapmanii* en diferentes medios de cultivo líquido. A) biomasa cosechada en fresco. B) Peso en seco de la biomasa. C) Porcentaje de humedad de *L. chapmanii*.

Ninguno de los tres medios de cultivo en los que se desarrolló *L. chapmanii* presentó patogenicidad sobre las larvas de *Ae. aegypti*, evidenciando esto que durante el escalado *in vitro*, el patógeno no desarrolló estructuras reproductivas, creciendo vegetativamente. Esto fue corroborado mediante la observación bajo el microscopio de las muestras tomadas así como con las pruebas de mortalidad realizadas con los medio de cultivo en el que creció la biomasa (0 % de mortalidad por parte de las larvas de *Ae. aegypti*).

Por su parte la producción diaria de zoosporas, posterior a la introducción de la biomasa en agua, fue mayor por parte de *L. chapmanii* escalado en medio ESG. Igualmente importante fue que en este medio (ESG) el tiempo de formación de zoosporangios y liberación de zoosporas fue menor, encontrándose estas estructuras a las 24 h de su inducción en agua. En los otros tratamientos, las primeras zoosporas empezaron a encontrarse a las 48 h después de la introducción en agua (Fig. 37).

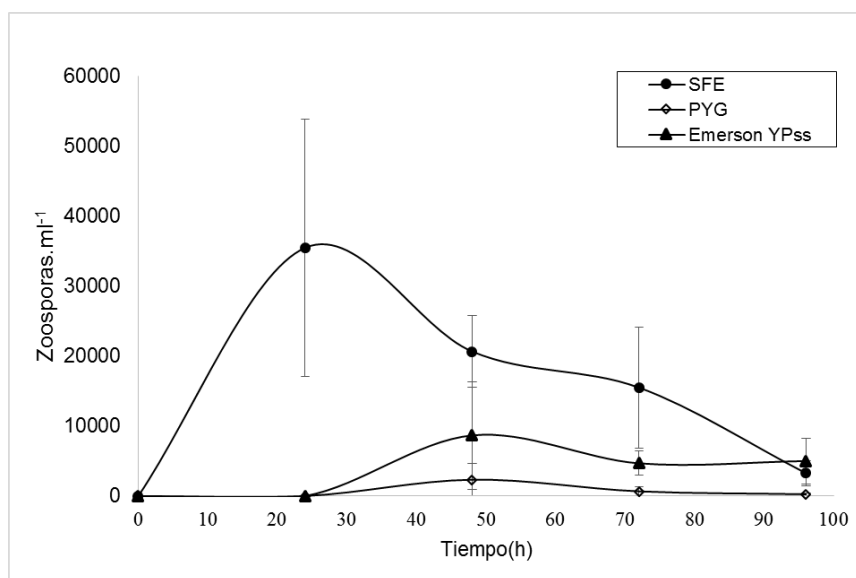


Figura 37. Producción diaria de zoosporas de *L. chapmanii* cultivada en diferentes medios de cultivo líquido y posterior a su introducción en recipientes con agua destilada.

En cuanto a las pruebas de mortalidad con larvas de *Ae. aegypti*, se registraron mortalidades superiores al 90 % en la totalidad de los ensayos realizados con las muestras de la suspensión a partir del medio ESG. Por su parte, los primeros registros de mortalidad con las suspensiones con el material procedente de los medios PYG y Emerson YPss, se presentaron a las 48 h desde la introducción de la biomasa en agua. En todos los casos, la mortalidad registrada a partir del material procedente del medio PYG fue inferior respecto a la registrada a partir de los

otros medios. En cuanto al medio Emerson YPss, la mortalidad aumentó a lo largo del tiempo, siendo coherente con el aumento diario del número de zoosporas en suspensión (Fig. 38).

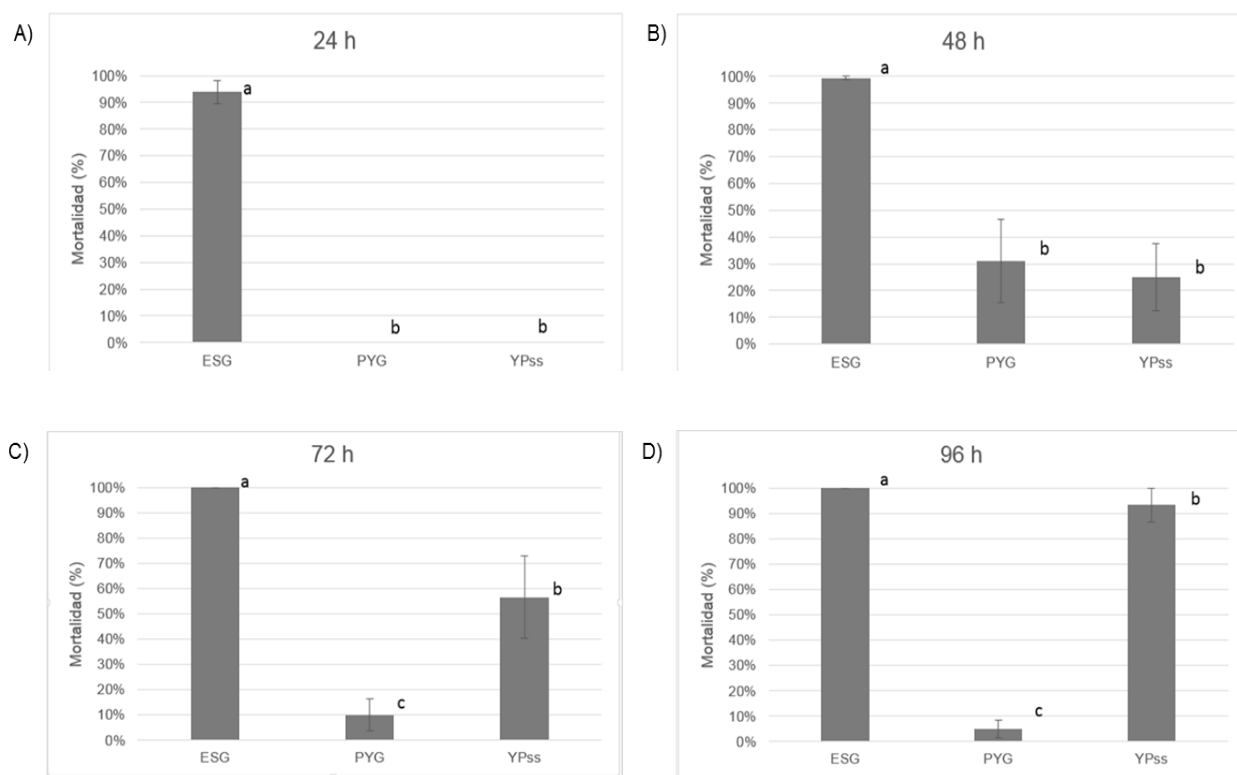


Figura 38. Mortalidad de larvas de *Ae. aegypti* generada por *L. chapmanii* procedente de los diferentes medios de cultivo y posterior a la inducción de la zoosporogénesis mediante introducción en agua destilada. A) Mortalidad registrada con las muestras tomadas a las 24 h. B) Mortalidad registrada con las muestras tomadas a las 48 h. C) Mortalidad registrada con las muestras tomadas a las 72 h. D) Mortalidad registrada con las muestras tomadas a las 96 h. En cada gráfica, las letras agrupan los resultados sin diferencias estadísticamente significativas. ($F_{2,24}=3.4$, $P<0.05$, en todos los casos).

Basándonos en los costos actuales de los compuestos químicos requeridos para la preparación de los diferentes medios de cultivo (Tabla 3), producir un litro de medio de cultivo PYG y Emerson YPss tiene un costo de \$12 y \$15 pesos (Arg) respectivamente (\$9.6 (AR) = US\$ 1 dólar). Por su parte, en una dietética, 100 g de semillas de girasol cuesta \$5, por lo que, producir un litro del medio ESG, tiene un costo de \$5 (extracto de semilla de girasol más agua destilada), resultando 60 y 70 % más económico que los medios tradicionales PYG y Emerson YPss, respectivamente.

Tabla 3. Precios actuales de los compuestos químicos requeridos para la preparación de los medios de cultivo PYG y Emerson YPss.

Producto	Marca	Presentación	Precio (\$)
Peptona de carne	Britania	500 g	1960
Glucosa PA	m/Biopack	1000 g	134
Extracto de levadura	Merck	500 g	620
Almidón soluble	m/Biopack	500 g	162
K ₂ HPO ₄	m/Biopack	500 g	181
MgSO ₄ *7H ₂ O	m/Biopack	500 g	255
Agua destilada	-	3,8 l	18

En cuanto al aumento de la biomasa, se estimó una producción final aprox. de 234, 156 y 121 g de *L. chapmanii* por litro de medio Emerson YPss, ESG y PYG respectivamente. Al comparar este aumento en masa con los costos respectivos a cada medio de cultivo, encontramos que producir 1.000 g de biomasa acarrea un costo final de \$64, \$32 y \$99 pesos (Arg) respectivamente para los mismos medios (US\$6.6; US\$3.3 y US\$10.32, respectivamente). Estos resultados nos llevan a concluir que económicamente la producción en el medio a base de semilla de girasol es la más barata.

La bibliografía referente a la masificación de oomycetes entomopatógenos es acotada. El escalado de *L. giganteum* en fermentadores de 14 y 1000 l con volúmenes efectivos de 10 y 650 l de medio de cultivo líquido a base de extracto de levadura, así como su posterior aplicación en laboratorio y a campo fueron previamente reportados (Kerwin et al., 1994). Igualmente, una metodología de manejo que permitió su almacenamiento durante más de 12 semanas, basada en un sistema simple de producción usando alternamente fases sólidas y líquidas de medio de cultivo a base de semilla de girasol (Jaronski & Axtell, 1984). Otra experiencia reportada con *L. giganteum* fue la producción masiva *in vitro* de zoosporas a partir de cultivos en medio sólidos, post inducción por inmersión en agua (Jaronski & Axtell, 1983).

Pruebas de formulación

Un producto formulado está compuesto básicamente por el ingrediente activo y un medio inerte que da soporte y sirve de vehículo al activo. Pueden usarse algunos aditivos que brindan protección, preservan el producto y prolongan su vida útil, facilitando la aplicación e interacción con los organismos a controlar (Rhodes, 1993). Por lo anterior y basados en la

literatura referente *L. giganteum* se probó el encapsulamiento de *L. chapmanii* en matriz de alginato de calcio según el protocolo propuesto por Axtell & Guzman (1987). Adicionalmente se probaron diferentes sustratos utilizados en prácticas agrícolas.

Materiales y métodos

Encapsulamiento en matriz de alginato de calcio

Para el encapsulamiento en matriz de alginato, se usó alginato sódico, siendo mezclado con el material a encapsular y posteriormente introducido por goteo en una solución de cloruro de calcio. Como resultado, se obtuvieron cápsulas de alginato de calcio con las estructuras de *L. chapmanii* en su interior. Para los ensayos, se preparó una solución gelante mezclando 18 g de CaCl_2 con 500 ml de agua destilada estéril. Aparte, en un vaso de precipitado de 500 ml, un volumen total de 350 ml de agua destilada estéril fue llevado a 60°C en una estufa eléctrica con un agitador magnético. Posteriormente se adicionaron 3 g de alginato sódico siendo mantenida la agitación hasta alcanzar la homogeneidad. Cuando la temperatura de la solución descendió a 25°C se adicionaron 150 ml de agua con el material a encapsular (micelio/zoosporas/larvas), el cual fue preparado previamente como se explica a continuación:

Tejido vegetativo: El micelio desarrollado durante 2 semanas en medio PYG líquido, procedente del proceso de escalado, fue filtrado y enjuagado tres veces con agua destilada (Fig. 39). Posteriormente una muestra de 20 g de la masa total fue dispuesta con 150 ml de agua destilada estéril en un vaso de precipitado de 500 ml. Este material fue licuado durante 20 s con una licuadora industrial de 1.5 l (Anion, Buenos Aires, Argentina) y posteriormente mezclada con los 350 ml de alginato de sodio en solución acuosa, para un volumen final de 500 ml. Adicionalmente y en paralelo, una muestra del licuado fue conservada a 25°C para determinar *a posteriori* la patogenicidad del material sin encapsulamiento, utilizando larvas L2/L3 de *Ae. aegypti*.

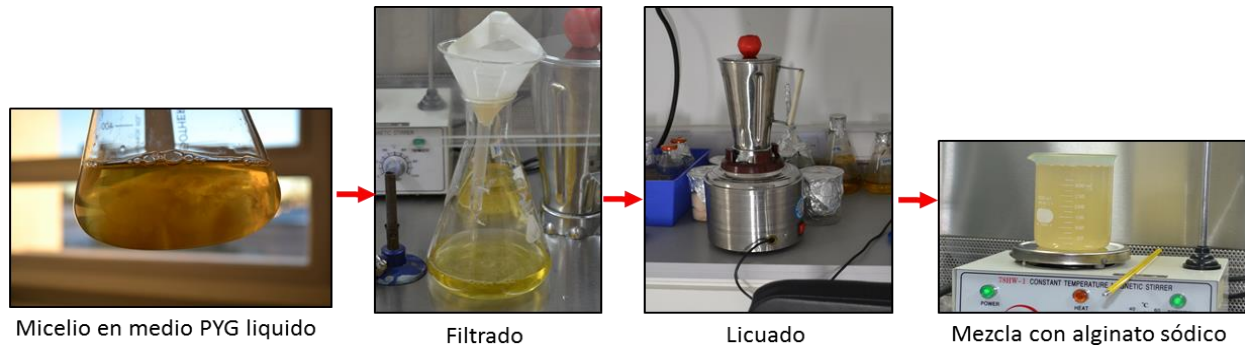


Figura 39. Preparación del micelio para el proceso de encapsulamiento en matriz de alginato de calcio.

Zoosporas: Se prepararon suspensiones de zoosporas en agua destilada estéril, a partir de *L. chapmanii* mantenido *in vitro* como se explicó previamente. Posteriormente se mezcló un volumen de 150 ml de la suspensión con 350 ml de la solución con alginato sódico (Vol. Total de 500 ml). Con cámara de Neubauer se determinó la concentración de zoosporas en esta suspensión, confirmando estar en el orden de magnitud de 10^4 zoosporas.ml⁻¹ (Fig. 40). Con el fin de determinar la viabilidad de las estructuras reproductivas antes de su encapsulamiento, se prepararon en paralelo 300 ml de la solución de alginato sódico con la misma concentración de zoosporas en suspensión,

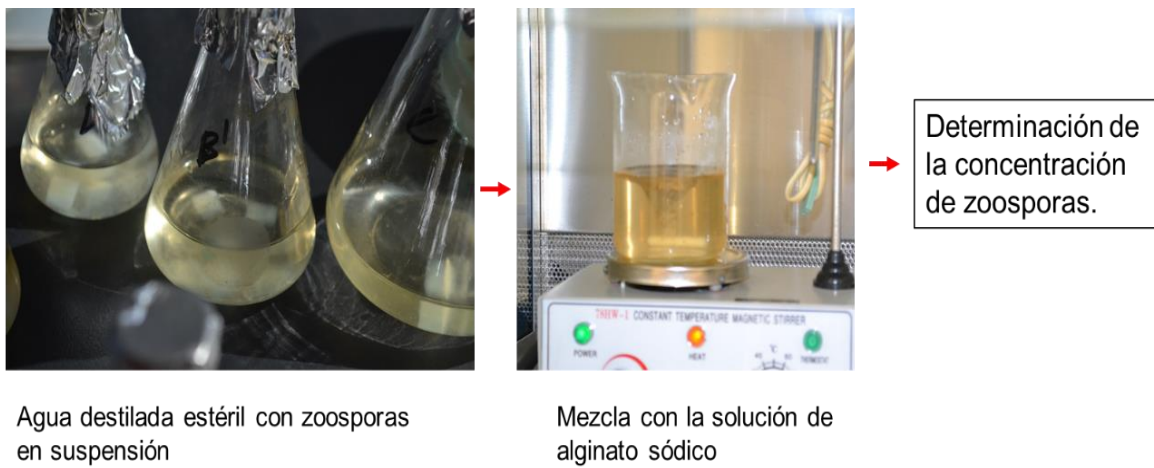


Figura 40. Preparación de las zoosporas en suspensión para el proceso de encapsulamiento en matriz de alginato de calcio.

Larvas de *Ae. aegypti* infectadas: Se encapsularon individualmente larvas de *Ae. aegypti* muertas por la acción de *L. chapmanii* post 24 h de infección, con el fin de determinar si *L.*

chapmanii era capaz de atravesar la barrera física generada por el alginato de calcio, utilizando como fuente de energía la reserva nutricional de la larva de mosquito.

Cada material a encapsular (micelio/zoosporas/larvas) fue tratado individualmente. El encapsulamiento se realizó en la cámara de flujo laminar, haciendo uso del agitador magnético con el fin de mantener en movimiento la solución gelante de cloruro de calcio. Por goteo, con ayuda de una jeringa de 60 ml, se incorporó la mezcla con alginato sódico (Fig. 41), salvo en el caso de las larvas de *Ae. aegypti*, en donde el goteo se realizó con una pipeta de plástico. Las cápsulas formadas fueron enjuagadas con agua destilada estéril y secadas con ayuda de papel absorbente, siendo almacenadas en vasos de precipitado de vidrio con tapa de aluminio a 4°C en heladera.

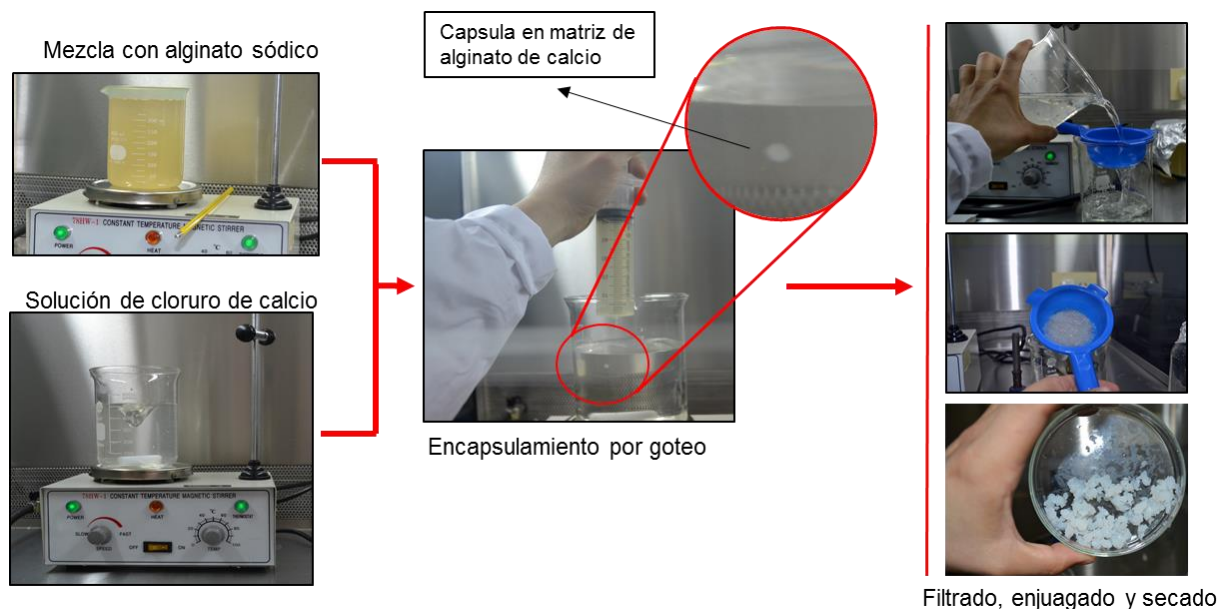


Figura 41. Proceso de encapsulado en matriz de alginato de calcio.

La infectividad y patogenicidad de los formulados en alginato de calcio, fue determinada empleando recipientes plásticos de 200 ml con 100 ml de agua corriente sin cloro. En cada recipiente se adicionaron 25 g del material encapsulado y 20 larvas sanas de *Ae. aegypti* (L2/L3) procedentes de la colonia de cría. Cada ensayo estuvo compuesto por tres réplicas de cada tratamiento y un control negativo con cápsulas de alginato de calcio sin *L. chapmanii*. Adicionalmente y con el fin de confirmar la viabilidad de *L. chapmanii*, cápsulas de Petri de 60 mm con medio de cultivo YPss-agar fueron inoculadas con muestras del producto obtenido,

después de su inmersión en alcohol etílico al 70% por 1 minuto. Las mismas fueron mantenidas en incubadora a 25°C.

Uso de sustratos sólidos

Los sustratos sólidos probados para almacenar, soportar y proveer el servicio como vehículo dispersor de *L. chapmanii* fueron la arena gruesa, vermiculita y mantillo de bosque, escogidos por ser sustratos sólidos usualmente implementados en prácticas agrícolas. Previo al inicio de las pruebas, los sustratos fueron esterilizados en autoclave durante 30 minutos a 120 °C y 20 psi. En recipientes plásticos de 200 ml, se adicionaron 40 ml de cada sustrato sólido con 50 ml de agua corriente declorinada mediante reposo durante 48 h. Como inóculo de *L. chapmanii*, se adicionaron 15 larvas de *Ae. aegypti* muertas y con buen desarrollo del patógeno en cada recipiente. Este material fue llevado a incubadora a 25°C durante 120 h hasta secarse, manteniendo la humedad sin presentar escurrimiento (equivalente a la capacidad de campo, en términos agronómicos) (Fig. 42). Para cada sustrato se contó con tres recipientes réplicas y un control sin inóculo del patógeno. Semanalmente, la viabilidad de los sustratos inoculados, fue probada mediante la adición de 50 ml de agua y 20 larvas sanas (L2/L3) de *Ae. aegypti* procedentes de la colonia de cría.



Figura 42. Sustratos sólidos utilizados en las pruebas con *L. chapmanii*. A) Mantillo de bosque y vermiculita. B) Arena gruesa de mar.

Resultados y discusión

Encapsulamiento en alginato de calcio

En los ensayos con micelio, zoosporas y larvas de *Ae. aegypti*, se obtuvieron cápsulas irregulares con tendencia esférica y diámetro variable no superior a los 5 mm Como resultado de las pruebas de mortalidad con material fresco, se registró una mortalidad del 100 % con las zoosporas suspendidas en la solución de alginato sódico, así como con las cápsulas frescas (menos de una hora, post encapsulamiento). Por su parte, el material vegetativo (micelio) nunca fue infectivo, ni en fresco post licuado, ni encapsulado (Tabla 4), posiblemente el licuado fue un proceso muy agresivo para este organismo. Al microscopio óptico se comprobó la presencia del material encapsulado al interior de las cápsulas (Fig. 43). Durante las pruebas de mortalidad se observó a las larvas de *Ae. aegypti* alimentándose de las cápsulas de alginato de calcio; de esta manera, posiblemente las zoosporas frescas encontradas allí generaron la infección, no permaneciendo viables posteriormente durante el periodo de almacenamiento.

Tabla 4. Pruebas de mortalidad con diferentes estructuras de *L. chapmanii*, en diferentes momentos del proceso de encapsulamiento con alginato de calcio.

	Procedencia	Mortalidad (%)
Previo al encapsulamiento	Zoosporas suspendidas en solución de sodio alginato sódico	100
	Micelio licuado en suspensión acuosa.	0
	Micelio licuado, suspendido en solución con alginato de calcio.	0
Material encapsulado	Cápsulas con zoosporas. Menos de 1 h post encapsulamiento.	100
	Cápsulas con zoosporas. Una semana post encapsulamiento.	26
	Cápsulas con micelio. Menos de 1 h post encapsulamiento	0
	Cápsulas con micelio. 1 semana post encapsulamiento	0

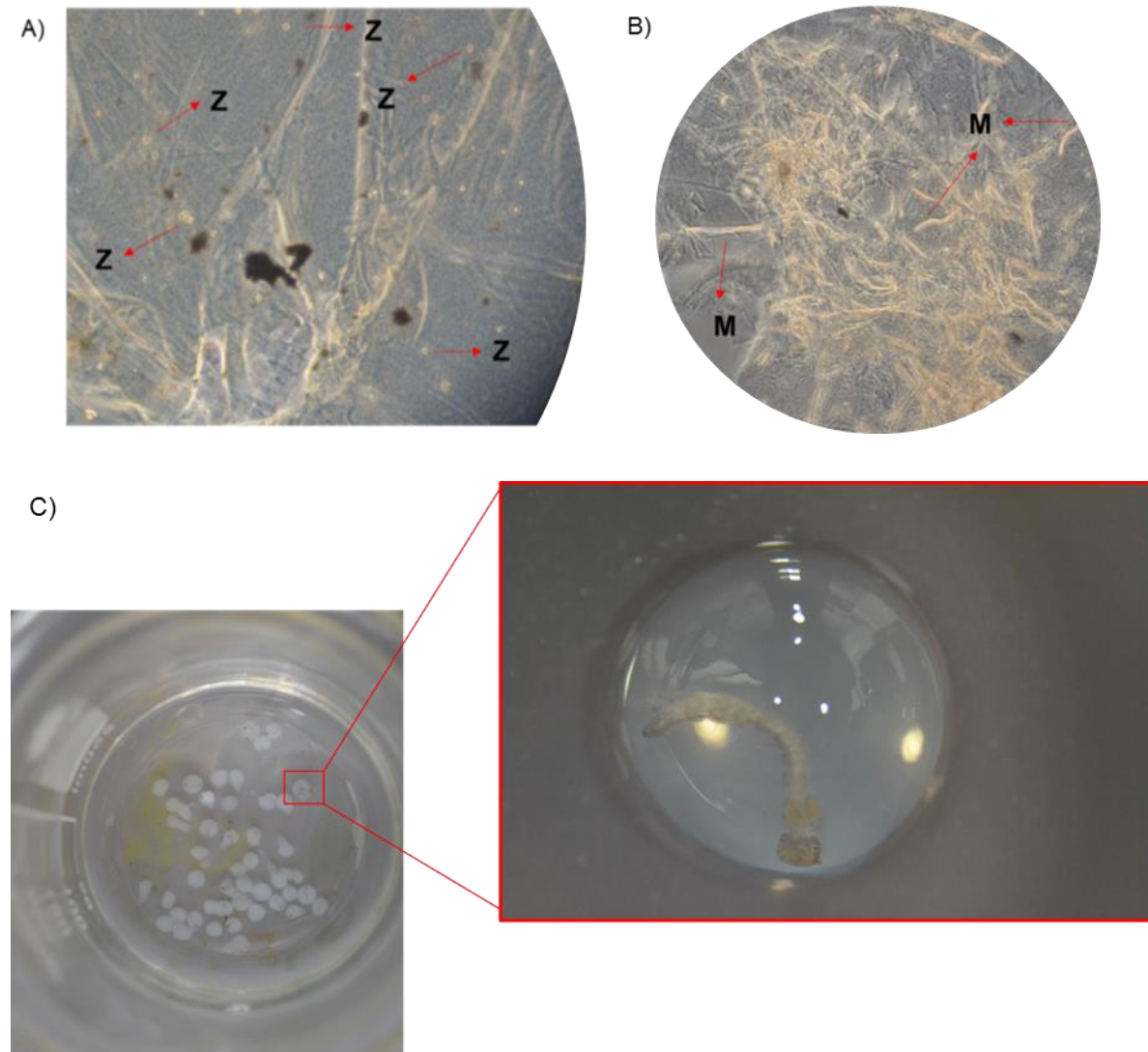


Figura 43. Estructuras encapsuladas en matriz de alginato de calcio. A) Cápsulas con zoosporas (Z: Zoosporas). B) Cápsulas con micelio (M: Micelio). C) Cápsulas con larvas de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chapmanii*.

Como se mencionó previamente, la finalidad de realizar este tipo de formulaciones, es la de mejorar el almacenamiento del patógeno, manteniéndolo viable y de fácil aplicación. Con respecto al patógeno *L. giganteum*, las primeras experiencias de aplicación involucraron la producción *in vitro* de zoosporas a partir de medios de cultivo inoculados con el microorganismo, posterior a su introducción en agua (Jaronski & Axtell, 1983); esta metodología igualmente aplicable a *L. chapmanii*, se considera efectiva, pero poco práctica como opción para el almacenamiento, al ser el medio de cultivo susceptible de contaminación por su composición nutricional. Otra forma de aplicación en campo reportada con *L. giganteum*,

fue a partir de placas de medio sólido con una semana de desarrollo del patógeno, licuado durante 10 a 20 s, con 50 -100 ml de agua destilada (Jaronski & Axtell, 1984). El encapsulamiento en matriz de alginato ha sido descrito para hongos y nematodos entomopatógenos (Bedding, 1988; Pereira & Roberts, 1991; Shah et al., 1998; Batista et al., 2014). Por su parte, para *L. giganteum* esta técnica fue aplicada empleando por separado el micelio y las oosporas, con la finalidad principal de mejorar su almacenamiento y manipulación así como facilitando su aplicación. De esta manera, se reportó la capacidad por parte del patógeno de desarrollar estructuras infectivas, generando gran mortalidad en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* tratadas. Igualmente, se reportó que este tipo de formulación mantuvo viable al patógeno entre 48 y 75 días post encapsulamiento (Axtell & Guzman, 1987). La aplicación en campo de *L. giganteum* encapsulado en matriz de alginato de calcio mostró gran eficacia de infección así como el posterior reciclaje del patógeno en larvas de mosquitos, persistiendo hasta por 10 semanas en diferentes ambientes con presencia de *Ae. aegypti* y *Cx. quinquefasciatus* (Rueda et al., 1990). Otros aspectos a considerar son la procedencia del alginato y la viscosidad de las cápsulas como consecuencia de la concentración de alginato empleado, ya que pueden generar variación en el tiempo de almacenamiento así como en las tasas de infección (Patel et al., 1990).

Respecto a otros tipos de formulación, el uso de pectina como biopolímero para el encapsulamiento del micelio y zoosporas de *L. giganteum*, presentó actividad residual al menos durante 12 días después de su aplicación (Maldonado-Blanco et al., 2011). La formulación mediante emulsificación agua en aceite (W/O) de suspensiones con estructuras infectivas de *L. giganteum*, mantuvo viable al patógeno hasta por 12 semanas, siendo almacenado a temperatura ambiente (Vandergheynst et al., 2007).

En los medios de cultivo inoculados con los productos de las formulaciones en matriz de alginato de calcio, no se desarrolló *L. chapmanii*, creciendo por su parte comunidades bacterianas (Fig. 44). Esto nos confirma que el patógeno no fue capaz de atravesar la barrera física generada por el alginato de calcio, incluso en el caso en donde se encapsularon las larvas de *Ae. aegypti*, en donde pensamos que podría aprovechar a las mismas como fuente de energía para el desarrollo y penetración del alginato. Sin embargo, cuando se introdujeron larvas sanas en los recipientes con larvas de *Ae. aegypti*, infectadas y encapsuladas, se apreció que las larvas sanas se alimentaron de las cápsulas, infectándose con el entomopatógeno.

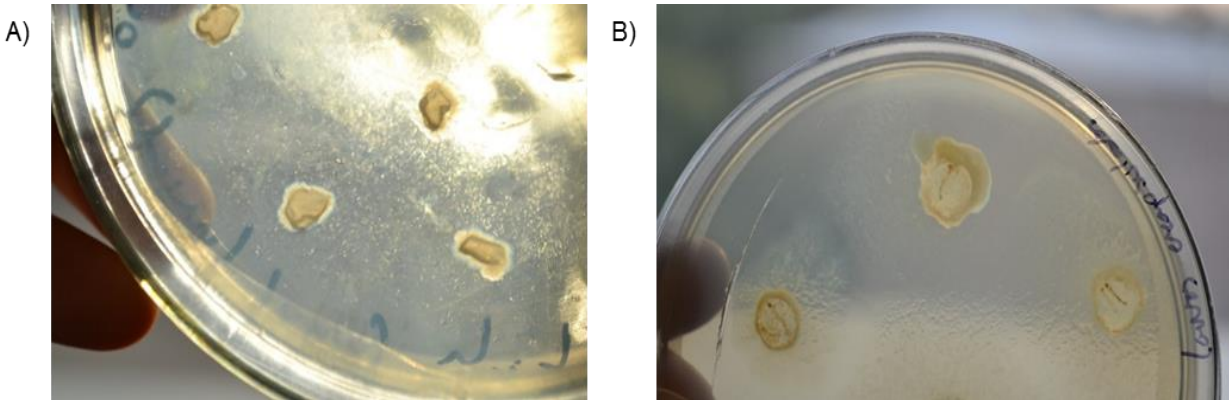


Figura 44. Crecimiento bacteriano a partir de las cápsulas de alginato de calcio. A) Micelio y zoosporas encapsuladas. B) Larvas de *Ae. aegypti* infectadas con *L. chapmanii*

Uso de sustratos sólidos

Los sustratos inoculados con *L. chapmanii* presentaron mortalidades de 0; 68 ± 10 ; y 44 ± 4 % en las poblaciones larvales de *Ae. aegypti* tratadas con arena, vermiculita y mantillo de bosque respectivamente. La mortalidad entre los tratamientos se diferenció estadísticamente ($P < 0.05$), (Fig. 45). Por su parte, la mortalidad en los controles negativos, con los sustratos sin inocular, fue nula. Al revisar bajo el microscopio óptico las larvas de *Ae. aegypti*, se encontró gran desarrollo de *L. chapmanii* en aquellas que fueron tratadas con la vermiculita inoculada, no evidenciándose lo mismo en las tratadas con el mantillo de bosque. El pH del agua con la vermiculita se mantuvo neutro (7); por su parte el agua con el mantillo de bosque se tornó ácida (5), afectando posiblemente tanto al patógeno como a las larvas de *Ae. aegypti*.

Los sustratos inoculados, almacenados a 25°C , no presentaron virulencia a la segunda semana desde su inoculación.

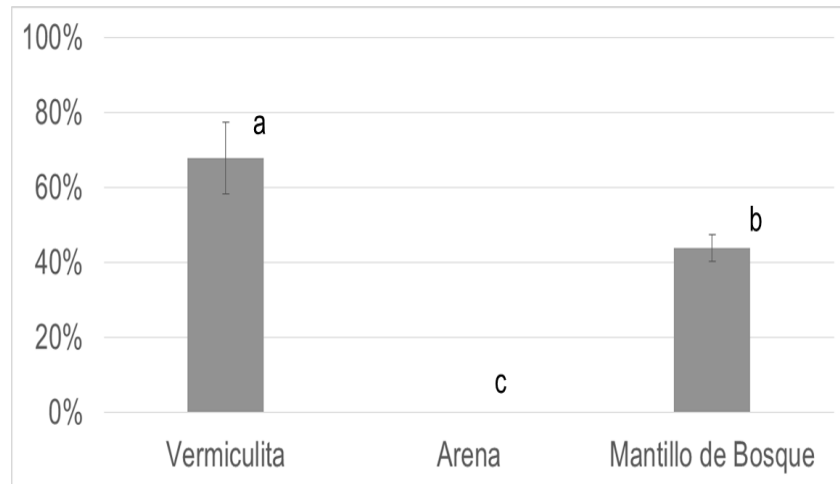


Figura 45. Mortalidad de las larvas de *Ae. aegypti* generada con los sustratos sólidos previamente inoculados con *L. chapmanii*. Estadísticamente, la mortalidad fue diferente en los tres tratamientos ($F_{2,15} = 3.7$, $P < 0.005$)

Pruebas preliminares para la producción de *L. chapmanii* en un bioreactor de fermentación

Continuando con los ensayos de escalado con *L. chapmanii*, se realizó una primera prueba de masificación haciendo uso de un bioreactor de 2.5 l con medio de cultivo líquido y en pro del desarrollo de un producto para mejorar el almacenamiento y la aplicación del entomopatógeno.

Materiales y métodos

El proceso de escalado inició con la preparación del pre inóculo mediante la adición de un trozo (1 cm² de área) de medio PYG-agar con desarrollo de *L. chapmanii* en frascos de Erlenmeyer de 40 ml con 10 ml de medio PYG-líquido, previamente esterilizados en autoclave a 120 °C y 20 psi. Este pre inóculo fue mantenido durante 48 h en agitación a 180 rpm y bajo condiciones de laboratorio con el fin de asegurar la ausencia de bacterias en el medio. Posteriormente, se realizó un primer escalado trasvasando el pre inóculo a frascos de Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio PYG-líquido estéril. Cabe destacar que aun cuando los resultados previos con medio PYG no fueron los mejores, para el desarrollo del presente ensayo fue escogido por permitir la detección rápida y visual de contaminación. En esta fase, *L. chapmanii* fue mantenida durante 48 h bajo las mismas condiciones de cultivo. Posteriormente,

este material fue utilizado para inocular un bioreactor de fermentación (New Brunswick™ BioFlo®, NY, USA) con 2 l de medio PYG-líquido, previamente esterilizado en autoclave. El mismo fue acondicionado mediante la remoción de los baffles laterales y la ubicación del aspa central de agitación a la altura respectiva al volumen 1.5 l. Durante la fermentación, el bioreactor se mantuvo a 25 °C y 35 rpm, con aireación constante y condiciones de asepsia. A diario se tomó una muestra, siendo observada al microscopio en búsqueda de estructuras reproductivas. Adicionalmente, se probó su patogenicidad mediante la adición de larvas de *Ae. aegypti*. La biomasa producida fue concentrada a los 5 días mediante centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos y posteriormente resuspendida en agua destilada estéril bajo condiciones de asepsia en cámara con flujo laminar. El producto final fue envasado en botellas de vidrio color ámbar de 1 l previamente esterilizadas. Las mismas fueron almacenadas en heladera a 4°C.

Ensayo I

Se realizaron pruebas de mortalidad con el sobrenadante así como con muestras de la biomasa recolectada en recipientes plásticos de 200 ml con 100 ml de volumen efectivo. De esta manera, a cada recipiente se le adicionó la biomasa presente en 10 ml del producto cosechado, completándose el volumen a 100 ml con agua sin cloro. Por su parte, las pruebas con el sobrenadante, se realizaron directamente con el líquido obtenido del proceso de concentración. En ambos casos (biomasa y sobrenadante), la patogenicidad se probó mediante la adición de 25 larvas (L2/L3) de *Ae. aegypti* por recipiente, registrándose la mortalidad pasadas 24 y 48 h desde el inicio. Se contó con tres réplicas por cada tratamiento, así como un control negativo con agua sin cloro.

Ensayo II

Este ensayo se realizó con *L. chapmanii* mantenido en heladera a 4°C, una semana después de haber sido cosechada y envasada como se describió previamente. Se usaron recipientes plásticos de 200 ml, 400 ml, 3 l y 5 l con volumen efectivo de 150 ml, 300 ml, 1 l y 3 l respectivamente, con agua corriente sin cloro. Los recipientes fueron inoculados con la biomasa presente en 10 ml del producto cosechado. A las 24 y 48 h, se revisó una muestra de la biomasa al microscopio óptico, en busca de estructuras reproductivas. Pasadas 48 h desde la inoculación, se adicionaron 20 larvas sanas de *Ae. aegypti* en cada recipiente con el fin de probar la viabilidad y patogenicidad del entomopatógeno.

Resultados preliminares

Leptolegnia chapmanii fue capaz de crecer en el bioreactor bajo las condiciones ambientales establecidas. Su patrón de crecimiento fue muy diferente al obtenido en los ensayos de escalado con el mismo medio de cultivo, desarrollándose durante las primeras 48 h un gran número de pequeñas masas de micelio (Fig. 46). Después de este tiempo, visualmente la biomasa no aumentó, manteniéndose la densidad de las estructuras en suspensión. El medio de cultivo por su parte, se mantuvo transparente, descartando así cualquier tipo de contaminación bacteriana durante la fermentación. En las muestras diarias tomadas durante los 5 días del proceso, no fue evidente la presencia de estructuras reproductivas. Igualmente, estas muestras no fueron patogénicas para las larvas de *Ae. aegypti* adicionadas.

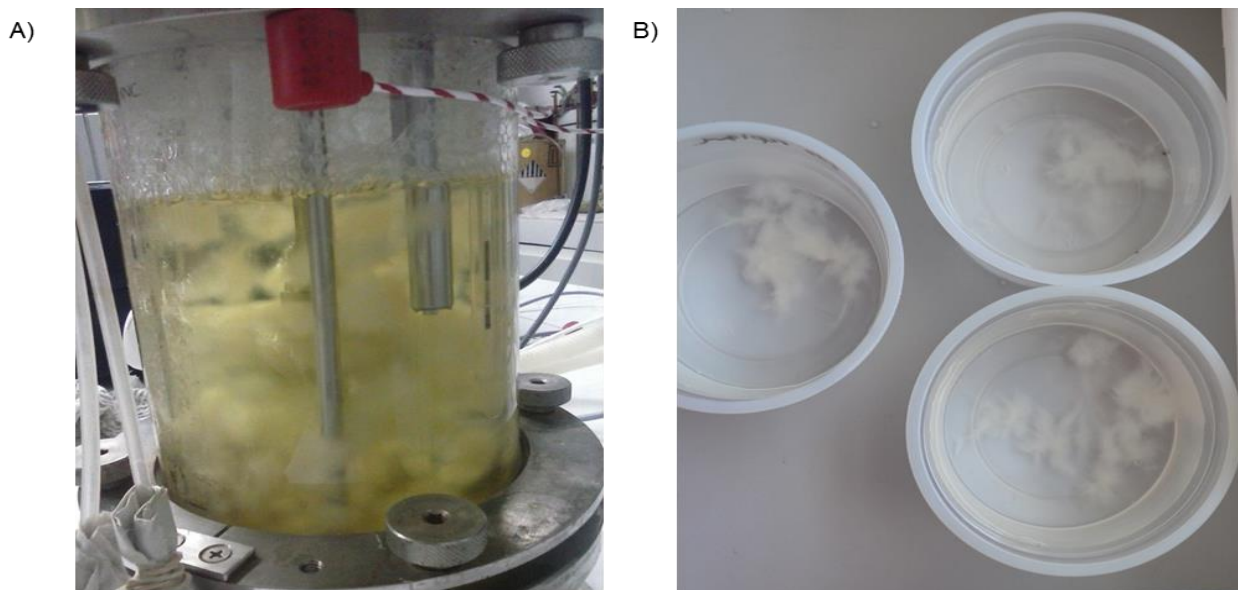


Figura 46. A) Fermentación de *L. chapmanii* en medio de cultivo PYG-líquido y condiciones controladas en un bioreactor New Brunswick™ BioFlo® 310. B) Patrón de crecimiento de la biomasa de *L. chapmanii*. Nótese las pequeñas masas de micelio.

Ensayo I

Las pruebas de mortalidad con el sobrenadante así como con las muestras de biomasa recién cosechada, no presentaron mortalidad en las poblaciones larvales de *Ae. aegypti*. De esta manera se confirmó que la biomasa cosechada correspondió principalmente a tejido vegetativo carente de estructuras infectivas.

Ensayo II

La biomasa introducida en los diferentes recipientes, indiferentemente al volumen de los mismos, inició el proceso de zoosporogénesis desde las 24 h de su inmersión en agua (Fig. 47), encontrándose zoosporas libres en el medio a las 48 h.

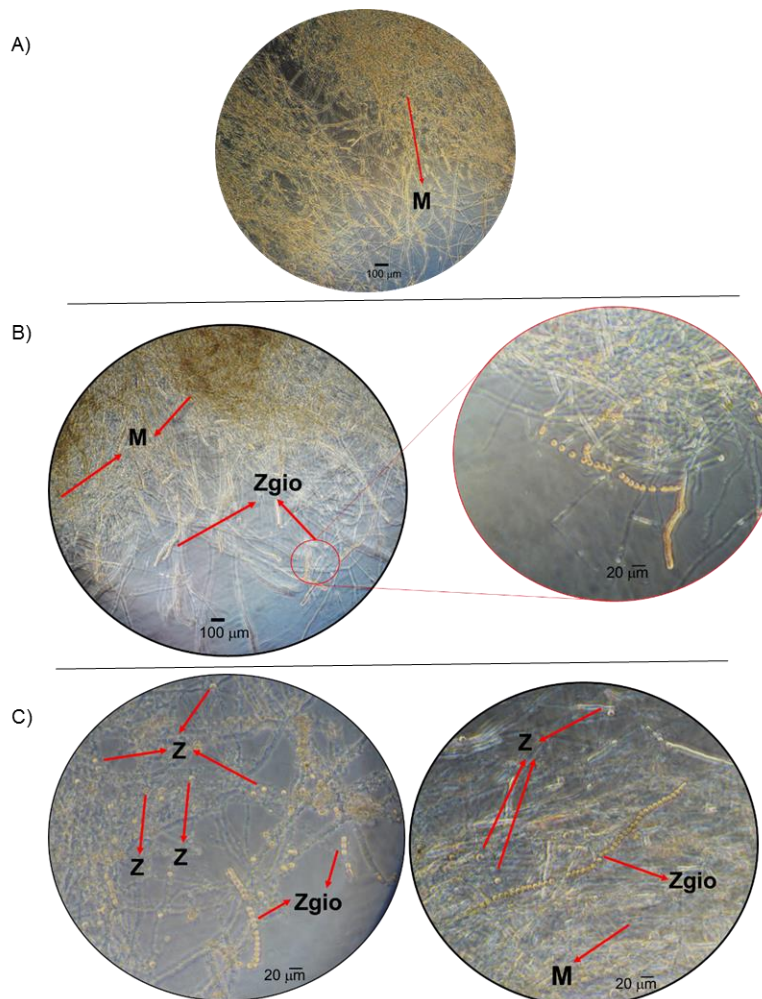


Figura 47. *L. chapmanii*. Proceso de zoosporogénesis a lo largo del tiempo. A) Material de partida almacenado en heladera a 4°C. B) Formación de zoosporangios, 24 h post introducción en los recipientes con agua. C) Presencia de zoosporangios y liberación de zoosporas en el medio, 48 h post introducción en los recipientes con agua. M: Micelio, Zgio: Zoosporangio, Z: Zoospora libre.

Respecto a las pruebas de mortalidad, pasadas 24 h desde la adición de las larvas de *Ae. aegypti*, se registraron mortalidades superiores al 70 %, confirmándose así la viabilidad y patogenicidad de las zoosporas producidas (Fig. 48).

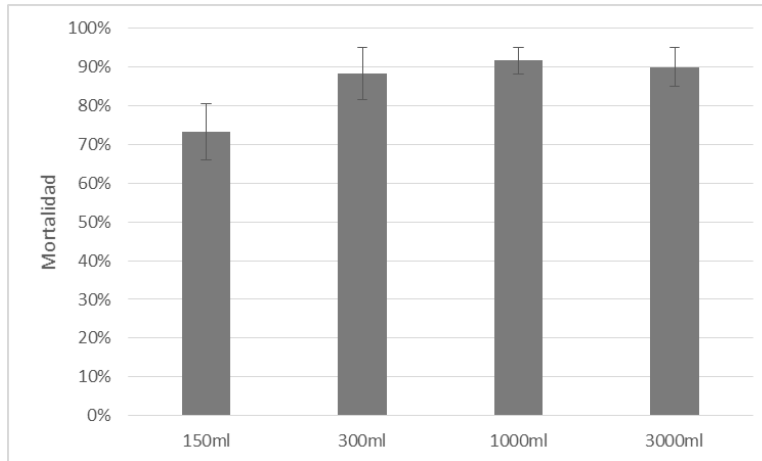


Figura 48. Mortalidad media de las larvas de *Ae. aegypti* (n=20) generada por *L. chapmanii* post 48 h de inmersión en el agua contenida en recipientes con diferente volumen.

CONCLUSIONES

Leptolegnia chapmanii fue capaz de crecer y desarrollarse en el medio ESG con una tasa de crecimiento menor a la de los otros medios de cultivo. La biomasa producida en este medio (ESG) presentó la mayor y más rápida capacidad de producción de zoosporas, siendo comparativamente más infectivo y patogénico.

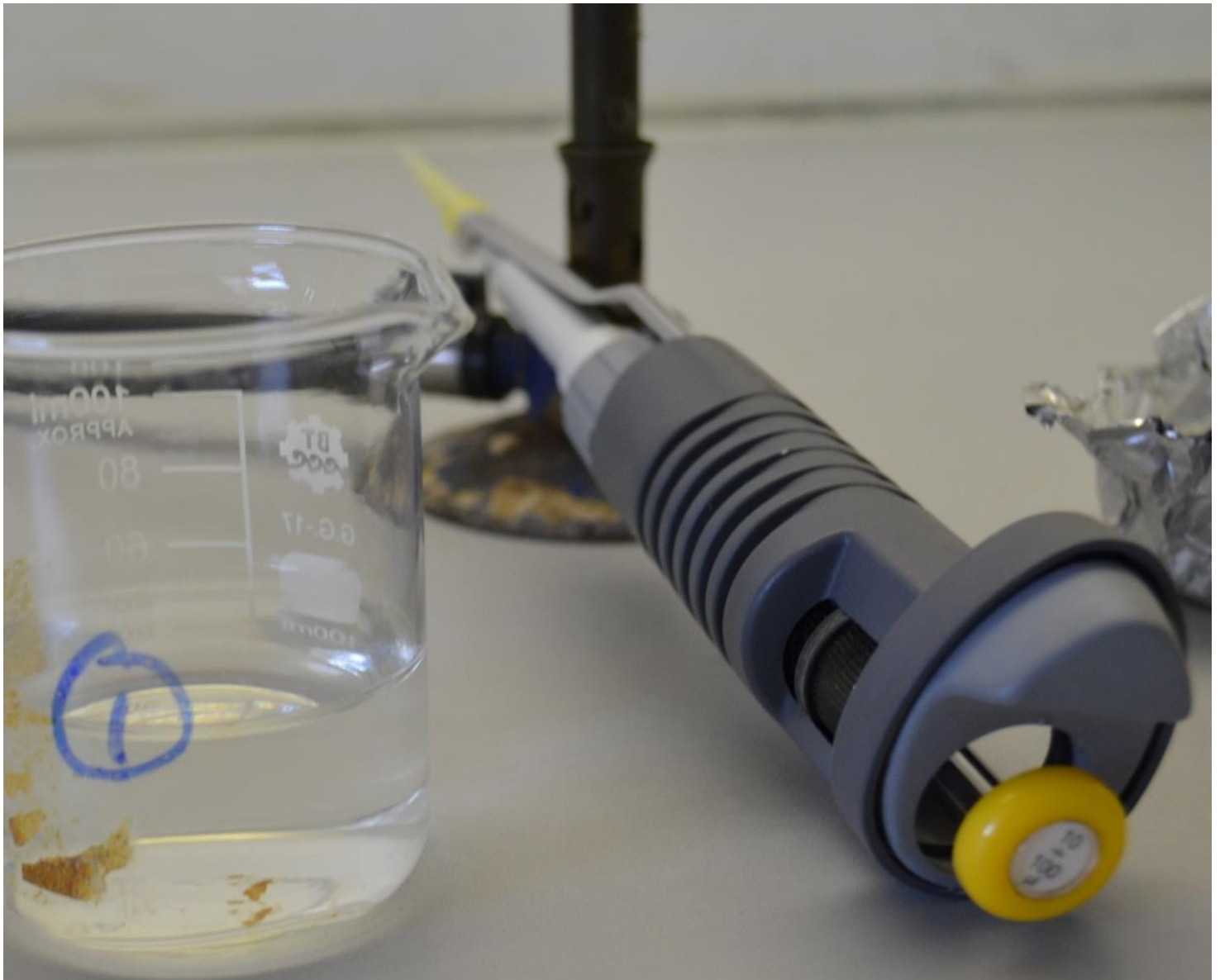
Del proceso de escalado en medio líquido, el mayor aumento en masa por parte de *L. chapmanii* se obtuvo con el medio Emerson YPss. Sin embargo, a partir de la biomasa desarrollada en el medio (ESG) se obtuvo la más rápida y numerosa producción de zoosporas. El patrón de crecimiento del patógeno varió en los diferentes medios de cultivo, presentando mejores características para su manipulación en los medios Emerson Ypss y ESG.

Leptolegnia chapmanii no desarrolló estructuras reproductivas mientras estuvo en medio de cultivo, siendo para ello necesaria su inducción en un medio nutricionalmente pobre, como lo es el agua.

Además de los beneficios ya mencionados, el medio de cultivo ESG resultó comparativamente más económico, siendo una alternativa de interés para su producción masiva.

Se descarta al encapsulamiento de las diferentes estructuras de *L. chapmanii* en matriz de alginato de calcio, como opción para su mantenimiento y aplicación, en vista de la pérdida de patogenicidad y viabilidad obtenida experimentalmente. Por su parte, y aunque con la vermiculita inoculada se obtuvo los mejores resultados de mortalidad, la infectividad por parte de la misma no fue superior a una semana.

Leptolegnia chapmanii creció adecuadamente en el bioreactor, presentando un patrón de desarrollo con buenas características para su manipulación y aplicación. Igualmente desarrolló estructuras infectivas entre 24 - 48 h después de su inmersión en agua, siendo patogénico para las larvas de mosquito. Actualmente se está evaluando el tiempo de viabilidad para el producto almacenado en heladera a 4°C y se están realizando pruebas en un bioreactor de mayor capacidad con el medio ESG líquido.



**CAPÍTULO V: Compatibilidad
de *L. chapmanii* con otros
productos larvicidas.**

CAPÍTULO V: Compatibilidad de *L. chapmanii* con otros productos larvicidas.

Consideramos importante conocer la compatibilidad del entomopatógeno *L. chapmanii* con otros productos larvicidas con el fin de determinar la viabilidad de su implementación en planes de manejo integrado. De esta manera, y abarcando lo propuesto en el objetivo 6, se evaluó el efecto de dos productos larvicidas (en diferentes concentraciones) en el crecimiento *in vitro* de *L. chapmanii*.

Compatibilidad de *L. chapmanii* con el regulador de crecimiento Diflubenzuron y con aceite de neem (*Azadirachta indica*).

Materiales y métodos

En este ensayo se usó Diflubenzurón marca Dimilin® en presentación granulada (GR2: 20 g/kg) así como un aceite de neem con 3.400 ppm de azadiractina. Las concentraciones de Dimilin® usadas durante el presente ensayo fueron superiores a las recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para aguas potables (0.25 pmm) (WHO, 2008), puesto que el producto no se adicionó en el agua directamente para el control de las poblaciones larvales de *Ae. aegypti*, sino al medio de cultivo en el que creció *L. chapmanii* y con el fin de evidenciar su efecto en el crecimiento *in vitro* del entomopatógeno. Por su parte, no se contó con una dosis de referencia para la aplicación del aceite de neem, por lo cual se seleccionaron tres concentraciones diferentes con el fin de evidenciar si la adición del mismo en el medio de cultivo afectaba el crecimiento de *L. chapmanii* (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración final de los productos larvicidas Dimilin ® y aceite de neem en el medio de cultivo PYG-agar.

	Concentración (ppm)
Dimilin ®	24
	105
	1045
Neem	100
	500
	1000

De esta manera, los productos larvicidas fueron adicionados en las diferentes concentraciones al medio de cultivo PYG-agar en los frascos de Erlenmeyer antes de su solidificación (entre 30-35°C) y previo al proceso de plaqueo en cápsulas de Petri (100 mm). Posteriormente, los medios de cultivo fueron inoculados mediante siembra en el centro de un trozo (1 cm²) de medio de cultivo con desarrollo de *L. chapmanii*, siendo mantenidos en incubadora a 25°C. El crecimiento de *L. chapmanii* fue determinado midiendo con regla milimetrada el radio de expansión desde el centro hacia la periferia del medio de cultivo, cada 24 h durante 4 días. Cada ensayo contó con 5 réplicas por tratamiento, siendo la experiencia repetida tres veces en tiempos diferentes.

Pasados 7 días desde su inoculación, se indujo la producción de zoosporas por parte de *L. chapmanii* mantenido *in vitro* en los diferentes medios de cultivo, adicionando 5 cubos (cada cubo con área = 1 cm²) de cada medio de cultivo en recipientes plásticos (200 ml) con 100 ml de agua destilada. Los recipientes fueron mantenidos en incubadora a 25°C durante 48 h dando espera al desarrollo y liberación de las estructuras reproductivas. Cumplido este lapso, se realizaron las pruebas de mortalidad adicionando 20 larvas sanas (L2/L3) de *Ae. aegypti* provenientes de la colonia de cría. Cada tratamiento contó con tres réplicas y un control negativo del medio de cultivo respectivo sin desarrollo de *L. chapmanii*. Igualmente, se dispuso de un control negativo con agua de la misma procedencia. Los recipientes fueron mantenidos en incubadora a 25°C, registrándose la mortalidad a las 48 h. La experiencia se repitió tres veces en tiempos diferentes.

Los datos de mortalidad en porcentaje, fueron transformados por el arcoseno de la raíz cuadrada para el análisis estadístico. El crecimiento radial así como la mortalidad generada en cada tratamiento, fueron analizados mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA), aplicándose igualmente el estadístico *pos hoc* SNK para agrupar los tratamientos sin diferencias estadísticas.

Resultados y discusión

Leptolegnia chapmanii fue capaz de crecer y desarrollarse en todos los medios de cultivo indiferente a la adición de los productos larvicidas en las diferentes concentraciones. Estadísticamente el crecimiento radial varió a lo largo del tiempo, con tasas promedio de 10.6; 10; 11.5; 2.2; 9.7; 8.5; 8.7 mm/día para el control, D_{24ppm}, D_{105ppm}, D_{1045ppm}, N_{100ppm}, N_{500ppm}, N_{1000ppm}, respectivamente. De esta manera, *L. chapmanii* creció más lentamente en

los medios con 500 y 1000 ppm de aceite de neem y mucho más lentamente en el medio con 1045 ppm de Dimilin® (Figs. 49, 50).

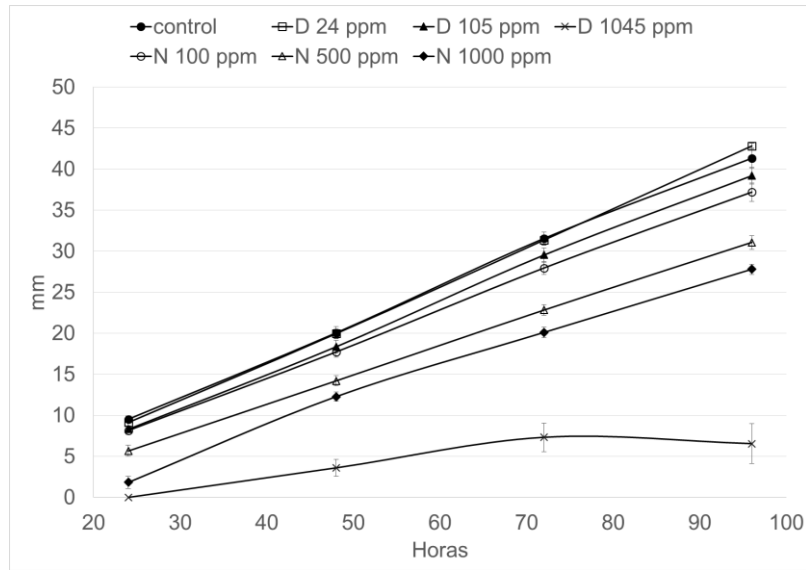


Figura 49. Crecimiento radial de *L. chapmanii* en medio de cultivo PYG-agar, con diferentes concentraciones de Diflubenzuron y aceite de neem.

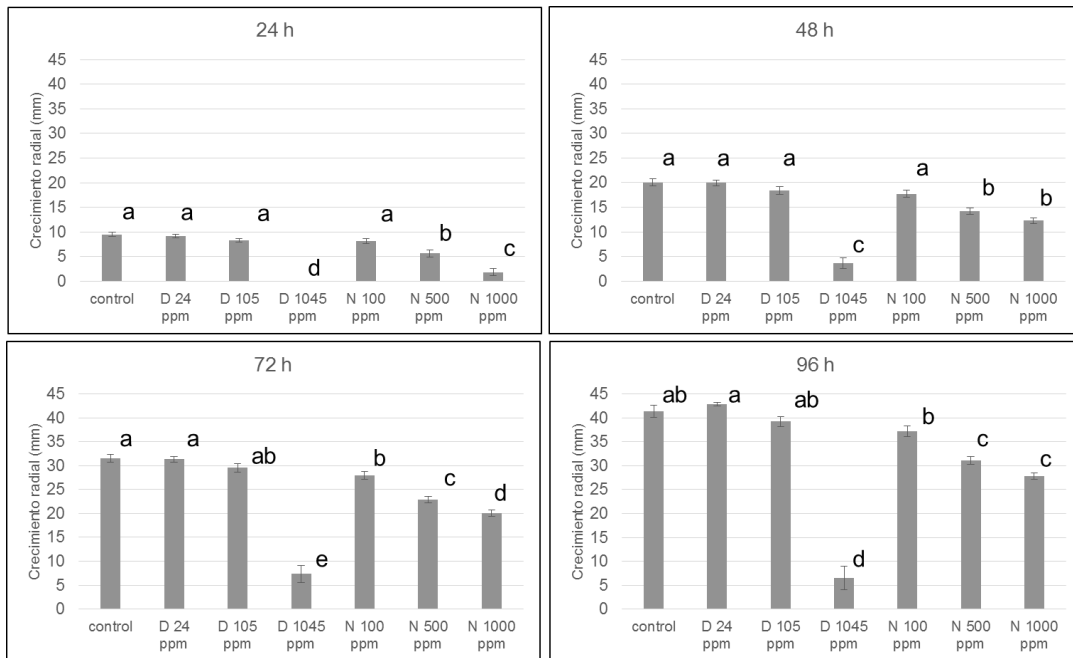


Figura 50. Crecimiento radial diario de *L. chapmanii* en medio de cultivo PYG-agar, con diferentes concentraciones de Dimilin® y aceite de neem. Cada letra agrupa a los tratamientos sin diferencias estadísticas ($F_{6,133}=2.16$, $P < 0.001$).

Por su parte, la mortalidad media generada por *L. chapmanii* fue alta en todos los casos (>70%), confirmándose la producción y viabilidad de las zoosporas así como la compatibilidad del patógeno con los productos diflubenzuron y el aceite de neem en las concentraciones adicionadas al medio de cultivo (Fig. 51 A). Para el análisis estadístico, la mortalidad en los tratamientos con Dimilin® fue corregida mediante la aplicación de la fórmula de Abbott, modificada por Schneider-Orelli en vista de la alta mortalidad registrada en los controles y a consecuencia de las altas concentraciones adicionadas (Fig. 51 B).

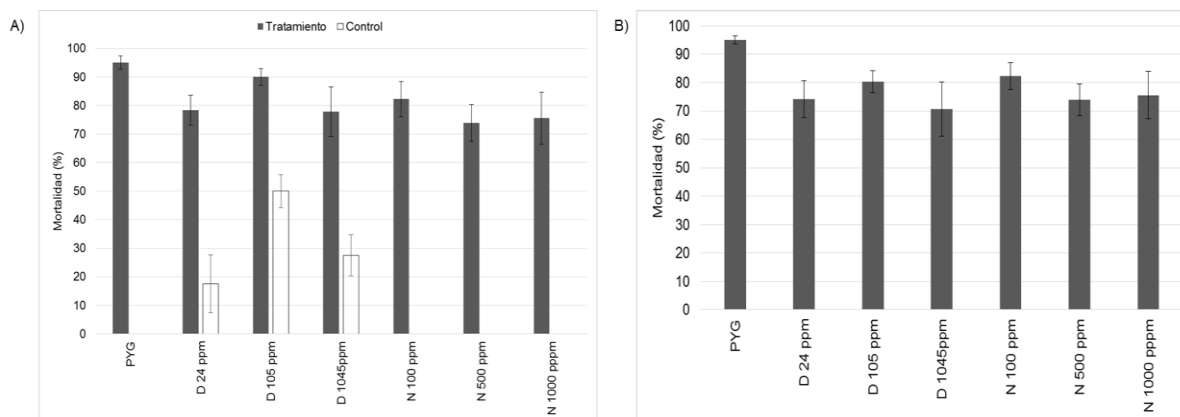


Figura 51. Mortalidad generada por *L. chapmanii* en medio PYG-agar con diferentes concentraciones de Dimilin® y de aceite de neem. A) Tratamiento: Medios de cultivo con *L. chapmanii*; Control: Medios de cultivo sin *L. chapmanii*. B) Mortalidad corregida con fórmula de Abbott, modificada por Schneider-Orelli.

De esta manera, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad generada por el entomopatógeno desarrollada en los diferentes medios de cultivo ($F_{6,56}=2.26$, $P=0.17$). El diflubenzuron, principio activo del producto Dimilin®, es un regulador de crecimiento que afecta la síntesis de quitina por parte de la larva, evitando el desarrollo del exoesqueleto al momento de la muda, por lo que el organismo no se desarrolla y muere. Este regulador de crecimiento ha sido probado como controlador de varias especies de mosquitos (Rettich, 1978) y aunque puede llegar a ser tóxico en altas concentraciones, en las dosis recomendadas no presenta mayores riesgos toxicológicos para las especies “no blanco” (Julin & Sanders, 1978; Mulla, 1995). Ha sido implementado experimentalmente en el control de larvas de *Cx. pipiens* desarrolladas en tanques sépticos (Cetin et al., 2006) y se ha documentado la disminución en la longevidad de las hembras adultas, así como el desarrollo de malformaciones que afectan la simetría de adultos en poblaciones de *Ae.*

aegypti tratadas durante los estados larvales con dosis subletales (entre 2 a 3.5 ppb) (Da Silva et al., 2009).

Por otro lado, debido a que muchos productos de síntesis química tradicionalmente usados en el control de insectos vectores no se ajustan perfectamente a los requerimientos para ser implementados en prácticas de manejo integrado de plagas, ha crecido el interés por desarrollar productos más amigables con el ambiente a partir de extractos botánicos. De esta manera, existe gran diversidad de extractos que han sido estudiados e implementados en productos repelentes, así como insecticidas por su acción en huevos, larvas, pupas y adultos de diversas especies de mosquitos (Govindarajan et al., 2011). Por su parte, productos derivados del neem han mostrado efecto repelente, anti-alimentario y como regulador de crecimiento de mosquitos (Schmutterer, 1990), siendo efectivos en el control de diferentes especies de vectores (Dua et al., 2009).

El principal compuesto de interés en los extractos de neem es la azadiractina, ingrediente activo que es utilizado en productos insecticidas y repelentes. Su extracción suele ser costosa, variando la eficiencia en el proceso de extracción según el tejido vegetal de partida así como el método de extracción implementado (Esparza-Díaz et al., 2010). De esta manera, la aplicación de productos con azadiractina, en diferentes presentaciones y concentraciones, ha presentado buenos resultados en las prácticas de control de mosquitos (Sinniah et al., 1994; Shanmugasundaram et al., 2008) y aunque el efecto larvicida de estos productos puede ser menor respecto a los larvicidas químicos, se han obtenido buenos resultados en el control de poblaciones de anofelinos bajo condiciones de campo (Awad & Shimaila, 2003). El mayor inconveniente que presentan los productos basados en neem, es la baja residualidad en el campo debida a su rápida degradación en el medio (Vatandoost & Vazin, 2004), siendo la formulación –emulsificación, por ejemplo- una alternativa viable (Anjali et al., 2010). El uso del neem en conjunto con otros productos insecticidas ha sido reportado. En combinación con *Bt* (*B. thuringiensis*) mostró un efecto complementario en el control de lepidópteros, generando una mortalidad del 100% en las poblaciones tratadas. Esta combinación, además presentó beneficios económicos respecto al uso individual de los productos, minimizando igualmente la posibilidad de generar resistencia por parte de los mismos frente a los productos usados (Singh et al., 2007; Abedi et al., 2014). Por lo anterior, el uso en conjunto de *L. chapmanii* y productos basados en neem, podrían ser de gran interés.

La compatibilidad de *L. chapmanii* con los productos larvicidas *Bti* y Temefos ha sido estudiada, encontrando que en condiciones de laboratorio y a semi campo, la viabilidad de las zoosporas no se vio afectada por la adición de estos productos en bajas concentraciones (inferiores a las recomendadas para su aplicación). Por el contrario, se encontró un efecto sinérgico entre estos productos, reportándose un aumento de la mortalidad en las poblaciones larvales de mosquitos (Pelizza et al., 2010a).

CONCLUSIONES

Las concentraciones más altas de aceite de neem así como el diflubenzuron adicionadas al medio de cultivo, repercutieron en la velocidad de crecimiento *in vitro* por parte de *L. chapmanii*, no impidiendo su desarrollo ni su posterior actividad patogénica sobre las larvas de *Ae. aegypti*.

Se considera viable el uso combinado de *L. chapmanii* y los productos larvicidas utilizados. Las concentraciones de diflubenzuron empleadas en el presente estudio, fueron muy superior a las recomendadas por el productor, por lo cual se esperaría que en campo (recipientes en donde se desarrollan las poblaciones larvales del mosquito), la aplicación del producto en las dosis recomendadas no afectase la acción de *L. chapmanii*.

El uso de *L. chapmanii* en combinación o alternado con estos productos larvicidas podría ser de gran interés en planes de manejo integrado de mosquitos, requiriéndose de mayores estudios para determinar una posible acción sinérgica entre los productos con las dosis de aplicación recomendadas o incluso inferiores.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abedi Z., Saber M., Vojoudi S., Mahdavi V. & Parsaeyan E., 2014. Acute, sub lethal, and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. J. Insec. Sci. 14: 1-9.
- Abbott W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., Mccourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.w. & Taylor M.F.J.R., 2005. The new higher level classification of eukariotes with emphasis on the taxonomy of protists. J. Eukariot. Microbiol. 52: 399-451.
- Anjali C.H., Sharma Y., Mukherjee A. & Chandrasekaran C., 2010. Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion- a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. Pest. Manag. Sci. 68: 158-163.
- Awad O.M. & Shimaila A., 2003. Operational use of neem oil as an alternative anopheline larvicide. Part A: laboratory and field efficacy. East. Mediterr. Health J.9: 637-645.
- Axtell R.C. & Guzman D.R., 1987. Encapsulation of the mosquito fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) in calcium alginate. 3: 450-459.
- Balaraman K. & Hoti S.L., 1986. Factors influencing *in vitro* zoosporogenesis of mosquito pathogenic fungus *Lagenidium*. Indian J. Med. 83: 380-383.
- Batista D.P.C, Souza R.S., Santos-Magalhães N.S., Sena-Filho J.G., Teodoro A.V., Grillo L.A.M. & Dornelas C.B., 2014. Polymer/Layered Silicate Nanocomposite as Matrix for Bioinsecticide Formulation. Macromol. Symp. 344: 14–21
- Bedding R. A., 1988. Storage of entomopathogenic nematodes. Patent no. WO88/08668.

- Benz G., 1987. Environment. In: Epizootiology of Insect Diseases. Fuxa, J.R., Tanada Y. (eds.), Wiley, New York, pp. 177–203.
- Braga G.U.L., Flint S.D., Miller C.D., Anderson A.J. & Roberts D.W., 2001. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Photochem. Photobiol. 74: 734–739.
- Braga G.U.L., Rangel D.E.N., Fernandes É.K.K., Flint S.D., Roberts D.W., 2015. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. Curr. Genet. 3: 405-425.
- Brathwaite D.O., San Martín J.L., Montoya R.H., del Diego J., Zambrano B. & Dayan G.H., 2012. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. Am. J. Trop. Med. Hyg. 87: 584–593.
- Cetin H., Yanikoglu A. & Cilek J.E., 2006. Efficacy of diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens* larvae in septic tank water. J. Am. Mosq. Control Assoc. 22: 343-345.
- Chelico L. & Khachatourians G.G., 2008. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 98: 93–100.
- Christophers S.R., 1960. *Aedes aegypti* (L.) The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. Published by the syndics of the Cambridge university press. Bentley House, 200 Euston Road, London, N.W., pp. 54.
- Clements A.N., 1992. The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction, Chapman and Hall (eds.), London. pp 509.
- Da Silva J.J., Mendes J. & Lomonaco C., 2009. Effects of sublethal concentrations of diflubenzuron and methoprene on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) fitness. Int. J. Trop. Sci. 29: 17-23.
- Deacon J.W., 1988. Behavioural responses of fungal zoospores. Microbiol. Sci. 5: 249-252.

- De Menezes H.D., Massola N.S. Jr., Flint S.D., Silva G.J. Jr., Bachmann L., Rangel D.E.N., & Braga U.L., 2015. Growth under visible light increases conidia and mucilage production and tolerance to UV-B radiation in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum acutatum*. *Photochem. Photobiol.* 91: 397-402.
- Dua V.K., Pandey A.C., Raghavendra K., Gupta A., Sharma T. & Dash A.P., 2009. Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria J.* 8:124.
- Esparza-Díaz G., Villanueva J.A., López-Collado J. & Rodríguez-Lagunes D.A., 2010. Azadirachtin extraction using cold press and soxhlet methods. *Biopesticides international.* 6: 45-51.
- Fang W. & St. Leger R.J., 2012. Enhanced UV resistance and improved killing of malaria mosquitoes by photolyase transgenic entomopathogenic fungi. *PLoS ONE* 7: e43069. doi:10.1371/journal.pone.0043069
- Fansiri T., Thavara U., Tawatsin A., Krasaesub S. & Sithiprasasna R., 2006. Laboratory and semi-field evaluation of mosquito dunks® against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* larvae (Diptera: Culicidae). *S.E. Asian J. Trop Med.* 37: 62-66.
- Fernandes É.K.K., Rangel D.E.N., Braga G.U.L., & Roberts D.W., 2015. Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Curr. Genet.* 61: 427-440.
- Floore T.G., 2006. Mosquito larval control practices: past and present. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22: 527-533.
- García J.J., Micieli M.V., Achinelly M.F. & Martí G.A., 2002. Establecimiento de una población de *Aedes aegypti* (L). en La Plata. *Actual Artróp Sanit. Argent, Monogr.* 2: 149-153.
- Gardner W.A., Sutlon R.M. & Noblei R., 1977. Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, and *Nosema necatrix* soybean foliage. *Environ. Entomol.* 6: 616-618.

- Gerberg E.J., Barnard D.R. & Ward R., 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. J. Am. Mosq. Control Assoc. Procedures for laboratory rearing of specific mosquitoes. Bulletin N° 5: 23-65.
- Ghosh A., Chowdhury N. & Chandra G., 2012. Plant extracts as potential mosquito larvicides. Indian J. Med. Res. 135: 581-598.
- Govindarajan M., Mathivanan T., Elumalai K., Krishnappa K., & Anandan A., 2011. Mosquito larvicidal, ovicidal and repellent properties of botanical extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 109: 353-367.
- Gubler D.J. & Clark G.G., 1996. Community involvement in the control of *Aedes aegypti*. Acta Trop. 61: 169–179.
- Häder D.P., Kumar H.D., Smith R.C. & Worrest R.C., 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. Photochem. Photobiol. 6: 267–285.
- Harbach R.E., 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa, 1668: 591-638.
- Holmes E.C., Bartley L.M. & Garnett G.P., 1998. The emergence of dengue: past, present and future. In: Emerging Infections. Krause RM (eds.). Academic Press; San Diego. pp. 301–325.
- IBM® corporation, 2011. SPSS statistic software, v. 20.0. USA
- Jansen C.C. & Beebe N.W., 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. Microbes Infect. 12: 272-279.
- Jaronski S. & Axtell R.C., 1983. Persistence of the mosquito fungal pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) after introduction into natural habitats. Mosq. News. 43: 332-337.
- Jaronski S.T. & Axtell R.C., 1984. Simplified production system for the fungus *Lagenidium giganteum* for operational mosquito control. Mosq. News. 44: 377-381.

- Julin A.M. & Sanders H.O., 1978. Toxicity of the IGR, Diflubenzuron, to freshwater invertebrates and fishes. *Mosq. News*. 38: 256-259.
- Kerwin J.L. & Washino R.K., 1983. Sterol induction of sexual reproduction in *Lagenidium giganteum*. *Exp. Mycol.* 7: 109-115.
- Kerwin J.L. & Washino R.K., 1988. Field evaluation of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) and description of natural epizootic involving a new isolate of the fungus. *J. Med. Entomol.* 25: 452-460.
- Kerwin J.L., Dritz D.A. & Washino R.K., 1994. Pilot scale production and application in wildlife ponds of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 10: 451-455.
- Knight K.L. & Stone A., 1977. A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). College Park, The Thomas Say Fundation, pp. 611.
- Kraemer M.U.G., Sinka M.E., Duda K.A. , Mylne A.Q.N., Shearer F.M., Barker C.M., Moore C.G., Carvalho R.G., Coelho G.E., Bortel W.V., Hendrickx G., Schaffner F., Elyazar I.R.F., Teng H.J., Brady O.J., Messina J.P., Pigott D.M., Scott T.W., Smith D.L., William Wint G.R. & Golding N., 2015a. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*. 4:e08347. doi: 10.7554/eLife.08347 .
- Kraemer M.U.G., Sinka M.E., Duda K.A. , Mylne A.Q.N., Shearer F.M., Brady O.J. , Messina J.P. , Barker C.M. , Moore C.G. , Carvalho R.G., Coelho G.E. , Bortel W.V. ,Hendrickx G. , Schaffner F. , William Wint G.R. , Elyazar I.R.F. , Teng H.J.& Hay S.I., 2015b. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Sci. Data* 2:150035. doi:10.1038/sdata.2015.35
- Kuno G. & Chang G.J.J., 2005. Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 608-637.
- Lacey L.A., Frutos R., Kaya H.K. & Vail§ P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. *Biol. Control.* 21: 230-248.

- Laird M., 1988. Predators in the biocontrol of immature Culicidae. In: The natural history of larval mosquito habitats. M. Laird (ed.), Academic Press, New York. pp. 466-484.
- Lee H.L., Pe T.H. & Cheong W.H., 1986. Laboratory evaluation of the persistence of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae. Mosq. Borne Dis Bull. 2: 61-66.
- Le Grand M. & Cliquet S., 2013. Impact of culture age on conidial germination, desiccation and UV tolerance of entomopathogenic fungi. Biocontrol Sci. Techn. 23: 847-859.
- López Lastra C.C., Steciow M.C. & 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.
- Lord J.C. & Fukuda T., 1988. An ultrastructural study of the invasion of *Culex quinquefasciatus* larvae by *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes: Saprolegniales). Mycopathologia. 104: 67-74.
- Maldonado-Blanco M.G., Leal-López E.Y., Ochoa-Salazar O.A., Santos M.E., Galán-Wong L.J. & Quiroz-Martínez H., 2011. Effects of culture medium and formulation on the larvicidal activity of the mosquito pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) against *Aedes aegypti*. Acta Trop. 117: 114-118.
- Maricopa County Environmental Service, 2006. Lifecycle and information on *Aedes aegypti* mosquitoes. <http://www.maricopa.gov/EnvSvc/VectorControl/Mosquitos/MosqInfo.aspx>.
- McInnis T.M. & Zattau W.C., 1982. Experimental infection of mosquito larvae by a species of the aquatic fungus *Leptolegnia*. J. Invertebr. Pathol. 39: 98-104.
- McInnis T.M. & Schimmel L.E., 1985. Host range studies on a new fungus *Leptolegnia*, a parasite of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 22: 226-227.

- Mills J.N., Gage K.L. & Khan A.S., 2010. Potential influence of climate change on Vector-Borne and zoonotic diseases: A Review and proposed research plan. *Environ. Health Pers.* 118: 1507–1514.
- Ministerio de Salud, 2009a. Boletín epidemiológico periódico. Situación actual del dengue en Argentina.
- Ministerio de Salud, 2009b. Parte de prensa, situación de vigilancia y acciones de control del dengue. Parte No. 5
- Morrison A.C., Zielinski-Gutierrez E., Scott T.W. & Rosenberg R., 2008. Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. *PLoS Med.* doi:10.1371/journal.pmed.0050068
- Muehleisen D.P., 1977. The effectiveness of *Lagenidium giganteum* as a biological control agent of *Culex pipiens quinquefasciatus*. MS thesis dissertation, Clemson University.
- Mulla M.S., 1995. The future of insect growth regulators in vector control. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11: 269-273.
- Nnakumusana E.S., 1986. Histopathological studies on the progress of infection of *Leptolegnia* sp. (SC-1) in *Anopheles gambiae* larvae exposed to zoospores in the laboratory. *Curr. Sci.* 55: 633–636.
- Nelson M.J., 1986. *Aedes aegypti*: Biology and Ecology. Pan American Health Organization. Washington, D.C.
- Patel K.J., Rueda L.M. & Axtell R.C., 1990. Comparisons of different types and concentrations of alginates for encapsulation of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales), a fungal pathogenic of mosquito larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6: 101-105.
- Pelaez F., 2005. Biological activities of fungal metabolites. In: *Handbook of Industrial Mycology*. An Z (ed), Marcel Dekker, New York, pp. 49–92.

- Pelizza S.A., 2007. Estudio y evaluación de *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Oomycetes, Saprolegniales) como agente de control biológico de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). Trabajo de tesis doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, pp. 49.
- Pelizza S.A., López Lastra C.C., Becnel J.J., Bisaro V. & García J.J., 2007a. Biotic and abiotic factors affecting *Leptolegnia chapmanii* infection in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). J. Am. Mosq. Control Assoc. 23: 177–181.
- Pelizza S.A., López Lastra C.C., Becnel J.J., Bisaro V. & García J.J., 2007b. Effects of temperature, pH and salinity on the infection of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Peronosporomycetes) in mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 96: 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. Invertebr. Pathol. 98: 314–319.
- Pelizza S.A., López-Lastra C.C., Mácia A., Bisaro V. & García J.J., 2009 Efecto de la calidad del agua de criaderos de mosquitos (Diptera. Culicidae) sobre la patogenicidad e infectividad de las zoosporas del hongo *Leptolegnia chapmanii* (Straminipila: Peronosporomycetes). Rev. Biol. Trop. 57: 371-380.
- Pelizza S.A., Scorsetti A.C., Bisaro V., López Lastra C.C. & García J.J., 2010a. Individual and combined effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensi*, Temephos and *Leptolegnia chapmanii* on the larval mortality of *Aedes aegypti*. Biocontrol. 55: 647–656.
- Pelizza S.A., Scorsetti A.C., López Lastra C.C. & García J.J., 2010b. Production of oogonia and oospores of *Leptolegnia chapmanii* Seymour (Straminipila: Peronosporomycetes) in *Aedes aegypti* (L.) larvae at different temperatures. Mycopathologia. 169: 71–74.
- Pereira R.M. & Roberts D.W., 1991. Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi and *Metarhizium anisopliae*. J. Econ. Entomol. 84: 1657-1661.

- Powell J.R. & Tabachnick W.J., 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* – A review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 108: 11-17.
- Rangel D.E.N., Fernandés É.K.K., Braga G.U.L. & Roberts D.W., 2011. Visible light during mycelial growth and conidiation of *Metarhizium robertsii* produces conidia with increased stress tolerance. FEMS Microbiol. Lett. 315: 81–86.
- Reinert J.F., Harbach R.E. & Kitching I.J., 2009. Phylogeny and classification of the tribe Aedini (Diptera: Culicidae). Zool. J. Linn. Soc. 157: 700-794.
- Rettich F., 1978. Effect of diflubenzuron on four species of mosquitoes (Diptera, Culicidae). Acta entomol. Bohemoslov. 75: 312-318.
- Rey J., 2006. The Mosquito. EDIS. Universidad de Florida. IFAS extension. <http://edis.ifas.ufl.edu/IN652>
- Rhodes D.J., 1993. Formulation of biological control agents. In: Exploitation of microorganisms. Jones D.G. (ed.). Chapman & Hall, London. pp. 412.
- Ritchie S.A., Rapley L.P. & Benjamin S., 2010. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82: 1053-1059.
- Roberts W.D. & Campbell A.S., 1977. Stability of entomopathogenic fungi. Misc. Publs. Ent. Soc. Am. 10: 19-76.
- Rogers D.J., Wilson A.J., Hay S.I. & Graham A.J., 2006. The global distribution of yellow fever and dengue. Ad. Parasitol. 62: 181-220.
- Rosen L., Shroyer D.A., Tesh R.B., Freier J.E. & Lien J.C., 1983. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 1108–1119.
- Rueda L.M., Patel K.J. & Axtell R.C., 1990. Efficacy of encapsulated *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae in artificial containers. J. Am. Mosq. Control Assoc. 6: 694-700.

- Rueda L.M., Patel K.J. & Axtell R.C., 1991. Comparison of floating and sinking encapsulated formulation of the fungus *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) for control of *Anopheles* larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc. 7: 250-254.
- Schmutterer H., 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annu. Rev. Entomol. 35: 271–297.
- Schneider-Orelli O., 1947. Entomologisches praktikum - Einführung in die land - unforswirtschaftliche Insektenkunde [Practical course in entomology: Introduction to agricultural and forestal entomology]. Ciudad de Aarau: Sauerländer y Co.
- Scholte E.J, Knols B.G.J, Samson R.A. & Takken W., 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. J. Insect Sci. 4:1-21.
- Seymour R.L., 1984. *Leptolegnia chapmanii*, an Oomycete pathogen of mosquito larvae. Mycologia. 76: 670-674.
- Shah P.A, Aebi M. & Tour U., 1998. Method to immobilize the aphid pathogenic fungus *Erynia neoaphidis* in an alginate matrix for biocontrol. Appl. Environ. Microb. 64: 4260-4263.
- Shanmugasundaram R., Jeyalakshmi T., Dutt M.S., & Murthy P.B., 2008. Larvicidal activity of neem and karanja oil cake against mosquito vectors, *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles stephensi* (L.). J. Environ. Biol. 29: 43-45.
- Singh G., Rup P.J. & Koul O., 2007. Acute, sublethal and combination of effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* toxins on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. B. Entomol. Res. 97: 351-357.
- Sinniah B., Sinniah D.A. & Ibrahim J., 1994. Effect of neem oil on mosquito larvae. Mosq. Borne Dis .Bull. 3: 90-93.
- Tabachnick W.J., 2010. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in changing world. J. Exp. Biol. 15: 946-954.

- USDA, 2013. USDA-ARS Collection of entomopathogenic fungal cultures, Catalog of strains. Biological Integrated Pest Management Research, Robert W. Holley Center for Agriculture & Health. 538 Tower Road. Ithaca, NY, USA. pp. 203
- Vandergheynst J., Scher H., Guo H.Y. & Schultz D., 2007. Water-in-oil emulsions that improve the storage and delivery of the biolarvacide *Lagenidium giganteum*. *Biocontrol*. 52: 207-229.
- Vatandoost H. & Vazin V.M., 2004. Larvicidal activity of neem tree extract (Neemarin) against mosquito larvae in the Islamic republic of Iran. *East. Mediterr. Health J.* 10: 573-581.
- World Health Organization (WHO), 1999. Microbial Pest Control Agents. *Bacillus thuringiensis*. WHO Press. pp. 18.
- World Health Organization (WHO), 2008. Diflubenzuron in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. WHO Press.
- Zattau W.C. & McInnis T., 1987. Life cycle and mode of infection of *Leptolegnia chapmanii* (Oomycetes) parasitizing *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.* 50: 134-145.

Paginas web:

Organización Mundial de la Salud (OMS),

http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/biological_control/es/.

http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/environmental_management/es/.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/>.

<http://www.who.int/topics/dengue/es/>.

http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/biological_control/es

Walter Reed Biosystematics Units, <http://www.mosquitocatalog.org/>

Centers for Disease Control and Prevention,

http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html.

Mosquito Information Web site, Florida Medical Entomology Laboratory, University of Florida,
http://mosquito.ifas.ufl.edu/Integrated_Mosquito_Management.htm

Encyclopedia of Life, <http://eol.org/pages/1028653/names>