

## Efecto Biocida de diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* ccb-le302 y *Beauveria Bassiana* CCB-LE265 sobre larvas III de *Aedes Aegypti*.

*The Biocidal effect of diferente concentracions of Metarhizium anisopliae CCB-LE302 and Beauveria Bassiana CCB-LE265 on larvae III of Aedes aegypti.*

ALCALDE MOSQUEIRA, Judith Georgette<sup>1</sup>; ROLDÁN RODRÍGUEZ, Judith Enit<sup>2</sup>; SARAVIA CUEVA, Verónica del Pilar<sup>3</sup>; COLLANTES SILVA, Luis<sup>4</sup>

### RESUMEN

El presente trabajo evaluó el efecto biocida de diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* CCB-LE302 y *Beauveria bassiana* CCB-LE265 sobre larvas III de *Aedes aegypti*, en condiciones de laboratorio. Las cepas de los hongos fueron obtenidos de SENASA. Las larvas de *A. aegypti*, procedentes del cerro Pesqueda, provincia y distrito de Trujillo, fueron mantenidas a temperatura  $24 \pm 2$  ° C y humedad relativa  $70 \% \pm 10$ . Se diseñaron 8 grupos experimentales, 4 grupos control y 5 repeticiones de 20 larvas cada uno. Para *M. anisopliae* CCB-LE302, se utilizaron las concentraciones  $2.5 \times 10^7$ ;  $2.5 \times 10^6$ ;  $2.5 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^4$  conidios/mL; obteniéndose la  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  al 6<sup>to</sup> día de aplicación con  $3.9 \times 10^4$  y  $1.6 \times 10^5$  conidios/mL respectivamente, sobre larvas III de *Ae. aegypti*. Para *B. bassiana* CCB-LE265, se utilizaron las concentraciones  $1.3 \times 10^7$ ;  $1.3 \times 10^6$ ;  $1.3 \times 10^5$  y  $1.3 \times 10^4$  conidios/mL; obteniéndose la  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  al 5<sup>to</sup> día de aplicación con  $3.6 \times 10^6$  y  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL. Se concluye que los hongos entomopatógenos ensayados presentan capacidad biocida.

**Palabras clave:** Efecto biocida, *Metarhizium anisopliae* CCB-LE302, *Beauveria bassiana* CCB-LE265, *Aedes aegypti*.

### ABSTRACT

In the present study, the biocidal effect of different concentrations of *Metarhizium anisopliae* CCB-LE302 and *Beauveria bassiana* CCB-LE265 on larvae III of *Aedes aegypti* in laboratory conditions. Both strains of fungi were obtained from SENASA. The larvae of *A. aegypti*, from the Cerro Pesqueda, Province and District of Trujillo, kept at  $24 \pm 2$  ° C and relative humidity of  $70\% \pm 10$ . Bioassays were conducted with 8 experimental groups and 4 control groups, with 5 replicates of 20 larvae each. For *M. anisopliae* CCB-LE302, concentrations were  $2.5 \times 10^7$ ,  $2.5 \times 10^6$ ,  $2.5 \times 10^5$  and  $2.5 \times 10^4$  conidia/mL,  $LC_{50}$  and  $LC_{90}$  obtained on the sixth day of application is  $3.9 \times 10^4$  conidia/ml and  $1.6 \times 10^5$  conidia/mL on larvae III of *Ae. aegypti*. For *B. bassiana* CCB-LE265, concentrations were  $1.3 \times 10^7$ ,  $1.3 \times 10^6$ ,  $1.3 \times 10^5$  and  $1.3 \times 10^4$  conidia/mL,  $LC_{50}$  and  $LC_{90}$  obtained on the fifth day of application is  $3.6 \times 10^6$  and  $1.3 \times 10^7$  conidia/mL. It was concluded that entomopathogenic fungi have both a biocidal capability against *Ae. aegypti*.

**Key words:** biocide effect, *Metarhizium anisopliae* CCB-LE302, *Beauveria bassiana* CCB-LE265, *Aedes aegypti*.

<sup>1,4</sup> Biólogo. MsC. Universidad Nacional de Trujillo. revistaucv-scientia@ucv.edu.pe

<sup>2</sup> Biólogo. Dra. Universidad Nacional de Trujillo. revistaucv-scientia@ucv.edu.pe

<sup>3</sup> Biólogo Microbiólogo. MsC. Universidad Nacional de Trujillo. revistaucv-scientia@ucv.edu.pe

## INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), considerado vector de arbovirus presenta cuatro estadios: huevo, larvas (I, II, III y IV), pupa y adulto.

Su alimentación es succionando la savia de las plantas; la hembra necesita además alimentarse de sangre de preferencia de humanos<sup>8</sup>. En el Perú actualmente la única forma de prevención es el control vectorial<sup>15</sup>. El control biológico es una alternativa ambiental y no inducen resistencia<sup>14</sup>. Entre los hongos reportados como entomopatógenos se encuentran los de la Clase Deuteromycete, Orden Moniliales y Familia Moniliaceae como: *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* entre otros<sup>14</sup>.

*M. anisopliae*, presenta conidióforos cilíndricos ramificados y conidios de forma cilíndrica a ovals de 5 a 7  $\mu\text{m}$ . En cultivo puro, presenta un color que varía desde el oliváceo hasta amarillo o verde oscuro. Su ciclo de vida comienza con el conidio que posee un apresorio, que coloniza el hemocele y destruye estructuras internas del insecto; las hifas del hongo, liberan las toxinas destruxinas, causando la muerte en un periodo variable dependiendo de la cantidad de esporas que se depositen sobre el mismo, temperatura, especie, tamaño, edad del insecto y virulencia de la cepa. Estudios histopatológicos muestran que sus toxinas ocasionan deshidratación por pérdidas de fluidos<sup>14</sup>. En condiciones de laboratorio se ha demostrado que *M. anisopliae* actúa como agente controlador en larvas de *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens*, *Ae. aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Ae. albopictus*<sup>29,26</sup>. Scholte y col.<sup>28</sup>, reportaron a su capacidad adulticida sobre *Anopheles gambiae* y *Cu. quinquefasciatus*; así mismo, Mnyone y col.<sup>17</sup> demostraron la virulencia en huevos de *Aedes* spp de la cepa *M. anisopliae* IP46, además de su efecto biocida en adultos de *A. gambiae sensu stricto* y *Anopheles arabiensis*. Silva y col.<sup>29</sup>, registraron que la concentración de  $5 \times 10^6$  conidios/mL de las 80 cepas de *M. anisopliae*, aisladas de suelos colectados en tres localidades diferentes en el

estado de Goiás - Brasil, indujeron entre 10 y 100% de mortalidad en larvas II de *Ae. aegypti*, alcanzando a las 24 horas el 90% de mortalidad.

*B. bassiana*, presenta conidióforos juntos formando synemas. En cultivo puro, presenta colonias blancas que se vuelven crema de aspecto algodonoso. El modo de infección de *B. bassiana* lo realiza a través del tegumento<sup>14</sup> por acción de enzimas, así como la destrucción de glóbulos sanguíneos, acciones mecánicas, producción de toxinas entre otros factores<sup>14</sup>, siendo fundamental el reconocimiento y compatibilidad entre el conidio y las células del tegumento del insecto<sup>22</sup>.

Geetha y col.<sup>9</sup>, demostró la efectividad de *B. bassiana*, sobre larvas de *Ae. aegypti* y Truman y col.<sup>31</sup> en larvas de *Culex tarsalis*, *Cu. pipiens*, *Anopheles albimanus*, *Ae. aegypti*, *Ae. sierrensis* y *Ae. nigromaculis*; sin embargo, Pereira y col.<sup>19</sup> determinó el 6% de mortalidad con la cepa CG494 frente al 83% de mortalidad de CG24 en larvas de segundo y tercer estadio larval de *Ae. aegypti*, mientras que Shandhu y col.<sup>25</sup> hallaron la ineficacia de *B. bassiana* sobre larvas de *Ae. aegypti*. Nunes y col.<sup>18</sup>, demostraron que adultos *A. gambiae*, de diferentes edades, son susceptibles a formulados de aceite de *B. bassiana* (I93-825), siendo los más susceptibles los que no fueron alimentados con sangre. Según Bukhari y col.<sup>2</sup>, registraron que *B. bassiana* (IMI-391510) fue menos efectivo que *M. anisopliae* (ICIPE-30) sobre larvas de *A. gambiae* y *A. stephensi*; sin embargo, igualmente susceptibles para *A. stephensi* y *A. gambiae* en ambos hongos.

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la actividad biocida de las diferentes concentraciones de conidios de *M. anisopliae* CCB-LE302 y *Beauveria bassiana* CCB-LE265, sobre larvas del estadio III de *Ae. aegypti* en base al porcentaje de mortalidad de larvas, CL50 (concentración letal media), CL90, TL50 (tiempo letal medio) y TL90 en condiciones de laboratorio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material biológico.

Larvas de *Ae. aegypti* estadio III fueron colectadas de criaderos naturales ubicados en el cerro Pesqueda, distrito y provincia de Trujillo, departamento de La Libertad; trasladadas luego en recipientes de plásticos al Laboratorio de Artropodología Parasitaria de la Universidad Nacional de Trujillo. Los hongos entomopatógenos utilizados: *M. anisopliae* (CCB-LE302) y *B. bassiana* (CCB-LE265) fueron obtenidos del cepario de Hongos Entomopatógenos de la Subdirección de Control Biológico SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria). Ate Vitarte, Lima - Perú.

### 2. Procedimiento.

#### 2.1. Crianza de *Ae. aegypti*.

Los diferentes estadios larvales fueron colocados en fuentes de plástico conteniendo agua de clorinada<sup>10</sup> y alimentadas con alimento balanceado "purina" en condiciones de esterilidad. Las pupas obtenidas fueron extraídas con pipetas plásticas y colocadas en recipientes con agua, que permanecieron al interior de una jaula de metal cubierta con tela organza y una abertura de 20 cm de diámetro<sup>20</sup>. Al emerger los adultos, la alimentación para los machos fue de una

sustancia azucarada al 10%, la que fue embebida en pedazos de algodón.

Las hembras fueron alimentadas con sangre de *Mus musculus* tres veces por semana. Para la oviposición de adultos hembra, dentro de la jaula de crianza, se acondicionó un recipiente con agua y papel filtro adherido en la parte interna de las paredes del recipiente<sup>20</sup>. La crianza de adultos se realizó hasta por tres generaciones con la finalidad de obtener una cepa poblacional<sup>20</sup>. Las condiciones de temperatura fueron  $24 \pm 2$  °C, humedad relativa de  $70 \% \pm 10$  y fotoperiodo de 10 horas luz y 14 horas oscuridad.

## 2.2. Obtención de esporas de *M. anisopliae* (CCB-LE302) y *B. bassiana* (CCB-LE265).

### 2.2.1. Preparación del medio de cultivo.

Se preparó el medio de cultivo Papa-Glucosa-Agar (PGA), suplementado con cloranfenicol, para luego distribuirlo en botellas planas de 50 ml.

### 2.2.2. Siembra.

Los hongos *M. anisopliae* (CCB-LE302) y *B. bassiana* (CCB-LE265) fueron sembrados en botellas planas conteniendo el medio cultivo PGA incubados a  $25 \pm 1$  °C durante 10 a 15 días, hasta su completa esporulación para los bioensayos<sup>4</sup>.

## 2.3. Evaluación de la actividad biocida

### 2.3.1. Diseño del bioensayo.

Para *M. anisopliae* (CCB-LE302) las concentraciones fueron  $2.5 \times 10^7$ ;  $2.5 \times 10^6$ ;  $2.5 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^4$  conidios/mL, control positivo (Tween 20 al 0.1%) y control negativo (agua destilada). Para *B. bassiana* (CCB-LE265), las concentraciones fueron  $1.3 \times 10^7$ ;  $1.3 \times 10^6$ ;  $1.3 \times 10^5$  y  $1.3 \times 10^4$  conidios/mL., control positivo (Tween 20 al 0.1%) y control negativo (agua destilada). Cada tratamiento consistió en 5 repeticiones y cada unidad experimental por 20 larvas del estadio III<sup>14</sup>.

### 2.3.2. Ejecución del bioensayo.

Cada unidad experimental consistió de 20 larvas del estadio III colocados en vasos de tecknopor, conteniendo 90 mL de agua destilada, luego se agregó la concentración de esporas del entomopatógeno en volumen de 10 mL. La evaluación se realizó cada 24 horas durante 10 días. Los bioensayos fueron sometidos a condiciones de temperatura de  $26 \pm 1$ °C y  $84 \pm 2\%$  de humedad relativa, registrados con un termo higrómetro.

### 2.3.3. Comprobación de la actividad biocida.

Las larvas muertas fueron recolectadas para ser sumergidas en hipoclorito de sodio al 0.5% por

2 minutos, luego enjuagados tres veces con agua destilada estéril y después colocados sobre papel absorbente estéril. Enseguida colocados en cámara húmeda e incubados por 5 a 7 días. La cámara húmeda consistió en placas petri cuyo interior se colocó pedazos de algodón estéril empapados con agua destilada estéril<sup>10</sup>. Una vez que el hongo desarrolló sobre el insecto se transfirió a placas con medio PGA, incubándolos a  $25 \pm 2$  °C durante 3 a 5 días<sup>10</sup>, tomando muestras para observar al microscopio y determinar si las estructuras pertenecen a los hongos entomopatógenos.

## 2.4. Determinación de la mortalidad

### 2.4.1. Determinación de la mortalidad corregida

Los porcentajes de mortalidad luego de 10 días de evaluación se corrigieron mediante la fórmula de Abbott<sup>1</sup> y los datos generados se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de grupos homogéneos<sup>6</sup>.

La mortalidad corregida fue calculada según la fórmula de ABBOTT<sup>1</sup>:

$$MC = [(\%MT - \%Mt) / (100 - \%Mt)] * 100$$

Donde:

MC = Mortalidad corregida

MT = Mortalidad en el tratamiento

Mt = Mortalidad del testigo

### 2.4.2. Determinación de signos

Se registró los signos de larvas muertas como: alteración en el color del tegumento, aparición de micelio y cambios morfológicos del insecto<sup>14</sup>.

### 2.4.3. Determinación de CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>, TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub>

Mediante el conteo de larvas muertas del estadio III de *Ae. aegypti* en cada una de las tratamientos de *M. anisopliae* (CCB-LE302) y de *B. bassiana* (CCB-LE265), se calculó los promedios; los cuales, se utilizaron para la determinación de la CL<sub>50</sub> (Concentración Letal media), CL<sub>90</sub>, TL<sub>50</sub> (Tiempo Letal medio) y el TL<sub>90</sub> mediante el programa estadístico PROBIT 5.1.

## 2.5. Análisis de resultados<sup>3</sup>

Se determinó el análisis de varianza, el test de comparación múltiple de medias de Tukey con  $P < 0,05$  utilizando el programa estadístico SPSS 18 para Windows y para el análisis de CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>, TL<sub>50</sub> y TL<sub>90</sub>, se utilizó el programa estadístico PROBIT 5.1.

## RESULTADOS

El registro del porcentaje promedio de mortalidad de larvas III de *Ae. aegypti*, tratados a las concentraciones  $2.5 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^6$  y  $2.5 \times 10^7$  conidios/mL de *M. anisopliae* (CCB-LE302) y su desviación estándar poblacional, el cual nos representa la distribución de los datos con respecto de la media aritmética se presenta en la tabla 1. Para la concentración  $2.5 \times 10^4$  conidios /mL, observamos que el efecto biocida del hongo inicia a partir del tercer día con un 4% de mortalidad mientras que para  $2.5 \times 10^5$  conidios/mL fue de 53% de mortalidad; sin embargo, para las concentraciones  $2.5 \times 10^6$  y  $2.5 \times 10^7$  conidios/mL se obtuvo 71 y 100 % de mortalidad respectivamente. Al quinto día, se observó 85% de mortalidad con la concentración  $2.5 \times 10^5$  conidios/mL; se alcanzó el 100% con las concentraciones  $2.5 \times 10^6$  y  $2.5 \times 10^7$  conidios /mL. En el sexto día, se observó que en el porcentaje de mortalidad existen diferencia estadísticas mínimas entre las concentraciones  $2.5 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^6$  y  $2.5 \times 10^7$  conidios/mL.

El registro del porcentaje promedio de mortalidad de larvas III de *Ae. aegypti*, tratados a las concentraciones  $1.3 \times 10^4$ ,  $1.3 \times 10^5$ ,  $1.3 \times 10^6$  y  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL de *B. bassiana* (CCB-LE265) y su desviación estándar se presenta en la tabla 2.

En el primer día, sólo se observa la acción biocida de la concentración  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL con un 30% de mortalidad, el porcentaje de mortalidad se incrementó conforme aumentaba la concentración de conidios y el tiempo se ve reducido. Con la concentración  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL a partir del cuarto día se observó mortalidad mayor a 80%.

Por el contrario, la concentración  $1.3 \times 10^4$  conidios /mL registró mortalidad menor o igual del 30% hasta el décimo día de evaluación.

La concentración  $1.3 \times 10^5$  conidios/mL, registró 1% de mortalidad al cuarto día y 56% de mortalidad al décimo día.

Las concentraciones  $1.3 \times 10^4$  y  $1.3 \times 10^5$  conidios/mL no presentan diferencias significativas pero si entre las concentraciones  $1.3 \times 10^6$  y  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL, siendo la más eficaz esta última. Las larvas afectadas por *M. anisopliae* (CCB-LE302), a diferentes concentraciones, presentaron características anormales indicando la acción de

toxinas y la natural inhibición de la quitina, mostrando el cambio de color en el tegumento (Figura 1 – A). La micosis causa daños físicos de tejidos y la deshidratación de las células por pérdida de fluidos, causando la flacidez del cuerpo de la larva así como la separación de la cabeza del tórax, reducción del tamaño y encorvamiento del cuerpo (Figura 1 – B). Para la obtención del hongo, se realizó cámara húmeda a los insectos muertos y luego de que el hongo creciera se sembró en medio PGA (Figura 1 – C), observando luego de cinco días la presencia del hongo mediante la observación microscópica a aumento 40x (Figura 1 – D).

Se registraron los mismos signos de las larvas infectadas con *B. bassiana* (CCB-LE265), también se observó el crecimiento de micelio en el cuerpo de la larva (Figura 2 – A,B); así como, su crecimiento en medio PGA y las estructuras típicas del hongo (Figura 2 – C,D). Mediante el análisis de Probit se determinó los valores de mortalidad mediante las CL50 y de las CL90 de *M. anisopliae* (CCB-LE302) y *B. bassiana* (CCB-LE265) para larvas del estadio III de *Ae. aegypti*. Para *M. anisopliae* (CCB-LE302) se realizó el análisis al sexto día puesto que se obtuvo el 100% de mortalidad en las dos últimas concentraciones. El control al 50% (CL50) fue de  $3.9 \times 10^4$  conidios /mL con límites de confianza de  $1.9 \times 10^4$  –  $6.9 \times 10^4$  conidios /mL y el control al 90% (CL90) fue de  $1.6 \times 10^5$  conidios /mL con límites de confianza de  $8.7 \times 10^4$  –  $8.1 \times 10^5$  conidios /mL. La CL50 para *B. bassiana* (CCB-LE265), fue de  $3.6 \times 10^6$  conidios /mL con límites de confianza de  $2.1 \times 10^6$  –  $6.3 \times 10^6$  conidios /mL y CL90 fue de  $1.3 \times 10^7$  conidios /mL con límites de confianza de  $7.3 \times 10^6$  –  $4.0 \times 10^7$  conidios /mL (Tabla 3). Los valores del TL50 y TL90 para *M. anisopliae* (CCB-LE302) y *B. bassiana* (CCB-LE265), fueron también determinados mediante el análisis de Probit. Para *M. anisopliae* a partir de la concentración  $2.5 \times 10^5$  conidios /mL tanto el TL50 como el TL90 presentaron valores más cercanos a la pendiente conforme se incrementaban las concentraciones; sin embargo, para *B. bassiana* el TL50 y TL90 presento valores más cercanos a la pendiente con la concentración  $1.3 \times 10^7$  conidios /mL (Tabla 4).

**Tabla 1. Porcentaje del promedio de larvas muertas del estadio III de *Aedes aegypti* (n=100), expuestas a diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae* (CCB-LE302) en condiciones de laboratorio\*.**

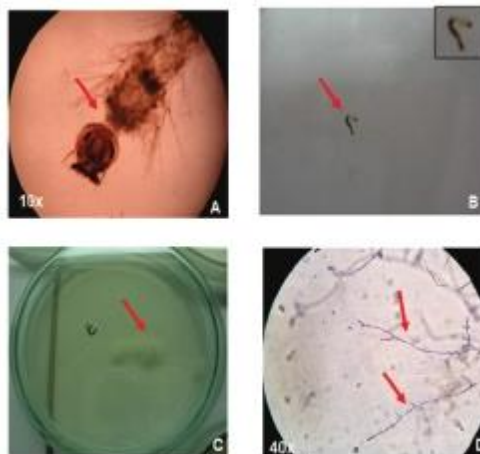
DIAS	TRATAMIENTOS (conidios/mL)			
	$2.5 \times 10^4$ A	$2.5 \times 10^5$ b	$2.5 \times 10^6$ b	$2.5 \times 10^7$ b
	% ± S	% ± S	% ± S	% ± S
1	0 ± 0	8 ± 0.9	10 ± 1.2	50 ± 1.6
2	0 ± 0	26 ± 1.3	38 ± 1.5	74 ± 2.2
3	4 ± 1.1	53 ± 2.1	71 ± 1.6	100 ± 0
4	13 ± 1.1	74 ± 1.8	95 ± 1.4	100 ± 0
5	20 ± 1.6	85 ± 1.6	100 ± 0	100 ± 0
6	34 ± 1.5	96 ± 1.3	100 ± 0	100 ± 0
7	41 ± 1.1	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
8	52 ± 0.5	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
9	57 ± 0.9	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
10	65 ± 1.4	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0

\* Temperatura  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , Humedad relativa  $84 \pm 2\%$ . <sup>a,b</sup> Letras diferentes en negrita, representan diferencias significativas según comparación múltiple de medias de Tukey,  $P < 0.05$ .

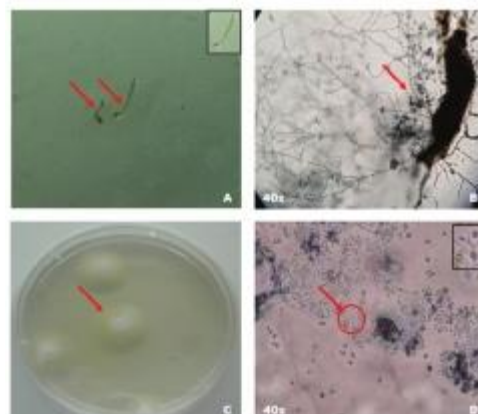
**Tabla 2. Porcentaje del promedio de larvas muertas del estadio III de *Aedes aegypti* (n=100), expuestas a diferentes concentraciones de *Beauveria bassiana* (CCB-LE265) en condiciones de laboratorio\*.**

DIAS	TRATAMIENTOS (conidios/mL)			
	1.3 x 10 <sup>4</sup> A	1.3x 10 <sup>5</sup> a	1.3 x 10 <sup>6</sup> b	1.3 x 10 <sup>7</sup> c
	% ± S	% ± S	% ± S	% ± S
<b>1</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	30 ± 0.7
<b>2</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	54 ± 2.8
<b>3</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	73 ± 2.9
<b>4</b>	0 ± 0	1 ± 0.4	15 ± 0.7	89 ± 1.8
<b>5</b>	0 ± 0	1 ± 0.4	22 ± 0.9	98 ± 0.5
<b>6</b>	15 ± 1.6	16 ± 0.4	39 ± 1.1	100 ± 0
<b>7</b>	19 ± 1.1	29 ± 0.8	49 ± 1.1	100 ± 0
<b>8</b>	22 ± 0.5	39 ± 1.5	62 ± 0.9	100 ± 0
<b>9</b>	26 ± 0	46 ± 1.3	74 ± 0.8	100 ± 0
<b>10</b>	30 ± 0.7	56 ± 1.8	86 ± 1.6	100 ± 0

\* Temperatura 26 ± 1°C, Humedad relativa 84 ± 2 %. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes en negrita, representan diferencias significativas según comparación múltiple de medias de Tukey, P<0.05.



**Figura 1.** Signos en larvas III de *Aedes aegypti* (n=100), expuestas a la especie fúngica de *Metarhizium anisopliae* (CCB-LE302) y aislamiento del hongo A. Separación de la cabeza del tórax; B. Cambio de color en el tegumento; C. Crecimiento del micelio sobre el cuerpo del insecto; D. Presencia de hifas (Flechas).



**Figura 2.** Signos en larvas III, obtención y observación microscópica de *Aedes aegypti* (n=100), expuestas a diferentes concentraciones de *Beauveria bassiana* (CCB-LE265). A. Alteración en el tamaño y desarrollo del hongo; B. Crecimiento del hongo en el cuerpo del insecto; C. Hongo en medio PGA; D. Conidios, raquis y conidióforos (Flechas).



**Tabla 3. Concentraciones letales (conidios/mL) al 50% (CL<sub>50</sub>) y 90% (CL<sub>90</sub>) y límites de confianza (LC) de *Metarhizium anisopliae* (CCB-LE302) y *Beauveria bassiana* (CCB-LE265) sobre larvas III de *Aedes aegypti* (n=100), en condiciones de laboratorio\*.**

Hongo	CL	Valor	LC	Ecuación de la recta
<i>M. anisopliae</i>	CL <sub>50</sub>	3.9E+04	1.9E+04 - 6.9E+04	3E-07x + 13.538
	CL <sub>90</sub>	1.6E+05	8.7E+04 - 8.1E+05	
<i>B. bassiana</i>	CL <sub>50</sub>	3.6E+06	2.1E+06 - 6.3E+06	7E-06x + 1.9615
	CL <sub>90</sub>	1.3E+07	7.3E+06 - 4.0E+07	

\* Temperatura 26 ± 1°C, Humedad relativa 84 ± 2 %.

**Tabla 4. Tiempo letal (días) al 50% (TL<sub>50</sub>), límites de confianza (LC) y pendiente de *Metarhizium anisopliae* (CCB-LE302) y *Beauveria bassiana* (CCB-LE265) sobre larvas III de *Aedes aegypti* (n=100), expuestas a diferentes concentraciones en condiciones de laboratorio\* al 95% de confianza.**

Hongo	Concentraciones	Tiempo			Ecuación de la recta
		TL <sub>50</sub>			
<i>M. anisopliae</i>	2.5 x 10 <sup>4</sup>	TL <sub>50</sub>	7.9	7.5 - 8.5	7.3091x - 17.855
		TL <sub>90</sub>	16.3	14.3 - 19.4	
<i>B. bassiana</i>	1.3 x 10 <sup>4</sup>	TL <sub>50</sub>	-	-	3.3909x - 10.164
		TL <sub>90</sub>	-	-	
<i>M. anisopliae</i>	2.5 x 10 <sup>5</sup>	TL <sub>50</sub>	2.7	2.2 - 3.1	10.964x + 1.6727
		TL <sub>90</sub>	5.4	4.6 - 6.9	
<i>B. bassiana</i>	1.3 x 10 <sup>5</sup>	TL <sub>50</sub>	9.1	8.7 - 9.7	5.945x - 18.582
		TL <sub>90</sub>	14.6	13.2 - 16.8	
<i>M. anisopliae</i>	2.5 x 10 <sup>6</sup>	TL <sub>50</sub>	2.1	1.5 - 2.7	10.082x + 13.509
		TL <sub>90</sub>	3.9	2.9 - 6.5	
<i>B. bassiana</i>	1.3 x 10 <sup>6</sup>	TL <sub>50</sub>	6.8	6.6 - 7.1	9.4x - 24.855
		TL <sub>90</sub>	11.5	10.7 - 12.6	
<i>M. anisopliae</i>	2.5 x 10 <sup>7</sup>	TL <sub>50</sub>	1.1	-	7.0727x + 41.564
		TL <sub>90</sub>	2.4	-	
<i>B. bassiana</i>	1.3 x 10 <sup>7</sup>	TL <sub>50</sub>	1.7	1.1 - 2.1	8.936x + 23.109
		TL <sub>90</sub>	4.0	3.1 - 6.2	

\* Temperatura 26 ± 1°C, Humedad relativa 84 ± 2 %.

## DISCUSIÓN

La aplicación de diferentes concentraciones de *M. anisopliae* (CCB-LE302) y *B. bassiana* (CCB-LE265) sobre larvas del estadio III de *Ae. aegypti*, demostraron en el presente ensayo ser virulentas, lo cual concuerda con estudios de Scholte y col.<sup>27</sup>, por tal motivo son consideradas entre las más importantes de la Familia Deuteromycete. Comparando la Tabla 1 y 2, *M. anisopliae* (CCB-LE302) resultó ser más efectivo que *B. bassiana*

(CCB-LE265). *M. anisopliae* a la concentración 2.5x10<sup>7</sup> conidios/mL presentó al primer, segundo y tercer día el 50, 74 y 100 % de porcentaje de mortalidad acumulada, lo cual indica su alta virulencia, esto concuerda con lo observado por Silva y col.<sup>29</sup>, quien indica que las mortalidades larvales de culícidos se producen entre las 24 y 48 horas; así mismo, el alto porcentaje de mortalidad (74%) al tercer día. Sin embargo, para *B. bassiana*

(CCB-LE265) se obtuvo 30% de mortalidad acumulada al primer día de aplicar  $2.5 \times 10^7$  conidios/mL (Tabla 2). Según Rodrigues y col.<sup>23</sup>, registraron que *M. anisopliae* LPP133 causó 50% de mortalidad en hembras de *Ae. aegypti* en 3.5 horas demostrando ser más virulento que *B. bassiana*. Los bioensayos estuvieron bajo condiciones ambientales constantes de temperatura a  $25 \pm 1$  °C y  $70 \pm 10$  de humedad relativa, factores importantes en las fases del crecimiento del hongo<sup>5</sup>. No obstante, aún no hay evidencias suficientes que indique la dependencia de las condiciones ambientales y la biología de los hongos, puesto que depende de la interacción insecto-patógeno, la correcta elección de la partícula infectiva a producir, la formulación adecuada a utilizar y la oportuna aplicación<sup>14</sup>. Hafez y col.<sup>12</sup> indica que la producción adecuada de conidios debe realizarse bajo condiciones de elevada humedad (70-80%) y temperatura (20-30°C). Después de comparar todas las concentraciones se observó que al sexto día las concentraciones más altas alcanzaron más del 95% de mortalidad. La mortalidad a través del tiempo originada a la concentración  $2.5 \times 10^7$  conidios/mL de *M. anisopliae* (CCB-LE302) no tiene diferencia significativa con las concentraciones  $2.5 \times 10^5$  y  $2.5 \times 10^6$  conidios/mL, con las que alcanzó el 96 y 100% de mortalidad, respectivamente. Entre los tratamientos de  $2.5 \times 10^4$  conidios/mL y las concentraciones  $2.5 \times 10^5$ ,  $2.5 \times 10^6$  y  $2.5 \times 10^7$  conidios/mL se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) esto indica que la mortalidad para *M. anisopliae* no depende del tiempo sino de la cantidad de esporas que infecta a la larva. En el control positivo (Tween 20) y negativo (Agua destilada), las larvas llegaron a cumplir su ciclo biológico. La mortalidad de *B. bassiana* (CCB-LE265) se compararon al quinto día, donde se observó 98% de mortalidad a la concentración  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL y a partir de este día los resultados tienen el mismo comportamiento. Entre los tratamientos de  $1.3 \times 10^4$ ,  $1.3 \times 10^5$ ,  $1.3 \times 10^6$  y  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL se observaron diferencias ( $P < 0.05$ ) los cuales alcanzaron 0, 1, 22 y 98% de mortalidad respectivamente. Silva y col.<sup>29</sup> registraron el 90% de mortalidad en larvas II de *Ae. aegypti* y Bukhari y col.<sup>2</sup> demostró que *B. bassiana* fue menos efectivo que *M. anisopliae*, lo cual concuerda con los resultados obtenidos. La mortalidad por *B. bassiana* (CCB-LE265) no depende del tiempo sino de la cantidad de esporas que infecte a la larva<sup>21</sup>. En el control positivo (Tween 20) y negativo (Agua destilada) las larvas cumplieron su ciclo biológico. Miranpuri y col.<sup>16</sup>, demostraron una gran efectividad de *B. bassiana* contra este insecto, lo cual no concuerda con los datos de la presente investigación puesto que los niveles de infección de son el resultado de diversos factores como: del contacto entre el inóculo de una cepa virulenta, la susceptibilidad de la cutícula del insecto a la germinación, penetración del tubo germinativo y el desarrollo del patógeno en la larva<sup>24</sup>. España<sup>7</sup>, considera a la muda como un mecanismo de defensa, por tanto es importante de enfrentar al hongo con larvas que mudan recientemente.

El efecto del hongo *M. anisopliae* (CCB-LE302) demostró la presencia de signos (Figura 1), donde se registró cambios anormales como alteración en el tamaño de la larva, la separación de la cabeza y el tórax del insecto, la flacidez del cuerpo larval y cambio de color en el tegumento. Las larvas se tornaron de color negro, debido a la desintegración de tejidos y cambios en el pH de la hemolinfa<sup>22</sup>. Para *B. bassiana* (CCB-LE265), se observaron además de los signos mencionados, el crecimiento de micelio y cambio de color rosado en el tegumento<sup>22</sup>. Estos síntomas fisiológicos anormales producidos por micosis lo describen Téllez y col.<sup>30</sup>. La muerte del insecto sobreviene por toxicosis y deshidratación; sin embargo el insecto enfrenta con diversos mecanismos de respuesta del sistema inmune para lo cual los hongos han desarrollado estrategias inmunosupresoras como la producción de toxinas. Las principales toxinas son las ciclopeptidos, producidos por *B. bassiana* y *M. anisopliae*; siendo las más comunes las destruxinas con actividad insecticida. Sin embargo, el cambio de coloración causado por *B. bassiana* es el resultado de la acción de la micotoxina oosperein, la cual posee pigmentos de color rojo que son poco liberados en el interior del hemocele<sup>11</sup>. La concentración letal media (CL50) y la CL90 para *M. anisopliae* (CCB-LE302) son de  $3.9 \times 10^4$  conidios/mL y  $1.6 \times 10^5$  conidios/mL respectivamente; los límites de confianza (LC) para CL50 es de  $1.9 \times 10^4$  a  $6.9 \times 10^4$  conidios/mL y para CL90 es de  $8.7 \times 10^4$  a  $8.1 \times 10^5$  conidios/mL teniendo como la ecuación de la recta a  $3E-07x + 13.538$ ; mientras que Pereira y col.<sup>19</sup>, registraron  $3.16 \times 10^5$  conidios/mL de CL50 para la cepa CG144 de *M. anisopliae*. *B. bassiana* (CCB-LE265) la concentración letal media (CL50) y la CL90 fue de  $3.6 \times 10^6$  y  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL respectivamente; los límites de confianza (LC) para CL50 es de  $2.1 \times 10^6$  a  $6.3 \times 10^6$  conidios/mL y para CL90 es de  $7.3 \times 10^6$  a  $4.0 \times 10^7$  conidios/mL teniendo como la ecuación de la recta a  $7E-06x + 1.9615$  (Tabla 3). Los valores del TL50 y TL90 para *M. anisopliae* (CCB-LE302) y *B. bassiana* (CCB-LE265), fueron también determinados mediante el análisis de Probit. En la Tabla 4, se observa que a medida que aumenta la concentración, el tiempo que pasa para matar el 50% y 90% de la población disminuye. Para la concentración  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL de *M. anisopliae* (CCB-LE302), es de 1.1 días y el TL90 de 2.4 días; sin embargo, también la concentración de  $2.5 \times 10^6$  conidios/mL es eficaz puesto que el TL50 y TL90 es de 2.1 y 3.9 días respectivamente. Para *B. bassiana* (CCB-LE265), el TL50 y TL90 de la concentración  $1.3 \times 10^6$  conidios/mL es de 6.8 y 11.5 días, mientras que para la concentración  $1.3 \times 10^7$  conidios/mL el TL50 y TL90 es de 1.7 y 4.0 días respectivamente, indicando su actividad virulenta en menos tiempo pero utilizando más esporas. Bukhari y col.<sup>2</sup>, reportó la baja virulencia de *B. bassiana* al compararlo con *M. anisopliae*; esto debido a la diferencia de rapidez en el crecimiento vegetativo. *M. anisopliae* posee un rápido crecimiento vegetativo aunque a expensas de la esporulación, mientras que *B. bassiana* tiene un lento crecimiento vegetativo con una alta

esporulación; sin embargo, el lento crecimiento vegetativo puede estar asociado con la liberación lenta de endotoxinas dentro del cuerpo larval, disminuyendo el porcentaje de mortalidad en los

insectos; así mismo, según Ibarra y col.<sup>13</sup>, menciona que los niveles de micosis varían de un género a otro.

### CONCLUSIONES

- *M. anisopliae* (CCB-LE302) y *B. bassiana* (CCB-LE265) presentan capacidad biocida sobre larvas del estadio III de *Ae. aegypti* en condiciones de laboratorio.
- La concentración de conidios que determina la CL50 y CL90 de *M. anisopliae* (CCB-LE302) al sexto día de aplicación es de  $3.9 \times 10^4$  conidios /mL y  $1.6 \times 10^5$  conidios /mL sobre larvas III de *Ae. aegypti*.
- La concentración de conidios que determina el TL50 y el TL90 de *M. anisopliae* (CCB-LE302) es de  $2.5 \times 10^5$  conidios /mL a los 2.7 y 5.4 días

respectivamente y a la concentración de  $2.5 \times 10^7$  conidios /mL es de 1.1 y 2.4 días respectivamente.

- La CL50 y CL90 de *B. bassiana* (CCB-LE265) obtenidas al quinto día de aplicación sobre larvas III de *Ae. aegypti* es de  $3.6 \times 10^6$  y  $1.3 \times 10^7$  conidios /mL respectivamente.
- El TL50 y el TL90 de *B. bassiana* (CCB-LE265) a la concentración de  $1.3 \times 10^5$  conidios /mL es de 9.1 y 14.6 días respectivamente, mientras que para la concentración  $1.3 \times 10^7$  conidios /mL es de 1.1 y 3.1 días respectivamente.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbott W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Economic entomol 1925; 18:265-267.
2. Bukhari T, Middelmann A, Constantianus J, Takken W, Knols B. Factors affecting fungus - induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. Bio Med Central Malaria J 2010; 9(22).
3. Calzada J. Métodos estadísticos para la investigación. 3ra. Ed. Lima, Perú: Edit. Jurídica. 1970.
4. Cañedo V, Ames T. Manual de Laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima-Perú. 2004.
5. Corral G, Romero A, Radrigan C, Zavlezo T. Las virtudes de los hongos entomopatógenos. Agronomía y forestal 2006; 30: 12-15.
6. Daniel W. Análisis de la variancia. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta ed México: Edit. Limusa Wiley. 2004.
7. España M. Caracterización enzimática de aislados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) y su virulencia sobre *Epilachni varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias: Áreas Biotecnología. México. 2000.
8. Forattini O. Entomología Médica. Vol. II. Culicini: *Culex*, *Aedes* e *Psorophora*. Brasil: Edit. Universidade de São Paulo. 1965.
9. Geetha I, Balaraman K. Effect of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on larvae of three species of mosquitoes. India J Experiment Biol 1999; 37: 1148-1150.
10. Gómez H, Soberanis W, Tenorio M, Torres E. Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos. Laboratorio de entomopatógenos. Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA. Ministerio de Agricultura. Perú. 2007.
11. Grove J, Pople M. The insecticidal activity of Beauvericin and the enniatin complex. Mycopathologia 1980; 70(2): 103-105.
12. Hafez M, Zaki F, Moursy A, Sabbour M. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth *Pthorimaea operculella* (Seller.). J Islamic Acad Sci 1994; 7(4).
13. Ibarra G, Moya G, Berlanga A. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis*) (Hemiptera: Cicadellidae). Rev Fol Ent Méx 2005; 44 (1):1-6.
14. Lecuona R. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de Insectos Plaga. Argentina: Edit. La Plata. S.R. Ltda. 1995.
15. Ministerio de Salud. Dirección Regional de Salud La Libertad. Guía de Procedimiento para la Vigilancia Entomológica y el control de *Aedes aegypti*. Trujillo - Perú. 2002.
16. Miranpuri G, Khachatourians G. Infection sites of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larval of mosquito *Aedes aegypti*. Entomol Experiment et Appl 1991; 59:19-27.
17. Mnyone LL, Russell T, Lyimo I, Lwetoijera D, Kirby M, Luz C. First report of *Metarhizium anisopliae* IP46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabienses* (Diptera: Culicidae). Bio Med Central Parasit & Vectors 2009; 2(1):59.
18. Nunes RL, Almeida NS, Nunes RLF, Helena SA, Helena GSA, Luz C. Pathogenicity of some hypocrealean fungi to adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitology 2010; 107(5): 1271-1274.
19. Pereira C, Rodrigues A, Gomes S, Azevedo S, Oliveira P, Ian S. The potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates for the control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. Biocontrol Sci Technol 2009; 19(8):881-886.
20. Pérez O, Rodríguez J, Bisset J, Leyva M, Díaz M, Fuentes O, Ramos F, Gonzales R, García I. Manual de indicaciones técnicas para insectarios Editorial Ciencias Médicas. La Habana. Cuba. 2004.
21. Poprawski T, Parker P, Tsai J. Laboratory and field evaluation of hyphomycete insect pathogenic fungi for control of brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae). Environ Entomol 1999; 28: 315-321.
22. TPrasad A, Veerwal B. Biototoxicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against early larval instars of anopheline mosquitoes. J Herbal Medic and Toxicol 2010; 4(2):181-188.
23. Rodrigues A, Sousa E, Pereira C, Pinheiro C, Samuels R. Susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*: prospects for Dengue vector control. Biocontrol Sci Technol 2008; 18(10): 1017-1025.
24. Rodríguez M, Gerding M, Andrés F. Efectividad de



- aislamientos de hongos entomopatógenos sobre larvas de Polilla del Tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae). Agric Téc 2006; 66(2):159-165.
25. Sandhu S, Rajak R, Sharma M. Bioactivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as pathogens of *Culex tritaeniorhynchus* and *Aedes aegypti*: effect of instar, dosages and time. Indian J Microbiol 1993; 33: 191- 194.
  26. Scholte E, Knols B, Samson R, Takken W. Entomopathogenic fungi for mosquito control. J Insect Sci 2004. 4: 19.
  27. Scholte E, Takken W, Knols B. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Acta Trópica 2007; 102:151-158.
  28. Scholte E, Takken W, Knols B. Pathogenicity of six east African entomopathogenic fungi to adult *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Proc Exp Appl Entomol NEV Amsterdam. 2003. 14:25-29.
  29. Silva R, Silva H, Luz C. Effect of *Metarhizium anisopliae* isolated from soil samples of the central Brazilian Cerrado against *Aedes aegypti* larvae under laboratory conditions. Rev Patol Trop 2004; 33 (2): 207-216.
  30. Tellez A, Cruz M, Mercado Y, Asaff A, Arana A. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Rev Mex Micol 2009; 30: 73-80.
  31. Truman B. Clark, William R. Kellen, Tokuo Fukuda and James E. Lindegren. Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. J Invert Pathol 1968; 11 (1):1-7.

**Recibido:** 19 enero 2014 | **Aceptado:** 24 mayo 2014