

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR

ECOTOXICIDAD CAUSADA POR LOS HONGOS *Metarhizium anisopliae* Y *Gliocladium virens* EN EL MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna* (CLADOCERO: DAPHNIDAE)

TESIS

Requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

CON AREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES TRANSMITIDAS

POR VECTOR

**PRESENTADO POR
Daenna Kaori Romero Moreno**

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. María Guadalupe Vázquez Martínez**

**ASESORES:
Dra. Norma Edith Rivero Pérez
Dr. Américo David Rodríguez Ramírez
Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa**

Tapachula, Chiapas.

Agosto 2013.

Ecotoxicidad causada por los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Gliocladium virens* en el microcrustáceo *Daphnia magna* (Cladocero: Daphnidae).

Artículo sometido de acuerdo a los requerimientos del Instituto Nacional de Salud Pública para obtener el grado de Maestro en ciencias de la salud con Área de concentración en Enfermedades Transmitidas por Vector.

Por

Daenna Kaori Romero Moreno

Agosto 2013

DEDICATORIA

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A ti Papi, por tu incondicional apoyo, tanto al inicio como al final de la maestría; por estar pendiente de mí a cada momento.

A ti Mami, que tienes algo de Dios por la inmensidad de tu amor, y mucho de ángel por ser mi guarda y por tus incansables cuidados. Porque si hay alguien que está detrás de todo este trabajo, eres tú mamita, que has sido, eres y serás el pilar de mi vida.

A la memoria de mi hermano Angel; por ser mi ANGELITO, que desde el Cielo está conmigo y que siempre recordaré, amaré y llevaré en mi corazón. Mi amorcito nunca te olvidaré.

“No existen conocimientos más elevados o más bajos, sino un conocimiento único que emana de la experimentación.”

Leonardo Da Vinci (1452-1519).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco mis padres por todo su amor, por estar conmigo en todo momento. Gracias por todo mamá y papá por creer en mí, aun que hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor.

A mi familia por ayudarme y preocuparse por mí, por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar.

A mi esposo Carlos Fong que me has ayudado a continuar, haciéndome vivir los mejores momentos de mi vida. Gracias a ti mi amor por tu cariño y comprensión, porque sé que siempre contaré contigo.

A mi directora de tesis Dra. María Guadalupe Vázquez Martínez, por confiar en mí en este proyecto, por su paciencia, motivación, criterio y aliento.

A mis asesores Dra. Alma Socorro Sobrino Figueroa, Dra. Norma Edith Rivero Pérez, Dr. Américo David Rodríguez Ramírez quienes pusieron todos sus conocimientos para que yo pudiera realizar esta investigación.

A mi querido tutor el Dr. José Luis Torres Estrada por todo su apoyo, que sin su colaboración hubiera sido más complicado, su paciencia, por su atención, amabilidad en todo lo referente a mi vida como alumna de maestría. Gracias por hacerme fácil lo difícil.

A la Q.F.B. Olga Ruth Gálvez Coutiño ha sido un privilegio poder contar con su guía y su ayuda. Al magnifico equipo de profesionales del laboratorio de patógenos por la buena disposición y colaboración que tuvieron conmigo.

A mis amigos Abel, Angie, Amilcar, Carlos, David, Luis, Sury, por su amistad, por el apoyo y permitirme entrar en su vida durante estos casi tres años de convivir dentro y fuera del salón de clase, por sus palabras de aliento, nunca los olvidaré.

A mis hermanas del alma Bere, Belem, Fabiola, Mily, Norma, que me acompañaron en esta aventura que significó la maestría y que, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos, las quiero mucho son las hermanas de sangre que no tuve pero que Dios me dio la oportunidad de elegir.

A CONACYT por el financiamiento de la maestría. Esta tesis se realizó dentro del proyecto de CONACYT No. 87102, titulado: Pruebas de campo confinadas de hongos entomopatógenos para el control de mosquitos *Anopheles albimanus*, vectores de paludismo en México.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
Cultivo de hongos.....	10
Cultivo de <i>D. magna</i>	10
Efecto letal de los hongos sobre <i>D. magna</i>	11
Efectos subletales de los hongos sobre <i>D. magna</i>	12
a) Tasa de incremento de población y producción de neonatos.....	12
b) Longevidad y talla.....	12
c) Tasa de infección.....	12
d) Malformaciones.....	13
Análisis de datos.....	13
RESULTADOS.....	13
Efecto letal de los hongos sobre <i>D. magna</i>	13
Efectos subletales de los hongos sobre <i>D. magna</i>	20
a) Tasa de incremento de población y producción de neonatos.....	20
b) Longevidad y talla.....	21
c) Tasa de infección.....	22
d) Malformaciones.....	23
DISCUSIÓN.....	24
REFERENCIAS.....	28

RESUMEN

La resistencia a insecticidas desarrollada por los mosquitos vectores de paludismo es un problema grave para las estrategias de control basadas en insecticidas químicos, por lo que se están desarrollando estrategias alternativas que permitan continuar la lucha contra los mosquitos vectores. Diversos estudios han demostrado que el uso de hongos entomopatógenos contra mosquitos vectores de paludismo puede ser una alternativa efectiva. Los hongos *Metarhizium anisopliae* y *Gliocladium virens* son considerados buenas opciones para su uso en estrategias de control de *Anopheles albimanus* pero se requieren estudios que demuestren su seguridad sobre organismos no blanco. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos tóxicos (letales y subletales) causados por los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Gliocladium virens* en el microcrustáceo *Daphnia magna* (Cladocero: Daphnidae). Para determinar efectos letales se realizaron bioensayos exponiendo a *D. magna* a diferentes concentraciones de ambos hongos. En efectos subletales se expusieron los microcrustáceos a la CL₁ de los hongos durante 21 días. Las concentraciones letales para *D. magna* con *M. anisopliae* fueron de CL₅₀ de 2.6×10^5 y la CL₁ de 0.7×10^1 conidias/mL y con *G. virens* fueron de CL₅₀ 4.4×10^5 y la CL₁ de 7.6×10^2 conidias/mL. Al exponer a los organismos a la CL₁ de los hongos, la población de *D. magna* no presentó efectos entre los tratamientos para las determinaciones de incremento de población, producción de neonatos, longevidad, talla y malformaciones, pero sí se reportó infección por el hongo *M. anisopliae*. Al aumentar a la CL₅₀ de los hongos, sí se observaron efectos entre los tratamientos para las determinaciones de tasa de incremento de la población, producción de neonatos y longevidad. De acuerdo a los resultados observados en las pruebas que se realizaron se puede indicar que estas cepas de hongos entomopatógenos podrían ser una buena alternativa para el control de mosquitos vectores, ya que los efectos letales y subletales que causaron sobre *D. magna* son similares a los reportados en otros estudios con hongos y menores a los reportados para insecticidas químicos.

Palabras clave: Ecotoxicidad, *Daphnia magna*, *Metarhizium anisopliae*, *Gliocladium virens*, efecto letal, efecto subletal.

INTRODUCCIÓN

El paludismo es la enfermedad tropical más importante a nivel mundial y se transmite a los humanos por la picadura de un mosquito hembra infectado del género *Anopheles* que inocular el parásito *Plasmodium* (WHO 2011). Se calcula que en el año 2010 se registraron 216 millones de casos de paludismo, siendo África el continente con mayor número de casos positivos a paludismo causados por *Plasmodium falciparum* y *P. vivax* (OPS 2011). Actualmente en México se han presentado 209 casos de paludismo causados por *P. vivax*, en donde Chiapas registra el mayor número con una cifra de 76 casos (CENAPRECE 2013).

El control de vectores se considera un componente importante en la prevención del paludismo, mientras que el uso de medicamentos antipalúdicos de forma profiláctica no es una estrategia recomendada para poblaciones humanas en zonas endémicas debido a que se han reportado en algunos casos resistencia a algunos antipalúdicos (White 2004). Es por eso que se han empleado estrategias de control basadas en la bionomía de los vectores (Ordóñez *et al.* 2008).

El método de control de los mosquitos vectores de paludismo que más se ha empleado es el químico, en donde se utilizan larvicidas y adulticidas. Aunque efectivo, el uso indiscriminado del control químico ha presentado aspectos adversos a la salud humana, biota y ecosistemas (Hudson *et al.* 2013), además de provocar el desarrollo de resistencia en los mosquitos vectores de paludismo (Penilla *et al.* 2005, Cáceres *et al.* 2011). Debido a esto se han buscado nuevas alternativas que sean amigables con el ambiente, eficaces y de bajo costo, como el control biológico (Scholte *et al.* 2003, Vázquez-Martínez *et al.* 2011). Dentro de las estrategias de control biológico destacan los hongos entomopatógenos debido

a que se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo, son considerados inocuos para el ambiente, tienen mayor persistencia en el tiempo que cualquier otro entomopatógeno ya que convierten al insecto muerto en una nueva fuente de inóculo (López & Vázquez-Martínez 2011) y se puede realizar su producción a bajo costo por métodos artesanales (Castillo *et al.* 2013).

Varios trabajos han demostrado que los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* son eficaces para el control de *An. gambiae* y *An. stephensi* (Bukhari *et al.* 2010, Kikankie *et al.* 2010, Prasad *et al.* 2010, Howard *et al.* 2010) y en México, específicamente sobre *An. albimanus* se cuenta con la cepa nativa de *Gliocladium virens* aislada de criaderos de mosquitos del sureste de Chiapas (Vázquez-Martínez *et al.* 2008). En bioensayos de laboratorio *G. virens* y *M. anisopliae* demostraron patogenicidad contra la fase larval y adulta de *An. albimanus* (Vázquez-Martínez *et al.* 2013), por lo que estos hongos entomopatógenos son excelentes candidatos para el desarrollo de un producto bioinsecticida. Sin embargo, a pesar de que se cuenta con todo el sustento teórico que evidencia la eficacia de los hongos entomopatógenos, hacen falta estudios que demuestren la inocuidad de estos hongos sobre organismos no blanco y así poder proponer su uso en campo.

Los microcrustáceos del género *Daphnia* son los organismos más utilizados para pruebas o como referencia en ensayos de toxicidad mundial, debido a que son fáciles de cultivar en el laboratorio, por su reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta) y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías (Ramírez & Mendoza 2008). Debido a que este organismo se utiliza para estimar la toxicidad de varios productos químicos y biológicos, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos tóxicos (letales y subletales) causados por los hongos entomopatógenos

Metarhizium anisopliae y *Gliocladium virens* en el microcrustáceo *Daphnia magna* (Cladocero: Daphnidae).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de hongos: Las cepas de hongos fueron cultivadas en placas Petri con medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (ADS, Becton Dickinson®), sobre el cual se colocó un círculo de papel celofán acorde a las dimensiones de la placa y previamente esterilizado (Dennis & Webster 1971). Los hongos se inocularon sobre el papel celofán e incubaron a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa de $70\pm 5\%$, aproximadamente durante 21 días. A partir de cultivos esporulados se preparó una suspensión stock de conidias del hongo *G. virens* y otra de *M. anisopliae* en una solución de Tween 80 al 0.0001% en agua tridestilada estéril.

La concentración de conidias fue determinada mediante conteos utilizando una cámara de Neübauer (Cañedo & Ames 2004). La viabilidad de las conidias fue estimada a través de medir la germinación conidial de muestras de la suspensión de conidias a una concentración de 10^6 conidias/mL incubadas en placas con medio PDA (Goettel & Inglis 1997). Para los bioensayos se usaron suspensiones de conidias con viabilidad arriba del 90%.

Cultivo de *D. magna*: Los ejemplares de *D. magna* se obtuvieron del cepario del laboratorio Alejandro Villalobos, de la UAM Iztapalapa. Los cultivos se mantuvieron en recipientes de vidrio de 1L con 800 mL de agua reconstituida, cuyas características fisicoquímicas son: dureza (como CaCO_3) de 160 y 180 mg/L, pH de 7.6 y 8.0, oxígeno

disuelto de 6.5 a 7.5 mg/L, con un fotoperíodo de 16:8 hr luz:oscuridad (L:O), una temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Ramírez & Mendoza 2008). Los organismos se alimentaron con *Monoraphidium* sp (Chloropyta), a una densidad de $1.2-1.5 \times 10^6$ algas por *Daphnia*/día (NMX-AA-87).

Efecto letal de los hongos sobre *D. magna*: Para determinar la concentración de los hongos entomopatógenos *M. anisopliae* y *G. virens* que mata al 50 y al 1% de la población expuesta (CL_{50} y CL_1) de *D. magna*, se probaron 5 diferentes concentraciones de conidias. Para *M. anisopliae* se tomó como base una concentración de 1.4×10^5 conidias/mL y para *G. virens* 3.3×10^5 conidias/mL, acorde a la CL_{50} reportada para larvas de *An. albimanus* (Vázquez-Martínez *et al.* 2013); a partir de estas concentraciones se abrió una ventana biológica con dos concentraciones arriba y dos abajo. Las pruebas se llevaron a cabo en frascos de vidrio de 50 mL, en donde se colocaron 10 ejemplares neonatos de *D. magna* (<24 horas) en 30 mL de solución de conidias con agua reconstituida para cada hongo. Se realizaron cuatro réplicas para cada tratamiento, más dos controles negativos, uno de *D. magna* en agua reconstituida y otro de *D. magna* en solución de Tween 80 al 0.0001%. Además se agregó un control positivo con larvas de *An. albimanus* expuestas a las diferentes concentraciones de conidias de los hongos entomopatógenos. Todos los bioensayos se realizaron a una temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, un fotoperíodo de 16:8 hr L:O. Los microcrustáceos fueron alimentados diariamente con microalgas y las larvas de *An. albimanus* con alimento para conejo molido y estéril. A las 24 y 48 hr de exposición a las conidias, se registró el número de organismos supervivientes en los bioensayos y se determinó el porcentaje de mortalidad. La falta de movimiento o ausencia de ritmo cardiaco de los organismos se utilizó como indicador de mortalidad (Ramírez & Mendoza 2008).

Efectos subletales de los hongos sobre *D. magna*: Las pruebas de toxicidad crónica (efectos subletales) se llevaron a cabo con 10 hembras de *D. magna* de 8 días de edad en recipientes de plástico de 12 Oz con 800 mL de una suspensión de conidias a la CL₁ de cada hongo. Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento y tres réplicas del bioensayo en diferentes días. Los efectos sobre los organismos como malformaciones, tasa reproductiva y longevidad se observaron cada 24 hr.

a) Tasa de incremento de población y producción de neonatos: Cada tercer día se evaluó el número de neonatos producidos por las hembras en cada bioensayo, durante 21 días. El incremento poblacional en cada prueba se obtuvo restándole al número final de individuos, el número inicial, entre el tiempo de exposición (21 días). La tasa de reproducción de neonatos se calculó con la relación del número total de neonatos obtenidos entre el número de días de cultivo.

b) Longevidad y talla: La longevidad se obtuvo sumando los días de vida que tenían los organismos al inicio del bioensayo (8 días) más los días que sobrevivió al bioensayo (día de la muerte). Para determinar la talla se realizaron mediciones a 10 ejemplares adultos, 10 juveniles y 10 neonatos de cada bioensayo, mediante un estereoscopio con ocular micrométrico (Leica Mz12) a un aumento de 10X y 20X.

c) Tasa de infección: Cada tercer día se realizaron observaciones de mortalidad, los ejemplares muertos fueron fijados en alcohol al 96% y mediante la observación en un

estereoscopio a 40X se determinó la infección. La tasa de infección se calculó, reportando el número de organismos infectados entre el total de organismos muertos.

d) Malformaciones: Una vez que se cumplió con los 21 días del bioensayo, se fijaron todos los ejemplares en alcohol al 96% y se observaron en el estereoscopio y microscopio a 4X y 10X, respectivamente. Las malformaciones se detectaron observando el tamaño de las antenas y cola. En estos organismos, las malformaciones se reflejan observando antenas y colas más cortas (Ramírez & Mendoza 2008).

Análisis de datos: Los resultados del porcentaje de mortalidad se utilizaron para calcular la concentración letal (CL_{50} y CL_1) mediante un análisis Probit versión 1.5 (EPA). Para analizar los efectos subletales se usó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y además un ANOVA después de una transformación de arcoseno de las mortalidades (Zar 1974), como comparación múltiple de medias se usó la prueba T Bonferroni y LSD de Fisher (SAS Institute, 2003).

RESULTADOS

Efecto letal de los hongos sobre *D. magna*

Durante los bioensayos realizados exponiendo *D. magna* a suspensiones de conidias de los hongos *G. virens* y *M. anisopliae*, se observó que ambos hongos tienen patogenicidad sobre *D. magna*. Los microcrustáceos presentaron las mortalidades más altas en el tratamiento con el hongo *G. virens* con el 100% de mortalidad a partir de las 24 hr de

exposición a las concentraciones de 3.26×10^9 , 3.26×10^8 , 3.26×10^7 conidias/mL (Cuadro 1). Se encontró una diferencia significativa de la mortalidad ($p=0.0001$), en la concentración antes mencionada con el control Tween y control de agua reconstituida. En cambio con *M. anisopliae* los organismos expuestos tuvieron el 100% de mortalidad a las 96 hr sólo en la concentración más alta de conidias 1.44×10^8 conidias/mL (Cuadro 2). Se encontró una diferencia significativa de la mortalidad ($p=0.0001$) en la concentración antes mencionada con el control Tween y control de agua reconstituida.

CUADRO 1

Mortalidad (%) de *Daphnia magna* expuestas a diferentes concentraciones de *Gliocladium virens*.

Tratamientos	Concentración (Conidias/ml)	% Mortalidad			
		24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
<i>G. virens</i>	3.26×10^9	100	100	100	100
	3.26×10^8	100	100	100	100
	3.26×10^7	100	100	100	100
	3.26×10^6	65	75	80	90
	3.26×10^5	47.5	60	70	80
	1.46×10^5	27.5	40	47.5	52.5
	3.26×10^4	25	32.5	42.5	50
Control Tween	-	0	0	1	1
Control agua reconstituida	-	0	0	0	0

CUADRO 2

Mortalidad (%) de *Daphnia magna* expuestas a diferentes concentraciones de *Metarhizium anisopliae*.

Tratamientos	Concentración (Conidias/ml)	% Mortalidad			
		24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
<i>M. anisopliae</i>	1.44×10^8	100	100	100	100
	1.44×10^7	77.5	87.5	95	97.5
	1.44×10^6	50	62.5	70	80
	1.44×10^5	40	47.5	57.5	65
	1.44×10^4	27.5	37.5	52.5	60
	6.4×10^3	25	37.5	47.5	55
	1.44×10^3	7.5	12.5	17.5	25
Control Tween	-	0	0	0	1
Control agua reconstituida	-	0	0	0	0

Para determinar la CL_{50} y la CL_1 se tomaron los datos de mortalidad a las 24 hr de exposición de *D. magna* a los hongos. Los datos se analizaron mediante el programa Probit (EPA), para calcular concentración letal o concentración expuesta (CL/EC). Este procedimiento permite encontrar los estimadores n-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos, analizando porcentajes de efectos contra dosis dentro de la regresión. Los resultados del análisis probit se presentan en los cuadros 3 y 4 para ambas cepas.

CUADRO 3

Mortalidad de *Daphnia magna* a 24 hr de exposición a diferentes concentraciones de

Metarhizium anisopliae.

Concentración de conidias	Expuestos	Muertos	Respuesta observada	Respuesta ajustada	Predicción de respuesta
1.44×10^3	20	3	0.1500	0.1500	0.1227
6.3×10^3	40	10	0.2500	0.2500	0.2024
1.44×10^4	40	11	0.2750	0.2750	0.2582
1.44×10^5	40	16	0.4000	0.4000	0.4460
1.44×10^6	40	22	0.5500	0.5500	0.6470
1.44×10^7	40	31	0.7750	0.7750	0.8133
1.44×10^8	40	40	1.0000	1.0000	0.9197

CUADRO 4

Mortalidad de *Daphnia magna* a 24 hr de exposición a diferentes concentraciones de *Gliocladium virens*.

Concentración de conidias	Expuestos	Muertos	Respuesta observada	Respuesta ajustada	Predicción de respuesta
3.26×10^4	40	10	0.2500	0.2500	0.1704
1.46×10^5	40	11	0.2750	0.2750	0.3434
3.26×10^5	40	19	0.4750	0.4750	0.4567
3.26×10^6	40	26	0.6500	0.6500	0.7688
3.26×10^7	40	40	1.0000	1.0000	0.9428
3.26×10^8	40	40	1.0000	1.0000	0.9923

Con los valores ajustados de la respuesta observada, el programa realizó una estimación de las concentraciones letales y estableció los límites de confianza (Cuadros 5 y 6).

CUADRO 5

Valores estimados de CL/CE y límites de confianza del análisis de regresión de la mortalidad de *Daphnia magna* a 24 hr de exposición a *Metarhizium anisopliae*.

Punto	Concentración expuesta	95% Limite de confianza	
		Inferior	Superior
CL/CE 1.00	7.73	0.329	59.588
CL/CE 5.00	164.66	16.262	758.52
CL/CE 10.00	840.970	127.795	2995.914
CL/CE 15.00	2527.818	507.177	7670.153
CL/CE 50.00	264843.250	119855.008	585216.875
CL/CE 85.00	27747962.000	9145037.000	138291264.000
CL/CE 90.00	83405928.000	23413266.000	548832704.000
CL/CE 95.00	425964640.000	92474504.000	4313023488.000
CL/CE 99.00	9070258176.000	1177153792.000	212893859840.000

CUADRO 6

Valores estimados de CL/CE y límites de confianza del análisis de regresión de la mortalidad de *Daphnia magna* a 24 hr de exposición a *Gliocladium virens*.

Punto	Concentración expuesta	95% Limite de confianza	
		Inferior	Superior
CL/CE 1.00	768.158	94.619	2910.278
CL/CE 5.00	4931.076	1039.872	13556.998
CL/CE 10.00	13288.298	3690.614	31142.322
CL/CE 15.00	25944.359	8606.614	31142.322
CL/CE 50.00	438759.188	250301.938	752950.125
CL/CE 85.00	7420087.000	3676947.250	20392016.000
CL/CE 90.00	14487138.000	6532461.000	47307772.000
CL/CE 95.00	39040044.000	15076528.000	167114400.000
CL/CE 99.00	250612128.000	70532248.000	1828775168.000

Las concentraciones letales para *D. magna* con *M. anisopliae* fueron de CL₅₀ de 2.6x10⁵ y la CL₁ de 0.7x10¹ conidias/mL y con *G. virens* fueron de CL₅₀ 4.4x10⁵ y la CL₁ de 7.6x10² conidias/mL.

Efectos subletales de los hongos sobre *D. magna*

Al exponer a los organismos a la CL₁ de los hongos, la población de *D. magna* no presentó efectos entre los tratamientos para las determinaciones de incremento de población, producción de neonatos, longevidad, talla y malformaciones, pero sí se reportó infección por el hongo *M. anisopliae*. Al aumentar a la CL₅₀ de los hongos, sí se observaron efectos entre los tratamientos para las determinaciones de tasa de incremento de la población, producción de neonatos y longevidad.

a) Tasa de incremento de población y producción de neonatos: Los organismos expuestos a la CL₁ de los hongos no tuvieron diferencias significativas en la tasa de incremento de la población entre los tratamientos ($p=0.0536$), ya que el control presentó un promedio de 2.47 ± 0.27 organismos, *G. virens* de 2.25 ± 0.27 y *M. anisopliae* de 3.66 ± 0.19 . La población de *D. magna* tuvo un notorio incremento cuando se expuso a la CL₅₀ de *M. anisopliae* con un promedio de 6.30 ± 0.29 organismos/día, el triple respecto al control 2.25 ± 0.21 y catorce veces más que en *G. virens* 0.44 ± 0.02 . Se encontraron diferencias significativas entre la tasa de incremento en el control con respecto a *G. virens* ($p=0.02$).

La tasa de reproducción de neonatos con la CL₁ para el control fue de 9.6 organismos/día, *G. virens* 7.6 organismos/día y *Metarhizium anisopliae* 10.5 organismos/día. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($F=1.06$; gl: 2; $p= 0.3$). Al exponer a la CL₅₀ de la cepa *M. anisopliae* se presentó un incremento de 24.8 organismos/día, en comparación con el control que tuvo una tasa de 8.61 neonatos/día y *G. virens* tuvo 0.19 neonatos/día. Se obtuvo una diferencia significativa entre los neonatos producidos en *M. anisopliae* y el control ($F= 3.2$; gl 2; $p=0.04$).

b) Longevidad y talla: El promedio de longevidad de *D. magna* expuesta a la CL₅₀ en el tratamiento con *G. virens* fue de 12.66±0.28 días, *M. anisopliae* presentó una longevidad mayor con 22.36 ±2.34 días, pero no superó al control, ya que en el control fue donde más días sobrevivieron los organismos con un promedio de 22.83±2.11 días de longevidad. En longevidad no hubo una diferencia significativa entre *M. anisopliae* y el control (F= 28.13, gl=87 *p*=0.05 LSD), pero con *G. virens* sí hubo diferencia significativa, ya que fue donde menos días sobrevivieron los organismos expuestos.

Respecto a la talla de los adultos de *D. magna* expuestos a la CL₅₀ de los hongos se observó que no presentaron una diferencia significativa con respecto al control, el cual presentó una talla promedio de 2.54±0.29mm, *G. virens* fue de 1.54±0.57mm y *M. anisopliae* presentó un promedio de 2.52±0.26mm. Se midieron juveniles y neonatos, y tampoco presentaron diferencias significativas (*p*= 0.0549) (Fig.1).



a. Adulto en control



b. Neonato en control



c. Adulto en *M. anisopliae*



d. Neonato en *M. anisopliae*



e. Adulto en *G. virens*



f. Neonato en *G. virens*

Fig. 1. Observaciones de talla de *D. magna* expuestas a diferentes tratamientos.

c) **Tasa de infección.** Las observaciones al microscopio de 20 *D. magna* (10 adultos y 10 juveniles) que estuvieron expuestas a la cepa *G. virens* nos demostró que estos organismos no presentaron crecimiento miceliar, en comparación con las 20 *D. magna* expuestas a *M. anisopliae*, en donde 12 organismos presentaron crecimiento miceliar. La tasa de infección de *D. magna* expuestas a *M. anisopliae* fue de 57.14%.

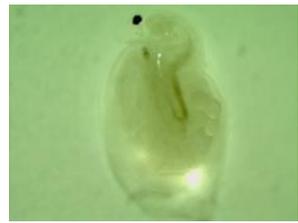
d) Malformaciones. La observación al microscopio de las *D. magna* expuestas a los hongos entomopatógenos, mostró que no se encontraron malformaciones en las antenas ni en la cola en comparación con el control (Fig. 2). Todos los organismos mostraron sus características morfológicas normales de forma similar a los organismos control.



a. Adulto en control



b. Neonato en control



c. Adulto en *G. virens*



d. Neonato en *G. virens*



e. Adulto en *M. anisopliae*



f. Neonato en *M. anisopliae*

Fig. 2. Aspecto de *Daphnia magna* expuestas a diferentes tratamientos.

DISCUSIÓN

Los hongos *M. anisopliae* y *G. virens* demostraron patogenicidad sobre *An. albimanus* por lo que se propuso que pueden ser candidatos para el desarrollo de bioinsecticidas (Vázquez-Martínez *et al.* 2013). Durante este estudio se observó que *M. anisopliae* y *G. virens* causaron efectos sobre *D. magna*, un microcrustáceo que por su sensibilidad se utiliza para evaluaciones de toxicidad. Entre los cladóceros, *D. magna* es la especie más utilizada y ha sido propuesta como especie de referencia en múltiples protocolos estandarizados de entidades reguladoras y organismos internacionales involucrados en la normalización de procedimientos de prueba (Martínez-Jerónimo *et al.* 2000).

Las concentraciones letales para *D. magna* con *M. anisopliae* fueron de CL_{50} de 2.6×10^5 y la CL_1 de 0.7×10^1 conidias/mL y con *G. virens* fueron de CL_{50} 4.4×10^5 y la CL_1 de 7.6×10^2 conidias/mL. Los valores obtenidos de CL_{50} en nuestro estudio se encuentran cercanos a los reportados para *D. magna* con otros hongos, como *G. catenulatum* cepa J1446 cuya CL_{50} fue de 5.5×10^6 CFU/L (EPA 2002).

Nestrud & Anderson (1994) reportaron que las zoosporas de *Lagenidium giganteum* no causan daño a la mayoría de los invertebrados acuáticos, a excepción de tres especies de cladóceros y chironomidos que fueron susceptibles. Se ha observado que *L. giganteum* produce efectos letales en *D. magna* a $>10^8$ CFU por lo que también este hongo causa efectos letales sobre *D. magna*, equivalentes a los efectos reportados en nuestro estudio. El hongo *L. giganteum* ha sido autorizado para su producción y comercialización por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) bajo la marca LaginexTM (Neetu *et al.* 2007).

En el caso de las pruebas con insecticidas químicos, *D. magna* ha demostrado ser susceptible a la mayoría de los productos químicos usados (Yordanova *et al.* 2009), en estudios con piretroides como alfacipermetrina se han reportado mortalidades de *D. magna* con una CL_{50} de 1.9 $\mu\text{g/L}$. Los efectos de los insecticidas químicos sobre *D. magna* se consideran como altamente tóxicos en comparación con los efectos tóxicos causados por los hongos. Aunque los estudios de toxicidad aguda son importantes para evaluar el riesgo potencial de los hongos entomopatógenos en *D. magna*, son también necesarios otros estudios como los ensayos de toxicidad crónica o efectos subletales, a fin de evaluar mejor el riesgo de estos hongos para el medio acuático. Dentro de los parámetros reproductivos estudiados se integran tasa de incremento de población, producción de neonatos, longevidad, talla, tasa de infección y malformaciones.

Como se observó en este estudio, la CL_1 de los hongos no causó efectos subletales en la población de *D. magna* pero la CL_{50} de *G. virens* no permitió un incremento de la población (0.44 ± 0.02 organismos/día). Con la cepa de *M. anisopliae* la población de *D. magna* incrementó el triple de su población con respecto al control (2.25 ± 0.21). Existen trabajos con otros agentes de control biológico como *Bacillus thuringiensis* *svar. israelensis* y *Spinosad* en dos microcrustáceos *D. pulex* y *D. magna* en condiciones de laboratorio y campo (Duchet *et al.* 2010), en donde se reportó un impacto negativo de *Spinosad* en las poblaciones de *Daphnia* mientras que *Bti* tuvo poco efecto sobre los parámetros toxicológicos demográficos tanto en campo como en laboratorio, ya que causó un decremento del 20% de la población expuesta.

Respecto a la producción de neonatos de *D. magna*, en condiciones óptimas de cultivo se reporta una producción de 8.96 neonatos diarios (Ortega-Salas & Reyes-Bustamante 2006), mientras que en este estudio, los organismos expuestos a la CL_{50} de la

cepa *M. anisopliae* presentaron una producción de 24.8 neonatos/día y *G. virens* tuvo 0.19 neonatos /día. En el caso de *D. magna* expuestas a insecticidas (Villarroel 2004) se observó que concentraciones superiores a 0.18 mg/L del acaricida Tetradifón producían un descenso significativo en el número de neonatos producidos. En este estudio, tanto la tasa de incremento de la población y la producción de neonatos fueron mayores al exponer *D. magna* al hongo *M. anisopliae*, por lo que quizá esta sea una respuesta de sobrevivencia ante la presencia del patógeno en la que *D. magna* busca la supervivencia de su especie mediante la producción de progenie (Reisen *et al.* 1984). Otro ejemplo de respuesta de sobrevivencia es con hembras de *An. albimanus*, cuando se les induce la oviposición forzada, que consiste en amputar manualmente un ala a las hembras previamente inmovilizadas y ellas como respuesta tienen una sobreproducción de huevos (Dzul *et al.* 2007).

La longevidad promedio de *D. magna* cuando se expuso a la CL₅₀ de *G. virens* fue afectada y se observó que los organismos vivieron menos días (12.66±0.28 días) que el control (22.835.03±2.11 días). En un estudio con el herbicida Propanil, se observó que la concentración más alta utilizada (0.55 mg/L) causó una reducción significativa del 39% en la longevidad con respecto al grupo control que sobrevivió 21 días (Villarroel 2004).

En relación a la talla, *D. magna* es un pequeño crustáceo cuya longitud oscila de 2 a 5 mm (Ramírez 2008), en nuestro trabajo se hizo una comparación de talla entre los tratamientos y no se encontraron diferencias entre el control (2.54±0.29mm) y los organismos expuestos a los hongos *G. virens* (1.54±0.57mm) y *M. anisopliae* (2.52±0.26mm). Martínez-Jerónimo (2008) reporta que la longitud de 1.64 ± 0.09 mm, corresponde a una talla razonablemente adecuada para poder ser manipulada. Hairston *et al.* (1999) reportan que la longitud corporal de hembras adultas de *D. exilis* en muestras de

campo fluctúa de 1.8 a 4.5 mm. Con el insecticida Tetradifón, el tamaño (longitud) de las hembras de *D. magna* se vió reducido (Villarroel 2004), obteniéndose valores de 0.38 cm, con respecto al control que medía 0.48cm. La longitud de los dáfnidos al ser tratados con el herbicida Propanil a 0.55 mg/L se vió reducida a 0.42 cm, mientras que el tamaño de los dáfnidos control fue de 0.48 cm. Como puede observarse en el estudio con insecticidas se presentó una disminución en la talla, en cambio con los hongos entomopatógenos a pesar de estar expuestos a altas concentraciones no presentaron afectación en la talla. En la tasa de infección *M. anisopliae* demostró causar el 57.14% de infección en comparación con *G. virens* quien no causó crecimiento miceliar. Ambas cepas de hongos entomopatógenos no presentaron alteraciones teratogénicas sobre *D. magna*.

De acuerdo a los resultados observados en la pruebas que se realizaron se puede indicar que estas cepas de hongos entomopatógenos podrían ser una buena alternativa para el control de mosquitos vectores, ya que los efectos letales y subletales que causaron sobre *D. magna* son similares a los reportados en otros estudios con hongos y menores a los reportados para insecticidas químicos.

REFERENCIAS

- Bukhari, T., A. Middelman, J.M. Constantianus, W. Takken & G.J. Knols. 2010. Factors affecting fungus-induced larval mortality in *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Malar. J.* 9:22.
- Cáceres, C.L., J.R. Rovira, A. García & R. Torres. 2011. Determinación de la resistencia a insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides en tres poblaciones de *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) de Panamá. *Biomédica.* 31: 419-427.
- Cañedo, V. & T. Ames. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la papa (CIP). P. 62.
- Castillo, R.I., O.R. Gálvez, J.L. Torres & M.G. Vázquez-Martínez. 2013. Control de calidad en la producción del hongo *Gliocladium virens*, patógeno de *Anopheles albimanus* (Wiedemann 1820), vector del paludismo en México. *Interciencia.* 38:387-391.
- CENAPRECE. Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. 2013.<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2013/semanas/sem30/pdf/cua7.pdf>
- Dennis, C. & J. Webster. 1971. Antagonistic Properties of species-groups of *Trichoderma*, I: Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 25-39.
- Duchet, C., M. A. Coutellec, E. Franquet, C. Lagneau & L. Lagadic. 2010. Population-level effects of *spinosad* and *Bacillus thuringiensis israelensis* in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna*: comparison of laboratory and field microcosm exposure conditions. *Ecotoxicol.* 19:1224–1237.

- Dzul, F.A., R.P. Penilla & A.D. Rodríguez. 2007. Susceptibilidad y mecanismos de resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus* del sur de la Península de Yucatán, México. *Salud Pública Mex.* 49:302-311.
- Goettel, S.M. & G.D. Inglis. 1997. 'Fungi: *Hyphomycetes*', in *Manual of Techniques in Insect Pathology*, ed. L.A. Lacey, London: Academic Press, pp. 213–249.
- Hairston, N.G. Jr., L.J. Perry, A.J. Bohonak, M.Q. Fellows, C.M. Kearns & D.R. Engstrom. 1999. Population biology of a failed invasion: Paleolimnology of *Daphnia exilis* in upstate New York. *Limnol. Oceanogr.* 44: 477-486.
- Howard, A., R. N'Guessan, C. Koenraad, A. Asidi, M. Farenhorst, M. Akogbéto, J.G. Bart & T. Willem. 2010. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malar. J.* 9:168.
- Hudson, N.L., E.J. Kasner, J. Beckman, L. Mehler, A. Schwartz, S. Higgins, J. Bonnar-Prado, M. Lackovic, P. Mulay, Y. Mitchell, L. Larios, R. Walker, J. Waltz, S. Moraga-McHaley, R. Roisman & G.M. Calvert. 2013. Characteristics and magnitude of acute pesticide-related illnesses and injuries associated with pyrethrin and pyrethroid exposures-11 states, 2000-2008. *A. J. Ind. Med.* 9:1-16.
- Kikankie, C.K., B.D. Brooke, B.G.J. Knols., L.L. Koekemoer, M. Farenhorst, R.H. Hunt, M.B. Thomas, M. Coetzee. 2010. The infectivity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to insecticide-resistant and susceptible *Anopheles arabiensis* mosquitoes at two different temperatures. *Malar. J.* 9: 2-9.
- López-Cancino, S.A. & M.G. Vázquez-Martínez. 2011. Hongos entomopatógenos para el control de mosquitos vectores de enfermedades. *Gaceta VIVA SALUD.* 3(6): 32-35.

- Martínez-Jerónimo, F., F.E. Chávez & R.V. Córdova. 2000. Effect of culture volume and adult density on the neonate production of *Daphnia magna*, as test organisms for aquatic toxicity tests. *Environ. Toxicol.* 15: 155-159.
- Martínez-Jerónimo, F., J.R. Estrada & L. Martínez-Jerónimo. 2008. *Daphnia exilis herrick*, 1895 (crustacea: cladocera) una especie zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. *Rev. Int. Cont. Amb.* 24:153-159.
- Neetu, V., K. K. Dua & S. Prakash. 2007. Efficacy of *Lagenidium giganteum* metabolites on mosquito larvae with reference to nontarget organism. *Parasitol. Res.* 101:385-390.
- Nestrud, L.B. & R.L. Anderson. 1994. Aquatic safety of *Lagenidium giganteum*: effects on freshwater fish and invertebrates. *J. Invertebr. Pathol.* 64:228-233
- NMX-AA-087-SCFI-2010. Análisis de agua evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, *Straus* (Crustacea-Cladocera) método de prueba.
- Ordóñez, J.G., M.G. Vázquez-Martínez, K.M. Valdez, R.P. Penilla, J.L. Torres & A.D. Rodríguez. 2008. Fundamentos y métodos de control químico e integrado En: Rodríguez M.H., Ulloa G.A., Ramsey W.J.M. Manual para la vigilancia y el control del paludismo en Mesoamérica. P.114.
- Ortega-Salas, A.A. & H. R. Bustamante. 2006. Crecimiento poblacional de *Daphnia magna* Strauss bajo condiciones de cultivo. *Cultivo de organismos acuáticos parte 1. Ciencia y Mar.* P. 3-18.
- Penilla, R.P., A.D. López, F. Solís, I.A. Domínguez & A.D. Rodríguez. 2005. Diagnóstico de los mecanismos de resistencia a insecticidas en los mosquitos vectores de paludismo en Chiapas, Oaxaca y Tabasco, México. *Entomol. Mex.* 4:763-767.

- Prasad, A. & B. Veerwal. 2010. Biototoxicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, against early larval instars of *Anopheline* mosquitoes, J. Herbal Med. Toxicol. 4:181-188.
- Ramírez, R.P. & A. Mendoza. 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Secretaría del Medio Ambiente y recursos naturales. Inst. Nac. de Ecol. P. 17-32.
- Reisen, W. K., M.M. Milby & M. E. Bock. 1984. The effects of immature stress on selected events in the life history of *Culex tarsalis*. J. Am. Mosq. Control. 44:385-395.
- Scholte, E.J., N.N. Basilio, R.C. Smallegange, W. Takken & G.J. Knols. 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae s.s.*) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Malar. 2:29.
- US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs. Biopesticides registration action document. 2002 *Gliocladium catenulatum* strain J1446 (PC Code 021009).
- Vázquez-Martínez, M.G., A. Rodríguez & M. Rodríguez. 2008. Patogenicidad de diferentes cepas de hongos sobre el mosquito *Anopheles albimanus* Wiedemann (Díptera: culicidae), vector de paludismo. Entomol. Mex. 7: 760-763.
- Vázquez-Martínez, M.G. 2011. El futuro de los bioinsecticidas en la salud pública. Gaceta VIVA SALUD. 3(1): 10-13.
- Vázquez-Martínez, M.G., A. Rodríguez, A.D. Rodríguez & M.H. Rodríguez. 2013. Lethal effects of *Gliocladium virens*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the malaria vector *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Bio. Science Technol. Doi.10.1080/09583157.2013.822470.

- Villarroel-Utrilla M.J. 2004. Alteraciones fisiológicas en el crustáceo *Daphnia magna* por exposición a plaguicidas: Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia, España 1-223.
- White, J.N. 2004. Antimalarial drug resistance. *J. Clin. Invest.* 113:8.
- World Health Organization. 2011. World malaria report 2011, World Health Organization, Geneva, 246. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report.
- Yordanova, V., T. Stoyanova., I. Traykov. & B. Boyanovsky. 2009. *Biotechnol. Biotechnol. eq.* 23/2009/. Toxicological effects of fastac insecticide (alpha - Cypermethrin) to *Daphnia magna* and *Gammarus pulex*. Special edition/on-line: 393-395.