



BIBLIOTECAS UNACH  
FAC. MEDICINA HUMANA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

CAMPUS II

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

---

---

EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE  
DIFERENTES CEPAS DE HONGOS SOBRE  
SIMÚLIDOS VECTORES DE ONCOCERCOSIS

TESIS QUE PRESENTA

**JOSUÉ ARCIA GONZÁLEZ**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS, MÉXICO

2010



24 de Junio del 2010  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

**C. JOSUÉ ARCIA GONZÁLEZ.  
PRESENTE.**

*Asunto: Autorización de la impresión de Tesis.*

Por este medio informo a usted que después de revisar la última versión de la Tesis:

**EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE DIFERENTES CEPAS DE HONGOS SOBRE SIMÚLIDOS VECTORES DE ONCOCERCOSIS,** para obtener el Grado de:

**Maestro en Ciencias de la Salud Ambiental y Enfermedades Transmisibles**

se autoriza la impresión con el registro correspondiente en los archivos de Posgrado.

**ATENTAMENTE  
"POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR"**

**DRA. MARÍA GUADALUPE VÁZQUEZ MARTÍNEZ  
Directora de Tesis**

C.c.p. Alumno interesado.

## AGRADECIMIENTOS

ESTA TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SALUD AMBIENTAL Y ENFERMEDADES TRANSMISIBLES ES PRODUCTO DEL PROYECTO FOMIX CHIAPAS - CONACYT GOBIERNO DEL ESTADO (CLAVE CHIS030755), DEL CUAL EL SUSTENTANTE ES EGRESADO.

EL PRESENTE TRABAJO TAMBIÉN CONTÓ CON APOYO ECONÓMICO DEL PROYECTO NO. 13972 DE LOS FONDOS SECTORIALES SALUD-CONACYT, BAJO LA RESPONSABILIDAD TÉCNICA DE LA DRA. MARIA GUADALUPE VÁZQUEZ MARTÍNEZ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE VECTORES, EN LAS INSTALACIONES DEL CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA (CRISP), EN TAPACHULA DE CÓRDOVA Y ORDÓÑEZ, CHIAPAS.

**EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD  
DE DIFERENTES CEPAS DE HONGOS  
SOBRE SIMÚLIDOS VECTORES DE  
ONCOCERCOSIS**

**JOSUÉ ARCIA GONZÁLEZ.**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al Grado  
de Maestro en Ciencias de la Salud Ambiental y Enfermedades  
Transmisibles

**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. MARÍA GUADALUPE VÁZQUEZ MARTÍNEZ**  
Centro Regional de Investigación en Salud Pública  
Tapachula, Chiapas

## AGRADECIMIENTOS:

A Dios:

Por haberme guiado en el transcurso de mi vida y ayudarme en los momentos más difíciles de mi existencia.

A mis padres:

*José Angel Arcia Santos (†)*

*Iberia González Martínez*

Por haber sido fuertes durante los primeros años de mi vida en que estuve al borde de la muerte, por su esfuerzo y tenacidad durante mi etapa de estudiante, y porque lo que he alcanzado hoy, es sólo por la gracia de Dios y por el decidido apoyo de mis padres.

A mis hermanos:

*Sally Susana Arcia González*

*Deli Janett Arcia González*

*Angel Urías Arcia González*

Gracias por su apoyo en todo momento y por los momentos inolvidables que hemos pasado juntos en familia. Los amo.

A mi esposa:

Tita Rosalba López de León, por los momentos que pasamos juntos con nuestro hijo Víctor Josué.

A mi hijo:

Víctor Josué Arcia López, quien ha tenido que sufrir durante mis ausencias por la distancia, a quien expreso mi amor con todo mi corazón.

A mi Directora de tesis:

Dra. María Guadalupe Vázquez Martínez

Gracias por su decidido apoyo en la realización del presente trabajo, sus sugerencias y correcciones, y sobre todo por su paciencia; estaré siempre agradecido por su invaluable apoyo.

A los Co-asesores:

Dr. José Luis Torres Estrada

Dr. Américo D. Rodríguez Ramírez

Por las sugerencias y comentarios a lo largo de la realización del presente trabajo, y por su decidido apoyo.

A la Directora del Centro Regional de Investigación en Salud Pública de Tapachula, Chiapas; Dra. Janine Ramsey Willoquet, por darme la oportunidad de participar conjuntamente con los investigadores del CRISP en la realización de este trabajo.

A la QFB. Olga Ruth Gálvez Coutiño:

Por su apoyo en los detalles de cultivos de hongos, por compartir sus conocimientos y por su valiosa amistad.

Al personal técnico de campo del CRISP:

René Monzón Vera, Amílcar Zúñiga Ambrosy, Octaviano Girón de León, y Arturo Roblero Pérez por su apoyo técnico en la obtención de larvas, por su amistad y compañerismo.

Al personal de Biblioteca y Centro de Cómputo del CRISP:

Gracias por brindarme su esmerada atención, apoyo y amistad.

A los Fondos Sectoriales SALUD-CONACYT por el apoyo económico brindado a través del proyecto No. 13972, bajo la responsabilidad de la Dra. Guadalupe Vázquez Martínez.

Al FOMIX por el apoyo económico a través del proyecto No. **CHIS030755**

Al Departamento de Posgrado de la Facultad de Medicina Humana Campus II de la UNACH por el apoyo brindado para la realización de la Maestría.

A los maestros, gracias por compartir sus conocimientos y experiencia.

A todos, mi agradecimiento sincero.

I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. ANTECEDENTES.....	17
A) África.....	18
B) América Latina.....	19
Hongos entomopatógenos.....	22
Modo de acción.....	22
III. JUSTIFICACIÓN.....	26
IV. OBJETIVOS.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
V. HIPÓTESIS.....	29
VI. METODOLOGÍA.....	30
Colecta de material biológico.....	30
Sistema artificial para la aplicación de bioensayos con larvas de simúlidos a nivel de laboratorio.....	30
Concentración óptima de Tween.....	31
Presión de aire óptima.....	32
Tipo de agua óptima.....	33
Tipo de alimento óptimo.....	33
Cepas de hongos.....	34
Medio de cultivo.....	34
Condiciones de cultivo.....	35
Solución de conidias.....	35



a) Solución de Tween 80 .....	35
b) Preparación de la solución stock de conidias.....	36
Conteo de conidias .....	36
Solución de conidias de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	37
a) Solución de conidias a $1 \times 10^8$ conidias/ml.....	38
b) Solución de conidias a $1 \times 10^7$ conidias/ml .....	39
c) Solución de conidias a $1 \times 10^6$ conidias/ml .....	39
d) Solución de conidias a $1 \times 10^5$ conidias/ml .....	39
e) Solución de conidias a $1 \times 10^4$ conidias/ml .....	39
Solución de conidias de <i>Beauveria bassiana</i> .....	39
a) Solución de conidias a $5 \times 10^7$ conidias/ml .....	40
b) Solución de conidias a $1 \times 10^7$ conidias/ml .....	40
c) Solución de conidias a $5 \times 10^6$ conidias/ml.....	41
d) Solución de conidias a $1 \times 10^6$ conidias/ml .....	41
e) Solución de conidias a $1 \times 10^5$ conidias/ml .....	41
Solución de conidias de <i>Gliocladium virens</i> .....	41
a) Solución de conidias a $1 \times 10^8$ conidias/ml.....	42
b) Solución de conidias a $1 \times 10^7$ conidias/ml .....	42
c) Solución de conidias a $1 \times 10^6$ conidias/ml .....	43
d) Solución de conidias a $1 \times 10^5$ conidias/ml .....	43
e) Solución de conidias a $1 \times 10^4$ conidias/ml .....	43
Bioensayos de entomopatogenicidad de <i>M. anisopliae</i> , <i>B. bassiana</i> y <i>G. virens</i> sobre la etapa larvaria de <i>Simulium ochraceum</i> .....	43
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	45
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45

Sistema para la aplicación de bioensayos con larvas de <i>S. ochraceum</i> .....	45
Mortalidad de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas	
a <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	50
Mortalidad de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a <i>Beauveria bassiana</i> .....	54
Mortalidad de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a <i>Gliocladium virens</i> .....	58
IX. CONCLUSIONES .....	62
X. RECOMENDACIONES .....	63
XI. BIBLIOGRAFÍA .....	64

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a siete concentraciones de Tween 80 .....	32
Figura 2	Larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a tres diferentes presiones de aire .....	32
Figura 3	Larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a dos tipos de agua.....	33
Figura 4	Larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a dos tipos de alimento.....	34
Figura 5	Mortalidad diaria de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a <i>Metarhizium anisopliae</i> con respecto al control.....	51
Figura 6	Valores Probit ajustados y línea de regresión de la mortalidad ocasionada por <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre larvas de <i>Simulium ochraceum</i> .....	53
Figura 7	Mortalidad diaria de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a <i>Beauveria bassiana</i> con respecto al control.....	56
Figura 8	Valores Probit ajustados y línea de regresión de la mortalidad ocasionada por <i>Beauveria bassiana</i> sobre larvas de <i>Simulium ochraceum</i> .....	58
Figura 9	Mortalidad diaria de larvas de <i>S. ochraceum</i> expuestas a <i>G. virens</i> con respecto al control.....	59
Figura 10	Valores Probit ajustados y la línea de regresión de la mortalidad ocasionada por <i>Gliocladium virens</i> sobre larvas de <i>S. ochraceum</i> .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Determinación de la concentración de conidias en la solución de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	37
Tabla 2	Determinación de la concentración de conidias en la solución de <i>Beauveria bassiana</i> .....	40
Tabla 3	Determinación de la concentración de conidias en la solución de <i>Gliocladium virens</i> .....	42
Tabla 4	Mortalidad de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a varias concentraciones de Tween 80.....	46
Tabla 5	Mortalidad diaria de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a tres diferentes presiones de aire.....	46
Tabla 6	Mortalidad diaria de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a dos tipos de agua.....	47
Tabla 7	Mortalidad diaria de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a dos tipos de alimento.....	48
Tabla 8	Mortalidad diaria de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a cinco concentraciones de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	50
Tabla 9	Análisis probit de la mortalidad larvaria de <i>Simulium ochraceum</i> causada por <i>Metarhizium anisopliae</i> a las 24 h.....	52
Tabla 10	Valores de CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub> de conidias del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i> sobre larvas de <i>Simulium ochraceum</i> .....	53

Tabla 11	Mortalidad de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a cinco concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i> .....	54
Tabla 12	Análisis Probit de la mortalidad larvaria de <i>Simulium ochraceum</i> causada por <i>Beauveria bassiana</i> a las 24 h.....	57
Tabla 13	Valores de CL <sub>50</sub> yCL <sub>90</sub> de conidias del hongo <i>Beauveria bassiana</i> sobre larvas de <i>Simulium ochraceum</i> .....	57
Tabla 14	Mortalidad de larvas de <i>Simulium ochraceum</i> expuestas a cinco concentraciones de <i>Gliocladium virens</i> .....	59
Tabla 15	Análisis Probit de la mortalidad larvaria de <i>Simulium ochraceum</i> causada por <i>Gliocladium virens</i> a las 72 h.....	60
Tabla 16	Valores de CL <sub>50</sub> yCL <sub>90</sub> de conidias del hongo <i>Gliocladium virens</i> sobre larvas de <i>Simulium ochraceum</i> .....	61

## I. INTRODUCCIÓN

La oncocercosis es una enfermedad producida por la infestación de un gusano filariforme: *Onchocerca volvulus*. Este parásito se transmite al hombre por la picadura de moscas negras, los simúlidos, que se reproducen en los ríos de fuerte corriente. Las personas que frecuentan estos ríos por la pesca, el baño, o para recoger agua tienen un riesgo mayor de contraer la enfermedad. La oncocercosis es más conocida como “ceguera de los ríos” debido a la asociación entre la ceguera producida por la enfermedad y el hábitat próximo a los ríos en que los simúlidos se reproducen (Soumbey-Alley et al. 2004).

La oncocercosis causa un prurito intenso, una dermatitis desfigurante y lesiones oculares que pueden evolucionar hasta la ceguera, por orden de importancia es la segunda causa de ceguera infecciosa en el mundo (Rodríguez-Pérez et al. 1991, 2005).

Los parásitos adultos viven en nódulos en el tejido subcutáneo, conjuntivo o muscular de las personas infectadas. Las hembras engendran las larvas llamadas microfilarias que migran a partir de los nódulos a otros tejidos. Las microfilarias, presentes en los tejidos subcutáneos, son ingeridas por los simúlidos hembras cuando pican al hombre para alimentarse (Rodríguez-Pérez et al. 1991). Una vez en el hombre, pasan aproximadamente un año como larvas esperando el estado adulto para acoplarse y engendrar microfilarias, cerrando así el ciclo biológico. La hembra adulta puede engendrar millones de microfilarias en el curso de los 9 a 15 años que dura su vida fértil.

La oncocercosis es una enfermedad devastadora para la economía. En los lugares donde la prevalencia de la oncocercosis es elevada, los jóvenes abandonan sus pueblos por miedo a contraer la oncocercosis (ceguera, epilepsia) dejando tras de sí las tierras fértiles abandonadas. En ausencia de trabajadores la producción se ve gravemente afectada acentuando la pobreza y el hambre. La expectativa de vida

de una persona que queda ciega en áreas endémicas puede estar reducida en cerca de 10 años (WHO 1995).

La oncocercosis es endémica en 28 países de África, un país de Oriente Medio y seis países de América Latina; más del 99% de los casos de oncocercosis y de ceguera ligada a ésta, se encuentran en el continente africano (Thylefors 2004). En México, ocurre endémicamente en dos regiones de Chiapas y en una región de Oaxaca, localizadas en áreas montañosas en el sureste, que en conjunto cubren un área de 16,932 km<sup>2</sup> y cuya población es aproximadamente de 286,000 personas, de las cuales 25,000 están infectadas con *O. volvulus*.

El tratamiento que se ha utilizado eficazmente en forma masiva para erradicar las microfilarias en el ser humano es la ivermectina (Hoerauf et al. 2003, Thylefors 2004). Las comunidades de los tres focos endémicos han recibido tratamiento con ivermectina (Mectizan®), en esquema semestral desde 1990. Esto ha llevado a pensar que de lograrse la reducción en la carga de microfilarias en piel a niveles por debajo del necesario para el mantenimiento de la transmisión, ésta podría ser interrumpida y la infección, de manera eventual, eliminada. Sin embargo, el avance hacia la interrupción de la transmisión en varias comunidades endémicas de México, así como en casi todos los países afectados, ha sido lento, a pesar de múltiples tratamientos semestrales con ivermectina. Por lo tanto, es necesario realizar monitoreos entomológicos periódicos para documentar la interrupción de la transmisión del parásito en México (Rodríguez-Pérez et al. 2005).

En el estado de Chiapas esta enfermedad ha sido encontrada principalmente en dos focos; el foco mayor en el sureste del estado, colindando con el foco noroeste de Guatemala (Huehuetenango), se ubica entre las latitudes 15° 4' y 15° 57' norte y las longitudes 92° 5' y 93° 7' oeste; comprende 14,410 km<sup>2</sup> en 21 municipios con 794 localidades y 207,339 habitantes. El foco menor en el declive norte del estado, el cual crece a partir del límite con el estado de Tabasco, ubicado entre las latitudes 16° 52' y 17° 7' norte y las longitudes 92° 29' y 92° 40' oeste; comprende 1,190 km<sup>2</sup> en 7 municipios con 42 localidades habitadas y 21,393

habitantes hasta el año 1998 (Rodríguez 2000). El principal vector en México y Guatemala es *Simulium ochraceum* (Shelley 1991, Rodríguez-Pérez et al. 1999).

Los métodos que se han empleado para controlar las poblaciones de simúlidos vectores de la oncocercosis, sobre todo en África, se basan principalmente en el uso de insecticidas químicos para combatir las larvas que son acuáticas, las cuales proliferan en corrientes naturales de curso rápido y en canales artificiales empleando un compuesto organofosforado llamado temephos, el cual es asperjado por helicóptero o avioneta principalmente en la orilla de los ríos de cauce rápido (Hougard et al. 2001). En México, el uso de insecticidas para el control del vector es prácticamente nulo, debido principalmente al difícil acceso y lo disperso de los criaderos. No obstante, en un esquema de participación comunitaria, el control de vectores mediante cualquier tipo de insecticida, podría ser efectivo (Shelley 1991).

Desgraciadamente los insecticidas químicos se caracterizan por producir serios problemas ambientales y de salud, por lo que su uso ha generado el desequilibrio del ecosistema establecido en los ríos donde los larvicidas son asperjados (Mohsen y Mulla 1981, Resh et al. 2003).

Los problemas generados por el uso indiscriminado de los compuestos químicos han planteado la necesidad de buscar alternativas de control que no se basen en el uso de químicos. Una alternativa que eliminaría las consecuencias indeseadas del control químico es el control biológico, donde destacan los hongos entomopatógenos (Scholte et al. 2003, 2004).

Los hongos entomopatógenos tienen un gran potencial como agentes de control, ya que constituyen un grupo con más de 750 especies que al dispersarse en el ambiente provocan infecciones fúngicas en las poblaciones de insectos (Pucheta et al. 2006).



Sin embargo, aún se desconoce la ecología básica de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico, por lo que es preciso comprender el modo de acción de éstos y su espectro de hospederos.

Un ejemplo de la acción de los hongos entomopatógenos lo constituye el hongo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Este es un hongo parásito facultativo, cuyo ciclo biológico comprende dos fases: una patogénica y otra saprofítica. La fase patogénica ocurre cuando el hongo entra en contacto con el tejido vivo del hospedero, en este caso insectos, en conjunto con humedad y temperatura adecuada (Corral et al. 2006).

El proceso infeccioso, que lleva a la muerte del insecto atacado por el hongo, se cumple en tres etapas. La primera, de germinación de esporas y penetración de hifas al cuerpo del hospedero. La segunda, de invasión de los tejidos por parte del micelio del hongo hasta causar la muerte del insecto. Durante este proceso se produce una gran variedad de metabolitos tóxicos, siendo las destruxinas las más estudiadas (Corral et al. 2006). Los síntomas de la enfermedad en el insecto son la pérdida de sensibilidad, descoordinación de movimientos y parálisis (Charnley 2005). Cuando el insecto muere queda momificado y algunas veces se pueden presentar zonas de pigmentación localizadas, que corresponden a los sitios de penetración de las conidias en el tegumento.

Finalmente, en la tercera etapa, se produce la esporulación y el inicio de un nuevo ciclo. El micelio del hongo se observa primero en las articulaciones y partes blandas de los insectos y en días posteriores se incrementa a todo el cuerpo hasta cubrirlo. Tras la muerte del insecto y bajo condiciones de alta humedad relativa, las conidiosporas pueden extenderse a través del cuerpo cubriéndolo con material fungoso de color verde oliváceo, para el caso de *M. anisopliae*.

Se han realizado estudios sobre diversas clases de insectos en los que se han empleado hongos entomopatógenos como medio de control biológico obteniendo buenos resultados. Estos estudios incluyen a lepidópteros (Solís-Soto et al. 2006), himenópteros (Sánchez et al. 2002); hemipteros (Vicentini et al. 2001), dípteros

(Samuels et al. 1989; Scholte et al. 2003, 2004, 2005; Blanford et al. 2005; Angel-Sahagún 2005), entre otros.

En base a los resultados obtenidos por estos investigadores, se espera que los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) y *Gliocladium virens* Corda (Hypocreales: Hypocreaceae) muestren patogenicidad sobre las larvas de *S. ochraceum*.

## II. ANTECEDENTES

La oncocercosis fue descubierta por primera vez en África por John O' Neill en 1875, aunque el vector transmisor no fue descubierto sino hasta 1926 por Blacklock (Arfan-ul-Bari 2007).

En el continente americano Robles registró el primer caso en Guatemala en 1915, por lo que se le llama también enfermedad de Robles. En México los primeros casos fueron reportados en 1923, posteriormente en Venezuela en 1949, en Colombia en 1965 y finalmente en Brasil en 1967 (Romero y Maia-Herzog 2003).

Desde sus inicios, los esfuerzos realizados para el control de las moscas negras, se enfocaron específicamente en el control de las larvas, ya que estas se hallaban confinadas en las corrientes de aguas de los ríos exclusivamente, lo que constituía un hábitat restringido y fácilmente tratable. El control de las moscas negras adultas sin embargo, resultó demasiado costoso, no obstante que fue efectivo en áreas limitadas y bajo circunstancias especiales (Jamnback 1981).

Hasta la llegada del DDT, los métodos propuestos y llevados a cabo para el control de las moscas negras eran notablemente ineficaces y caros ya que la labor consistía en quitar las larvas de las piedras, remover la vegetación de los ríos; además involucraba la aplicación de sustancias muy tóxicas para la fauna como

emulsiones aceitosas, xilol, keroseno, compuestos arsenicales, entre otros (Jamnback 1981).

El DDT fue utilizado en el año 1945 en Yepocapa, Guatemala por Fairchild y Barreda (Guillet 1984), obteniendo excelentes resultados lo que pudo demostrar su alta efectividad como larvicida. En 1947 Garnham y McMahon probaron la efectividad del DDT como larvicida en África, obteniendo también excelentes resultados (Jamnback 1981).

El DDT fue utilizado por dos décadas en varias partes del mundo, hasta que finalmente fue retirado como medio de control de larvas de moscas negras debido a las fatales consecuencias para la fauna de los ríos, además de los índices de resistencia que a través de los años, se hallaron en varias especies de *Simulium*. La investigación que se inició a finales de los 50's se centró entonces en la búsqueda de alternativas para el control, y no fue sino hasta principios de los 70's que se sintetizaron dos compuestos sustitutos del DDT, el temephos (Abate®) y el metoxiclor. Ambos larvicidas fueron ampliamente estudiados desde entonces (Jamnback 1981).

Estos descubrimientos motivaron el interés de organizaciones internacionales para implementar programas importantes para el control de la oncocercosis en varios lugares como:

#### A) África

El control de la ceguera de los ríos producida por la oncocercosis, comenzó en 1974 en África oriental como un proyecto regional grande llamado *Programa de Control de la Oncocercosis* (PCO). El tratamiento de control del vector con larvicida en los sitios donde se desarrollaban las moscas transmisoras de la enfermedad, era la única forma disponible. El PCO fue planeado como una iniciativa regional para

superar los factores epidemiológicos que habían minado los esfuerzos a nivel local; por lo que el control eficaz debía abarcar zonas endémicas enteras. El programa se extendió en sus primeros años para lograr una cobertura total en varios sistemas de ríos de siete países. No obstante, aún este ambicioso programa inicial fue insuficiente, por lo que tuvo que aumentar su cobertura a 12 países más. El control del vector fue la estrategia primaria en África oriental, y fue reforzada con la distribución de Mectizan® de 1989-1990.

A mediados de los 90's un segundo programa fue puesto en marcha, el *Programa Africano para el Control de la Oncocercosis (PACO)* para cubrir los 19 países restantes infestados; además se extendió en otros países del mundo entre los que se encuentran los seis países afectados de América Latina. El PACO se basa en la administración de ivermectina (Mectizan®), medicamento que fue desarrollado por la compañía Merck & Co., en los 80's y que ahora es donado para el control de la enfermedad. El Mectizan® es distribuido por las propias comunidades, que son entrenadas y apoyadas por instituciones de agencias internacionales, gobiernos de países participantes, organizaciones no gubernamentales, países donadores y por supuesto las mismas comunidades. El PACO fue probado y validado en base local, pero ha ido creciendo mediante el continuo lanzamiento de nuevos proyectos. La red de distribución también está siendo probada con el propósito de que ofrezca otras intervenciones. Esta posibilidad abre las puertas a un posterior desarrollo y presenta la oportunidad de proveer otras intervenciones básicas de salud en países con ceguera de los ríos, que son exclusivamente remotas, rurales y pobres, la mayoría de las cuales no son alcanzadas por otros programas, ni por el apoyo gubernamental (Hougard et al. 2001, Thylefors 2004).

## B) América Latina

Antes de que la ivermectina estuviera disponible, las medidas de control tomadas en contra de la oncocercosis en América Latina incluían acciones como la nodulectomía, aplicación de larvicida, y el tratamiento con DEC (citrato de dietil

carbamazina), y suramina. Estos fármacos presentaban fuertes efectos colaterales en los pacientes, por lo que dejaron de usarse a la llegada de la ivermectina (Rodríguez-Pérez 1991, Rodríguez 2002).

La donación de Mectizan (ivermectina), renovó el interés por el control de la oncocercosis en las Américas, y pocos años después se inició la administración de ivermectina en las zonas afectadas. Esto condujo a la formación en 1993 del *Programa para la Eliminación de la Oncocercosis en las Américas* (PEOA), con sede en Guatemala y cuyo objetivo es la eliminación de la morbilidad y la infección (hasta donde sea posible), mediante el uso de ivermectina. En los seis países de América Latina afectados por la oncocercosis se estableció un programa de tratamiento bianual en base a las observaciones de Cupp y cols. (1989), ya que en Guatemala al aplicar una segunda dosis extendiendo el periodo de tratamiento a siete meses más, se registró una supresión casi total de la transmisión en humanos por las moscas negras (Lindblade et al. 2007). Gracias a la implementación de esta estrategia se ha logrado el objetivo de eliminar la morbilidad y la infección por oncocercosis en la región (WHO 2001; Dadzie et al. 2003). Para el 2004, la población elegible para tratamiento de los 13 focos endémicos era de 445,000 personas (WHO 2005). En 2004 y 2005, la meta de administrar el tratamiento en el programa bianual se llevó a cabo en todos los focos de la región menos en el foco del sureste de Venezuela (WHO 2005; M. Sauerbrey, datos no publicados). Se cree que la interrupción de la transmisión se ha llevado a cabo en los focos de Ecuador, México, Guatemala y Colombia (WHO 2002, 2005).

En los focos de Chiapas, México; los esfuerzos continúan tomando medidas alternativas en virtud de la ausencia de un macrofilaricida contra *O. volvulus*, por lo que se ha instituido el tratamiento con ivermectina cuatro veces al año en 50 de las comunidades más endémicas (WHO 2005). Pero por otro lado, es necesario contar con una herramienta de diagnóstico capaz de detectar la presencia de *O. volvulus* adultos en humanos de esta región lo cual sería de mucha utilidad para decidir el momento adecuado para la suspensión del tratamiento con ivermectina sin el riesgo de recaídas (WHO 2005).

La alta incidencia de resistencia a los insecticidas organofosforados que originalmente estaban siendo empleados para el control de los simúlidos vectores de la oncocercosis, estaban amenazando la eficacia del Programa Africano para el Control de la Oncocercosis; por lo cual se buscaron nuevas estrategias de control que garantizaran la efectividad del Programa (Thylefors 2004). Esto motivó que implementara un programa de manejo de resistencia al temefos en el complejo de *S. damnosum*, lo cual se consiguió mediante la rotación de *Bacillus thuringiensis* H-14, permetrina y/o carbosulfan, y temefos (Kurtak et al. 1987, Hougard et al. 1993). Esto demostró la factibilidad de manejar la resistencia a insecticidas químicos, incorporando en la estrategia el empleo de agentes biológicos de control.

La atención se dirigió entonces al control biológico, que había mostrado efectividad en el control de plagas de insectos en agricultura.

#### Control biológico

El control biológico tuvo sus inicios con notables pioneros en la patología de invertebrados como Agostino Bassi, Louis Pasteur y Elie Metchnikoff (Steinhaus 1956, 1975). Básicamente este tipo de control consiste en la utilización de otros organismos vivos, la mayoría de ellos microorganismos, en cuyo metabolismo se producen sustancias que son capaces de destruir o matar a una gran diversidad de insectos plaga. En la actualidad una gran variedad de entomopatógenos son usados para combatir los insectos plaga que afectan a cultivos y a insectos vectores de enfermedades de importancia médica y veterinaria (Burges 1981; Tanada y Kaya 1993; Lacey y Kaya 2000).

Los principales organismos entomopatógenos usados para control biológico son bacterias, virus, protozoarios, nemátodos, y hongos (Lacey et al. 2001).

## Hongos entomopatógenos

La utilización de hongos entomopatógenos se ha llevado a cabo alrededor del mundo para el control de insectos que afectan los cultivos, y se está valorando el potencial de estos hongos contra mosquitos adultos para reducir la transmisión de enfermedades como la malaria (Lacey et al. 2001; Blanford et al. 2005).

Los hongos, a diferencia de otros agentes entomopatógenos, no necesitan ser ingeridos por el insecto para controlarlo (Carruthers y Hural 1990) pudiendo ocurrir la infección por contacto y adhesión de las esporas a las partes bucales, membranas intersegmentales o a través de los espiráculos (Charnley 1997; Jeffs et al. 1997; Kershaw y Talbot 1998).

### Modo de acción

Los hongos inician su proceso infectivo cuando las esporas son retenidas en la superficie del integumento, donde se inicia la formación del tubo germinativo, comenzando el hongo a excretar enzimas como las proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas (Hajek et al. 1994). Estas enzimas degradan la cutícula del insecto y coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio, que es una estructura especializada formada en el tubo germinativo. Una vez dentro del insecto, el hongo se desarrolla como cuerpos hifales que se van diseminando a través del hemocele e invaden diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi, mitocondrias y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días de iniciada la infección (Gupta et al. 1994).

Una vez muerto el insecto y ya agotados muchos de los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento micelar e invade todos los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas, inician la formación de nuevas esporas (Pucheta et al. 2006).

*Beauveria bassiana* es un hongo que se ha colocado como uno de los más eficazmente utilizados para el control de la roya del café. Su uso se ha llevado a cabo en Brasil (Fernández et al. 1985), Honduras (Lazo 1990), México (Méndez 1990), Colombia (Jiménez 1992), Nicaragua (Barrios 1992), Ecuador (Sponagel 1994), e India (Haraprasad et al. 2001) (Posada-Vega 2005).

Ernst-Jan Scholte y cols., en 2005, utilizaron *M. anisopliae* para implementar una posible estrategia de control del vector de la malaria impregnando al mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto*, con soluciones del hongo. El estudio consistió en determinar si los mosquitos adultos se infectaban reduciendo su periodo de vida después de tener contacto directo con el hongo. En este estudio se obtuvo un 23% de mosquitos infectados con el hongo, lo cual indica que la tasa de inoculación entomológica (EIR), puede reducirse de 262 picaduras infectantes por persona al año a 64, traduciéndose en una reducción en la intensidad de la infección del 75%, lo cual coloca a este método de control biológico como una poderosa herramienta para el control de la malaria.

Blanford y cols. (2005), realizaron un trabajo en el que reportaron el potencial de los hongos entomopatógenos para reducir la transmisión de la malaria. El experimento lo realizaron tanto en laboratorio como en campo. El estudio en laboratorio involucró a adultos del vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae) y consistió en monitorear la mortalidad de estos a ocho aislados de hongos Hyphomycetes de dos especies comunes: *B. bassiana* y *M. anisopliae* exponiendo mosquitos hembras adultos a contenedores con residuos de rociados de los hongos. Los mosquitos se introdujeron en los contenedores 24 h después de que los contenedores fueron rociados. Encontraron que seis de los ocho rociados produjeron más del 80% de mortalidad hacia el día 14 del ensayo con un 70% de cadáveres con desarrollo de esporas. El estudio en campo se realizó utilizando el aislado de *B. bassiana* marcado como IMI 391510 el cual ya se usa en un producto bioplaguicida empleado en la agricultura. El propósito fue evaluar su actividad insecticida y esto se hizo a partir de dos tratamientos: el primero consistió en la aplicación tópica directa contra *An. stephensi* y el segundo como residuo de un



rociado en la malla de una jaula. Los tratamientos mataron al 91% y al 93% de mosquitos respectivamente en el día 14 del ensayo. Aunque estos no fueron los únicos resultados que se obtuvieron de este experimento, nos muestran claramente el potencial que los hongos entomopatógenos tienen como método de control biológico.

Rodríguez y cols. (2006), realizaron estudios de laboratorio para el control de larvas de la polilla del tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae), para lo cual probaron dos cepas de hongos entomopatógenos: Qu-M558 de *M. anisopliae* var. *anisopliae* y Qu-B912 de *B. bassiana*. Realizaron dos evaluaciones, la primera de las cuales fue realizada aplicando concentraciones de 0 a  $10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  directamente sobre larvas de tercer estadio mediante el sistema de pulverización torre Potter. La  $\text{CL}_{50}$  y  $\text{CL}_{90}$  para Qu-B912 fue de  $10^{4.4}$  y  $10^{7.6}$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , y para Qu-M558 de  $10^{5.4}$  y  $10^{9.1}$  conidias  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. La segunda fue realizada sobre hojas de tomate aplicando suspensiones de 0 a  $10^8$  conidias  $\text{mL}^{-1}$  del aislamiento Qu-B912, a través del sistema de pulverización torre Potter. Larvas del tercer estadio de *T. absoluta* fueron alimentadas con estas hojas infectadas. Trece días después de la inoculación los porcentajes de mortalidad alcanzaron un 68% a la máxima concentración de inóculo.

Angel-Sahagún y cols. (2005), evaluaron bajo condiciones de laboratorio la susceptibilidad de los estados biológicos de huevo, pupa y adulto de *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) a aislados de los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown y Smith. Los huevos, pupas y adultos de la mosca del cuerno fueron susceptibles a los hongos entomopatógenos, los cuales causaron reducción en la emergencia de adultos de 3.8 a 6.3% en comparación al testigo (72%). Las pupas fueron micosadas en un rango entre 50 y 71.3%. El porcentaje de mortalidad de adultos fue mayor al 90% en la mayoría de los aislados. Los resultados muestran que los aislados de *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus* son patógenos de diferentes estados biológicos de la mosca del cuerno y que estos hongos reducen la emergencia de adultos cuando son aplicados a huevos y pupas, y causan mortalidad al aplicarlos a adultos.

Solís-Soto y cols. (2006), llevaron a cabo estudios de laboratorio para evaluar la toxicidad de blastosporas de la cepa BbPM de *B. bassiana* contra larvas de la palomilla del manzano *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) de cinco días de desarrollo; emplearon concentraciones que fluctuaron entre  $1.2 \times 10^9$  a  $3.8 \times 10^5$  blastosporas/ml para calcular la  $CL_{50}$ . La mortalidad de las larvas expuestas al hongo fue determinada a las 24, 48 y 72 horas y el porcentaje de larvas micosadas a los ocho días. La  $CL_{50}$  hallada fue de  $8.82 \times 10^6$  blastosporas/ml. Se halló el mayor porcentaje de mortalidad de larvas expuestas a las 72 horas, siendo de 96%, y un 82% de larvas micosadas a los ocho días de exposición de los insectos al hongo.

Kamala y cols. (2008), realizaron un experimento con el propósito de evaluar el efecto aduictida de *M. anisopliae* sobre el vector de la malaria *An. stephensi*. Para ello, expusieron mosquitos adultos machos y hembras de *An. stephensi* a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidias/ml de formulaciones preparadas tanto en aceite como en agua. Los resultados revelaron un 96% de mortalidad en adultos con las formulaciones en aceite, y un 94% de mortalidad en adultos con las formulaciones en agua al término del octavo día del ensayo. También encontraron que la tasa de emergencia de adultos disminuía a medida que aumentaban la concentración hasta  $1 \times 10^8$  conidias/ml. Por lo tanto se concluyó que las esporas del hongo o las células desarrolladas en la cutícula del insecto, así como el posterior desarrollo del hongo en patas y alas, suprimen su sistema de defensa celular, causando la muerte debido a inmovilización total.

En el 2008, Rodríguez-Meneses realizó un estudio de laboratorio en el que demostró la capacidad entomopatógena de tres cepas de hongos: *B. bassiana* (cepa 48 para chinche café), *M. anisopliae* (cepa 33 de gallina ciega) y *Gliocladium sp.* (cepa nativa del sureste de Chiapas) sobre larvas de *An. albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). Las larvas sometidas a la acción del hongo *M. anisopliae* mostraron un 100% de mortalidad a las 24 y 48 horas de exposición a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/ml y  $1 \times 10^6$  conidias/ml, respectivamente. Las larvas expuestas a *Gliocladium sp.*, mostraron un 100% de mortalidad a las 96 horas a una concentración de  $4.6 \times 10^7$  conidias/ml, mientras que *B. bassiana* causó una

mortalidad de 93.33% a la concentración de  $5.5 \times 10^7$  conidias/ml a las 96 horas de exposición. Este estudio demostró que los hongos *M. anisopliae* y *Gliocladium sp.*, pueden ser considerados como candidatos para el control del vector de paludismo.

Otro estudio del 2008 fue el realizado por Cirerol-Cruz, cuyo objetivo fue evaluar la patogenicidad en condiciones de laboratorio de los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces sp.* y *Gliocladium sp.* sobre ninfas y adultos de *Triatoma dimidiata* vector de la enfermedad de Chagas. Los triatominos fueron inoculados tópicamente con soluciones de conidias de las cuatro cepas de hongos a la concentración de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidias/ml. Se registraron mortalidades de 69.4% en ninfas y 100% en adultos con *B. bassiana*.

*Gliocladium sp.* causó una mortalidad de 24.9% en ninfas y 100% en adultos. *Metarhizium anisopliae* causó mortalidades de 13.85% en ninfas y de 33.3% en adultos, mientras que *Paecilomyces sp.* provocó una mortalidad de 9.7% en ninfas y de 100% en adultos. Los resultados indican que *B. bassiana* y *Gliocladium sp.* causaron los más altos índices de mortalidad tanto en ninfas como en adultos, por lo que se pueden considerar como buenos candidatos para el control biológico de triatominos vectores de la enfermedad de Chagas.

### III. JUSTIFICACIÓN

Se ha establecido que una importante incidencia de la oncocercosis en América Latina se encuentra precisamente en nuestro país. La oncocercosis se ubica en zonas bien delimitadas de los estados de Chiapas y Oaxaca lo cual hace pensar que este problema de salud pública aún no ha sido del todo controlado. A pesar de la administración de ivermectina, que fue introducida a México desde 1990 aún persisten los factores que favorecen la presencia de la infección. Es por lo tanto necesario que se continúen haciendo trabajos de investigación con el propósito de establecer las medidas que permitan un mejor control de las poblaciones de los simúlidos vectores de la enfermedad, más aún cuando en nuestro

país es prácticamente nulo el interés por la implementación de un control de los vectores.

El control de los simúlidos mediante el uso de larvicidas, ha mostrado ser una buena medida adicional para controlar la enfermedad en otros países, tal como ha sido demostrado mediante el uso del temefos en Guatemala. Sin embargo, ejemplos como los de África, donde el uso continuo de un solo insecticida (temefos) ocasionó un alto nivel de resistencia repercutiendo en fallas en el control de la enfermedad y que fue remediado mediante la implementación de un programa de manejo de resistencia incorporando bioinsecticidas, son una indicación de que se deben continuar los esfuerzos en la búsqueda de agentes de control biológico.

La comparación de entomopatógenos con los plaguicidas químicos convencionales se establece usualmente a partir de la perspectiva de su eficacia y costo. Sus ventajas son numerosas ya que su empleo se traduce en beneficios medioambientales que incluyen seguridad para los humanos y el ecosistema, la reducción de los residuos de plaguicidas en los alimentos, y la preservación de la biodiversidad. Además, su aplicación se lleva a cabo con el uso de equipos convencionales, pueden ser producidos en medios artificiales y almacenados por largos periodos de tiempo. Los entomopatógenos son específicos para ciertas especies, o grupos de insectos plaga, además de que pueden ser utilizados como control a largo plazo. Las estrategias para el uso de los organismos entomopatógenos para el control de insectos son básicamente las mismas que para otros agentes de control biológico.

Los métodos de control biológico especialmente los hongos entomopatógenos, han sido exitosamente utilizados para combatir plagas de insectos que afectan a los cultivos, y recientemente algunos trabajos demuestran que los hongos entomopatógenos pueden tener potencial para controlar mosquitos vectores de paludismo; sin embargo aún no se ha podido establecer totalmente la efectividad de los hongos entomopatógenos como herramienta para el control de otros insectos vectores de enfermedades. Teniendo en cuenta lo anterior, el uso de los hongos entomopatógenos como medio de control biológico de simúlidos vectores de la oncocercosis podría ser factible, por lo que el presente estudio

propone evaluar, mediante bioensayos en laboratorio, el potencial de los hongos como patógenos de *S. ochraceum*.

#### IV. OBJETIVOS

##### *Objetivo general*

Evaluar la patogenicidad de diferentes cepas de hongos sobre los simúlidos vectores de la oncocercosis.

##### *Objetivos específicos*

- a) Determinar el potencial de patogenicidad de los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Gliocladium virens* sobre *S. ochraceum*, mediante bioensayos en laboratorio.
- b) Establecer la concentración letal cincuenta y noventa (LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub>) del aislamiento más virulento, sobre larvas de *S. ochraceum*.

## V. HIPÓTESIS

Las enfermedades fúngicas en insectos son muy comunes y están ampliamente distribuidas, y pueden diezmar las poblaciones produciendo una epizootia natural. Virtualmente todas las órdenes de insectos son susceptibles a la infección por hongos, incluyendo a los dípteros, los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *G. virens*, tienen efecto entomopatógeno sobre la etapa larvaria de *S. ochraceum*, vector de la oncocercosis en Chiapas.

## VI. METODOLOGÍA

### Colecta de material biológico

Las colectas de larvas de *Simulium ochraceum* se llevaron a cabo en dos localidades del Municipio de Tapachula, Chiapas (Finca Chapultepec y El Chaparrón) y tres localidades del Municipio de Cacahoatán, Chiapas (Faja de Oro, Fracción La Unidad y Cacahoatán). Se realizaron capturas diurnas (09:00 a 13:00 h) en ríos de agua clara de fuerte corriente, en donde se revisaron hojas de plantas acuáticas y rocas que contenían adheridas las larvas de simúlidos; se midieron los parámetros de temperatura ambiental, temperatura y pH del agua.

Para su traslado a laboratorio, las larvas se colocaron en una hielera de unicel rectangular de 40 x 25 x 30 cm, y 2 cm de grosor, con una bomba de aire portátil para proveer oxigenación al agua. Una vez en el laboratorio de Patógenos y Vectores del CRISP, localizado en la ciudad de Tapachula, Chiapas; las larvas se mantuvieron hasta la implementación del bioensayo, a una temperatura de 27°C y con oxigenación aportada por 2 bombas de aire marca Sunny SAP-2000.

Sistema artificial para la aplicación de bioensayos con larvas de simúlidos a nivel de laboratorio.

Existen dos tipos de categorías de sistemas artificiales disponibles para llevar a cabo bioensayos de laboratorio con larvas de simúlidos. En los sistemas cerrados, la circulación de aire se logra mediante burbujas (Lacey y Mulla 1977), mediante barras magnéticas giratorias (Colbo y Thompson 1978), o mediante el uso de bombas (Brenner y Cupp 1980). En los sistemas abiertos las larvas son mantenidas gracias a un canal de agua circulante la cual es reciclada mediante una bomba (Jamnback y Frempong-Boadu 1966).

En este trabajo, se optó por realizar los bioensayos con larvas en el laboratorio basados en los sistemas cerrados. Sin embargo, el diseño de la metodología fue necesario ajustarlo sobre ensayo y error, dado que no existe en la literatura reportes sobre las condiciones óptimas de las variables involucradas en los bioensayos con agentes de control biológico en simúlidos. De tal forma que para poder conocer los rangos de las diferentes variables implicadas en la supervivencia de las larvas a nivel de laboratorio, se procedió a realizar varios bioensayos en los que se valoró la concentración de Tween 80, la oxigenación del agua (aportada por bombas de pecera), dos tipos de agua y dos tipos de alimento.

Los experimentos se realizaron con grupos de 25 larvas de *S. ochraceum* de segundo a tercer estadio en vasos desechables de plástico con capacidad de 375 ml. Se evaluaron: 1) siete concentraciones de Tween 80; 2) tres niveles de presión de aire: 65.37 ml/min, 359.6 ml/min, 728.3 ml/min, aportadas por bombas Sunny SAP-3000; 3) dos tipos de alimento (para peces y para conejos); 4) agua de criadero y agua destilada. Los experimentos se realizaron por triplicado y se registró la mortalidad cada 24h. Todos los bioensayos fueron independientes uno del otro y realizados no en el orden arriba mencionado, con excepción de la concentración óptima de Tween la cual sí fue necesario establecerla en una primera instancia. Es probable que exista interacción entre los diferentes parámetros y que un diseño experimental en bloques completamente aleatorizados podría proporcionar resultados diferentes en cuanto a las condiciones óptimas. Sin embargo, dado que este no era el objetivo principal de este trabajo, se optó por el ensayo y error, parámetro por parámetro, y de forma independiente.

#### Concentración óptima de Tween

En el primer bioensayo se probaron siete concentraciones de Tween 80 (0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.00001%, 0.000001% y 0.0000001%), buscando la concentración que produjera menos mortalidad de larvas de *S. ochraceum*. Se



agregaron 100 ml de cada concentración de Tween 80, y se proveyó de aire (a un flujo variable no determinado) a cada vaso mediante el uso de bombas de pecera, se empleó alimento para larvas de *Anopheles albimanus* a un régimen de una ración cada 8 horas, además se monitoreó el porcentaje de mortalidad cada 24 horas.



Figura 1. Larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a siete concentraciones de Tween 80.

En cada una de las concentraciones de Tween 80 se registraron y tabularon los porcentajes de mortalidad cada 24 horas.

#### Presión de aire óptima

En este bioensayo se probaron tres niveles de presión de aire, buscando aquella que favoreciera mejor la supervivencia de las larvas, para lo cual se colocaron 100 ml de una solución de Tween 80 al 0.000001% a cada vaso, la presión se controló mediante válvulas colocadas en cada suministro de aire; ajustando el nivel de presión con un flujómetro (Gilmont Instruments S/N 014543-014556). En este bioensayo aún no se consideraba que la alimentación fuera un parámetro que pudiera afectar la sobrevivencia de las larvas por lo que se continuó usando el alimento de larvas de *An. albimanus*.



Presión 1 65.37 ml/min

Presión 2 359.6 ml/min

Presión 3 728.3 ml/min

Figura 2. Larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a tres diferentes presiones de aire.

El conteo de mortalidad de larvas se realizó cada 24 horas, con lo cual se tabularon los resultados obtenidos y posteriormente se graficaron.

#### Tipo de agua óptima

Este bioensayo se realizó para saber si el agua de criadero natural favorecía más la supervivencia de las larvas en condiciones de laboratorio, en comparación con el agua destilada, la cual se había utilizado en los otros bioensayos. Se colocaron vasos con 1) 100 ml de agua de criadero natural, 2) 100 ml de agua destilada, y 3) un control con 100 ml de solución Tween 80. Se manejaron tres repeticiones de cada uno. Se administró aire mediante bombas de pecera a flujo variable (Fig. 3). La mortalidad se monitoreó cada 24 horas y se registraron los resultados.



Figura 3. Larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a dos tipos de agua.

#### Tipo de alimento óptimo

En este bioensayo se valoraron dos tipos de alimento con el propósito de verificar si alguno de ellos mostraba más eficacia en la supervivencia de las larvas en condiciones de laboratorio. Los alimentos probados fueron: 1) alimento para peces, 2) alimento para conejos y 3) el control con alimento para larvas de *An. albimanus*. Este sistema fue modificado con respecto a los tres anteriores agregándole movimiento giratorio a los vasos para facilitar la alimentación de las larvas; esto se logró mediante el uso del agitador eléctrico (Orbital Shaker MRC) la

velocidad aplicada fue de 120 rpm, que fue la máxima velocidad soportada por el sistema (Fig. 4).



Figura 4. Larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a dos tipos de alimento.

El porcentaje de la mortalidad de las larvas fue registrada cada 24 horas y los resultados fueron tabulados.

Las condiciones en las cuales se registraron las menores mortalidades en cada uno de los bioensayos individuales, fueron las que se establecieron en los bioensayos con las diferentes cepas de hongos, tal como se describe más adelante.

#### Cepas de hongos

Se utilizaron tres cepas de hongos reportadas con características entomopatógenas que son: *M. anisopliae* (cepa 33 de gallina ciega), *B. bassiana* (cepa 48 para chinche café), donadas por el CINVESTAV, unidad Irapuato, y *G. virens*, elegida de una colección de cepas nativas colectadas en la región sureste del estado de Chiapas (Vázquez-Martínez et al. 2007).

#### Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de los hongos fue el medio Sabouraud Dextrosa Agar de Bioxon® (Becton Dickinson) y fue preparado de

acuerdo a las instrucciones del fabricante, a una concentración de 65 gr/L. El medio se pesó en una balanza analítica (Velab Model ES-500H), posteriormente se colocó en un matraz erlenmeyer agregando un litro de agua Tridestilada. Se colocó en un agitador magnético de calor (SYBRON/Thermolyne), hasta disolución completa y esperando hasta ebullición por 2 minutos, después se esterilizó por 15 minutos a 121°C a 1 atm de presión, en una autoclave (All American modelo 25-X). Posteriormente se dejó enfriar por 30 minutos, y se le agregó el antibiótico Sulfestrep® (Estreptomina, 1 gr.) en la proporción de 1 ml por litro de medio. Se vertió en placas estériles desechables de plástico, se dejó enfriar y se sellaron las placas con parafilm, posteriormente se guardaron en refrigeración a 8°C hasta el momento de su uso.

#### Condiciones de cultivo

Las cepas para los bioensayos fueron tomadas de su respectivo stock y sembradas en medio Sabouraud Dextrosa Agar de Bioxon® (Becton Dickinson). Se incubaron a 27°C en una incubadora (Fisher modelo 307), hasta esporulación completa en aproximadamente 15 a 21 días de incubación.

#### Solución de conidias

##### a) Solución de Tween 80

Se preparó una solución stock de Tween 80 al 1% en agua tridestilada, para lo cual se tomaron 1000 µl de Tween 80 usando una pipeta automática (Finnpipette® Digital Pipettors, GSA), y se colocaron en un matraz erlenmeyer de 100 ml, se agregaron 99 ml de agua tridestilada y por agitación manual y ayuda de un calentador eléctrico se disolvió a 50°C por unos minutos, hasta completa disolución.

De esta solución stock se tomó 1000 µl y se mezcló con 99 ml de agua tridestilada para obtener una solución de Tween 80 al 0.1%, y así sucesivamente hasta llegar a la concentración deseada de Tween 80 al 0.000001%.

## b) Preparación de la solución stock de conidias

Para preparar la solución stock de conidias se utilizó la campana de flujo laminar (SEV Modelo CFL101), se tomaron nueve placas del hongo completamente esporulado y se procedió a colectar las conidias con una hoja de bisturí para después pasar las conidias a un matraz erlenmeyer estéril de 500 ml, el cual contenía 100 ml de la solución de Tween 80 al 0.00001%. La solución se agitó fuertemente a mano por 5 minutos y posteriormente en un sonicador de baño de agua (Branson Ultrasonic Cleanser Modelo B-12) durante 15 minutos, para lograr la separación de las conidias. Posteriormente se filtró por decantación utilizando un cuadro de tul de 15x15cm, con retícula de 1 mm de apertura, la cual se sujetó a la boca del matraz mediante una liga de hule, y se recogió el filtrado en un vaso de plástico. Este procedimiento se realizó por duplicado para obtener una buena cantidad de volumen, estos dos filtrados se mezclaron finalmente para obtener una sola cantidad. Se procedió a diluir 1:100 con agua tridestilada estéril para obtener la solución en Tween 80 al 0.000001%. A partir de esta solución stock se prepararon las soluciones de conidias empleadas en los bioensayos.

Una vez obtenidas las soluciones para los bioensayos, se rotularon y se confinaron en frascos de vidrio estériles de boca ancha con tapa de rosca y se guardaron en refrigeración a 8°C, hasta el momento de su uso.

Las soluciones se sacaron del refrigerador y se dejaron atemperar por un lapso de media hora antes de utilizarlas en los bioensayos.

## Conteo de conidias

Para el conteo de conidias se procedió con el método descrito en el Manual de Técnicas de Patología de Insectos (Goettel e Inglis 1997), en el que se describen los criterios empleados para realizar la lectura de conidias en la cámara de Neubauer y obtener la concentración de la solución en conidias/ml. Se realizaron

cinco repeticiones del conteo de conidias, se promedió y finalmente se calculó la concentración de conidias/ml. A partir de esta solución stock se prepararon las soluciones de conidias empleadas en los bioensayos.

#### Solución de conidias de *Metarhizium anisopliae*

Se realizó una dilución 1:100 de la solución stock. De esta dilución se hicieron cinco conteos en la cámara de Neübauer a cada una de cinco muestras de la solución de conidias y se promediaron para obtener el valor utilizado en el cálculo final. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Determinación de la concentración de conidias en la solución de *Metarhizium anisopliae*.

Muestra	Conteo 1	Conteo 2	Conteo 3	Conteo 4	Conteo 5	Promedio	Promedio General
1	25	34	38	30	37	32.8	34.92
2	21	33	36	33	22	29	
3	30	26	32	36	34	31.6	
4	49	43	39	41	37	41.8	
5	33	33	48	36	47	39.4	

El procedimiento fue como sigue:

La concentración de conidias de la solución stock fue:

$$C = P_c \times F_d \times 250,000$$

Pc = Promedio del conteo de conidias

Fd = Factor de dilución

$$\text{Concentración} = 34.92 \times 100 \times 250,000 = 8.73 \times 10^8 \text{ conidias/ml}$$

A partir de esta concentración madre se obtuvieron las demás concentraciones utilizadas en el bioensayo:  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ .

Las concentraciones de conidias utilizadas en los bioensayos se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Conidias/ml} = \text{Cd/Cm} \times \text{Vd}$$

En donde:

Cd=Concentración deseada

Cm = Concentración madre

Vd = Volumen deseado

a) Solución de conidias a  $1 \times 10^8$  conidias/ml

$$(1 \times 10^8) / (8.73 \times 10^8) = 0.1145$$

$$0.1145 \times 300\text{ml} = 34.35 \text{ ml}$$

34.35 ml de la solución madre se llevó a un volumen final de 300 ml agregando 266.65 ml de agua tridestilada, obteniéndose 300 ml de una solución  $1 \times 10^8$  conidias/ml.

b) Solución de conidias a  $1 \times 10^7$  conidias/ml

$$(1 \times 10^7) / (1 \times 10^8) = 0.1 \times 300 \text{ ml} = 30 \text{ ml.}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^8$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua tridestilada con lo que se obtuvieron 300 ml de una solución  $1 \times 10^7$  conidias/ml.

c) Solución de conidias a  $1 \times 10^6$  conidias/ml

$$(1 \times 10^6) / (1 \times 10^7) = 0.1 \times 300 \text{ ml} = 30 \text{ ml.}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^7$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua tridestilada con lo que se obtuvieron 300 ml de una solución a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidias/ml.

d) Solución de conidias a  $1 \times 10^5$  conidias/ml

$$(1 \times 10^5) / (1 \times 10^6) = 0.1 \times 300 \text{ ml} = 30 \text{ ml.}$$

Se le agregaron 270 ml de agua tridestilada y se obtuvieron 300 ml de una solución a la concentración de  $1 \times 10^5$  conidias/ml.

e) Solución de conidias a  $1 \times 10^4$  conidias/ml

$$(1 \times 10^4) / (1 \times 10^5) = 0.1 \times 300 \text{ ml} = 30 \text{ ml.}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^5$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua tridestilada, con lo cual se obtuvieron 300 ml de una solución a una concentración de  $1 \times 10^4$  conidias/ml.

Solución de conidias de *Beauveria bassiana*

Se realizó una dilución 1:100 de la solución stock y se hicieron 5 conteos al igual que con *M. anisopliae*, obteniéndose los datos como se muestran en la Tabla 2.



Tabla 2. Determinación de la concentración de conidias en la solución de *Beauveria bassiana*.

Muestras	Conteo	Conteo	Conteo	Conteo	Conteo	Promedio	Promedio General
1	36	34	50	37	48	41	39.08
2	38	37	33	53	41	40.4	
3	47	38	41	28	26	36	
4	40	46	36	44	32	39.6	
5	29	51	32	32	48	38.4	

$$\text{Concentración} = 39.08 \times 100 \times 250,000 = 9.77 \times 10^8 \text{ conidias/ml.}$$

A partir de esta concentración madre se obtuvieron las concentraciones que se utilizaron en los bioensayos las cuales fueron las siguientes:

$$5 \times 10^7, 1 \times 10^7, 5 \times 10^6, 1 \times 10^6, 1 \times 10^5$$

a) Solución de conidias a  $5 \times 10^7$  conidias/ml

$$(5 \times 10^7) / (9.77 \times 10^8) = 0.051$$

$$0.051 \times 300 \text{ ml} = 15.3 \text{ ml.}$$

Se tomaron 15.3 ml de la solución madre y se le agregaron 284.7 ml de agua tridestilada con lo cual se obtuvieron 300 ml de una solución de  $5 \times 10^7$  conidias/ml.

Para obtener las siguientes concentraciones se hizo exactamente lo mismo:

b) Solución de conidias a  $1 \times 10^7$  conidias/ml

$$(1 \times 10^7) / (5 \times 10^7) = 0.2 \times 300 \text{ ml} = 60 \text{ ml.}$$

Se tomaron 60 ml de la solución  $5 \times 10^7$  conidias/ml y se le agregaron 240 ml de agua tridestilada con lo cual se obtuvieron 300 ml de una solución a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/ml.

c) Solución de conidias a  $5 \times 10^6$  conidias/ml

$$(5 \times 10^6) / (1 \times 10^7) = 0.5 \times 300 \text{ ml} = 30 \text{ ml.}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^7$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua tridestilada con lo cual se obtuvieron 300 ml de una solución de  $5 \times 10^6$  conidias/ml.

d) Solución de conidias a  $1 \times 10^6$  conidias/ml

$$(1 \times 10^6) / (1 \times 10^7) = 0.1 \times 300 \text{ ml} = 30 \text{ ml.}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^7$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua tridestilada con lo cual se obtuvieron 300 ml de una solución de  $1 \times 10^6$  conidias/ml.

e) Solución de conidias a  $1 \times 10^5$  conidias/ml

$$(1 \times 10^5) / (1 \times 10^6) = 0.1 \times 300 \text{ ml} = 30 \text{ ml.}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^6$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua tridestilada con lo que se obtuvieron 300 ml de una solución  $1 \times 10^5$  conidias/ml.

Solución de conidias de *Gliocladium virens*

Se realizó una dilución 1:100 a partir de la solución stock de conidias y se hicieron 5 conteos para hacer el cálculo de la concentración final. Los conteos fueron los siguientes:

Tabla 3. Determinación de la concentración de conidias en la solución de *Gliocladium virens*.

Muestras	Conteos	Conteos	Conteos	Conteos	Conteos	Promedio	Promedio General
1	36	34	50	37	48	41	39.4
2	38	37	33	53	41	40.4	
3	47	38	41	28	26	36	
4	40	46	36	44	32	39.6	
5	41	43	43	39	34	40	

$$\text{Concentración} = 39.4 \times 100 \times 250,000 = 9.85 \times 10^8 \text{ conidias/ml}$$

A partir de esta concentración madre se obtuvieron las concentraciones que se utilizaron en los bioensayos, las cuales fueron las siguientes:  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$

a) Solución de conidias a  $1 \times 10^8$  conidias/ml

$$(1 \times 10^8) / (9.85 \times 10^8) = 0.1015$$

$$0.1015 \times 300 = 30.45 \text{ ml}$$

Se tomaron 30.45 ml de la solución madre y se le agregaron 269.55 ml agua tridestilada con lo cual se obtuvieron 300 ml de una solución de  $1 \times 10^8$  conidias/ml.

b) Solución de conidias a  $1 \times 10^7$  conidias/ml

$$(1 \times 10^7) / (1 \times 10^8) = 0.1 \times 300 \text{ ml} = 30 \text{ ml}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^8$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua Tridestilada con lo cual se obtuvieron 300 ml de una solución de  $1 \times 10^7$  conidias/ml.

c) Solución de conidias a  $1 \times 10^6$  conidias/ml

$$(1 \times 10^6) / (1 \times 10^7) = 0.1 \times 300 \text{ ml} = 30 \text{ ml}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^7$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua Tridestilada con lo cual se obtuvieron 300 ml de una solución de  $1 \times 10^6$  conidias/ml.

d) Solución de conidias a  $1 \times 10^5$  conidias/ml

$$(1 \times 10^5) / (1 \times 10^6) = 0.1 \times 300 = 30 \text{ ml}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^6$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua tridestilada con lo cual se obtuvieron 300 ml de una solución de  $1 \times 10^5$  conidias/ml.

e) Solución de conidias a  $1 \times 10^4$  conidias/ml

$$(1 \times 10^4) / (1 \times 10^5) = 0.1 \times 300 = 30 \text{ ml}$$

Se tomaron 30 ml de la solución  $1 \times 10^5$  conidias/ml y se le agregaron 270 ml de agua tridestilada con lo que se obtuvieron 300 ml de una solución de  $1 \times 10^4$  conidias/ml.

Bioensayos de entomopatogenicidad de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *G. virens* sobre la etapa larvaria de *S. ochraceum*

Los bioensayos se realizaron con grupos de 25 larvas de *S. ochraceum* de 2º a 3er estadio por cada concentración de conidias. Se manejaron 4 repeticiones, tanto para las concentraciones como para el control.

Las concentraciones de conidias empleadas para los bioensayos con *M. anisopliae* y *G. virens* fueron  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ , y  $1 \times 10^4$ , mientras que para *B. bassiana* fueron  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ .

Se colocaron 200 ml de cada una de las concentraciones de conidias en vasos desechables de plástico No. 14, con capacidad de 375 ml; posteriormente se colocaron las larvas mediante un gotero de plástico. El grupo control se colocó de la misma manera que los grupos de prueba utilizando únicamente 200 ml de Tween 80 al 0.000001% sin conidias.

Los vasos se colocaron en el Orbital Shaker MRC a 120 r.p.m. para facilitar la alimentación de las larvas.

Se suministró oxígeno a razón de 359.6 ml/min por cada repetición mediante el uso de bombas para pecera marca Sunny SAP-3000.

Las larvas fueron alimentadas cada 12 h, empleando alimento para peces preparado a base de concentrado de proteína de pescado hidrolizada.

Los bioensayos se realizaron en la Cámara Ambiental (Thermo Electron Corporation 818), la cual proveyó 2 temperaturas: una diurna de 27°C y una nocturna de 23°C. El fotoperiodo aplicado fue de 12 h de luz (7:00 AM – 7:00 PM) y 12 h de oscuridad (7:00 PM- 7:00 AM). Los porcentajes de mortalidad se registraron cada 24 h.

## VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de mortalidad fueron utilizados para calcular la Concentración Letal media y noventa ( $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ ) de las tres cepas de hongos probadas sobre larvas de *S. ochraceum*.

Se empleó el Programa de Análisis Probit utilizado por la EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente) versión 1.5 con el que se calcularon los valores de CL (50 y 90), Chi cuadrada de bondad de ajuste y la línea de regresión Probit.

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sistema para la aplicación de bioensayos con larvas de *S. ochraceum*

Los sitios de crianza de las larvas de simúlidos presentaron una temperatura del agua que osciló entre 20 y 22°C, temperatura ambiental que fluctuó entre 24 y 28°C, y el pH del agua osciló entre 6.9 – 7.1. Para los bioensayos de laboratorio se ajustaron las condiciones de temperatura y el fotoperiodo a las reportadas en los criaderos naturales, por lo que la Cámara Ambiental, en donde se realizaron los bioensayos, fue ajustada a dos temperaturas: una diurna de 27°C y una nocturna de 23°C. El fotoperiodo aplicado fue de 12 h de luz (7:00 AM – 7:00 PM) y 12 h de oscuridad (7:00 PM- 7:00 AM).

La concentración de 0.000001% de Tween permitió la sobrevivencia de un mayor número de larvas de simúlidos, ya que a esta concentración se obtuvo la menor mortalidad (36.5%) a las 48 horas, en relación a las otras concentraciones (Tabla 4).

Tabla 4. Mortalidad de larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a varias concentraciones de Tween 80.

Concentración de Tween 80	Porcentaje de mortalidad diaria		
	24 h	48 h	72 h
0.1%	14	72	100
0.01%	10	65	100
0.001%	8	56	100
0.0001%	8	41.3	98.6
0.00001%	8	56	100
0.000001%	1.33	36.5	100
0.0000001%	18.6	48	97.3

En otro bioensayo se probaron tres presiones de las bombas que aportaron el aire a los recipientes con larvas, el resultado fue que las larvas pudieron sobrevivir por más tiempo empleando la presión de 359.6 ml/min.

Tabla 5. Mortalidad diaria de larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a tres diferentes presiones de aire.

Presiones de aire	Porcentaje de mortalidad diaria	
	24 h	48 h
65.37 ml/min	50	100
359.6 ml/min	10	100
728.3 ml/min	90	100

En el bioensayo para probar el tipo de agua, se encontró que a las 48 horas se presentó un 85.3% de mortalidad en las larvas del agua destilada, mientras que el agua de criadero natural presentó un 84% de mortalidad larvaria. A las 72 horas el agua destilada presentó un 98.6% de mortalidad larvaria, mientras que el agua de

criadero un 94.6% (Tabla 6). Por lo tanto se observó que no existe realmente una diferencia marcada entre los dos tipos de agua, ya que los porcentajes de mortalidad son muy similares, posiblemente debido a que el pH del agua destilada empleada fue calibrado con hidróxido de sodio al 0.01% hasta alcanzar el pH del agua de criadero que fue de  $7.1 \pm 0.1$ , ya que originalmente el agua destilada tenía un pH muy ácido cercano a 5.0 por lo tanto el agua empleada para el bioensayo fue el agua destilada con pH calibrado. Para bioensayos posteriores se recomienda usar agua destilada con un pH calibrado a 7.1 que es el pH de los criaderos naturales de simúlidos.

Tabla 6. Mortalidad diaria de larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a dos tipos de agua.

Tipo de agua	Porcentaje de mortalidad diaria			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Agua destilada	0	85.3	98.6	100
Agua de criadero	6.66	84	94.6	97.3
Control Tween 80 al 0.000001%	0	73.3	90.6	93.3

En el bioensayo para evaluar tipos de alimento se encontró que el porcentaje de mortalidad de larvas empleando el alimento para peces fue menor (20% de mortalidad a las 120 hs) que los mostrados con el alimento para conejo y alimento control (46.67% y 25% de mortalidad, respectivamente) (Tabla 7), lo que sugiere que el alimento para peces logra una mayor supervivencia de larvas de *S. ochraceum* a nivel de laboratorio.



Tabla 7. Mortalidad diaria de larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a dos tipos de alimento.

Tipos de alimento	Porcentaje de mortalidad diaria				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Alimento para peces	1.67	3.33	10	11.67	20
Alimento para conejos	0	11.67	18.33	23.33	46.67
Control (alimento para <i>An. albimanus</i> )	0	5	13.33	16.67	25

Los resultados de estos bioensayos, aunque realizados de manera independiente, permiten sugerir un sistema que puede favorecer la supervivencia de las larvas en laboratorio. Las condiciones de este sistema consisten de una presión de aire de 359.6 ml/min, una concentración de Tween 80 al 0.000001%, utilizando alimento para peces y utilizando un agitador eléctrico (Orbital Shaker MRC) a 120 r.p.m. para facilitar la alimentación de las larvas. Se eligió usar agua destilada estéril con el pH ajustado a  $7.1 \pm 0.1$ , en lugar de traer agua de los criaderos, puesto que esto último puede resultar impráctico. Este sistema puede ser empleado en cualquier tipo de evaluación que involucre a larvas de simúlidos.

Los sistemas utilizados para los bioensayos con simúlidos son de dos tipos, los sistemas abiertos y los sistemas cerrados; algunos investigadores han perfeccionado dispositivos que comparten características de los dos sistemas (Gaugler et al. 1980).

El presente trabajo está basado en bioensayos que utilizan los sistemas cerrados, que son de fácil mantenimiento y que requieren de poco espacio (Araújo-Coutinho et al. 2005). Esto resultó idóneo para el presente trabajo ya que permitió el diseño de un sistema para la aplicación de bioensayos con larvas de simúlidos.

Como resultado de los bioensayos realizados bajo este sistema, se logró monitorear la mortalidad de las larvas por espacio de seis días, permitiendo así obtener los porcentajes de mortalidad con respecto al tiempo.

En el 2005, Araújo-Coutinho y colaboradores en Brasil, diseñaron un bioensayo basado en sistemas cerrados en el que lograron monitorear la mortalidad larvaria de simúlidos producida por la exposición a larvicidas por un espacio de tiempo determinado. Utilizaron en su sistema vasos de plástico desechables a los que les suministraron oxigenación mediante el uso de bombas para pecera, utilizando para lo cual agua del criadero natural de donde provenían las larvas. En el presente trabajo el sistema diseñado es similar aunque con ciertas variantes, como es el hecho de haber utilizado tanto agua destilada como agua del criadero natural de las larvas para establecer si esta variable tenía algún efecto en la mortalidad. Al igual que Araújo-Coutinho y colaboradores, se utilizaron bombas de pecera para proveer la oxigenación, sin embargo, en el presente trabajo se estableció el nivel de presión adecuado para lograr la mayor supervivencia larvaria. También, se estableció la concentración de Tween 80 que permitió la mayor supervivencia. Otra de las variables que se manejaron fue encontrar el tipo de alimento que propiciara la mayor supervivencia larvaria, para lo cual se probaron dos tipos de alimento es decir alimento para conejos y alimento para peces. En virtud de que el alimento para las larvas de simúlidos tiene que ser filtrado por estas para ser aprovechado, fue necesario aplicar agitación rotatoria al sistema para facilitar la disponibilidad de alimento. Se observó que sin la agitación, las larvas dejaban de aprovechar el alimento por que se sedimentaba, y a una agitación mayor de 120 r.p.m. el medio líquido se salía del vaso de plástico, por lo cual el sistema no permitió la aplicación de una mayor fuerza giratoria. Para los objetivos del presente trabajo este sistema resultó idóneo, eficiente y reproducible, por lo cual se puede recomendar su implementación en cualquier sistema que involucre larvas de simúlidos. Sin embargo, las interacciones que pueden resultar entre los diferentes parámetros no han sido evaluadas ni en este ni en otros trabajos con estos tipos de sistemas. Un diseño experimental que contemple la evaluación de todas las posibles interacciones podría mejorar el sistema empleado en este estudio.

## Mortalidad de larvas de *S. ochraceum* expuestas a *M. anisopliae*

El bioensayo usando *M. anisopliae* causó un 100% de mortalidad de larvas de simúlidos a la concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml en las primeras 24 horas y de 97% a la concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/ml. A las 48 horas la mortalidad alcanzada fue de 100% a la concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/ml, a las 96 horas la mortalidad obtenida fue de 92% a la concentración de  $1 \times 10^6$  conidias/ml y de 71% a la de  $1 \times 10^5$  conidias/ml (Tabla 8).

Tabla 8. Mortalidad diaria de larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a cinco concentraciones de *Metarhizium anisopliae*.

Concentración (conidias/ml)	Porcentaje de mortalidad diaria			
	24 h	48 h	72 h	96 h
$1 \times 10^8$	100	---	---	---
$1 \times 10^7$	97	100	---	---
$1 \times 10^6$	23	51	72	92
$1 \times 10^5$	14	37	41	71
$1 \times 10^4$	14	27	33	51
Control	3	10	13	17

Este resultado es muy similar al obtenido por Rodríguez-Meneses quien reportó que este hongo causó un 100% de mortalidad sobre larvas de *An. albimanus* de 2<sup>o</sup> estadio a las 24 horas a una concentración de  $2.58 \times 10^7$  conidias/ml (Rodríguez-Meneses 2008).

La tendencia observada en los porcentajes de mortalidad indica que esta es dependiente de la concentración del hongo (relación dosis-respuesta), es decir a

medida que aumenta la concentración mayor es el porcentaje de mortalidad producido por *M. anisopliae*.

Por otro lado, las dos concentraciones más altas ( $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^7$  conidias/ml) produjeron datos de mortalidad muy similares (100 y 97% a las 24 h respectivamente), indicando que ambas concentraciones son suficientes para controlar las larvas de *S. ochraceum* en condiciones de laboratorio (Figura 5).

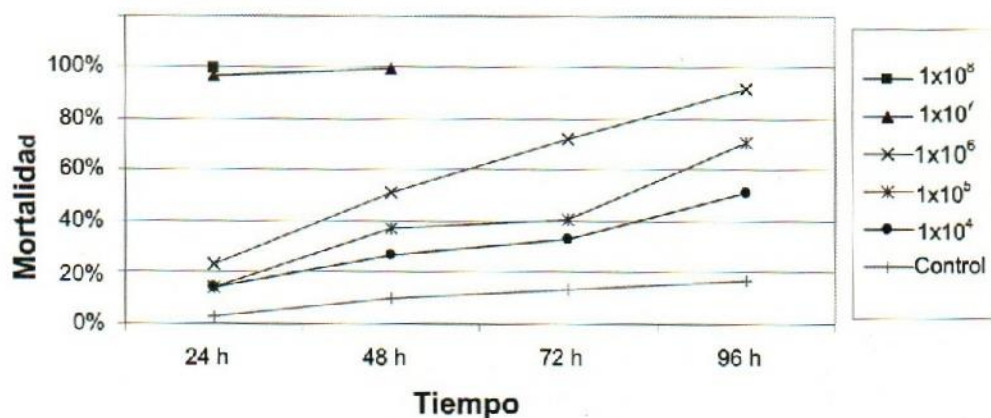


Figura 5. Mortalidad diaria de larvas de *S. ochraceum* expuestas a *M. anisopliae* con respecto al control.

Kamala y colaboradores (2008) reportaron un 96% de mortalidad de larvas de *An. stephensi* hacia el 8<sup>o</sup> día de exposición a *M. anisopliae* a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidias/ml. Al comparar los resultados de Kamala y colaboradores con los resultados obtenidos en el presente trabajo se encontraron diferencias entre ambos ya que Kamala reportó el 96% de mortalidad larvaria hasta el 8<sup>o</sup> día de exposición, mientras que en el presente trabajo se alcanzó el 100% de mortalidad en el cuarto día de exposición al hongo, lo cual podría deberse a que la concentración usada en el presente trabajo fue mayor ( $1 \times 10^8$  conidias/ml) que la empleada por Kamala y cols. Sin embargo, en ambos trabajos, se demostró que *M. anisopliae* causó altos porcentajes de mortalidad sobre la fase larvaria de estos dípteros, a pesar de las

Los datos obtenidos mediante el análisis probit se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Análisis probit de la mortalidad larvaria de *Simulium ochraceum* causada por *Metarhizium anisopliae* a las 24 h.

Concentración (Conidias/ml)	Individuos expuestos	Individuos muertos	Respuesta observada	Respuesta ajustada controles	Respuesta esperada
Control	100	3	0.03	0.000	0.1033
1x10 <sup>4</sup>	100	14	0.14	0.0409	0.000
1x10 <sup>5</sup>	100	14	0.14	0.0409	0.000
1x10 <sup>6</sup>	100	23	0.23	0.1413	0.1414
1x10 <sup>7</sup>	100	97	0.97	0.9665	0.9665
1x10 <sup>8</sup>	100	100	1.0	1.0	1.0

La Chi cuadrada para heterogeneidad (calculada) = 2.904

La Chi cuadrada para heterogeneidad (tabulada con un grado de significancia de 0.05) = 7.815

El valor de Chi cuadrada del análisis probit fue 2.904 ( $P > 0.05$ ). Esto demuestra que no existe diferencia significativa entre las mortalidades de larvas de *S. ochraceum* observadas y esperadas indicando que el modelo se ajusta a los datos de mortalidad obtenidos por las conidias del hongo *M. anisopliae* por lo cual la  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$  y los límites de confianza pueden ser estimados con certeza.

Los valores estimados de las CL (50 y 90) y los límites de confianza están dados en la Tabla 10. El valor de  $CL_{50}$  obtenido mediante el análisis Probit fue de  $2.342 \times 10^6$  conidias/ml (límite inferior de  $1.771 \times 10^6$  y superior de  $3.048 \times 10^6$  conidias/ml); la  $CL_{90}$  fue de  $6.465 \times 10^6$  conidias/ml, con un límite inferior de  $4.82 \times 10^6$  y superior de  $9.537 \times 10^6$  conidias/ml. Estos resultados difieren de los obtenidos por Bruck y cols. (2005), quienes en un estudio realizado con el hongo *M. anisopliae* reportaron una  $CL_{50}$  de  $2.7 \times 10^6$  conidias/g de suelo del aislado F52 de *M. anisopliae* sobre larvas de *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae); esto sugiere que la cepa de *M. anisopliae* utilizada en el presente trabajo muestra una mayor

capacidad entomopatógena para larvas de simúlidos en condiciones de laboratorio que la cepa de *M. anisopliae* empleada por Bruck y cols. para controlar larvas de *Delia radicum*.

Tabla 10. Valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  de conidias del hongo *M. anisopliae* sobre larvas de *S. ochraceum*.

CL	Conc.	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
1.00	370782.688	192747.766	574706.563
5.00	636196.438	379386.219	911644.500
10.00	848406.750	541409.375	1172241.125
15.00	1030334.125	686029.563	1393585.375
50.00	2342105.750	1771982.125	3048602.500
85.00	5323961.500	4033166.250	7568274.000
90.00	6465600.500	4820918.500	9537792.000
95.00	8622272.000	6235631.000	13531093.000
99.00	14794270.000	9956364.000	26459590.000

La línea de regresión probit está dada en la Figura 6.

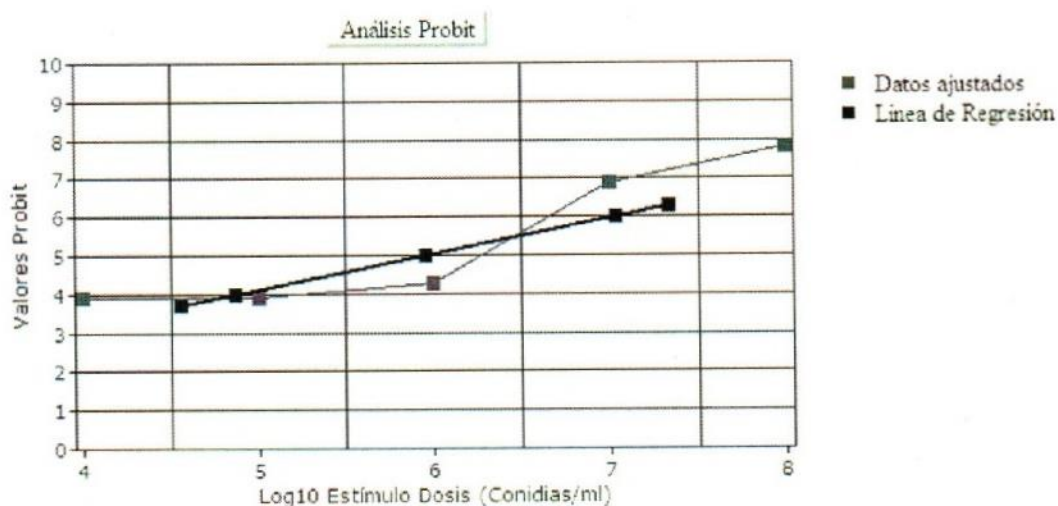


Figura 6. Valores Probit ajustados y la línea de regresión de la mortalidad ocasionada por *M. anisopliae* sobre larvas de *S. ochraceum*.

Los resultados del bioensayo demostraron que *M. anisopliae* presenta un importante efecto entomopatógeno sobre la etapa larvaria de *S. ochraceum*.

#### Mortalidad de larvas de *S. ochraceum* expuestas a *B. bassiana*

El bioensayo se llevó a cabo utilizando cinco concentraciones de *B. bassiana*  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $5 \times 10^7$  conidias/ml. Estas concentraciones se prepararon a partir de la solución madre de *B. bassiana* obtenida en el laboratorio. El bioensayo se realizó bajo las condiciones de laboratorio ya especificadas.

Como resultado se obtuvo que la concentración más baja ( $1 \times 10^5$  conidias/ml) mostró mortalidad larvaria inferior al 50% en los primeros 3 días del bioensayo, y superior al 50% sólo hasta el día 4.

Las concentraciones intermedias ( $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  conidias/ml) alcanzaron el 50% de mortalidad o más a partir del día 2 del bioensayo, mientras que las concentraciones altas ( $1 \times 10^7$  y  $5 \times 10^7$  conidias/ml) superaron el 50% de mortalidad larvaria a partir del primer día de bioensayo lo cual se ve en la siguiente tabla.

Tabla 11. Mortalidad de larvas de *Simulium ochraceum* expuestas a cinco concentraciones de *Beauveria bassiana*.

Concentración (conidias/ml)	24 h	48 h	72 h	96 h
$5 \times 10^7$	80%	99%	100%	---
$1 \times 10^7$	69%	88%	98%	100%
$5 \times 10^6$	48%	66%	81%	96%
$1 \times 10^6$	24%	51%	76%	90%
$1 \times 10^5$	9%	18%	37%	58%
Control	1%	2%	5%	10%

Watson et al. (2002) llevaron a cabo bioensayos con el objeto de valorar la eficacia de dos cepas (L90 y P89) de *B. bassiana* para el control de larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). Como resultado reportaron para la dosis alta ( $1 \times 10^{10}$  conidias/ml) un porcentaje de mortalidad de 56% para la cepa L90 y 48% para la cepa P89. Para las concentraciones media ( $1 \times 10^9$  conidias/ml) y baja ( $1 \times 10^8$  conidias/ml) reportaron porcentajes de mortalidad que fueron dependientes de la dosis. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo demuestran que *B. bassiana* presentó una mayor acción entomopatógena sobre la etapa larvaria de *S. ochraceum* que la obtenida por Watson y cols., sobre larvas de *M. domestica* (Diptera: Muscidae), ya que en nuestro estudio la concentración  $5 \times 10^6$  conidias/ml alcanzó el 48% de mortalidad hacia las 24 h del bioensayo, mientras que Watson y cols., obtuvieron el mismo porcentaje de mortalidad a concentraciones de  $1 \times 10^{10}$  conidias/ml.

En el 2005, Bruck y colaboradores realizaron bioensayos de suelo en laboratorio para estimar la virulencia del aislado GHA de *B. bassiana* contra larvas de segundo instar de *Delia radicum* (Diptera: Muscidae: Anthomyiidae) para lo cual emplearon una concentración considerada alta ( $3.85 \times 10^6$  esporas viables/g de suelo seco) en los que reportaron una mortalidad larvaria de 46% en el 14° día de exposición. En el mismo año (2005), Davidson y Chandler realizaron bioensayos con larvas de *Delia antiqua* (Meigen) reportando a los diez días del bioensayo una mortalidad de 22.8% para el aislado 396.93 de *B. bassiana* a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/ml.

Posteriormente en el 2008, Rodríguez-Meneses llevó a cabo estudios para evaluar la acción entomopatógena de *B. bassiana* sobre larvas de *An. albimanus*, para lo cual realizó bioensayos de laboratorio en el que reportó 33.3% de mortalidad hacia el séptimo día de exposición, a una concentración de  $2.19 \times 10^7$  conidias/ml.



Al comparar estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo se observa que las mortalidades son diferentes debido posiblemente a que se trata de especies distintas de dípteros, al tipo de alimentación empleada, y a que las condiciones de los bioensayos fueron diferentes, sin embargo en todos los estudios realizados se observó acción entomopatógena de *B. bassiana* sobre larvas de *S. ochraceum*.

Se observó que la concentración baja de *B. bassiana* ( $1 \times 10^5$  conidias/ml), alcanzó un 60% de mortalidad larvaria hacia el día 4 del bioensayo, mientras que concentraciones mayores ( $1 \times 10^6$  hasta  $5 \times 10^7$  conidias/ml) superaron el 80% de mortalidad larvaria hacia el día 4 del bioensayo (Figura 7).

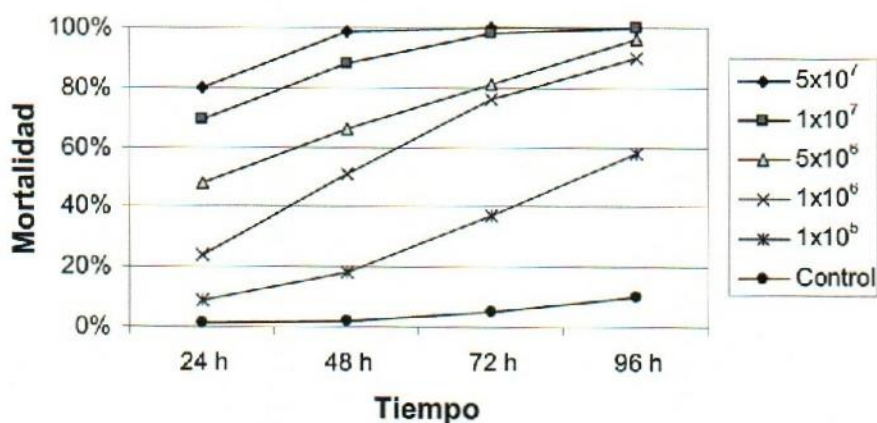


Figura 7. Mortalidad diaria de larvas de *S. ochraceum* expuestas a *B. bassiana*, con respecto al control.

Los datos reportados por el programa EPA Probit Analysis Program Version 1.5 a las 24 h para este bioensayo son los mostrados en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis Probit de la mortalidad larvaria de *Simulium ochraceum* causada por *Beauveria bassiana* a las 24 h.

Concentración (Conidias/ml)	Individuos expuestos	Individuos muertos	Respuesta observada	Respuesta ajustada controles	Respuesta esperada
Control	100	1	0.0100	0.0000	0.0110
1x10 <sup>5</sup>	100	9	0.0900	0.0799	0.0656
1x10 <sup>6</sup>	100	24	0.2400	0.2316	0.2697
5x10 <sup>6</sup>	100	48	0.4800	0.4742	0.5050
1x10 <sup>7</sup>	100	69	0.6900	0.6866	0.6111
5x10 <sup>7</sup>	100	80	0.8000	0.7978	0.8181

Los valores de Chi cuadrada para heterogeneidad calculada y tabulada fueron 3.995 y 7.815 respectivamente, y como la prueba de Chi cuadrada no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las mortalidades esperadas y observadas de *S. ochraceum*, es factible realizar el análisis Probit.

Los valores obtenidos mediante el análisis Probit indicaron que en este bioensayo se obtuvo una CL<sub>50</sub> de 4.842x10<sup>6</sup> conidias/ml (límite inferior de 3.434x10<sup>6</sup> conidias/ml y límite superior de 6.799x10<sup>6</sup> conidias/ml) y CL<sub>90</sub> de 1.305x10<sup>8</sup> conidias/ml (límite inferior de 7.158x10<sup>7</sup> conidias/ml y límite superior de 3.026x10<sup>8</sup> conidias/ml) (Tabla 13).

Tabla 13. Valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de conidias del hongo *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Simulium ochraceum*.

CL	Concentración	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
1.00	12247.824	2864.548	33515.129
5.00	70590.195	24368.586	148975.141
10.00	179604.531	75783.852	332291.094
15.00	337324.625	162131.000	574038.688
50.00	4842180.000	3434781.750	6799703.500
85.00	69507776.000	41394888.000	141586848.000
90.00	130546312.000	71580072.000	302615552.000
95.00	332151744.000	159793776.000	940312768.000
99.00	1914359168.000	710807936.000	7993371136.000

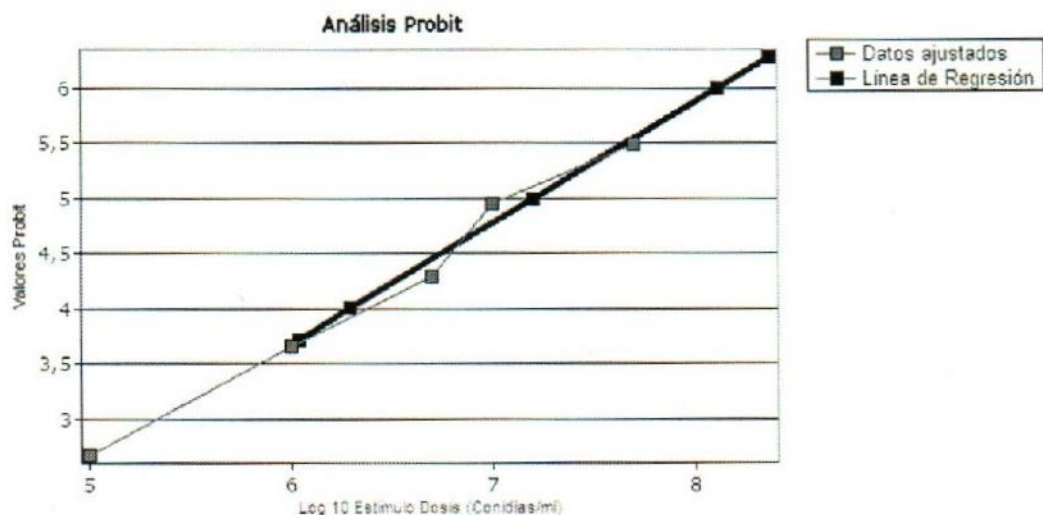


Figura 8. Valores Probit ajustados y línea de regresión de conidias del hongo *B. bassiana* sobre larvas de *S. ochraceum*.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican claramente que *B. bassiana* presentó efecto entomopatígeno sobre la etapa larvaria de *S. ochraceum* lo cual es alentador para considerarla como candidato para el control biológico.

Mortalidad de larvas de *S. ochraceum* expuestas al hongo *G. virens*.

*Gliocladium virens* es un hongo que se ha utilizado como medio de control biológico de fitopatógenos, y es considerado específicamente como un micoparásito en el control de los hongos que atacan a los cultivos (Highley et al. 1997, Hmouni et al. 2006).

En este estudio se empleó una cepa de *G. virens* nativa del sureste de Chiapas la cual fue probada para evaluar su patogenicidad sobre larvas de *S. ochraceum*.

El bioensayo se llevó a cabo empleando cinco concentraciones del hongo. A las 24 h la concentración más alta ( $1 \times 10^8$  conidias/ml) causó una mortalidad larvaria de 28%, y hasta las 96h se obtuvo el 100% de mortalidad en esta concentración. Las concentraciones más bajas de  $1 \times 10^7$  conidias/ml reportaron mortalidades de 91% al cuarto día del bioensayo (Tabla 14).

Tabla 14. Mortalidad de larvas de *S. ochraceum* a cinco concentraciones de conidias de *G. virens*.

Concentración (Conidias/ml)	24 h	48 h	72 h	96 h
$1 \times 10^8$	28%	65%	95%	100%
$1 \times 10^7$	23%	60%	73%	91%
$1 \times 10^6$	7%	34%	44%	66%
$1 \times 10^5$	9%	18%	28%	46%
$1 \times 10^4$	11%	21%	25%	36%
Control	3%	11%	14%	18%

Las mortalidades alcanzadas a las 24 h son muy bajas por lo que no se consideran idóneas para emplearlas en bioensayos como método de control biológico de larvas de simúlidos. A las 48 h sólo las dos concentraciones más altas ( $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidias/ml) alcanzaron mortalidades de 60% y 65% respectivamente, las demás se mantuvieron por debajo del 40% de mortalidad, lo cual representa un bajo potencial entomopatógeno. Los resultados en este bioensayo demuestran que las mortalidades de 91 y 100% debidas a *G. virens* solamente se obtienen a altas concentraciones ( $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  conidias/ml respectivamente) y hasta las 96 horas de iniciado el bioensayo (Figura 9).

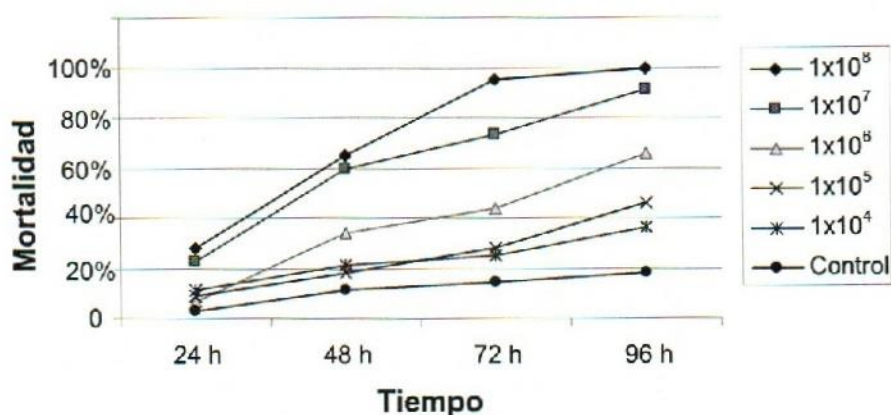


Figura 9. Mortalidad diaria de larvas de *S. ochraceum* expuestas a *G. virens* con respecto al control.

Los datos reportados por el programa EPA Probit Analysis Program Version 1.5 a las 72 h para este bioensayo son los que se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Análisis probit de la mortalidad larvaria de *Simulium ochraceum* causada por *Gliocladium virens* a las 72 h.

Concentración (Conidias/ml)	Individuos expuestos	Individuos muertos	Respuesta observada	Respuesta ajustada controles	Respuesta esperada
Control	100	14	0.1400	0.0000	0.1927
1x10 <sup>4</sup>	100	25	0.2500	0.7010	0.0103
1x10 <sup>5</sup>	100	28	0.2800	0.1081	0.0837
1x10 <sup>6</sup>	100	44	0.4400	0.3063	0.3273
1x10 <sup>7</sup>	100	73	0.7300	0.6656	0.6864
1x10 <sup>8</sup>	100	95	0.9500	0.9381	0.9220

Los valores de Chi cuadrada para heterogeneidad calculada y tabulada fueron 2.244 y 7.815 respectivamente.

La prueba de Chi cuadrada de bondad de ajuste indicó que no existió diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en las mortalidades de *S. ochraceum*, por lo tanto la CL y los límites pueden ser estimados.

Los valores estimados de la CL y los límites de confianza fueron calculados y se muestran en la tabla 16, obteniendo una CL<sub>50</sub> de 3.016x10<sup>6</sup> conidias/ml, y una CL<sub>90</sub> de 7.128x10<sup>7</sup> conidias/ml.

Tabla 16. Valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de conidias del hongo *G. virens*, sobre larvas de *S. ochraceum*.

CL	Concentración	Límites de confianza al 95%	
		Inferior	Superior
1.00	9693.135	836.959	42529.590
5.00	52084.918	7861.319	165851.313
10.00	127660.547	25779.609	344918.406
15.00	233794.609	57207.563	567905.125
50.00	3016697.500	1495062.125	5195395.500
85.00	38924996.000	22039446.000	84260656.000
90.00	71286424.000	37740984.000	179783280.000
95.00	174723200.000	81267048.000	569411712.000
99.00	938856064.000	326797984.000	5186578432.000

Con estos datos se obtuvo la línea de regresión la cual se muestra en la siguiente figura.

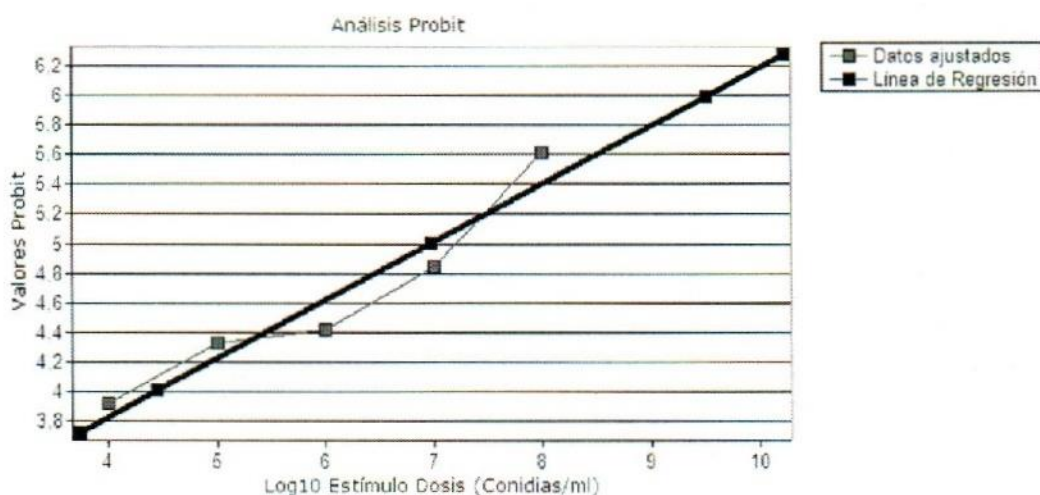


Figura 10. Valores Probit ajustados y la línea de regresión resultante, de conidias del hongo *G. virens*, sobre larvas de *S. ochraceum*.

No se cuenta con reportes de estudios previos en que se haya utilizado hongos entomopatógenos como agente de control biológico de *S. ochraceum* en los focos endémicos del norte y sureste del Estado de Chiapas, por lo cual los resultados del presente estudio son datos relevantes y que podrán ser considerados como base para futuras investigaciones en el área.

## IX. CONCLUSIONES

- El sistema que favoreció la supervivencia de las larvas se clasifica dentro de los sistemas cerrados y quedó diseñado bajo las siguientes condiciones: bioensayos en solución de Tween 80 al 0.000001% en agua destilada, oxigenación aportada por una presión de aire de 359.6 ml/min, aporte de alimento para peces en un régimen de dos raciones cada 24 horas, y utilizando un agitador eléctrico (Orbital Shaker MRC) a una velocidad de 120 r.p.m. La sobrevivencia de las larvas se obtuvo hasta por 6 días, por lo tanto este sistema puede ser empleado en cualquier tipo de evaluación.
- Las tres especies de hongos probadas en este trabajo reportaron potencial entomopatógeno sobre la fase larvaria de *S. ochraceum*, siendo la más efectiva y rápida la debida a *M. anisopliae*, seguida por *B. bassiana* y finalmente la de menor efectividad *G. virens*.
- Las larvas de 2º a 3er estadio de *S. ochraceum* fueron más susceptibles a *M. anisopliae* con una  $CL_{50}$  de  $2.342 \times 10^6$  conidias/ml y una  $CL_{90}$  de  $6.465 \times 10^6$  conidias/ml.

## X. RECOMENDACIONES

- Realizar otros estudios para evaluar la entomopatogenicidad de los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *G. virens*, sobre la fase adulta de *S. ochraceum*, con diferentes técnicas de inoculación.
- Evaluar la acción entomopatógena de otras especies de hongos sobre la fase larvaria y adulta de *S. ochraceum* a nivel de laboratorio.
- Continuar los estudios para establecer un método de control biológico mediante el uso de los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *G. virens*, sobre *S. ochraceum* en campo.



## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Angel-Sahagún CA, Lezama-Gutiérrez R, Molina-Ochoa J, Galindo-Velasco E, López-Edwards M, Rebolledo-Domínguez O, Cruz-Vázquez C, Reyes-Velázquez WP, Skoda SR, Foster JE, 2005. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) *Journal of Insect Science* 5:50, 8pp.
- Araújo-Coutinho C, Figueiró R, Viviani AP, Nascimento ES, Cavados CFG, 2005. A Bioassay Method for Black Flies (Diptera: Simuliidae) Using Larvicides *Neotropical Entomology* 34(3):511-513.
- Arfan-ul-Bari, 2007. Clinical Spectrum of Onchodermatitis *JCPSP*, 17(8):453-456.
- Barrios M, 1992. Producción y virulencia de algunas cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. contra la broca del cafeto *Hypothenemus hampei* (Ferrari). M. S. thesis, Instituto Interamericano para Cooperación en la Agricultura - Centro Agronómico Tropical de Instrucción y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- Blanford S, Chan BHK, Jenkins N, Sim D, Turner RJ, Read AF, Thomas MB, 2005. Fungal Pathogen Reduces Potential for Malaria Transmission *Science* 308:1638-1641.
- Burges HD, (Ed.). 1981. "Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980." Academic Press, London.
- Brenner RJ and Cupp EW, 1980. Rearing black flies (Diptera: Simuliidae) in closed system of water recirculation *Tropenmed. Parasit.* 31: 247-258.

- Bruck DJ, Snelling JE, Dreves AJ, Jaronski ST, 2005. Laboratory bioassays of entomopathogenic fungi for control of *Delia radicum* (L.) larvae *Journal of Invertebrate Pathology* 89:179-183.
- Carruthers IR, Hural K, 1990. Fungi as natural occurring entomopathogens. En Baker RR, Dunn PE (Eds.) *New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Liss. Nueva York, EEUU. 115-138.
- Charnley AK, 2005. *Fungal pathogens of insects: from mechanisms of pathogenicity to host defense* Department of Biology & Biochemistry, University of Bath.
- Charnley AK, 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En Wicklow D, Soderstrom M, (Eds.) *The Mycota IV. Environmental and Microbial Relationships*. Springer. Heidelberg, Germany 185-201.
- Cirerol-Cruz BE, Rodríguez-Meneses A, Vázquez-Martínez MG. 2008. Potencial entomopatógeno de cepas de hongos para el control de *Triatoma dimidiata*, vector de la enfermedad de Chagas en México. Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Químicas Tapachula, Chiapas; México. Tesis de Maestría.
- Colbo MH and Thompson BH, 1978. An efficient technique for laboratory rearing of *Simulium verecundum* S. & J. (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* 56: 507-510.
- Corral G, Romero A, Radrigán C, Zaviezo T, 2006. Las virtudes de los hongos entomopatógenos *Agronomía y Forestal* 30:12-15.
- Cupp EW, Ochoa AO, Collins RC, Ramberg FR, Zea G, 1989. The effect of multiple ivermectin treatments on infection of *Simulium ochraceum* with *Onchocerca volvulus* *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 501-506.

- Dadzie Y, Neira M, Hopkins D, 2003. Final Report of the Conference on the Eradicability of Onchocerciasis *Filaria Journal*, 2:2.
- Davidson G, Chandler D, 2005. Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi Against Larvae and Adults of Onion Maggot (Diptera: Anthomyiidae) *J. Econ. Entomol.* 98(6): 1848-1855.
- Fernández PM, Lecuona RE, Alves S, 1985. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill a broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) Coleoptera, Scolytidae. *Ecossistema* 10: 176-182.
- Gaugler R, Molloy D, Haskins T, and Rider G, 1980. A bioassay system for the evaluation of blackfly (Diptera: Simuliidae) control agents under simulated stream conditions. *Can. Entomol.* 112:1271-1276.
- Goettel MS, Inglis GD, 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey L, editor. *Manual of Laboratory Techniques in Insect Pathology*, pp. 213-247. London: Academic Press.
- Guillet P, 1984. La lutte contre l'onchocercose humaine et les perspectives d'intégration de la lutte biologique *Entomophaga* 29(2):121-132.
- Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM, 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* 64:13-17.
- Hajek, AE, St. Leger, RJ, 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-322.

- Haraprasad N, Niranjana SR, Prakash HS, Shetty HS, Wahab S, 2001. *Beauveria bassiana* - a potential mycopesticide for the efficient control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India *Biocontrol Science and Technology* 11: 251-260.
- Highley TL, Anantha Padmanabha HS, Howell CR, 1997. Control of wood decay by *Trichoderma* (*Gliocladium*) *virens*, USDA Forest Service, Forest Products Laboratory, Madison5, WI, USA.
- Hmouni A, Mouria A, Douira A, 2006. Biological control of tomato grey mould with compost water extracts, *Trichoderma sp.*, and *Gliocladium sp.* *Phytopathologia Mediterranea* 45, 110-116.
- Hoerauf A, Büttner DW, Adjei O, Pearlman E, 2003. Science, medicine, and the future: Onchocerciasis *British Medical Journal* 326, 207-10.
- Hougard JM, Alley ES, Yaméogo L, Dadzie KY, Boatman BA, 2001. Eliminating Onchocerciasis after 14 Years of Vector Control: A Proved Strategy *The Journal of Infectious Diseases* 184:497-503.
- Jamnback H, 1981. The origins of Blackfly Control Programmes. In: "*Blackflies the future for biological methods in integrated control*" (Marshall Laird, Editor), pp. 71-73; Academic Press.
- Jamnback H and Frempong-Boadu J, 1966. Testing black fly larvicides in the laboratory and in streams. *Bull. Wld Hlth Org.* 34: 405-421.
- Jeffs LB, Xavier IJ, Matai RE, Khachatourians GG, 1997. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metharizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* and *Verticillium*, *Can. J. Microbiol.* 45:936-948.

- Jiménez JA, 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café *Cenicafé* 43:84-98.
- Kamala KS, Murugan K, Naresh Kumar A, Ramasubramanian N, Mathiyazaghan P, 2008. Adulticidal effect of fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* on malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) *African Journal of Biotechnology* 7(6):838-841.
- Kershaw MJ, Talbot NJ, 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis *Fungal Genet. Biol.* 23:18-33, 83.
- Lacey LA, Frutos R, Kaya, HK, Vail P, 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? *Biological Control* 21, 230-248.
- Lacey LA, and Kaya HK (Eds.), 2000. "Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests." Kluwer Academic, Dordrecht.
- Lacey LA and Mulla MS, 1977. A new bioassay unit for evaluating larvicides against blackflies. *J. Econ. Ent.* 70: 453-456.
- Lazo RR, 1990. Susceptibilidad de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* al hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, y su tolerancia al oxiclورو de cobre. M. S. thesis, Instituto Interamericano para Cooperación en la Agricultura - Centro Agronómico Tropical de Instrucción y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- Lindblade KA, Arana B, Zea-Flores G, Rizzo N, Porter ChH, Domínguez A, Cruz-Ortiz N, Unnasch ThR, Punkosdy GA, Richards J, Sauerbrey M, Castro J, Catú E, Oliva O, Richards FO Jr, 2007. Elimination of *Onchocerca volvulus* Transmission in the Santa Rosa Focus of Guatemala *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(2):334-341.

- Mohsen ZH, Mulla MS, 1981. Toxicity of Blackfly larvicidal formulations to some aquatic insects in the laboratory *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 26:696-703.
- Méndez I, 1990. Control microbiano de la broca del fruto del cafeto *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera Scolytidae), con el hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) en el Soconusco, Chiapas. M. S. thesis, Colegio de Postgraduados, Chapingo, Mexico.
- Posada FJ, Vega FE, 2005. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens, *Journal of Insect Science*, 5(37), 10 pp. Available online: [insectscience.org/5.37](http://insectscience.org/5.37)
- Pucheta-Díaz M, Flores-Macias A, Rodríguez-Navarro S, De la Torre M, 2006. Mechanism of action of entomopathogenic fungi *INCI*, 31(12): 856-860.
- Resh VH, Lèveque Ch, Statzner B, 2003. Long-term, large-scale biomonitoring of the unknown: Assessing the effects of insecticides to control river blindness (onchocerciasis) in West Africa *Annu. Rev. Entomol.* 49:115-139.
- Rodríguez-Domínguez J, 2002. Las enfermedades transmitidas por vector en México *Rev. Fac. Med. UNAM* 45(3):126-141.
- Rodríguez-Meneses A, 2008. Isolation and selection of stocks of fungi for *Anopheles albimanus* mosquito control. Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Medicina Humana, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; México. Tesis de Maestría.
- Rodríguez Pérez MA, Reyes Villanueva F, Barrera Saldaña HA, Domínguez Vázquez A, Lizarazo Ortega C, 2005. Impacto del programa de tratamiento con ivermectina sobre la supresión de *Onchocerca volvulus* en México *Ciencia UANL*, 8(4): 483-489.

- Rodríguez P, 2005. Herramientas Moleculares para el Combate de la Oncocercosis en México *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3,4):112-129.
- Rodríguez Pérez MA, Rivas Alcalá AR, 1991. Algunos problemas en la investigación para el control de la transmisión de *Onchocerca volvulus* en México *Salud Pública de México* 33(5):493-503.
- Rodríguez Pérez MA, Danís-Lozano R, Rodríguez MH, Bradley JE, 1999. Comparison of Serological and Parasitological assessments of *Onchocerca volvulus* transmission after 7 years of mass ivermectin treatment in Mexico *Tropical Medicine and International Health* 4(2):98-104.
- Rodríguez SM, Gerding PM, France IA, 2006. Entomopathogenic fungi isolates selection for egg control of tomato moth, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: gelichiidae) eggs *Agricultura Técnica (Chile)* 66(2):151-158.
- Romero SM, Maia-Herzog M, 2003. Overseas disease: Comparative studies of onchocerciasis in Latin America and Africa *History Sciences Health Manguinhos*, Rio de Janeiro, 10(1):251-258.
- Samuels KDZ, Pinock DE, Allsopp PG, 1989. The potential of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a biological control agent of *Inopus rubriceps* (Macquart) (Diptera: Stratiomyidae) *J. Aust. Ent. Soc.* 28:69-78.
- Sánchez P, Morillo F, Caetano F, Ituriaga T, Guerra J, Muñoz W, 2002. Detección de hongos entomopatógenos del género *Cordyceps* ((Fr.) Link), 1833 (Ascomycotina: Pyrenomycetes) sobre hormigas del género *Camponotus* Mayr, 1861 (Hymenoptera: Formicidae) en plantaciones de cacao de Barlovento, Estado Miranda, Venezuela *Entomoptropica*, 17(2):191-195.

- Scholte EJ, Njiru BN, Smallegange RC, Takken W, Knols BGJ, 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* *Malaria Journal* 2(29): <http://www.malariajournal.com/content/2/1/29>.
- Scholte EJ, Knols BGJ, Samson RA, Takken W, 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review *Journal of Insect Science*, 4:19-24 pp.
- Scholte EJ, Ng'habi K, Kihonda J, Takken W, Paaijmans K, Abdulla S, Killeen GF, Knols BGJ, 2005. An entomopathogenic fungus for Control of Adult African Malaria mosquitoes *Science*, 308:1641-1642.
- Solís-Soto A, García-Gutiérrez C, González-Maldonado MB, Medrano-Roldán H, Galán-Wong LJ, 2006. Toxicidad de blastosporas de *Beauveria bassiana* (Vuill) contra palomilla del manzano *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) *Folia Entomol. Mex.* 45(2):195-200.
- Soumbeiy-Alley E, Basáñez MG, Bissan Y, Boatín BA, Remme JHF, Nagelkerke NJD, De Vlas SJ, Borsboom GJ, Habbema JDF, 2004. Uptake of *Onchocerca volvulus* (Nematoda: Onchocercidae) by *Simulium* (Diptera: Simuliidae) is not strongly dependent on the density of skin microfilariae in the human host *Journal of Medical Entomology* 41(1):83-94.
- Sponagel KW, 1994. La broca del café *Hypothenemus hampei* en plantaciones de café robusta en la Amazonia Ecuatoriana. 191pp. Giessen, Germany, Wissenschaftlicher, Fachverlag.
- Steinhaus EA, 1956. Microbial control: The emergence of an idea. *Hilgardia* 26, 107-160.



- Steinhaus EA, 1975. "Disease in a Minor Cord." Ohio State Univ. Press, Columbus, OH.
- Tanada Y, and Kaya HK, 1993. "Insect Pathology." Academic Press, San Diego, CA., USA.
- Thylefors B, 2004. Eliminating onchocerciasis as a public health problem *Tropical Medicine and International Health* 9(4):A1-A3.
- Vázquez-Martínez MG, Hernández ChE, y Gálvez CO, 2007. Aislamiento de cepas nativas de hongos asociados a insectos vectores de enfermedades. INSP. XII Congreso de Investigación en Salud Pública. Cuernavaca Morelos. Pag. 209.
- Vicentini S, Faria M, De Oliveira MRV, 2001. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method *Neotropical Entomology*, 30(1):97-103.
- Watson DW, Geden CJ, Long SJ, Rutz DA, 2002. Efficacy of *Beauveria bassiana* for Controlling the House Fly and Stable Fly (Diptera: Muscidae) Cornell Univ, Dept Entomol, Comstock Hall, Ithaca, NY 14853, USA.
- World Health Organization, 1995. Onchocerciasis and its control: Report of a WHO Expert Committee on Onchocerciasis control. *World Health Organ Tech Rep Ser* 852:1-104.
- World Health Organization, 2001. Criteria for Certification of Interruption of Transmission/elimination of Human Onchocerciasis. *World Health Organ Doc WHO/CDS/CPE/CEE/2001.18a*. Geneva: WHO.

World Health Organization, 2005. Weekly Epidemiological Record Onchocerciasis (river blindness) 30(80):257–260.

World Health Organization, 2002. Weekly Epidemiological Record Onchocerciasis (river blindness). 77:249–256.