

# Investigación

## Control biológico de larvas de la mosca del establo

*Stomoxys calcitrans* con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* in vitro

Edgar J. Bernal, MVZ\*

Víctor H. Arcila, MVZ\*

César A. Serrano-Novoa, MV MS\*

**Resumen.** Como consecuencia del desarrollo de resistencia al uso de acaricidas e insecticidas en el ámbito veterinario y agrícola, se ha generado gran interés en la evaluación, desarrollo y utilización de métodos alternos para el control de los parásitos externos del ganado, tomando como propuesta los hongos entomopatógenos, los cuales generan expectativas. Se han realizado trabajos de evaluación del posible efecto biocontrolador de diversas especies de hongos, éstos se han concentrado en la garrapata *Boophilus microplus*, lo que permite considerarla como una posibilidad de estudio en moscas de importancia veterinaria. Este estudio es un primer paso en el desarrollo de una metodología in vitro para la evaluación a partir de larvas de segundo instar de la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* por el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. Se trabajaron cepas de laboratorios Laverlam®, y tres aislamientos diferentes. Las cepas se aplicaron en varias concentraciones  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  a una temperatura de 23 °C y una HR de 80%, los tres aislamientos se manejaron a una misma concentración,  $1 \times 10^7$ , teniendo como temperatura promedio los 18°C y una HR promedio de 63%. Se evaluó la mortalidad producida por cada concentración de cepa. Ninguna de las cepas mostró actividad en las larvas.

**Palabras clave:** acaricidas, aislamientos, cepas, insecticidas, parásitos externos.

**Abstract.** Due to extensive use of acaricides and insecticides in livestock industries it has been developed a resistance phenomenon that generate the necessity to improve alternative methods for outter parasites control on cattle. Use of entomopathogenic fungus are available strategie. It has been executed checking labors about possible biocontrol effects of several kinds of fungus but these tests are focused on *Boophilus microplus*. This is a first step in the development of an in vitro methodology to evaluate a biological control starting from second instar larvae of *Stomoxys calcitrans* with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Four stocks were evaluated: the first stock was applied with a concentration of  $1 \times 10^2$  conidia/ml,  $1 \times 10^4$  conidia/ml,  $1 \times 10^6$  conidia/ml and  $1 \times 10^8$  conidia/ml of *M. anisopliae*. They were maintained under laboratory conditions at 23 °C and 80% relative humidity. Three isolation were applied with a concentration of  $1 \times 10^7$  conidia/ml of *M. anisopliae*. They were maintained under laboratory conditions at 18 °C and 63% relative humidity. The total mortality produced by each tack was checked. None of the four stoks showed activity on the larvae.

---

\* Centro de Investigaciones en Ciencias Animales (CICA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia. A.A. 2019 Bucaramanga, Colombia. Correo electrónico: dec\_mvz\_bga@correoucc.edu.co

## Introducción

La tendencia mundial a consumir productos orgánicos como estrategia para una mejor calidad de vida ha generado en el consumidor una preferencia por alimentos libres de tóxicos, obligando a la industria agropecuaria a encaminar sus esfuerzos hacia un diseño higiénico y ecológico. Adicionando a lo anterior está el costo por el uso de químicos y su mala utilización, lo que trae como consecuencia el desarrollo de resistencia en algunos ectoparásitos, contaminación de la proteína de origen animal y el ecosistema, entre otros. Todo esto hace pensar en implementar el control biológico, considerando los hongos entomopatógenos como una alternativa para el manejo de los parásitos externos.

Los ectoparásitos afectan al ganado comportándose como vectores de enfermedades y minimizando la eficacia en producción; las formas adultas se alimentan de sangre provocando estrés en el ganado, obligándolo a tener una pérdida de energía al realizar movimientos continuos con la cabeza, las orejas y la cola para contrarrestar el ataque de éstos, disminuyendo así el tiempo de alimentación y causando una baja en las ganancias (4). Las pérdidas económicas causadas por los ectoparásitos provienen de la disminución del crecimiento y las mermas en la producción de carne y leche (se considera que las moscas picadoras causan una disminución del 25% en la producción de carne y leche), de los costos de insumos utilizados para el control de ectoparásitos que muchas veces es intensivo e innecesario y crean dependencia a pesticidas, lo cual se vuelve insostenible a mediano y largo plazo (11).

Dentro de las moscas que afectan la ganadería en Colombia se encuentran las moscas picadoras que se describen como dípteros (insecto con dos alas), de un tamaño superior a 3 mm, que ingieren sangre o fluidos biológicos (moscas hematófagas), y tienen piezas bucales con capacidad de penetrar la piel del animal. Dentro de este grupo de interés veterinario en nuestro país se encuentran la mosca de los cuernos, *Haematobia irritans*, y la mosca del establo, *Stomoxys calcitrans* (5, 19), las cuales representan el 90% de la población de adultos en las explotaciones pecuarias (11).

El género *Stomoxys* cuenta con alrededor de 18 especies. La especie *calcitrans* es la más común en zonas templadas y se encuentra en todo el mundo. Tiene

una probóscide penetrante, ambos sexos se alimentan de sangre (7), y después de alimentarse buscan un nuevo sitio sobre estructuras como el granero, cercas, paredes, árboles. Los adultos prefieren la luz fuerte, pero algunos están siguiendo a animales dentro de construcciones o en el campo (2, 30), y suelen localizarse particularmente en las extremidades.

Después de que la hembra ha tenido un número suficiente de alimentaciones sanguíneas pone los huevos sobre la paja húmeda, el estiércol o material en descomposición; la hembra puede poner 500 huevos en grupos de 25-50. Las larvas se alimentan de material vegetal. En clima caliente, el ciclo de vida en promedio dura 4 semanas, pero puede variar de 3 a 7 semanas, dependiendo de la temperatura (30).

La mosca de los establos, al succionar la sangre, causa una picadura dolorosa y es una de las más molestas para el ganado. Se piensa que puede transmitir anemia infecciosa equina y surra entre los caballos. Se sospecha que transmite anthrax entre otros animales. En muchos casos, es el vector mecánico de protozoarios y puede ser intermediario del nemátodo *Habronema* (30).

Uno de los problemas que sin duda está afectando seriamente la productividad ganadera es la presencia tan alta de moscas en las explotaciones. Durante los últimos 8 a 10 años, estos ectoparásitos han tenido una presencia continua durante todo el año, generando un problema permanente y dejando de ser un fenómeno de tipo estacional (8).

Un factor que ha favorecido el gran incremento en la población de moscas es su ciclo biológico corto. Éste es un punto importante para su control, ya que este parásito tiene la capacidad de producir un gran número de generaciones en el año las cuales representan un riesgo en la producción de bovinos (8).

Durante muchos años, los productos utilizados para el control de estos ectoparásitos han estado basados en sustancias químicas como fosforados, piretroides e ivermectinas, aplicadas en diversas formulaciones y presentaciones: polvos, aditivos en el alimento, aspersión, aretes, aplicaciones "pour on" e inyectables (8). Sin embargo, la resistencia es un fenómeno que se presenta en cualquier tipo de población (insectos, artrópodos, bacterias, etc.) y se manifiesta cuando una población es sometida a la acción de alguna sustancia

en forma constante, de tal manera que algunos, por sus características genéticas, se van haciendo resistentes a ciertas dosis y una vez desarrollada esta capacidad, éstos sobreviven y, al reproducirse su descendencia, es también resistente. Por principio, el control de moscas debe estar basado en estrategias culturales y uso de trampas, reservando la utilización de pesticidas para épocas críticas de alta infestación (20, 25).

Actualmente el control biológico de las plagas de importancia agrícola y pecuaria es una práctica de proyecciones incalculables, y en Colombia existe la necesidad de adaptar esta biotecnología con mayor atención y dedicación (29). El control biológico es la manipulación, por parte del hombre, de algunos agentes de control natural, sin importar que el insecto que se pretende controlar o los agentes de control (parásitos, predadores o patógenos) sean nativos o hayan sido introducidos, y su principal prioridad es la limpieza ecológica. No se conoce en el mundo un ejemplo que indique que este sistema haya tenido efectos deletéreos en el ecosistema. Otra ventaja es la posibilidad de integrarlo con otros métodos de control, incluso con el químico. Dado que en Colombia el desarrollo y la implementación de programas cuidadosos de control integrado ha sido relativamente reciente, el manejo de programas insectiles ha estado basado en la utilización de insecticidas, en la mayoría de los casos de una manera indiscriminada, lo que ha ocasionado un gran deterioro en la calidad de los alimentos. Durante los últimos años ha venido tomando auge en el país el control biológico que, aunque modesto en comparación con países más ricos o científicamente más avanzados, ha tenido ejecuciones brillantes, como es el caso del control de plagas de la caña del Valle del Cauca en agricultura (9).

El uso de enemigos naturales contra las plagas se inició en el país hace más de setenta años, específicamente en 1913 cuando los doctores Federico Lleras Acosta y Luis Zea Uribe introdujeron desde México la bacteria *Coobacillus acridiorum* para el control de la langosta que en ese entonces destruía diversos cultivos nacionales. En 1930, el doctor Luis María Murillo importó desde Estados Unidos la avispa parásita *Aphelinus mali* (Haldeman) para el control del pulgón lanígero del manzano *Erisoma lanigerum* (Hausman)

que atacaba los huertos de ese frutal en el departamento de Boyacá.

La expansión moderna del control biológico alcanza en la década de los años sesenta y setenta su mayor dinámica en el país, cuando los ingenieros azucareros establecen laboratorios de crías masivas de la avispa *Trichogramma spp.* para el control de plagas de la caña, ejemplo que es seguido en forma entusiasta por empresarios privados quienes montan diversos laboratorios en la costa Atlántica, Santander y Valle del Cauca.

El conocimiento del uso de los hongos entomopatógenos para el control de plagas no es muy reciente. En 1934, el padre de la patología de insectos, Agostino Bassi, realizó un estudio sobre la enfermedad conocida como muscardina blanca del gusano de seda, denominada *Beauveria bassiana* por Vuillemin en 1912. Sin embargo, gran parte del mérito por el uso de microorganismos en control de plagas se atribuye al ruso Metschnikoff, quien, en 1878, estudió el control del coleóptero de los granos *Anisoplia austriaca* con el hongo *Metarhizium anisopliae*. Alves (1986) asegura que cerca del 80% de las enfermedades que ocurren en insectos son causados por hongos y que los géneros más frecuentes son: *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Erynia*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomurea* y *Penicillium*. Las especies de hongos más usadas son *Beauveria bassiana*; seguida por *M. anisopliae* (1).

Los hongos entomopatógenos tienen una adaptación parasitaria debida al resultado de un proceso de evolución que ha venido desarrollándose a través del tiempo (6). Han presentado mutaciones y recombinaciones que favorecieron el desarrollo de mecanismos enzimáticos, permitiéndoles utilizar los hospederos que se encuentran; disponibles en sus diferentes hábitat para persistir en las condiciones ambientales en que se encuentran, esto explica que la patogenicidad y la virulencia de los entomopatógenos están reguladas por un proceso enzimático y por uno o por varios genes, por lo cual, el grado de intensidad con que este fenómeno se presente está regido por la acción de los factores climáticos, y la estructura espacial y genética de la población plaga hospedera, lo que podría explicar la variabilidad de la patogenicidad y virulencia entre especies y cepas (18).

Dentro de los factores que regulan la patogenicidad se encuentran: especificidad, capacidad de adhesión, producción de exoenzimas, formación de estructuras apresorios y producción de toxinas. Se ha encontrado que entre las especies de hongos existe la tendencia a perder su capacidad de germinación, de crecimiento, de la formación de apresorios, la producción de enzimas y de infectar insectos e incluso hasta matarlos (26), de donde se destaca que el continuo pase sobre medios, la calidad de los constituyentes, el pH, la temperatura, la humedad relativa y el pase del patógeno sobre insectos no específicos, hacen que pierdan gradualmente sus características culturales antes mencionadas repercutiendo en su patogenicidad y virulencia. También se ha demostrado –tanto en el laboratorio como en el campo– la sensibilidad de los hongos a la radiación solar y más específicamente a la ultravioleta, afectando principalmente la germinación y por consiguiente la patogenicidad (10, 13).

A diferencia de otros agentes entomopatógenos, los cuales deben ser ingeridos para invadir al hospedero, los hongos generalmente penetran en el insecto a través de su cutícula externa, actuando como insecticidas de contacto. Esta cualidad única les permite ampliar el espectro de hospederos y atacar a insectos chupadores, entre otros. Las esporas de los hongos son las que inician el proceso patogénico, luego de su adhesión a la superficie de los insectos, y constituyen la base de los productos insecticidas comerciales. Una vez adheridas, las esporas germinan y empiezan a penetrar a través de la cutícula gracias a una combinación de presión mecánica y acción enzimática que va degradando esta estructura externa. Dentro del insecto, los hongos empiezan rápidamente a crecer y a producir toxinas que les permiten evadir la respuesta inmune del insecto y que en muchos casos son la causa directa de la muerte del hospedero. Una vez que el hongo ha consumido todos los nutrientes y tejidos del insecto, emerge y produce esporas, continuando con el ciclo patogénico.

*M. anisopliae* es un hongo parásito facultativo, cuya reproducción asexual se realiza a partir de conidios, que al germinar sobre la cutícula del insecto producen una toxina, causando la muerte de éste al ocurrir la invasión de su cuerpo por el hongo (27).

El ciclo biológico del *M. anisopliae* comprende dos fases: una patogénica y otra saprofítica. La fase de

patogénesis ocurre cuando el hongo entra en contacto con el tejido vivo del huésped y la humedad en el microclima es del 85% o más.

*M. anisopliae* es un parásito facultativo que posee conidias que constituyen la unidad infectiva del hongo. El proceso infectivo que lleva al insecto atacado por el hongo a morir se cumple en tres fases: la primera fase de germinación de esporas y penetración de hifas al cuerpo del hospedero dura de 3 a 4 días. La penetración del hongo al hospedero ocurre a través de la cutícula o por vía oral. Cuando la penetración se da por la cutícula intervienen lipasa, quitinazas y porretazas. El tubo germinativo de la conidia invade directamente, produciendo apresorios que penetran la epicutícula, dando lugar a cuerpos hifales que se desarrollan en el hemocelo y circulan en la hemolinfa (27).

La patogenicidad del hongo sobre los insectos depende de una compleja relación entre la habilidad del hongo para penetrar la cutícula y la fortaleza del sistema inmunológico del insecto para prevenir el desarrollo del mismo. Esta relación se debe a factores concretos incluidos las diferencias cuticulares, la penetración cuticular y las reacciones inmunes. El desarrollo del hongo sobre el insecto puede ser influenciado por la eficacia de los hemocitos en encapsular y melanizar el patógeno. Casi siempre los hematocitos se agregan al lugar de la penetración cuticular, formando algunas veces nódulos alrededor de las esporas inyectadas. En el interior de los insectos la germinación usualmente procede de esporas que están fuera de la agregación de hematocitos pero para que se desarrollen siempre deben estar afuera del agregado (27).

La segunda fase es la invasión de los tejidos por parte del micelio del hongo hasta causar la muerte del insecto y dura de 2 a 3 días. Durante el proceso de invasión del hongo se producen una gran variedad de metabolitos tóxicos. El *M. anisopliae* produce gran variedad de metabolitos secundarios. Los compuestos tóxicos más estudiados han sido las destruxinas. Estos ciclodepsipéptidos son producidos durante el crecimiento micelial, y hasta el momento se han identificado más de 14, de los cuales los más importantes son destruxina A, B, C, D, E y desmetildestruxina B. Los síntomas de la enfermedad en el insecto son la pérdida de sensibilidad, incoordinación de movimientos y parálisis. Cuando el insecto muere queda momificado.

Algunas veces se pueden presentar zonas de pigmentación localizadas que corresponden a los sitios de penetración de las conidias en el tegumento (27).

Finalmente sigue la tercera fase, 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 finalmente cubrirlo. Tras la muerte del insecto, y bajo unas condiciones de humedad relativa alta, las conidiosporas pueden extenderse a través del cuerpo cubriéndolo con material fungoso característico. Los conidióforos del género *Metarhizium* son montículos bajos, cubiertos de conidias erectas, ramificadas y agrupadas en una copa fértil, filídicas solitarias en pares o en haces con conidias apicales basipétalas, catenuladas, en columnas subovoides o cilíndricas, y con extremos redondeados unicelulares de color verde oliváceo en masas (27).

Los estudios de control biológico de la mosca del establo *S. calcitrans* han sido muy pocos; es importante mencionar que en Estados Unidos se están usando dos especies de microhymenopteros de la familia Pleromalidae: la *Spalangia endius* y *Muscidifurax raptor* (16). En Argentina, para el control tanto de mosca doméstica como de la mosca del establo usan *Pachycrepoideus vindemmiae* y *Spalangia cameroni*, las cuales tienen una alta capacidad de búsqueda de pupas de moscas para parasitarlas, colocando en éstas sus huevos. En este país también se utiliza el hongo *Entomophthora sp.*, que en condiciones de alta humedad ambiental produce una gran mortalidad en la población de moscas.

Hogsette (1994) menciona la presencia de una especie de *Coptera sp.*, no identificada, parasitando pupas de *Stomoxys calcitrans* L. en Hungría (17).

En la industria avícola, por el gran problema que se tiene de mosca, se han desarrollado programas de control integrado con énfasis en el control biológico y en particular con liberación de avispas parasitoides (28).

Morgan y cols., entre 1975 y 1979, reportaron programas de liberación de *Spalangia endius* y *Muscidifurax raptor* en lecherías y granjas avícolas de postura y de engorde, con óptimos resultados y alto parasitismo tanto sobre *Musca domestica* (L.) como en *Stomoxys calcitrans* (21, 22).

El parásito hembra deposita un solo huevo dentro de la pupa, y tanto ella como su progenie se ali-

mentan de hemolinfa de la pupa. El nuevo individuo entre los 20 y los 35 días (dependiendo de las condiciones climáticas) para comenzar inmediatamente la búsqueda del área hospedera, la localización de la pupa, el tanteo y la perforación de la misma y su alimentación y postura (23).

La avispa parásito puede vivir a expensas de por lo menos otras cinco especies de moscas que se encuentran regularmente en gallineros y establos tales como *Stomoxys calcitrans* L., *Siphona irritans* L., *Fannia canicularis* L., *F. femoralis* L. (12).

## Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Universidad Cooperativa de Colombia, seccional Bucaramanga, y la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, por tanto el ensayo da cuenta de los procesos adelantados en dos espacios geográficos distintos (Bucaramanga y Bogotá).

**Bucaramanga:** ubicada a los 7° 08' de latitud norte con respecto al Meridiano de Bogotá, y 73° 08' de longitud al oeste de Greenwich. Su altura sobre el nivel del mar es de 959 m, y sus pisos térmicos se distribuyen en cálido, 55 kilómetros cuadrados; medio, 100 kilómetros cuadrados; y frío, 10 kilómetros cuadrados. Su temperatura media es 23 °C y su precipitación media anual es de 1.041 mm.

Bogotá: ubicada a los 4° 35' 56", latitud norte, y a los 74° 04' 51" longitud oeste; altura, 2.600 m sobre el nivel del mar. Cuenta con una temperatura media de 14 °C y varía entre 8,9 y 19,9 °C.<sup>1</sup>

En este estudio se elaboraron tres colonias de laboratorio, dos en la ciudad de Bucaramanga creadas bajo las mismas condiciones en las instalaciones del Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia, y una tercera colonia en los laboratorios de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

La captura de la muestra estudiada en Bucaramanga se realizó en una finca ganadera ubicada en la Mesa de los Santos (Santander) de nombre La For-

<sup>1</sup> [www.alcaldiabogota.gov.co](http://www.alcaldiabogota.gov.co)

tuna, y propiedad de la Universidad Cooperativa de Colombia; para la captura se prepararon tres jaulas entomológicas de 65 cm de largo por 45 cm de ancho, de marcos y piso de madera; para las paredes y el techo se utilizó tul, con una manga en la parte superior hecha de este mismo material, y con un cierre en uno de los lados de la caja entomológica. También fue necesaria una red entomológica o jama hecha de tul y mango de madera.

Como técnica de captura se utilizó la descrita por Mwangala y Galloway (1993), en donde brevemente describen que teniendo amarrado el individuo (bovino, equino) se hace un barrido horizontal en la parte baja de las extremidades del animal; una vez capturadas las moscas en el primer barrido, se cuentan y se llevan a la jaula entomológica teniendo cuidado de no producir lesiones en la muestra. Este procedimiento se realiza hasta completar 200 moscas por caja entomológica (24).

La captura de la muestra estudiada en Bogotá se realizó en el hato ganadero ubicado en las instalaciones de la Universidad Nacional, para lo cual se utilizaron dos cajas entomológicas de 30 x 30 cm, de marcos de madera y paredes de tul, con un cierre de velcro en los orillos de una de sus caras, también se utilizó una jama de tul y mango metálico. La técnica utilizada fue la misma empleada en Bucaramanga. Fueron capturadas 200 moscas *S. calcitrans* por caja entomológica.

Capturada la muestra se creó un ambiente propicio para la mosca del establo, para lo cual fue necesario realizar varios ensayos y adaptaciones en cuanto a las medidas más adecuadas de las jaulas entomológicas, modo de transportarlas de la finca al laboratorio, suministro del alimento, etc. Como medio de oviposición se utilizaron tasas plásticas de 12 cm de diámetro y 7 cm de alto con estiercol fresco de ganado, teniendo la precaución de que el animal del cual se recogió no estuviera en tratamiento con antibióticos y que no hubiera recibido antiparasitarios dos meses atrás (15). Diariamente se humedeció con un atomizador que contenía agua. Para alimentar las moscas del establo se utilizó sangre citratada, la cual se mantenía refrigerada; diariamente se sacaron 40 cm de sangre en tubos de ensayo, se calentaron a 37 grados centígrados al baño María, y se regó la sangre en tapas de cajas Petri, las cuales fueron colocadas separadas en las cajas entomológicas. También se les suministró agua azucarada en tapas

de cajas Petri. La sangre y el azúcar fueron cambiadas dos veces al día (3, 4, 31).

Las moscas se mantuvieron a una temperatura promedio de 23 grados centígrados, una humedad relativa promedio de 55% y una intensidad de luz de 12 horas diarias.

Para el presente estudio se utilizó el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para tres bioensayos. Para los dos primeros bioensayos realizados en Bucaramanga se contó con una cepa comercial marca Laverlam®, lista para su aplicación; las cepas utilizadas en la ciudad de Bogotá provenían de unos aislamientos hechos de *Genus spp.* (Chiza) (Coleoptera: Melolonthidae), producto de una investigación hecha por un estudiante de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia.<sup>2</sup>

Para el caso del estudio en Bucaramanga, el hongo se preparó en agua destilada estéril, disolviéndola en éste a concentraciones de  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$ , y cada concentración fue introducida en atomizadores; en Bogotá, el hongo se encontraba sembrado en medio de cultivo sabouraud-dextrosa-agar (SDA). Se realizó un raspado del hongo y se diluyó en 10 ml de agua destilada estéril que contenía Tween-80 al 0,05%, se homogeneizó durante 30 segundos. Se contabilizaron las esporas a esta solución madre con ayuda de la cámara de Neubauer en un microscopio binocular de contraste de luz, siguiendo la metodología de Goettel e Inglis (14). Se realizaron dos diluciones hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas. Este mismo procedimiento se realizó para obtener las concentraciones de cada una de las cepas.

El bioensayo se desarrolló en tres etapas, las dos primeras en Bucaramanga y la última en la ciudad de Bogotá.

**Primera etapa.** El bioensayo se llevó a cabo en un cuarto de 1x2 m de madera con temperatura promedio de 23 °C y una humedad relativa promedio de 80%. El ensayo se realizó con larvas de 2 instar de la mosca del establo *S. calcitrans*, provenientes de la colonia de laboratorio. Los insectos fueron mantenidos en tazas de vidrio de 12 cm de diámetro y 5 cm de profundidad

<sup>2</sup> César Zuluaga Castro, Identificación de chizas y enemigos naturales y cultivos de papa y pastos en Cundinamarca.

que contenían un medio de crianza larval, que previamente se había preparado con estiércol fresco colocado en baño serológico a 80 °C durante 30 minutos, se repitió esto por tres días consecutivos.

La unidad experimental estaba conformada por una caja entomológica de 30x30 cm hecha de marcos y piso de madera con paredes de tul, la cara frontal tenía un cierre velcro en tres de sus orillos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Tratamientos evaluados en el bioensayo para medir la actividad insecticida de *M. anisopliae*.

Cepa	Concentración	No. Individuos/Réplica
Laverlam	1x10 <sup>2</sup> conidias	60
Laverlam	1x10 <sup>4</sup> conidias	60
Laverlam	1x10 <sup>6</sup> conidias	60
Laverlam	1x10 <sup>8</sup> conidias	60
Testigo tratado	0	60
Testigo absoluto	0	60

En el interior de cada jaula se colocó una taza de vidrio con el medio de crianza larval que contenía 60 individuos, cada jaula contaba con una toalla en la parte superior, la cual se humedecía constantemente para mantener la humedad. El cuarto se mantuvo en oscuridad durante todo el bioensayo.

El hongo fue rociado con un atomizador por concentración en las tazas de vidrio las cuales ya contenían las larvas, se humedeció totalmente el estiércol con 20 disparos que equivalieron al total del volumen utilizado (Figura 1).



**Figura 1.** Caja entomológica, recipiente de bioensayo y atomizador con el cual se roció el hongo.

**Segunda etapa.** Se realizó a los dos meses de haber realizado la primera etapa. El procedimiento tuvo las mismas características que la anterior, con una variante en la forma de aplicar el hongo. Cada grupo de larvas, antes de ser colocado en las tazas con el medio de crianza larval, fue sumergido en la concentración durante 30 segundos.

**Tercera etapa.** Se llevó a cabo en un laboratorio de entomología de la Universidad Nacional, en un estante con cortinas negras que evitaba la entrada de luz; se mantuvo una temperatura promedio de 18 °C y una humedad relativa promedio de 63%. El ensayo también se realizó con larvas de segundo instar provenientes de la colonia de laboratorio que se mantenía en esta ciudad. La unidad experimental (replica) estaba conformada por una caja de Petri con medio de crianza larval con el mismo tratamiento de las etapas anteriores (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tratamientos evaluados en el bioensayo para medir la actividad de *M. Anisopliae*.

Cepa	Concentración	Réplica	No. Indiv/Réplica
Cun004	1x10 <sup>7</sup>	7*	5
Cun005	1x10 <sup>7</sup>	7*	5
Cun066	1x10 <sup>7</sup>	7*	5
Testigo tratado	0	6	5
Testigo absoluto	0	6	5

\* Las réplicas que fueron rociadas con hongo tienen una más que las que no fueron rociadas con el hongo, porque ésta no cuenta con medio de crianza larval sino con papel filtro humedecido, para empezar una reactivación del hongo.

Cada grupo de larvas fue colocado en un tul estéril y luego sumergido en hipoclorito de sodio al 0,05% por 30 segundos, después se hicieron tres pases por agua destilada que se encontraban en tres recipientes distintos. Una vez desinfectadas las larvas fueron rociadas con el hongo mediante un micro aspersor, se esperó que se secaran y se pasaron a las cajas de Petri con el medio de crianza larval.

Las cajas fueron ubicadas en el estante separando cada grupo de réplicas por 20 cm de distancia.

## Diseño experimental

### Bucaramanga

La unidad experimental comprendió grupos de 60 larvas de segundo instar; se tuvieron en cuenta dos controles: a) control tratado (individuos asperjados sólo con agua destilada estéril), b) control absoluto (individuos no asperjados). La cepa de hongo fue evaluada en 4 concentraciones de esporas por mililitro de solución:  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  trabajando una réplica para cada concentración.

### Bogotá

La unidad experimental comprendió grupos de 5 larvas de segundo instar; se evaluó un total de 3 cepas de hongo cada una en una concentración  $1 \times 10^7$  trabajando 7 réplicas para cada concentración. Se tuvieron en cuenta dos controles: a) control tratado (individuos asperjados sólo con agua destilada estéril), b) control absoluto (individuos no asperjados).

La evaluación y toma de datos se realizó desde el siguiente día de la aplicación, llevando un registro diario de la mortalidad en cada grupo de individuos o repetición (Bogotá). El registro se realizó hasta que el control absoluto llegó a un 100% de eclosión de moscas adultas. Con el propósito de verificar la causa de la muerte, los individuos muertos colectados fueron colocados en cámara húmeda a temperatura ambiente.

## Resultados y discusión

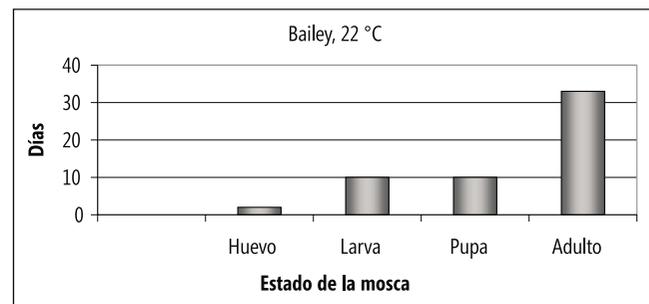
El tiempo del ciclo biológico de la mosca en el laboratorio varía en las tres etapas del proyecto, teniendo en cuenta que la mosca provenía de dos espacios geográficos distintos, es por ello que a continuación se presentará las características de cada una de ellas tomando como referencia lo descrito por Bailey y cols. en 1975 (3) en estudios hechos en laboratorio (Tabla 3). (Véanse las Figuras 2, 3, 4 y 5).

Las diferencias encontradas en esta investigación se pudieron presentar por el clima y el microclima como factores determinantes en el desarrollo de *S. calcitrans* (30). En la evaluación de la cepa del hongo *M. anisopliae* a las concentraciones de  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  sobre larvas de 2 instar de *S. calcitrans* a partir del trabajo adelantado donde la larva fue expuesta al

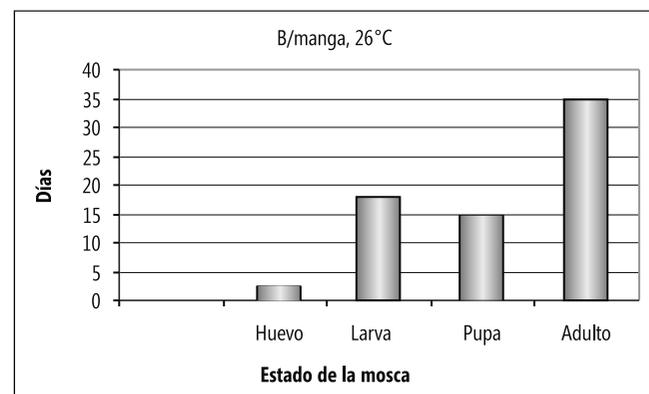
hongo a una temperatura y humedad controladas en una habitación construida en su totalidad en madera se encontró que la viabilidad de las larvas de la mosca del establo *S. calcitrans* no fue afectada por la exposición al hongo en las diferentes concentraciones, dado que en los grupos tratados se presentó una mínima mortalidad –de 1 a 2 larvas por unidad experimental–.

**Tabla 3.** Número de días en cada estado del ciclo de vida.

Estado	Bailey y cols., 1975 22 °C	Bucaramanga 26 °C	Bogotá 24 °C
Huevo	2 días	2 días	12 días
Larva	10 días	18 días	30 días
Pupa	10 días	15 días	21 días
Adulto	33 días	35 días	52 días



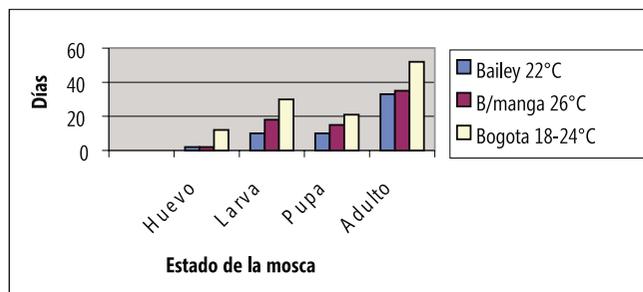
**Figura 2.** Gráfica del tiempo de los diferentes estados de la mosca a una temperatura de 22 °C según Bailey.



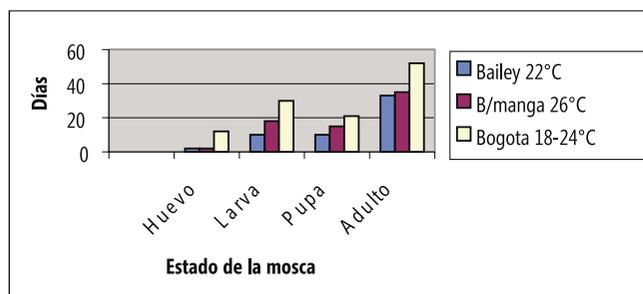
**Figura 3.** Gráfica del tiempo de los diferentes estados de la mosca a una temperatura de 26 °C en Bucaramanga.

En términos generales, se puede afirmar que la mortalidad no se incrementó con la concentración de hongo y que se distribuyó de modo casi aleatorio entre

tratamientos (Figura 6). La mayor mortalidad se observó en  $1 \times 10^6$ , y ésta fue en un espacio de tiempo muy largo entre ellas.



**Figura 4.** Gráfica del tiempo de los diferentes estados de la mosca a una temperatura de 18 a 24 °C en Bogotá.



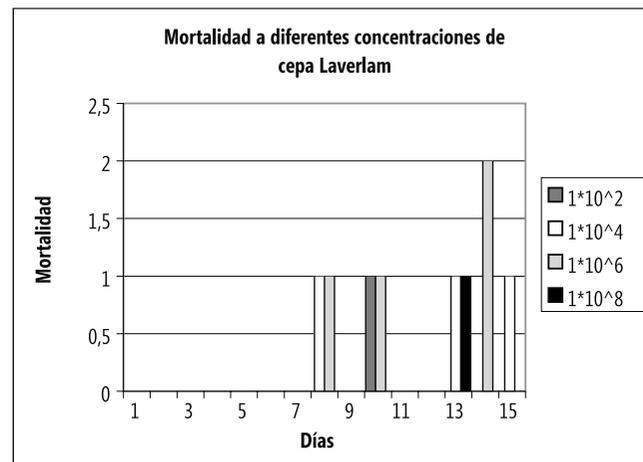
**Figura 5.** Gráfica del tiempo de los diferentes estados de la mosca a diferentes temperaturas.

**Tabla 4.** Mortalidad de la cepa Laverlam a diferentes concentraciones.

Mortalidad de la cepa Laverlam				
Número de días	Mortalidad			
	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^8$
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	1	1	0
9	0	0	0	0
10	1	0	1	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	1	0	1
14	0	0	2	0
15	0	1	0	0

Evaluación de los aislamientos del hongo *M. anisopliae* a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/ml sobre larvas de segundo instar de *S. calcitrans*. La viabilidad de las larvas de segundo instar no fue afectada por la exposición al hongo con ninguna de las tres cepas utilizadas, dado que en los grupos tratados se presentó una mínima mortalidad, de 1 a 3 larvas por cepa.

En general se puede decir que el hongo no mostró ningún efecto sobre las larvas, ya que la mayor mortalidad se encontró en la cepa CUN004 con 4 muertes que se presentaron en el día 14 la primera, dos en el día 15 y la tercera en el día 19. Las cuatro larvas fueron puestas en cámara húmeda para observar el crecimiento del hongo y determinar si esta fue la causa; esperados 5 días no se observó crecimiento del hongo.



**Figura 6.** Mortalidad a diferentes concentraciones de cepa comercial de Laverlam.

Las moscas mantenidas en laboratorio en cajas entomológicas de 70x70 cm (200 moscas) presentaron el menor porcentaje de mortalidad (del 10%) ofreciéndoles unas condiciones de luz muy parecidas a las que tienen en libertad, y proporcionándoles el principal alimento para su oviposición y mantenimiento.

A medida que disminuye la temperatura en la cría de la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* en laboratorio se encontró que, al igual que lo descrito por Bailey y cols. en 1975, aumenta el número de días en cada uno de sus estados del ciclo de vida (3).

A manera de conclusiones, al aumentar la concentración de la cepa Laverlam sobre las larvas de se-

gundo instar de la mosca del establo *S. calcitrans* no se encontró susceptibilidad. Las larvas de segundo instar de esta mosca no son susceptibles por las cepas CUN 004, CUN 005, CUN 066 en la concentración de  $1 \times 10^7$  conidias/ml; la mortalidad no pasó de 2,4%.

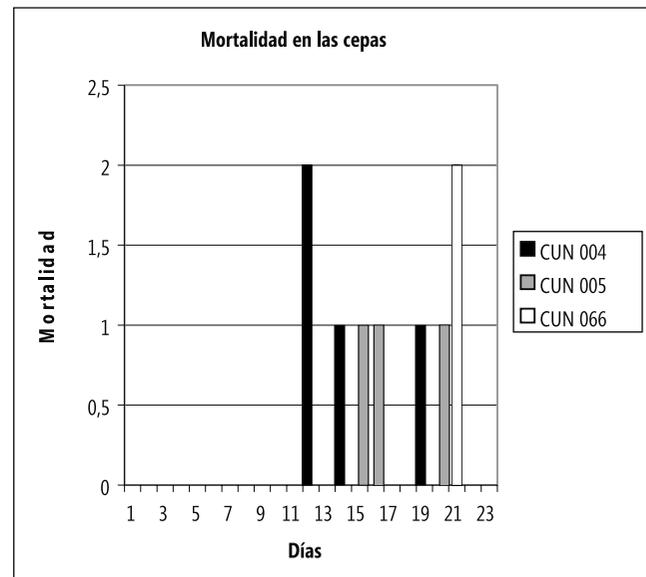
**Tabla 5.** Mortalidad de las diferentes cepas a una misma concentración

No. Días	Cun 004	Cun 005	Cun 066
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	2	0	0
13	0	0	0
14	1	0	0
15	0	0	1
16	0	0	1
17	0	0	0
18	0	0	0
19	1	0	0
20	0	0	1
21	0	2	0
22	0	0	0
23	0	0	0

La reactivación de las cepas es un factor importante para aumentar la virulencia de éstas. Es necesario evaluar nuevas especies y cepas de hongos entomopatógenos sobre huevo, larva y pupa de la mosca de establo *S. calcitrans* para determinar su eficacia biocontroladora y realizar nuevos bioensayos con diferentes hongos entomopatógenos que hayan demostrado agresividad en el control de ectoparásitos en el ganado.

Para la realización de futuras pruebas in vitro se recomienda utilizar un número mayor de cepas del

hongo entomopatógeno, y un mayor número de concentraciones, asegurando así la confiabilidad de los resultados. Si se llegaran a encontrar cepas de hongos más promisorias, se debe tratar de desarrollar pruebas a nivel de praderas para determinar el posible efecto del hongo sobre poblaciones larvarias de moscas.



**Figura 7.** Mortalidad de las larvas con las cepas CUN004, CUN005, CUN066 a una concentración de  $1 \times 10^7$ .

## Referencias

1. Alves SB. Patología general. En: Manole, editor, Control microbiano de insectos. Brasil; 1986; pp. 1-70 y 237-277.
2. Anderson JR, Poorbough JH. Observations on the ethology and ecology of various diptera associated with northern California poultry ranches. J Med Entomol 1964; 1: 131-147.
3. Bailey DL, Whitfield TL, LaBrecque GC. Laboratory Biology and techniques for mass producing the stable fly, *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). J Med Ent 1975; 12 (2): 189-193.
4. Benavides OE. Manejo integrado de plagas y enfermedades en explotaciones ganaderas. Control de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. En: Carta Fedegan No. 69, 2001.
5. Benavides OE, Romero NA. Manejo integrado de plagas y enfermedades en explotaciones ganaderas. Con-

- sideración para el control integral de parásitos externos del ganado. En: Carta Fedegan No. 70, 2001.
6. Bigler L. Quality assessment and controlling entomofagous insects used for Biological. *J Appl Ent* 1989; 108: 390-400.
  7. Bishop FC. The stable fly (*Stomoxys calcitrans*) an important livestock pest. *J Econ Entomol* 1913; 6: 112-126.
  8. Cantú Covarrubias A. Estudio sobre la resistencia de la mosca del cuerno (*Haematobia irritans*) a insecticidas en bovinos en Tamaulipa. Campo experimental Aldama INIFAP. 2002.
  9. Cardona C. Control biológico alternativa ecológica y económica. En: Colombia Ciencia y Tecnología 1990; 8(3): 17-18.
  10. Carruthers RI, Feng Z, Ramoss ME, Soper RS. The effect of solar radiation on the survival of *Entomophaga grilli* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) conidia. *J Invertebrate Pathol* 1988; 52: 154-162.
  11. Cassalet E. Reconocimiento, dinámica y control de dípteros de importancia veterinaria. En: Epidemiología, diagnóstico y control de enfermedades parasitarias en bovinos. Corpoica. Compendio No. 2, 1996, Medellín, Colombia.
  12. De Bach P. Lucha biológica contra los enemigos de las plantas. Mundiprensa, 1977, pp. 226-285.
  13. Farguez J, Rougier M, Gouget R, Itier B. Effect du rayonnement solaire sur la persistance des conidiospores de l'hyphomycete entomopathogene *Nomurea rileyi*, a la surface d'un couvert vegetal. *Entomophaga* 1988; 33(3): 357-370.
  14. Goettel MS, Inglis GD. Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey LA, editor. *Manual of techniques in insect pathology*. London: Academic Press Limited; 1997. pp. 213 - 249.
  15. Herd RP. Endectocidal drugs: Ecological risks and counter measures. *Parasitology* 1995; 25:875-885.
  16. Hernández J, Rosales. Control biológico de *Stomoxys calcitrans* MAG, 1997.
  17. Hogsette J. Hymenopteran pupal parasites recovered from house fly and satable fly (*Dip: Muscidae*) pupae collected on livestock and poultry facilities in Northern and Central Hungary. *Environ Entomol* 1994; 23 (3): 778-781.
  18. Lezama R. Patogenicidad de hongos parásitos de insectos. En: Memorias primer seminario de patología. Facultad de las Ciencias Biológicas Aplicadas. Universidad de Colima. Tecoman Colima, 1994, p 47-81.
  19. López VG. Control de garrapatas. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Compendio No. 39, Medellín, Colombia, 1980.
  20. McKenzie CL, Byford RL. Continuous, alternating, and mixed insecticides affect development of resistance in the horn fly (*Diptera: Muscidae*). *Econ Entomology* 1993; 86(4): 1040-1048.
  21. Morgan PB. Rearing and release of the house fly pupal parasite *Spalangia endius*. *Environmental Entomol.* 1975; 4 (4): 609-611.
  22. Morgan PB. Interrelationship between two species of muscoid flies and pupal parasitoid *S. endius*. *J Med Entomol* 1979; 16 (4).
  23. Morgan PB. The potential use of parasites to control *M. somestica* and other fly breeding flies at agricultural installations in the Southern United States. Department of Agricul, 1981.
  24. Mwangala S, Galloway T. D. Susceptibility of horn flies, *Haematobia irritans* (L.) (*Diptera: Muscidae*) to pyrethroids in Manitoba. *Canadian Entomol* 1993; 125: 47-53.
  25. Pickens LG, Schmidtman ET, Miller RW. Como controlar la mosca doméstica y del establo sin usar pesticidas. Departamento de Agricultura de Estados Unidos, boletín de información No. 673, 1994. p. 14.
  26. Raid R, Cherry R. Effects of soil parameters on pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae* to the sugarcane grub 27. *Ligyris subtropicus* (*Coleoptera: Scarabaeidae*). *Fla Entomol.* 1992; 75(2): 179-184.
  28. Rodriguez DA. Uso de patógenos para el manejo de insectos plagas. Colombia ciencia y tecnología 1990; 8 (3): 19-21.
  29. Rutz D, Axtell R. House fly (*M. domestica*) parasites associates with poultry manure in North Carolina. *Entomol. Soc Am* 1980; 9 (2).
  30. Vergara R. El control biológico a lo largo de la historia. Colombia Ciencia y Tecnología 1990; 8 (3): 6-7.
  31. Wall R Shearer D. Arthropod ectoparasites of veterinary importance. *Vet Entomol* 1997; 163-165.
  32. Whitfield T L, Labreque G C, Patterson R S, Meifert D W. Effect of gamma irradiation on sterility and longevity of Stable flies. *J Econ Entomol* 1978; 71: 608-609.