



Instituto Tecnológico para  
La Agricultura Sustentable



# INFORME TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

“Desarrollo y producción de un insecticida biológico para el control de la mosca domestica (*Musca domestica L.*) en planteles avícolas.”

Código: PYT-2011-0042

Instituto Tecnológico para la Agricultura  
Sustentable. ITAS

Santiago 2014.

## INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

### I. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del Proyecto: “Desarrollo y producción de un insecticida biológico para el control de la mosca domestica (*Musca domestica L.*) en planteles avícolas.”

Código: PYT-2011-0042

Región Metropolitana.

Fecha de aprobación o adjudicación; Abril 2011

Forma de Ingreso al FIA: Concurso Innovación 2010

Agente Ejecutor y Asociados:

Ejecutor: Instituto Tecnológico para la Agricultura Sustentable.

Asociados: Avícola el Toco, (Cintazul). Centro Veterinario y Agrícola Ltda. (Centrovét)

Coordinador del Proyecto: Raúl Venegas V.

Costo Total:

Aporte del FIA:

Período de Ejecución: Abril 2010- Diciembre 2014.

### II. RESUMEN EJECUTIVO

El desafío que el presente proyecto ha tratado de enfrentar es la reducción de la población del insecto mosca domestica (*Musca domestica*), díptero presente en planteles avícolas productores de huevos y en el entorno de poblaciones humanas, que comparten el ambiente con estos sistemas industriales de producción. Las poblaciones de moscas domesticas, generadas en gran cantidad en los planteles avícolas, se transfieren a las comunidades humanas vecinas y al medio ambiente circundante con efectos contaminantes, lo que determina además de la aplicación de fuertes dosis insecticidas, con aparición de resistencia a estos químicos una permanente confrontación judicial entre las empresas y las comunidades.

El objetivo buscado por el presente proyecto correspondió al desarrollo, validación y comercialización de un controlador biológico para la mosca domestica en sistemas de producción avícola industrial. El proyecto logro

aislar, identificar y reproducir hongos entomopatógenos (reguladores de las poblaciones de insectos, en particular dípteros), que están presentes en los sistemas productivos y en ecosistemas naturales. Desde los galpones de producción se obtuvieron y seleccionaron cepas de alta patogenicidad sobre estos insectos, Los hongos se reprodujeron y se introdujeron de manera inundativa en el plantel en estudio, obteniéndose efectos sobre los insectos adultos en periodos de alta humedad ambiental. Las cepas aisladas e identificadas correspondieron a 18 aislados pertenecientes a los géneros *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*.

Se realizaron pruebas experimentales de campo en unidades de producción con 11.000 aves. Se identificaron y aislaron cepas de alta efectividad evaluándose tres formas de aplicación: 1) Suspensiones para asperjar las construcciones donde se mantienen las aves y los acumulos de estiércol de estos sistemas, esta modalidad resulto ser la más efectiva tanto en pruebas de campo como en gallineros experimental .2) Polvo seco que se administró en el alimento, en un porcentaje de acuerdo al consumo diario que hacen las aves, de acuerdo a la literatura entre  $10^6$  y  $10^7$  esporas por kilogramo de peso vivo, esta modalidad no permitió control de los insectos por cuanto el paso a través del intestino es de pequeña escala no alcanzando a generar un control de los insectos en el estiércol.3) Cebos para eliminación de adultos. Estos cebos no tuvieron un comportamiento adecuado dado que en las condiciones de acumulación de estiércol en los sistemas de producción en jaula, estos no atraen suficientemente a los insectos adultos. Se probaron cebos con leche y con melaza sin resultados adecuados.

Se generaron presentaciones del producto obtenido que corresponde a una presentación en polvo seco mojable b) Sachetes de 15 y 30 gramos de producto que se pueda suspender en agua y aplicar sobre la infraestructura de galpones y gallineros así como sobre las acumulaciones de estiércol.

### III. TEXTO PRINCIPAL

#### 1. Breve resumen de la propuesta, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.

La propuesta “Desarrollo y producción de un insecticida biológico para el control de la mosca domestica (*Musca domestica* L.) en planteles avícolas.” Logró de acuerdo a los objetivos planteados inicialmente aislar, identificar y evaluar el efecto y capacidad controladora de 18 cepas de hongos de los géneros *Beauveria*, *Paecilomyces* *Metarhizium*. Para esto se estableció un sistema de crianza del insecto *M.domestica* a partir de la cual se obtuvieron permanentemente los estados de desarrollo del insecto necesarios para evaluar las diferentes cepas de hongos obtenidos, tanto desde sistemas de producción de aves como sistemas agropecuarios. Los hongos aislados y evaluados se sometieron tanto a pruebas *in vitro* como *in vivo* para lo cual se realizaron pruebas en sistemas de producción experimentales y pruebas de campo en una importante empresa del rubro avícola como es CINTAZUL. En ambas situaciones se lograron niveles adecuados de control del insecto *M. domestica*, tanto *in vitro* como *in vivo*. Lográndose valores de control sobre 60% y hasta un 80%, tanto en larvas como en adultos.

Para la reproducción de los hongos se utilizó un sistema artesanal de alta eficiencia con inóculos incubados en botellas, especialmente para realizar los experimentos *in vitro*. También como objetivo del proyecto de diseño y desarrolló un prototipo de fermentador automático que permite la incubación de 40 kilogramos de sustrato. Este sistema se ha corregido en el tiempo y aun requiere ajuste menores para su uso continuo.

Finalmente los inóculos más eficientes obtenidos por el proyecto se han enviado al laboratorio SALIMAX para su análisis toxicológico, con posterioridad a lo cual se presentaran los resultados a la autoridad sanitaria para el proceso de registro del producto que hemos denominado **CONBIOL *M. domestica* WP**.

## 2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

### Descripción breve de los resultados obtenidos, comparación con los objetivos planteados, y razones que explican las discrepancias

1.- Durante el desarrollo del trabajo de investigación se aislaron y evaluaron 18 cepas de 3 géneros de hongos entomopatógenos con resultados relevantes en el proyecto, estos presentaron efecto variables sobre los estados de desarrollo de la mosca domestica, los aislados correspondieron a 14 cepas de *Beauveria bassiana*, 2 cepa de *Metarhizium anisopliae* y 1 cepa de *Paecilomyces lilacinus*, además de una cepa *Pochonia chlamydosporia* con efecto sólo sobre huevos de *M. domestica*

2.- Se estableció el nivel de patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas e identificadas, sobre los distintos estados de desarrollo de la mosca domestica (larva, pupa y adulto) obtenidas a partir de una crianza artificial, evaluando *in vitro* la efectividad de estos aislados en función de la concentración de ellos, lográndose definir dos cepas de *Beauveria bassiana* ( C2 y F2) como los más patogénicos para el control del insecto.

3.- Se diseño y desarrollo de un Biorreactor prototipo para la producción de hongos entomopatógenos.

Se diseño y construyo un fermentador para la incubación de hongos entomopatógenos, con una capacidad de incubación máxima de 40 kilogramos de sustrato, este biorreactor se ha estado ajustando tanto en sus condiciones iniciales de filtrado de aire, como en su capacidad de mezclado y secado de los sustratos para incubación, es un aparato que tiene una evolución dinámica desde el punto de vista tecnológico pues hay que ir adaptándolo en la medida de la experiencia acumulada en su uso.

4.- Se evaluaron en *vitro* e *in vivo* las presentaciones finales logradas, se evaluaron suspensiones obtenidas por la incorporación en agua sobre las conidias las que finalmente se aplican en sistemas experimentales e industriales de producción de aves de postura y también se obtuvieron presentaciones finales en polvo que permiten la conservación de los preparados a través del tiempo. La obtención de cebos efectivos es un problema no resuelto por el proyecto pues a pesar de obtener resultados experimentales importantes, estos sistemas en la realidad funcionan de manera deficiente por la gran oferta de alimento que tienen los insectos en condiciones de explotaciones comerciales de aves, donde el estiércol se acumula permanentemente constituyendo una fuente infinita de alimento para los parásitos.

Se definieron experimentalmente las mejores cepas obtenidas en relación a los niveles de control sobre las diferentes etapas de desarrollo del insecto parásito *M. domestica*, encontrándose efectos de distinta magnitud en todas las etapas, en particular el efecto más potente se logro sobre insectos adultos en condiciones de alta humedad ambiental, esto tanto en condiciones de experimentación en un gallinero en ITAS como en gallineros industriales. Un desafío pendiente del trabajo es lograr condiciones de humedad que mejoren la sobrevivencia y actividad controladora de los entomopatógenos evaluados.

5.- Diseño estratégico para comercialización del producto: Entregar documentación para obtención de registro SAG de producto generado por el proyecto.

Se enviaron muestras del producto en polvo al laboratorio SALIMAX para la realización de las pruebas de toxicidad las que se utilizarán en la presentación de la solicitud de registro a las instituciones de sanitarias que regulan estos insumos. Estos análisis tienen fechas de realización de 150 días. Esta situación se debe a la gran demanda de ratas y conejos al bioterio del instituto de salud pública.

Se realizaron reuniones de trabajo con la gerencia Comercial de CENTROVET para definir cuáles son los puntos estratégicos a considerar al introducir un producto como el desarrollado al mercado de los insumos agropecuarios.

#### Descripción breve de los impactos obtenidos

- Obtención de dos cepas de *B. bassiana* con alta capacidad de control de *M. domestica*. En condiciones de humedad relativa de 70% o superior
- Obtención de un producto en polvo, en base a *B. bassiana* utilizable en suspensión con capacidad de control de hasta un 82% de la *Mosca domestica* bajo condiciones de Temperatura y Humedad adecuada.
- Diseño y construcción de un Biorreactor para la reproducción de hongos biocontroladores tanto entomopatógenos como antagonistas.

### **3. Aspectos metodológicos del proyecto:**

- descripción de la metodología efectivamente utilizada

**Objetivo N° 1** Obtener aislados nativos de hongos entomopatógenos desde poblaciones de mosca domestica en planteles avícolas.

#### **Metodología:**

Muestreo y colección de distintos estados de desarrollo de, *M domestica* para la detección de patologías originadas por hongos Entomopatógenos, con red entomológica se capturarán moscas adultas y se tomarán muestras fecales desde planteles avícolas, de la empresa asociada, Cinta Azul, las larvas se dispusieron en bandejas y los insectos adultos es jaulas de crianza, periódicamente se observa la presencia de insectos muerto o con signos de infección por patógenos, estos ejemplares se desinfectan con hipoclorito de

sodio, se lavan repetidas veces con agua estéril y se incuban hasta la aparición de micelio desde los insectos, éstos se aíslan y siembran en cultivos puros hasta su uso (Kaaya, et al, 1995 ; Kalsbeek et al, 2001).

**Objetivo N°2.** Establecer el nivel de patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas e identificadas sobre los distintos estados de desarrollo de la mosca domestica (larva, pupa y adulto) obtenidas a partir de una crianza artificial, evaluando in vitro la efectividad de los aislados obtenidos en función de la concentración de ellos.

### **Metodología:**

#### 2.1) El Establecimiento de crianza artificial de *M. domestica*:

El Establecimiento de crianza artificial de *M. domestica* se baso en lo descrito por Lam et al, 2007; Zurek et al, 2002; Scorza y Cova, 2006

El sistema de crianza de este insecto se basará en lo descrito por (Lam et al, 2007; Zurek et al, 2002) La colonia inicial de moscas se colectaran de planteles avícolas, las moscas adultas se mantienen en jaulas de malla de 28L se mantienen con agua ad libitum, alimento, mezcla de leche en polvo descremada y azúcar en polvo (1:1) y HR de 50-80% , temperatura de 25-30°C y ciclos de 16:8 L:O. Los huevos de las moscas se colectarán al tercer en discos petri ubicados en el piso de las jaulas con algodón humedecido con leche descremada, diariamente, se extraen los huevos, pesan y se depositan sobre dieta artificial (salvado de trigo, levadura de cerveza, melaza, leche en polvo y agua), al cabo de 5 a 7 días se extraen las pupas formadas a través de la técnica de flotación y se depositan en jaulas de crianza, para reiniciar el ciclo.

#### 2.2) Evaluación de patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en distintos estadíos de mosca domestica:

2.2.1) La patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en huevos, larvas, pupas y adultos de mosca domestica, se realizó con una suspensión de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidias/ml. De cada aislado de hongo, se preparó una suspensión ajustando su concentración mediante recuento de conidias en cámara de Neubauer. Huevos recién ovipuestos por las moscas, 18 mg, aproximadamente 240 huevos, se distribuyeron en un pequeño trozo de papel toalla estéril, y se depositan en envase que contenían 80g de la dieta artificial. Sobre los huevos en el papel se les inoculó 12 gotas de una suspensión de cada hongo a evaluar, los envases con tres repeticiones por tratamiento, se incuban a 25°C y se evalúa el número de larvas eclosionadas y porcentaje de mortalidad. El grupo testigo sólo recibió agua, sin el hongo.

Para los estados de larvas y pupas se realizó el mismo protocolo: Grupo de 20 larvas L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> (48 y 72 horas de vida) y grupos de pupas de 24 y 48 horas de formación, se sumergieron por 3 minutos en cada suspensión de hongo, las larvas se dispusieron en envases con tapa por 24-48 horas a 25°C y se transfirieron a envases con 60 gr de medio para larva, con fotoperiodo de 14:10 L:O y 25-28°C. Evaluando la tasa de mortalidad, sobrevivencia y emergencia de adultos. Las larvas muertas se colectaron y su superficie se esterilizó por inmersión en hipoclorito de sodio al 10% por 3 seg, se lavaron repetidas veces en agua destilada estéril y se dispusieron en cámara húmeda hasta la esporulación de los hongos. (Geden et al 1995, Cova et al 2009, a,b; Barson et al, 1994; Mochi et al, 2010)

El grupo control fue sumergido en solución de agua con 0.01% Tween-80. Cada ensayo se repitió tres veces.

Los adultos fueron tratados con suspensiones acuosas de los hongos en concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml. Grupos de 50 moscas adultas de 2-3 días de vida fueron asperjadas con cada concentración por 20 seg, dejándolas sobre papel filtro en cajas de 30x20x20 cm a 25°C y 14:10 L:O. El grupo control se trató con agua destilada estéril, cada tratamiento fue con tres repeticiones.

La mortalidad se registró por 7 días, colectando los cadáveres, esterilizando la superficie y transfiriéndolos a cámara húmeda.

2.2.2) Evaluación del comportamiento de los hongos en el control de larva de moscas a nivel fecal.

**Método:**

Como una etapa previa a la evaluación del paso de los hongos por el tracto gastrointestinal en las aves, se evaluó el comportamiento de los diferentes aislados de hongos sobre las fecas de aves y su potencial control sobre las larvas de moscas. Se colectaron fecas de aves en experimentación, depositando 30 gramos de fecas en recipientes de plásticos y mezclándolas con 4ml de una suspensión de  $10^9$  conidias/ml de cada hongo a evaluar, en cada recipiente se depositaron 15 larvas L2, tres repeticiones por tratamiento, se cubrieron con tul y se incubaron a 25°C por 8-9 días hasta evaluar el porcentaje de pupas y adultos emergidos.

2.2.3) Evaluación del tránsito gastrointestinal y supervivencia de conidias de hongos entomopatógenos en aves de experimentación.

**Método:**

Las cepas aisladas se administraron oralmente a las aves y las que atravesaron el tracto gastrointestinal para determinar su virulencia en larvas y adultos de mosca domestica con suspensión de  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  conidias/ml.

Se evaluó el paso intestinal de los hongos en las aves, dándoles a consumir al hongo previamente molido con cada concentración de conidias/g y mezclado con el alimento, se les entrego diariamente, por 6 días un gramo y luego 4g del hongo en mezcla con el alimento, por gallina. Las evaluaciones se realizaron con tres y dieciocho grupos de dos gallinas por grupo y un grupo testigo al que no se le dio el hongo. Al tercer día cuarto y sexto día de consumo del hongo se tomaron muestras diarias de las fecas frescas, las que fueron colectadas en bandejas que se colgaron bajo la aves seleccionas en los distintos pisos de los gallineros. Las muestras de fecas frescas, 1 gramo por bandeja se llevaron a dilución y se sembraron en placas de agar-agua e incubaron a 25°C por una semana hasta determinar la presencia de unidades formadoras de colonia.

**Objetivo 3:** Diseño y desarrollo de un Biorreactor prototipo para la producción de hongos entomopatógenos.

Método:

1) Diseño ingenieril y construcción.

I.- Descripción general del equipo para la incubación y producción de entomopatógenos.

El equipo desarrollado está integrado por 4 unidades que se describen a continuación:

- a.- Unidad estructural del autoclave con una cavidad de doble chaqueta, abatible.
- b.- Unidad estructural de la tapa del autoclave, con sistema de elevación y giro de esta.
- c.- Unidad de calefacción y refrigeración de agua destilada, con sistema de bomba y radiador.
- d.- Unidad eléctrica de potencia y control de los circuitos.
- e.- Unidad de secado

### Unidad del autoclave

La unidad del autoclave está compuesta por una marmita de doble chaqueta con capacidad neta de 250 litros. En su interior está fabricada en acero 304 con espesor de 4 mm. En su parte superior una tapa del mismo acero es de espesor 5 mm, y reforzada.

La marmita de doble chaqueta almacena agua que circula entre ambas fuentes o chaquetas, y permite que en su interior se llegue a temperaturas de 120°C, o 25°C indistintamente.

El levantamiento de la temperatura a 120 °C se realiza en un periodo corto de tiempo, con participación de un operador, que en forma automática enciende gas butano con su respectivo quemador. Una vez se alcanza la temperatura deseada, se apaga automáticamente la combustión de gas y luego se vuelve a encender manteniendo la temperatura de 120°C en su interior.

Terminando este proceso, se entra a un régimen de circulación de agua a 25°C, intermitente que quedara una, dos o tres semanas según sea el proceso, tiempo en el cual la temperatura del agua se controla externamente con la alimentación de gas totalmente apagada, y sin participación de operador.

Una vez concluido el proceso de 10/20/30 días, a temperatura ambiente de 25°C, se abre la tapa, y para sacar su contenido, se puede voltear el autoclave, con un sistema manual de manilla que incluye un reductor mecánico.

Además de todo lo anterior la tapa del equipo incluye un sistema interior de agitación

### Sistema de calefacción y enfriamiento

El sistema de calefacción y enfriamiento es una unidad aparte del equipo, cuya función es hacer circular agua al interior de las chaquetas a distintas temperaturas para facilitar el manejo de la temperatura que se quiere alcanzar al interior del autoclave.

Durante la esterilización esta unidad solo hace circular el agua a 121°C, luego cuando comienza su enfriamiento, la hace circular, la enfría en un radiador con ventilador hasta alcanzar los 25°C que se necesitan durante todo el proceso de producción.

Todo el conjunto de la autoclave, está controlado y alimentado por un sistema eléctrico que según sea el momento o la función, opera de distinta forma.

Este sistema incluye un tablero con protectores para la alimentación eléctrica de los motores, y con los respectivos interruptores de movimiento.

Adicionalmente el tablero incluye un control de movimiento automático para el proceso de producción, mediante un PLC con horario y pantalla de control.

#### Unidad de Secado:

Está constituido por un secador tipo bora 90 c / 0.55 kw de potencia con 85 m<sup>3</sup> / hora y presión de trabajo 175 milibar. Además resistencias eléctricas con un total de 2 kw para calentar aire, dos filtros, un estanque de decantación de agua en material plástico o inoxidable.

Ciclo de Biorreactor contempla: autoclaveado durante una hora a 121 C° y dos atmósferas de presión, control de los parámetros térmicos de los procesos de esterilización, incubación a la temperatura necesaria para cada organismo y secado, control de rangos de pH, rotación o agitación del sustrato, liberación tanto de CO<sub>2</sub> como humedad y finalmente secado del medio de cultivo con los inóculos esporulados. Los que finalmente se muelen y formulan.

**Objetivo N° 4:** Formular y evaluar *in vitro* e *in vivo* la presentaciones finales que se espera obtener, tanto en polvo, suspensión y cebos.

#### **Método:**

Se elaboraron tres formulaciones; polvo mojable, de larga vida y buena miscibilidad en agua para formar una suspensión homogénea atomizable, con una concentración del producto final ( $\geq 10^8$  conidias/g); una suspensión concentrada de conidias, preparada con agua más un surfactante para facilitar la dispersión en el agua, determinando gramos de polvo/L agua. El último formulado fueron Cebos, mezcla de conidias en polvo, azúcar y un atrayente para los insectos y un colorante inerte que facilite la manipulación e indique la ubicación del producto. Las distintas formulaciones se evaluarán *in vitro* en tres concentraciones de conidias ( $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  conidias/g), en suspensión sobre insectos adultos puestos en contacto con superficies contaminadas (Geden et

al, 1995, Watson et al, 1995); sobre larvas desde alimento inoculado y sobre moscas adultas con el empleo de cebos de atracción (Crespo et al, 1998; Kaufman et al, 2005).

Las evaluaciones in vivo se realizaron con gallinas de experimentación y a nivel de campo en galpones de aves de postura siguiendo los protocolos señalados por (Watson, et al, 1995; Crespo et al, 1995; Kaufman et al, 2005; Cova et al, 2009; Cova et al, 2010 a).

### **Objetivo N° 5**

Presentar resultados finales ante autoridad sanitaria para registrar y patentar los productos finales, para su comercialización a nivel nacional.

Análisis toxicológico digestivo agudos y crónicos para las formulaciones desarrolladas

Pruebas de alergia

Pruebas respiratorias agudas.

Revisión bibliográfica sobre las formulaciones desarrolladas a partir de las cepas aisladas, para fundamentar la revisión documental que se debe presentar a la autoridad sanitaria. como requisito inicial para la obtención de registro.

Evaluación Técnica: Incorporar la información obtenida durante el desarrollo de esta investigación, respecto de las formulaciones probadas (test de eficiencia), en la estructura del protocolo que se entrega a la autoridad sanitaria.

- **Principales problemas metodológicos enfrentados.**

a)El primer problema metodológico enfrentado fue la imposibilidad de reproducir artificialmente el hongo entomopatógeno, específico de *M. domestica* *Entomophthora muscae*, descrito en la literatura como un importante controlador de *M. domestica* causante de significativas epizootias en

poblaciones de insecto, bajo condiciones de alta densidades y temperatura y humedad ambiental. Lamentablemente fue imposible reproducirlo de manera masiva y de acuerdo a la literatura, aún no se ha descrito un método efectivo de reproducción. Este controlador se presentó esporádicamente de manera natural asociado a las condiciones ambientales descritas.

b)Aplicación de controladores en épocas de temperaturas extremas, este es un problema critico principalmente en verano y primavera tardía en que se producen alzas violentas de la temperatura ambiente con una disminución rápida de la humedad ambiental situaciones que han dificultado el efecto de os controladores aplicados a nivel de campo y a nivel experimental. Considerando esta situación La fundación FIA autorizó la prolongación del proyecto hasta Diciembre de 2014.

c)Ajustes del biorreactor en el sentido de utilizar filtros de mayor capacidad de limpieza del aire que se introduce al sistema tanto en la ventilación del fermentador y del sistema y extracción de gases como en el periodo secado de los sustratos esporulados. También fue necesario el ajuste mecánico de las aspas de mezclado.

- **adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.**

a)La mayor adaptación del conjunto del sistema de trabajo fue el alargue del programa hasta Diciembre de 2014 con el objeto de aplicar los preparados biológicos en condiciones de temperatura y humedad que por la planificación original de la iniciativa de investigación no se habían realizado, esto es aplicaciones en primavera temprana con humedad y temperaturas más cercana a las necesidades biológicas de los biocontroladores.

b) Introducción de filtro absoluto el ingreso de aire al biorreactor, esta situación mejora la calidad del aire que ingresa al sistema pero reduce el flujo, complementariamente se invirtió la dirección de este y se introdujeron filtros de mayor superficie para resolver la dificultad de la reducción del volumen de aire que ingresa al sistema.

c) En la última etapa de trabajo se introdujo el uso de un larvícida comercial asociado a la aplicación de los biocontroladores, en consideración a que estos últimos no presentan niveles altos de control sobre larvas, desarrollándose un sistema de manejo integrado, sin embargo hay una acumulación permanente de estiércol de aves que genera condiciones que sobrepasan la capacidad regulatoria de los sistemas de control.

El insecticida utilizado como complemento correspondió a RUSH® cuyo principio activo es Piriproxyfén. Se esperaba una modificación de la quitina del insecto y un aumento de la eficacia del controlador.

### **Alteración de la Fisiología de la Muda o Ecdisis producida por el larvícida introducido al ensayo.**

El piriproxyfén es un ingrediente activo que apareció a fines del siglo XX. Esta sustancia es un símil o análogo de la hormona tímica juvenil (HJ). Esta hormona es secretada en forma natural por un grupo de 20 a 25 células, altamente diferenciadas ubicadas en un área cerebral llamada pars intercerebralis, así como también una estructura cercana a la pars intercerebralis, conocida como **Corpora Allata**. La Hormona Juvenil es capaz de estimular a la glándula protorácica para que esta secrete la hormona ecdisona, que es con la que se inicia la muda. Así, el piriproxyfén es capaz de generar una “señal” artificial y falsa en las larvas expuestas a su acción, lo que altera su proceso de desarrollo y por lo tanto genera inviabilidad de la larva expuesta. Esta especificidad hacen que los químicos en base a piriproxyfén sean altamente efectivos con mínimas dosis, altamente específicos para insectos, y en general, reduzcan en forma importante riesgo de resistencia. Del mismo modo, el piriproxyfén posee una baja movilidad en suelo, siendo degradado por efecto de la microflora y microfauna presente en este. El

piriproxyfén ha mostrado un muy buen efecto de control sobre larvas de moscas domésticas (*Musca domestica*), Pequeña Mosca Doméstica (*Fannia canicularis*), zancudos de diferentes especies, cucarachas, pulgas y garrapatas entre otras especies. Dentro de las características asignadas al piriproxyfén están las siguientes:

1. Alterar la embriogénesis (capacidad de generación de un embrión dentro del huevo ovipuesto)
2. Inhibición y/ o alteración de la metamorfosis en la larvas
3. Inhibición de la emergencia en el caso de las pupas
4. Alteraciones reproductivas en el caso de los adultos.

- **descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.**

**Objetivo N°1** Obtener aislados nativos de hongos entomopatógenos desde poblaciones de mosca domestica en planteles avícolas.

#### **Método:**

Con red entomológica se capturaron moscas adultas y se tomaron muestras fecales desde planteles avícolas, de la empresa asociada. Las fecas se dispusieron en bandejas, observando periódicamente en larvas de mosca domestica la presencia de patologías infecciosa originadas por hongos entomopatógenos. Los adultos se colocaron en recipientes de malla, con agua y alimento a base de leche en polvo y azúcar. Esta jaulas se mantuvieron a 25-20°C, diariamente se observarán los insectos muertos y se montaron en cámara húmeda, previa desinfección con hipoclorito de sodio y lavados con agua estéril, se incubaron por 7 días a 25°C, los insectos con signos de infección por algún patógeno, se sembrados en placas con medio de cultivo e incubadas a 25°C hasta su total esporulación, las cepas obtenidas se

guardaron en tubos con medio de cultivo en refrigeración hasta su uso (Kaaya, et al, 1995; Kalsbeek et al, 2001).

Los hongos aislados en cultivos puros fueron enviados al laboratorio de Micología de Universidad de Valparaíso para su identificación a nivel específico. Los aislados obtenidos corresponden a los géneros *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Metarhizium* (Kaaya, et al, 1995; Kalsbeek et al, 2001).

**Objetivo N° 2** Establecer el nivel de patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas e identificadas sobre los distintos estados de desarrollo de la mosca doméstica obtenidas a partir de una crianza artificial, evaluando in vitro la efectividad de los aislados obtenidos en función de la concentración de ellos

## **2.1 Establecimiento de crianza artificial de *M. domestica***

### **Método:**

El Establecimiento de una crianza artificial de *M. domestica* se basó en lo descrito por Lam et al, (2007); Zurek et al, (2002); Scorza y Cova, (2006).

Muestras de poblaciones de insectos adultos y larvas, colectadas de galpones con aves de postura en la empresa agrícola el Toco, Huevos Cintazul, Los adultos se depositaron en jaulas de crianza de 28 L y las larvas en bandejas con dieta artificial, incubándolas en sala de crianza a 25-28°C y fotoperiodo de 14:10 L:O. Los adultos son alimentados permanentemente con, azúcar granulada y leche descremada y con recipientes con algodón embebidos en agua. Los huevos se colectan al 3-4 día de vida de las hembras en placas con algodón embebido en leche, los huevos colectados se depositan en bandejas con dieta artificial (harina de trigo 400g, levadura 15g, melaza 15ml, leche 15g y agua 700ml), a razón de 0,5 g de huevos por 230 gramos de dieta artificial, a los 8-9 días se extraen las pupas por flotación y se trasladan nuevamente a jaulas de crianza hasta su emergencia para reiniciar el ciclo.

## **2.2 Evaluación de patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en distintos estados de desarrollo de mosca domestica.**

### **Método:**

**Establecer el nivel de patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas e identificadas sobre los distintos estados de desarrollo de la mosca domestica (larva, huevos y adulto) obtenidas a partir de una crianza artificial.**

2.2.1 La patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas y huevos de mosca domestica, se realizó con una suspensión de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidias/ml. De cada aislado de hongo, se preparó una suspensión ajustando su concentración mediante recuento de conidias en cámara de Neubauer.

#### **a) Huevos**

Grupos de Huevos de 18 mg, aproximadamente 240 huevos, recién ovipuestos, se distribuyen en trozos de papel toalla estéril, en envase con 20g de alimento para las larvas. Sobre los huevos en el papel se les asperjan 12 gotas de una suspensión de cada hongo a evaluar, a una concentración de  $10^9$  conidias/ml, los envases con tres repeticiones por tratamiento, se incuban a 25°C y se determina el número de larvas eclosionadas y porcentaje de mortalidad. El grupo testigo sólo recibe agua, sin el hongo.

#### **b) Larvas:**

Grupo de 25 larvas L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub> (48 y 72 horas de vida) se sumergieron por 3 minutos en cada suspensión de hongo, las larvas se dispusieron en envases con tapa por 24-48 horas a 25°C y se transfirieron a envases con 60 gr de medio para larva, con fotoperiodo de 14:10 L:O y 25-28°C. Evaluando la tasa de mortalidad, sobrevivencia y emergencia de adultos. Las larvas muertas se colectaron y su superficie se esterilizó por inmersión en hipoclorito de sodio al 10% por 3 segundos, se lavaron repetidas veces en agua destilada estéril y se dispusieron en cámara húmeda hasta la esporulación de los hongos. El grupo control fue sumergido en solución de agua con 0.01% Tween-80. Cada ensayo

se repitió tres veces. (Barson et al, 1994; Geden et al, 1995 Tefera and Pringle, 2003; Cova et al, 2009 (a,b)).

#### **c) Pupas:**

Las evaluaciones para el estado de pupas se realizaron de manera similar, grupos de 15 pupas de 48 horas y 72 horas de desarrollo, se sumergieron en una suspensión de cada hongo y concentración de conidias/ml por 3 minutos, las pupas tratadas se colocaron en envases con papel filtro humedecido con agua destilada estéril, se incubaron a 25°C, observando el porcentaje de eclosión de los adultos. El grupo control fue sumergido en agua destilada estéril, cada tratamiento se repitió tres veces.

#### **d) Adultos**

La determinación de patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en adultos de mosca domestica se realizó por aspersión. Suspensiones acuosas de los hongos en evaluación se prepararon a concentración de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml. Grupos de 25 a 30 moscas de 2-3 días de vida fueron asperjadas con cada concentración por 20 seg, dejándolas sobre papel filtro en cajas de 30x20x20 cm a 25°C y 14:10 L:O. El grupo control se trató con agua destilada estéril, cada tratamiento fue con tres repeticiones. La mortalidad se registró por 7 días, colectando los cadáveres, esterilizando la superficie y transfiriéndolos a cámara húmeda

### **2.2.2 Evaluación del comportamiento de los hongos en el control de larvas de moscas a nivel fecal.**

#### **Método:**

Se colectaron en bandejas, fecas de aves en experimentación, depositando 30 gramos de fecas en recipientes de plásticos y mezclándolas con 4ml de una suspensión de  $10^9$  conidias/ml de cada hongo a evaluar, en cada recipiente se depositaron 15 larvas L2, tres repeticiones por tratamiento, Los envases se cubrieron con tul y se incubaron a 25°C por 8-9 días hasta evaluar el porcentaje de pupas y adultos emergidos. Las pupas extraídas se depositan en frascos con tapón de algodón se incuban y se observa la emergencia de adultos.

### **2.2.3 Evaluación de la efectividad de los aislados mediante el tránsito gastrointestinal y supervivencia de conidias de hongos entomopatógenos en aves de experimentación.**

#### **Método:**

Se evaluó el paso intestinal de los hongos en las aves, dándoles a consumir al hongo en polvo con una concentración de  $10^9$  conidias/g y mezclado con el alimento, las cepas a evaluar corresponden a *B. bassiana* C2, F2; *P. lilacinus* A y *M. anisopliae* B, los hongos fueron entregados diariamente, por 6 días, 4g del hongo en mezcla con el alimento por gallina. Las evaluaciones se realizaron con tres y dieciocho grupos de dos gallinas por grupo y un grupo testigo al que no se le dio el hongo. Al tercer día cuarto y sexto día de consumo del hongo se tomaron muestras diarias de las fecas frescas, las que fueron colectadas en bandejas que se colgaron bajo la aves seleccionas en los distintos pisos de los gallineros. Las muestras de fecas frescas, 1 gramo por bandeja se llevaron a dilución y se sembraron en placas de agar-agua e incubaron a 25°C por una semana hasta determinar la presencia de unidades formadoras de colonia.

**Objetivo N° 3** Diseño y desarrollo de un Biorreactor prototipo para la producción de hongos entomopatógenos.

#### **Metodo:**

1) Diseño ingenieril y construcción.

I.- Descripción general del equipo para la incubación y producción de entomopatógenos.

El equipo desarrollado está integrado por 4 unidades que se describen a continuación:

- a.- Unidad estructural del autoclave con una cavidad de doble chaqueta, abatible.
- b.- Unidad estructural de la tapa del autoclave, con sistema de elevación y giro de esta.
- c.- Unidad de calefacción y refrigeración de agua destilada, con sistema de bomba y radiador.
- d.- Unidad eléctrica de potencia y control de los circuitos.
- e.- Unidad de secado

#### Unidad del autoclave

La unidad del autoclave está compuesta por una marmita de doble chaqueta con capacidad neta de 250 litros. En su interior está fabricada en acero 304 con espesor de 4 mm. En su parte superior una tapa del mismo acero es de espesor 5 mm, y reforzada.

La marmita de doble chaqueta almacena agua que circula entre ambas fuentes o chaquetas, y permite que en su interior se llegue a temperaturas de 120°C, o 25°C indistintamente.

El levantamiento de la temperatura a 120 °C se realiza en un periodo corto de tiempo, con participación de un operador, que en forma automática enciende gas butano con su respectivo quemador. Una vez se alcanza la temperatura deseada, se apaga automáticamente la combustión de gas y luego se vuelve a encender manteniendo la temperatura de 120°C en su interior.

En todo momento durante este proceso el agua a 120°C está circulando dentro de las dos chaquetas o fuentes. Todo este anterior proceso termina a las dos o 3 hrs. de operación, tiempo que se considera necesario para esterilizar completamente lo que se puso a interior de la fuente del autoclave.

Terminando este proceso, comienza la etapa de enfriamiento del agua, entre chaquetas, lo cual se consigue haciendo pasar agua enfriada, bombeada desde afuera.

Terminando este proceso, se entra a un régimen de circulación de agua a 25°C, intermitente que quedara una, dos o tres semanas según sea el proceso,

tiempo en el cual la temperatura del agua se controla externamente con la alimentación de gas totalmente apagada, y sin participación de operador.

En este proceso circuital del agua no se consideran escapes de vapor de agua destilada, solo excepcionalmente en caso que el gas o las resistencias eléctricas quedaran fuera de control y eso produjera un aumento de la temperatura que ponga en peligro la vida de una persona o la vida útil del equipo, solo en este caso actuaría una válvula de seguridad.

Una vez concluido el proceso de 10/20/30 días, a temperatura ambiente de 25°C, se abre la tapa, y para sacar su contenido, se puede voltear el autoclave, con un sistema manual de manilla que incluye un reductor mecánico.

Además de todo lo anterior la tapa del equipo incluye un sistema interior de agitación y 5 entradas para distintas funciones que se explicaran más adelante.

#### Unidad de la tapa

La unidad de la tapa, además de la tapa incluye un agitador mecánico de espiral fabricado en acero inoxidable 304, soportado en un eje vertical, y movimiento rotatorio intermitente ejecutado por un motor eléctrico, a su vez, controlado externamente.

La función de este agitador está circunscrita al periodo de desarrollo de los hongos, periodo en el cual hay que hacer girar el sustrato vegetal donde se desarrolla el hongo con el fin de agregar oxígeno y retirar CO<sub>2</sub>.

Una vez terminado este proceso, la tapa debe ser retirada de su lugar, para lo cual se sacan sus cierres de hermeticidad, y se levanta a la posición más alta, que permita su giro. El izamiento de la tapa se facilita con un pilar paralelo al autoclave, que direcciona el movimiento de la tapa, y posiciona a su vez al pistón neumático al tornillo eléctrico que eleva el conjunto.

Este movimiento facilita la operación de extracción de la producción del hongo, lo cual se producirá cuando se voltee el autoclave. Todo este Proceso debe contar con la participación de un operador.

#### Sistema de calefacción y enfriamiento

El sistema de calefacción y enfriamiento es una unidad aparte del equipo, cuya función es hacer circular agua al interior de las chaquetas a distintas temperaturas para facilitar el manejo de la temperatura que se quiere alcanzar al interior del autoclave.

Durante la esterilización esta unidad solo hace circular el agua a 121°C, luego cuando comienza su enfriamiento, la hace circular, la enfría en un radiador con ventilador hasta alcanzar los 25°C que se necesitan durante todo el proceso de producción.

Esta unidad incluye un radiador de cobre con un ventilador, un calderín con resistencias eléctricas, una bomba de agua y las respectivas cañerías de conexión.

Según sea el momento del proceso, entraran en funcionamiento los distintos equipos, cuando haya que enfriar el radiador con su ventilador, cuando hay que hacer circular el agua actúa la bomba, y cuando hay que entibiarla a 25°C, entran en función las resistencias eléctricas.

#### Sistema de sensores, control y fuerza

Todo el conjunto del autoclave, está controlado y alimentado por un sistema eléctrico que según sea el momento o la función, opera de distinta forma.

Este sistema incluye un tablero con protectores para la alimentación eléctrica de los motores, y con los respectivos interruptores de movimiento.

Adicionalmente el tablero incluye un control de movimiento automático para el proceso de producción, mediante un PLC con horario y pantalla de control.

Dentro de los sistemas de alimentación del PLC, se incluye un sensor para el calderín de entibiamiento del agua, un sensor para controlar la temperatura del agua al interior de las chaquetas, un sensor para controlar la temperatura en el interior del autoclave. Paralelamente, está incluido un sensor de humedad al interior el autoclave, una conexión a un solenoide de válvula para admisión de agua, otro solenoide con válvula parar dejar salir aire.

#### Unidad de Secado:

Está constituido por un secador tipo bora 90 c / 0.55 kw de potencia con 85 m<sup>3</sup> / hora y presión de trabajo 175 milibar. Además resistencias eléctricas con un

total de 2 kw para calentar aire, dos filtros, un estanque de decantación de agua en material plástico o inoxidable.

La empresa AUSIND que construyó el equipo se compromete a respetar la confidencialidad de la información reservada, y acuerda su guarda y custodia escrita, así como su no divulgación, uso o suministro, ni en todo o parte, o por cualquier tercero sin el previo, expreso y estricto consentimiento de ITAS S.A.

2) Puesta en marcha de biorreactor para la producción masiva de hongos entomopatógenos.

3) Ajuste de parámetros bioecológicos para las cepas a reproducir.

4) Ciclo de Biorreactor contempla: autoclaveado durante una hora a 121 C° y dos atmósferas de presión, control de los parámetros térmicos de los procesos de esterilización, incubación a la temperatura necesaria para cada organismo y secado, control de rangos de pH, rotación o agitación del sustrato, liberación tanto de CO<sub>2</sub> como humedad y finalmente secado del medio de cultivo con los inóculos esporulados. Los que finalmente se muelen y formulan.

( ya ase describió en su totalidad)

2) Diseño ingenieril y construcción.

3) Puesta en marcha de birreactor para la producción masiva de hongos entomopatógenos.

4) Ajuste de parámetros bioecológicos para las cepas a reproducir.

5) El diseño del birreactor contempla: autoclaveado durante una hora a 121 C° y dos atmósferas de presión, control de los parámetros térmicos de los procesos de esterilización, incubación y secado, control de rangos de pH, rotación o agitación del sustrato, liberación tanto de CO<sub>2</sub> como humedad y finalmente secado del medio de cultivo con los inóculos esporulados. Los que finalmente se muelen y formulan.

**Objetivo 4:** Formular y evaluar *in vitro* e *in vivo* la presentaciones finales que se espera obtener, tanto en polvo, suspensión y cebos

Método:

#### **4.1 Evaluación del efecto en la sobrevivencia de los insectos adultos expuestos a diferentes formulaciones y aplicación de los hongos entomopatógenos**

##### 4.1.1) Preparación de las formulaciones y control de calidad

Preparación de las formulaciones y control de calidad Reproducción masiva de los hongos en sustrato sólido y líquido

###### a) Sustrato sólido.

La producción de los hongos se realizó en sustrato sólido, arroz partido, el sustrato se lava con abundante agua y se deja remojando 20 minutos, luego se escurre hasta alcanzar una humedad de 45 % . El sustrato humedecido se distribuye en frascos de vidrio de 1L, que se esterilizaron por 40 minutos a 121°C, una vez frío el medio, se inocula cada botella con los hongos previamente preparados en medio líquido.

El medio líquido para la reproducción de los inóculos fúngicos se realizó de acuerdo a indicado por Polar et al, 2005; y Jenkins et al, 1998, en matraces erlenmeyer de 1 L se colocan, en proporción de 20 gramos de levadura de cerveza y de sacarosa por litro de agua destilada, se esteriliza por 30 min a 121°C, una vez frío este medio se inocula con la cepa en uso, que tiene una concentración de  $10^8$  esporas/ml y se somete a agitación a 150 rpm y 25-28°C por 5 a 7 días. Este tipo de producción provee un inóculo con fragmentos de micelio suspendidos en una fase de crecimiento activo que se transfiere con jeringa automática 15ml del producto sobre al sustrato sólido en las botellas, éstas se incuban a  $25 \pm 2$  °C por 15 días, agitándolas una vez por semana para homogenizar el crecimiento del hongo sobre el sustrato.

Esta producción se escaló a un nivel superior, con el uso del biorreactor, para ello se depositaron 20 k de arroz partido con un contenido de humedad de 40%, se lleva a esterilización por 35 minutos a 121°C, pasado este tiempo se extrae el vapor y se agita el sustrato a distintos intervalos de tiempo hasta eliminar el exceso de humedad y reducir la temperatura. Una vez frío se inocula con una suspensión del hongo, producido previamente en medio líquido, como ya fue descrito. El sustrato inoculado se lleva a fase de incubación 26-28°C por 15 días y con agitación por un periodo de 20 minutos una vez a la semana. Pasado el tiempo de incubación se procede a secar el sustrato con el hongo mediante un flujo de aire caliente (40°C) y con agitación a intervalo de 6 horas y por un periodo de tres días. Una vez seco el sustrato, se extrae y se almacena en bolsas al vacío hasta el proceso de extracción de conidias mediante la molienda con molino de martillo y control de calidad.

#### b) Secado y extracción de las conidias

Después de 15 días de incubación y bajo el sistema de la producción en botellas, el sustrato con los hongos se distribuye en bandejas y se llevan a una estufa de secado con 30°C por dos días, hasta obtener un contenido de humedad de 4-5% del sustrato. El sustrato seco, se embolsa al vacío y se conservan hasta su molienda y extracción de conidias.

La primera fase de extracción de conidias se realiza, en ambos sistemas de producción, sometiendo el sustrato seco al tamizado por un set de tamices de diferentes micronaje con vibración constante.

El sustrato con las esporas aun adheridas, que no lograron desprenderse por la agitación, son molidas en un molino de martillo con una criba de 3mm para reducir el tamaño de partícula y poder realizar la extracción de las esporas por medio de un ciclón, Mycoharvest, el que genera un flujo de aire que aspira las esporas mediante un flujo de presión negativa que arrastra las partículas pequeñas hacia dos capachos de colecta. El polvo colectado en estos recipientes así como los extraídos en la primera fase con el ro-tap, son almacenados en bolsas selladas al vacío para su control de calidad.

### c) Control de calidad del producto

El producto final es sujeto una serie de pruebas de calidad, de acuerdo a lo indicado por Alves, 1980 y Jenkins et al, 1998 que consisten en:

1.- El contenido de humedad se chequea antes y después del proceso de secado determinando que el nivel de humedad del polvo debe ser de 5% o menos.

2.- Viabilidad de las conidias, para ello se prepara una suspensión del producto a evaluar, a una concentración de  $10^5$  esporas/ml, una gota de esta suspensión se coloca sobre un portaobjeto en que previamente se dispuso una fina película de medio PDA, este portaobjeto se coloca en cámara húmeda a  $25^\circ$  por una 24 horas, luego se cuenta bajo microscopio el número de esporas germinadas de un número de 100, esto se repite tres veces y se determina el porcentaje de esporas germinadas, se recomienda que éste sea  $\geq 85\%$ .

3.- Concentración de conidias, el número de conidias por gramo de producto final se determina por poner 0,1g de polvo por 100ml de agua con 0,05% de Tween 80, se agita y se lee en cámara de Neubauer. La concentración en el polvo debería ser  $10^{10}$  conidias/g

4.- Pureza. Este parámetro se evalúa durante todo el proceso de producción, tomando muestras del sustrato esterilizado, del medio líquido producido para el crecimiento de los hongos y empleado para la inoculación de los sustratos y finalmente el producto final, el polvo. Si en las etapas previas a la producción de polvo, aparecen contaminantes, se eliminan las batchadas producidas. Para la evaluación del polvo, se prepara una suspensión de  $10^7$  conidias/ml se siembra en placas con PDA, en diluciones seriadas se incuban por 5 días a  $25^\circ\text{C}$ , luego se cuenta el número de colonias del hongo y de posibles contaminantes por dilución, el nivel de contaminantes debe ser menos a 0,02%.

## **4.2 Evaluación in vitro de cada formulación en los estados de desarrollo del insecto**

### **Método:**

**4.2a) Tratamiento por aspersión:** Suspensiones acuosas de los hongos en evaluación se prepararon a concentración de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml

Grupos de 100 pupas próximas a emerger se dispusieron en frascos con tapón y luego de 24 horas de eclosionadas las moscas, se anestesiaron con frío, por 3 minutos. Una vez extraídas desde los frascos, se depositaron en una malla y se asperjaron con rociador, 8 ml de una suspensión de los hongos y concentración a evaluar, escurrido el exceso de líquido, se depositaron en jaulas de crianza de plástico, con alimento (azúcar y leche descremada) y agua ad libitum. Se mantuvieron a temperatura de 25°C y 14:10 L:O , evaluando el porcentaje de insectos muertos en el tiempo. El grupo control se trató con agua destilada estéril, cada tratamiento fue con tres repeticiones. La mortalidad se registró por 10-15 días, colectando los cadáveres, esterilizando la superficie y transfiriéndolos a cámara húmeda para la detección de los hongos.

Estos tratamientos de aspersión a adultos se realizaron con incorporación de diferentes aditivos como; leche, melaza y mezcla de ambos. Los protocolos a seguir se realizaron siguiendo la misma metodología descrita. Para la aspersión de suspensión de hongos con leche, se empleó leche en polvo a razón de 3g/L, para la aspersión de suspensión de hongos con melaza, se usó una cantidad de 0,5ml/L.

**4.2.a.1 Tratamiento de aspersión azucarada sobre una superficie** de los hongos controladores a concentración de  $10^9$  conidias/ml.

Insectos adultos se colocaron en las jaulas de crianza que contenían en su interior, colgando, una malla de plástico de color oscuro, previo a la introducción de los insectos ésta fue asperjada con 10 ml de una suspensión azucarada de cada hongo a evaluar a una concentración de  $10^9$  conidias/ml, se retiró el exceso del líquido de cada trozo de malla y se colgó al centro de la

jaula, dejando espacio en los bordes y piso de la jaula para el desplazamiento de las moscas. Fueron alimentadas con azúcar, leche descremada y frascos con agua. En el testigo se asperjó la malla con agua azucarada, sin el hongo. Las jaulas se mantuvieron a temperatura ambiente y se evaluaron por 20-25 días la tasa de mortalidad de los insectos en cada tratamiento, observado la presencia de los hongos desde el cuerpo de los insectos una vez esterilizados y colocados en cámara húmeda.

**4.2b.1) Tratamiento con cebo** para alimentación de insectos adultos con una formulación de azúcar más esporas de los hongos entomopatógenos.

Se tomó un número conocido de pupas próximas a eclosionar, a las 24 horas de emergidos los adultos, se les dio a comer en vidrio reloj azúcar con leche descremada y agua dispuesta en botellas con algodón. Cada jaula de crianza de plástico, con las moscas se les dio a consumir un cebo que consistía en 15 gramos de azúcar mezclada con esporas de los hongos controladores a evaluar, la concentración de la mezcla fue de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/g. Estas se mantuvieron a temperatura ambiente y se evaluó por 20 días el porcentaje de moscas muertas y la presencia de los hongos evaluados en los cadáveres luego de ser montados en cámara húmeda.

El grupo testigo, no recibió a consumir el cebo, solo la alimentación habitual.

**4.2b.2) Tratamiento con aspersión más cebo** con los diferentes hongos controladores en insectos adultos, a concentraciones de  $10^9$  conidias/g/ml.

Al igual que en los casos anteriores se trabajó con un número definido de adultos de 24 horas de vida, se anestesiaron con frío y luego se asperjaron con suspensión de los hongos a evaluar y se colocaron en jaulas de plástico las que contenían el cebo, placas con 15 gramos de azúcar mezcladas con el hongo en polvo a evaluar y placas con el alimento habitual; leche descremada y azúcar, además de envases con agua. El grupo testigo fue asperjado con agua sin los hongos y alimentado con leche y azúcar. Se evaluó por 20 días la

mortalidad de los insectos en cada tratamiento, evaluando la presencia de éstos desde los cadáveres, previa esterilización de los cuerpos e incubados a 25°C en cámara húmeda.

**4.2b.3) Tratamiento con cebo y nitrato de amonio** como atrayente de los insectos adultos.

Se distribuyeron 400 moscas adultas de 24 horas de vida en jaulas de crianza que contenían los cebos, mezcla de 15 g de azúcar y esporas de hongos, con una concentración de  $10^9$  conidias/g. Esta mezcla se depositó sobre un vidrio reloj, el que fue colocado en el centro de una tapa de una placa petri, que contenía 0,3g de nitrato de amonio disuelto en 2ml de agua. Cada jaula también contenían placas con comida (leche y azúcar) y frascos con algodón con agua, estas se dejaron a temperatura ambiente por 20 días, evaluando la tasa de mortalidad de cada tratamiento y la presencia de los hongos desde el cadáver de los insectos.

#### **4.2c) Evaluación de las formulaciones en aves de experimentación**

**4.2c.1) Evaluación del efecto los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, mezclados con aceite miscible (Winspray®) al 2% sobre la sobrevivencia de insectos adultos de *M. domestica* en un gallinero experimental.**

##### **Método:**

Para este ensayo se consideraron tres grupos de aves en jaula, con 60 animales cada uno, todos ellos separados por mallas antiáfido lo que permite

introducir insectos adultos en cada grupo y evaluar su comportamiento posterior.

Los grupos considerados fueron:

A nivel de tres baterías experimentales con aves de postura, de 3x3 metros con 30 jaulas cada una con 60 gallinas se realizaron liberaciones de moscas adultas de 72 horas de vida, provenientes de la crianza artificial establecida y en mantención en el centro, a 24 horas de la liberación se realizaron aplicaciones semanales por aspersión de los hongos mejor evaluados en los ensayos anteriores (*B. bassiana* F2 y C2) fueron mezclados con aceite miscible al 2% y 1%. La suspensión de los hongos se realizó a partir de conidias de las dos cepas de hongos, desarrolladas en sustrato sólido.

Se preparó una suspensión de 12L de agua que contenía una concentración de  $10^9$  conidias/ml, Tween 80 (0,1ml/L) y se asperjó con una bomba de espalda en dos de los galpones experimentales, rociando todas las áreas cubiertas por la malla, comederos y bebederos, aplicando en cada galpón 6 L de la suspensión preparada. El último galpón correspondió al testigo el que sólo se asperjó con agua.

Los tratamientos fueron los siguientes:

Grupo 1. Testigo absoluto.

Grupo 2. Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml más un 1% o 2% de aceite miscible.

Grupo 3. Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml. Sin adición de aceite.

Estas aplicaciones se realizaron semanalmente y en cada uno de los tres recintos con animales se liberó dos bandeja de crianza con insectos adultos, estableciéndose el número de insectos liberado por metro cuadrado posteriormente se evaluó la variación semanal de insectos por metro cuadrado. Los resultados se sometieron a análisis de varianza y test de Duncan para realizar la evaluación estadística de los tratamientos.

**4.2c.2).- Tratamiento por aspersión acuosa de *B. bassiana* sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml adicionada con un 2% de Aceite miscible o 4% de melaza.**

**Método.**

Para este ensayo se consideraron tres grupos de aves en jaula con 60 animales cada uno, todos ellos separados por mallas antiafido lo que permite introducir insectos adultos en cada grupo y evaluar su comportamiento posterior.

Los grupos considerados fueron:

**Grupo 1.** Testigo absoluto.

**Grupo 2.** Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml más un 2% de aceite miscible.

**Grupo 3.** Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml más 4% de melaza.

Estas aplicaciones se realizaron semanalmente y en cada uno de los tres recintos con animales se liberó dos bandeja de crianza con insectos adultos, evaluando el número de de insectos liberado por metro cuadrado, evaluando los datos igual que en el tratamiento anterior.

**Evaluación del efecto de los controladores.**

Se realizaron tres a cuatro aplicaciones de la suspensión de los controladores, una cada semana, efectuando el recuento de moscas adultas cada 5 días mediante un contador mecánico, determinando el número de moscas observadas en un área definida del gallinero, obteniendo el número de insectos por  $m^2$ .

El recuento de los insectos se realizo entre las 10:30 a 11:30am

**4.3) Evaluación a nivel de campo de las formulaciones sobre el control de la mosca**

#### **4.3.a) Control de *M. domestica* en un plantel avícola con aves de postura en jaula, comparando dos pabellones de 11000 aves cada uno, sometidos a control convencional y control biológico con *B. bassiana*.**

##### **Método.**

Se estableció un ensayo de campo para evaluar el efecto del controlador biológico *B. bassiana* (cepas F2 y C2), aplicado en un pabellón avícola con 11.000 aves de postura en jaula.

Para efectos de la evaluación se conformaron 2 grupos de aves en galpones separados con 11000 aves cada uno.

##### **Tratamiento grupo 1.**

Aplicación semanal en el galpón tratado de 60 litros de una suspensión de conidias de *B. bassiana* con una concentración de  $10^9$  conidias/ ml. Esta aplicación se realizó con motobomba de espalda asperjando la estructura completa del galpón y los residuos fecales de ave que se acumulan bajo las jaulas.

**Tratamiento Grupo 2.** Este corresponde a un tratamiento químico con aplicación de un larvícida, Rush® (Piriproxyfén) y de un insecticida para adultos Cyperkill®. (Cipermetrina), aplicados semanalmente.

El conteo de moscas adultas por metro cuadrado de pabellón se realizó según el método de Scudder (1974), en el que se utilizan rejillas de un metro cuadrado las que se ubican en los lugares de mayor afluencia de moscas en ambos galpones evaluados, ubicándolas en lugares de características equivalentes en términos de luminosidad, temperatura y humedad, en cada galpón evaluado. Estas rejillas se distribuyeron en número de 8, cuatro en cada galpón ubicándolas separadas cada 10 metros, bajo las jaulas en lugares soleados y luminosos

En este ensayo no se utilizó un testigo absoluto debido al alto costo que genera el impacto del parasito sobre una unidad de producción de huevos, si el insecto se deja sin control.

Las mediciones de la población de moscas por metro cuadrado se realizaron durante 8 semanas, realizándose cada vez a las 10:30 de de la mañana.

Las aplicación de los preparados tanto químicos como biológicos se llevó a cabo a las 18 horas cada vez , evitando las horas de mayor calor que puede producir daño a los hongos aplicados.

**4.3.b) Evaluación de campo del efecto controlador de una suspensión del hongo *B. bassiana* F2 y C2,+ 2% de aceite miscible, asperjado sobre insectos adultos en galpones comerciales de 1.000 m<sup>2</sup> y 11.000 aves en condiciones de temperatura mínima media de 8,89 °C en relación a testigo absoluto,.**

#### **Método.**

Se estableció un ensayo de campo para evaluar el efecto del controlador biológico *B. bassiana* (cepas F2 y C2), aplicado en un pabellón avícola con 11.000 aves de postura en jaula.

Para efectos de la evaluación se conformaron 2 grupos de aves en galpones separados con 11.000 aves cada uno.

#### **Tratamiento grupo 1.**

Aplicación semanal, en el galpón tratado con métodos biológicos, de 40 litros de una suspensión de conidias de *B .bassiana* con una concentración de 10<sup>9</sup> conidias/ ml. Esta aplicación se realizó con bomba manual de espalda asperjando la cama de estiércol de las aves que se acumula bajo las jaulas. El uso de bomba manual de espalda se debe a que el plantel recién establecido, con animales de 20 semanas, tiene una gran sensibilidad al stress y en esta etapa se ha evitado el ruido del motor.

**Tratamiento Grupo 2.** Este corresponde a un testigo absoluto sin aplicación de un controlador químico.

El conteo de moscas adultas se realizó según el método de Schlapbach 2007 en el que se utilizan tarjetas de cartulina que se ubican en los lugares de mayor afluencia de moscas en ambos galpones evaluados, ubicándolas en lugares de características equivalentes en términos de luminosidad, temperatura y humedad, en cada galpón. Estas cartulinas de 7,5cm x 10cm se distribuyeron en número de 14 en cada galpón ubicándolas de manera equidistante, en las cerchas de la estructura en lugares soleados y luminosos. Este conteo se realizó cada 7-10 días.

En este ensayo, a diferencia de la etapa realizada en el verano de 2014, se utilizó un testigo absoluto debido a que en la fecha actual la carga parasitaria de los insectos no es tan alta como en primavera y verano y por lo tanto se reduce el impacto de la ausencia de control químico en el grupo testigo.

#### **Evaluación del efecto de los controladores.**

Se realizaron aplicaciones de la suspensión de los controladores, una cada semana, efectuando el recuento de moscas adultas cada siete días de acuerdo a dos modalidades: una mediante el empleo de rejillas de madera, según Scudder (1974), estas se disponen inclinadas en puntos del galpón y se cuenta por un minuto el número de moscas presentes entre las 10 a 12 de la mañana.

La otra modalidad fue la utilización de un número definido de tarjetas de cartulina de color blanco de 7X10 cm., las que se dispusieron en la parte superior de los galpones y distribuidas de manera homogénea. Semanalmente se retiran las tarjetas y se remplazan por nuevas, contando las manchas fecales observadas en cada tarjeta.

**4.3c) Evaluación a nivel experimental y de campo, en galpones de postura del efecto de los biocontroladores en cuatro condiciones de temperatura y humedad a lo largo del año,**

**4.3c1.** Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 70-75 % HR y temperaturas medias de 24 y 19 C° Realizable durante los meses de Mayo y Junio (Otoño)

**4.3c2.** Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 74-66 % HR y temperaturas medias de 16-19 C° Realizable durante los meses de Agosto y Septiembre  
( Primavera temprana)

**4.3c3.** Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 59-52 % HR y temperaturas medias de 22-26 C° Realizable durante los meses de Octubre y noviembre  
(Primavera Tardía)

Las tres pruebas enunciadas se llevaron a cabo como una experiencia continua entre los meses Agosto y Diciembre de 2014.

En esta parte del trabajo se utilizaron 2 unidades de producción de huevos de 11.000 aves cada una. De estos galpones se estableció que los tratamientos serian los siguientes.

**Galpón 1**

**Unidad 1. Tratada con *Beauveria bassiana* (F2 y C2).** Galpón con 11000, aves. Esta unidad se trató con una aspersión semanal de una suspensión de *B. bassiana* con las cepas F2 y C2 con una concentración de 10<sup>9</sup> conidias por ml. y un volumen de 60 litros por galpón de 12 X 80 metros. Las cepas usadas fueron las mejor evaluadas tanto in vitro como in vivo (F2 y C2). El tratamiento estuvo dirigido a las acumulaciones de estiércol bajo las jaulas y a la totalidad de la estructura del galpón, en especial techumbre y cerchas que es donde se

ubican los preferentemente insectos, durante la tarde y noche cuando la temperatura desciende.

El experimento de campo se extendió entre el 9 de agosto y el 18 de Diciembre de 2014.

La aspersión se aplicó durante los meses de Agosto y Septiembre previa evaluación de la cantidad de insectos por metro cuadrado y recambio semanal de tarjetas de monitoreo cada vez a las 11 de la mañana. A partir de octubre las aplicaciones se realizaron por la tarde y las evaluaciones durante la mañana del mismo día de aplicación.

A partir del mes de Octubre se complemento la aplicación de los controladores biológicos con la aplicación de un larvícida hormonal, (Juvenoide, RUSH ®). Orientado a las acumulaciones de estiércol.

## **Galpón 2.**

**Unidad 2.** Testigo. Durante los meses de Agosto Septiembre y Octubre se mantuvo como testigo absoluto, sin aplicaciones de insecticidas y a partir de Noviembre se le introdujo el manejo normal de insectos que efectúa la industria avícola Cintazul, realizado por una empresa externa, que incluye Cyperkill ®, cipermetrina, como adulticida y Rush ® como larvícida, con aplicaciones semanales.

Las evaluaciones se realizaron semanalmente con el método de Scudder (1974), con rejillas de madera, para determinar la presencia de insectos por metro cuadrado y se uso el método de Schlapbach (2007) con tarjetas de monitoreo a través de las cuales se establece la presencia y evolución de las poblaciones de insectos a través de las manchas fecales depositadas por estos parásitos.

### **4.4) Elaboración y diseño de etiquetas en función de las formulaciones desarrolladas.**

Se realizó un trabajo en grupo con los profesionales de Centrovet y se definió el tipo de envase en función del producto y características de la etiqueta en

términos de tipo y forma, el contenido está definido por la autoridad sanitaria SAG o ISP.

**Objetivo 5:** Nombre Presentar resultados finales ante autoridad sanitaria para registrar y patentar los productos finales, para su comercialización a nivel nacional.

Método:

Análisis toxicológico digestivo agudos y crónicos para las formulaciones desarrolladas

Pruebas de alergia

Pruebas respiratorias agudas.

Revisión Documental Revisión bibliográfica sobre las formulaciones desarrolladas a partir de las cepas aisladas,

Revisión técnica: Incorporar la información obtenida durante el desarrollo de esta investigación, respecto de las formulaciones probadas (test de eficiencia), en la estructura del protocolo que solicita la autoridad sanitaria para la evaluación técnica.

**4.- Descripción de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias.**

**Actividades objetivo específico N° 1.** Obtener aislados nativos de hongos entomopatógenos desde poblaciones de mosca domestica en planteles avícolas.

**1.1) Muestreo y colección de distintos estados de desarrollo de, *M domestica* para la detección de patologías originadas por hongos Entomopatógenos.**

Se muestreo distintos estados de desarrollo de *M. domestica*, cadáveres de entomofauna local y de suelos con alta materia orgánica proveniente de galpones avícolas y suelos agrícola, para la detección de patologías originadas por hongos entomopatógenos.

Las muestras larvas y moscas adultas se depositan en bandejas y en jaulas de crianza con agua y alimento, observando periódicamente la presencia de insectos muerto y esporulados, los insectos muertos se esterilizan con hipoclorito de sodio al 10%, por 3 segundos, se enjuagan con agua estéril y se incuban en cámara húmeda hasta obtener hongos esporulados desde los cadáveres, los hongos son aislados, identificados se almacenan en frío hasta su uso (Kaaya, et al, 1995; Kalsbeek et al, 2001).

**Actividades objetivo específico N° 2.** Establecer el nivel de patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas e identificadas sobre los distintos estados de desarrollo de la mosca domestica (larva, pupa y adulto) obtenidas a partir de una crianza artificial, evaluando in vitro la efectividad de los aislados obtenidos en función de la concentración de ellos

### **2.1) Establecimiento de crianza artificial de *M. domestica***

El Establecimiento de crianza artificial de *M. domestica* se basó en lo descrito por Lam et al, (2007); Zurek et al, (2002); Scorza y Cova,(2006)

Muestras de poblaciones de insectos adultos y larvas, colectadas de galpones con aves de postura en la empresa agrícola el Toco, se depositaron en jaulas de crianza de 28 L y en bandejas con dieta artificial, respectivamente, incubándolas en sala de crianza a 25-28°C y fotoperiodo de 14:10 L:O. Los adultos son alimentados con agua, azúcar granulada y leche descremada de manera permanente. Los huevos se colectan al 3-4 día de vida de las hembras en placas con algodón embebido en leche, los huevos colectados se depositan en bandejas con dieta artificial (harina de trigo, levadura, melaza, leche descremada y agua), a los 8-9 días se extraen las pupas por flotación y se

trasladas nuevamente a jaulas de crianza hasta su emergencia para reiniciar el ciclo.

### **2.2a) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en huevos de mosca domestica.**

Grupos de huevos de 18 mg, aproximadamente 240 huevos y recién ovipuestos, se distribuyen en trozos de papel toalla estéril, los que se colocan sobre el alimento para las larvas en envase con 20g de. Sobre los huevos se asperjan 12 gotas de una suspensión de cada hongo a evaluar, a una concentración de  $10^9$  conidias/ml, los envases con tres repeticiones por tratamiento, se incuban a 25°C y se determina el número de larvas eclosionadas y porcentaje de mortalidad. El grupo testigo sólo recibe agua, sin el hongo.

### **2.2b) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas de mosca domestica.**

La patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas, pupas y adultos de mosca domestica, se realizó con una suspensión de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidias/ml. De cada aislado de hongo, se preparó una suspensión ajustando su concentración mediante recuento de conidias en cámara de Neubauer. Grupo de 25 larvas L<sub>2</sub> (72 horas de vida) se sumergieron por 3 minutos en cada suspensión de hongo, las larvas se dispusieron en envases con tapa por 24-48 horas a 25°C y se transfirieron a envases con 60 gr de medio para larva, con fotoperiodo de 14:10 L:O y 25-28°C. Evaluando la tasa de mortalidad, sobrevivencia y emergencia de adultos. Las larvas muertas se colectaron y su superficie se esterilizó por inmersión en NaCl al 10% por 3 seg, se lavaron repetidas veces en agua destilada estéril y se dispusieron en cámara húmeda hasta la esporulación de los hongos. El grupo control fue sumergido en solución de agua con 0.01% Tween-80. Cada ensayo se repitió tres veces.

### **2.2c) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en pupas de mosca domestica.**

Grupos de 15 pupas de 24 horas y 72 horas de desarrollo,

se sumergieron en una suspensión de cada hongo a una concentración de  $10^9$  conidias/ml por 3 minutos, las pupas tratadas se colocaron en envases con papel filtro humedecido con agua destilada estéril, se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$ , observando el porcentaje de eclosión de los adultos. El grupo control fue sumergido en agua destilada estéril, cada tratamiento se repitió tres veces

#### **2.2d) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en adultos de mosca domestica.**

**Tratamiento por aspersión:** Suspensiones acuosas de los hongos en evaluación se prepararon a concentración de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml. Grupos de 30-50 moscas de 2-3 días de vida fueron asperjadas con cada concentración por 20 seg, dejándolas sobre papel filtro en cajas de 30x20x20 cm a  $25^{\circ}\text{C}$  y 14:10 L:O. El grupo control se trató con agua destilada estéril, cada tratamiento fue con tres repeticiones. La mortalidad se registró por 15 días, colectando los cadáveres, esterilizando la superficie y transfiriéndolos a cámara húmeda

#### **2.2.2 Evaluación del comportamiento de los hongos en el control de larva de moscas L2 a nivel fecal.**

Se colectaron en bandejas, fecas de aves en experimentación, depositando 30 gramos de fecas en recipientes de plásticos y mezclándolas con 4ml de una suspensión de  $10^9$  conidias/ml de cada hongo a evaluar, en cada recipiente se depositaron 15 larvas L2, tres repeticiones por tratamiento, Los envases se cubrieron con tul y se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$  por 8-9 días hasta evaluar el porcentaje de pupas y adultos emergidos. Las pupas extraídas se depositan en frascos con tapón de algodón se incuban y se observa la emergencia de adultos.

#### **2.2.3) Evaluación de la efectividad de los aislados mediante el tránsito gastrointestinal y supervivencia de conidias de hongos entomopatógenos en aves de experimentación.**

**Método:**

Se evaluó el paso intestinal de los hongos en las aves, dándoles a consumir al hongo en polvo con una concentración de  $10^9$  conidias/g y mezclado con el alimento, las cepas a evaluar corresponden a *B. bassiana* C2,F2; *P. lilacinus* A y *M. anisopliae* B, los hongos fueron entregados diariamente, por 6 días, 4g del hongo en mezcla con el alimento por gallina. Las evaluaciones se realizaron con tres y dieciocho grupos de dos gallinas por grupo y un grupo testigo al que no se le dio el hongo. Al tercer día cuarto y sexto día de consumo del hongo se tomaron muestras diarias de las fecas frescas, las que fueron colectadas en bandejas que se colgaron bajo la aves seleccionas en los distintos pisos de los gallineros. Las muestras de fecas frescas, 1 gramo por bandeja se llevaron a dilución y se sembraron en placas de agar-agua e incubaron a 25°C por una semana hasta determinar la presencia de unidades formadoras de colonia.

**Actividades objetivo específico N° 3.** Diseño de ingeniería y puesta en marcha de Biorreactor para la producción masiva de hongos entomopatógenos.

Reproducción en Biorreactor prototipo, de las cepas patógenas en evaluación y ajuste del mecanismo de Autoclaveado, incubación y secado de medios de cultivos esporulados.

Ajuste de parámetros de cultivo de los hongos en biorreactor,

**Actividades objetivo específico N° 4.** Nombre Formular y evaluar *in vitro* e *in vivo* la presentaciones finales que se espera obtener, tanto en polvo, suspensión y cebos

**4.1) Preparación de las formulaciones y control de calidad Reproducción masiva de los hongos en sustrato sólido y líquido**

a) Sustrato sólido.

La producción de los hongos se realizó en sustrato sólido, arroz partido, bajo dos modalidades

a1) Arroz partido humedecido por 20 minutos en agua y escurrido hasta una humedad del grano de 45%,. El sustrato humedecido se distribuye en frascos de vidrio de 1L y se esterilizan por 35 a 40 minutos a 121°C, una vez frío el medio, se inocula cada botella con los hongos previamente preparados en medio líquido.

El medio líquido se realizó de acuerdo a indicado por Polar et al, 2005; y Jenkins et al, 1998, en matraz erlenmeyer, se mezclan 20 gramos de levadura de cerveza y de sacarosa por litro de agua destilada, se esteriliza por 30 min a 121°C, una vez frío este medio se inocula con la cepa en uso, que tiene una concentración de  $10^7$  esporas/ml y se somete a agitación a 150 rpm y 25-28°C por 5 días. Este tipo de producción provee un inóculo con fragmentos de micelio suspendidos en una fase de crecimiento activo que se transfiere al sustrato sólido de producción masiva en botellas que se incuban a  $25 \pm 2$  °C por 15 días.

a2) Preparación en el biofermentador se depositaron 20 k de arroz partido con un contenido de humedad de 40%, se lleva a esterilización por 35 minutos a 121°C, pasado este tiempo se extrae el vapor y se agita el sustrato a distintos intervalos de tiempo hasta eliminar el exceso de humedad y reducir la temperatura. Una vez frío se inocula con una suspensión del hongo, producido previamente en medio líquido, como ya fue descrito. El sustrato inoculado se lleva a fase de incubación 26-28°C por 15 días y con agitación por un periodo de 20 minutos una vez a la semana. Pasado el tiempo de incubación se procede a secar el sustrato con el hongo mediante un flujo de aire caliente (40°C) y con agitación a intervalo de 6 horas y por un periodo de tres días. Una vez seco el sustrato, se extrae y se almacena en bolsas al vacío hasta el proceso de extracción de conidias mediante la molienda con molino de martillo y control de calidad.

d) Secado y extracción de las conidias

Después de 15 días de incubación y bajo el sistema de la producción en botellas, el sustrato con los hongos se distribuye en bandejas y se llevan a una estufa de secado con 30°C por dos días, hasta obtener un contenido de humedad de 4-5% del sustrato. El sustrato seco, se embolsa al vacío y se conservan hasta su molienda y extracción de conidias.

La extracción de conidias se realiza, en ambos sistema de producción, sometiendo el sustrato seco al tamizado por un set de tamices de diferentes micronaje con vibración constante, previa molienda por un molino de martillo. El polvo colectado luego del tamizado es almacenado en bolsas selladas al vacío para su control de calidad.

#### e) Control de calidad del producto

El producto final es sujeto una serie de pruebas de calidad, de acuerdo a lo indicado por Alves, (1980) y Jenkins et al, (1998) que consisten en:

- 1.- El contenido de humedad se chequea antes y después del proceso de secado determinando que el nivel de humedad del polvo debe ser de 5% o menos.
- 2.- Viabilidad de las conidias, para ello se prepara una suspensión del producto a evaluar, a una concentración de  $10^5$  esporas/ml, una gota de esta suspensión se coloca sobre un portaobjeto en que previamente se dispuso una fina película de medio PDA, este portaobjeto se coloca en cámara húmeda a 25° por una 24 horas, luego se cuenta bajo microscopio el número de esporas germinadas de un número de 100, esto se repite tres veces y se determina el porcentaje de esporas germinadas, se recomienda que éste sea  $\geq 85\%$ .
- 3.- Concentración de conidias, el número de conidias por gramo de producto final se determina por poner 0,1g de polvo por 100ml de agua con 0,05% de Tween 80, se agita y se lee en cámara de Neubauer. La concentración en el polvo debería ser  $10^{10}$  conidias/g
- 4.- Pureza. Este parámetro se evalúa durante todo el proceso de producción, tomando muestras del sustrato esterilizado, del medio líquido producido para el

crecimiento de los hongos y empleado para la inoculación de los sustratos y finalmente el producto final, el polvo. Si en las etapas previas a la producción de polvo, aparecen contaminantes, se eliminan las bachadas producidas. Para la evaluación del polvo, se prepara una suspensión de  $10^7$  conidias/ml se siembra en placas con PDA, en diluciones seriadas se incuban por 5 días a  $25^{\circ}\text{C}$ , luego se cuenta el número de colonias del hongo y de posibles contaminantes por dilución, el nivel de contaminantes debe ser menos a 0,02%.

#### **4.2 a) Evaluación in vitro de cada formulación en los estados de desarrollo de la mosca.**

**4.2a.) Tratamiento por aspersión:** Suspensiones acuosas de los hongos en evaluación se prepararon a concentración de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml.

##### **Método.**

Grupos de 100 pupas próximas a emerger, se dispusieron en frascos con tapón y luego de 24 horas de eclosionadas las moscas, se anestesiaron con frío, por 3 minutos. Una vez extraídas desde los frascos, se depositaron en una malla y se asperjaron con rociador, 8 ml de una suspensión de los hongos y concentración a evaluar, escurrido el exceso de líquido, se depositaron en jaulas de plástico, con alimento (azúcar y leche descremada) y agua ad libitum. Se mantuvieron a temperatura de  $20-25^{\circ}\text{C}$  y 14:10 L:O, evaluando el porcentaje de insectos muertos en el tiempo. El grupo control se trató con agua destilada estéril, cada tratamiento fue con tres repeticiones. La mortalidad se registró por 10-15 días, colectando los cadáveres, esterilizando la superficie y transfiriéndolos a cámara húmeda

**4.2.a.1 Tratamiento de aspersión azucarada sobre una superficie** de los hongos controladores a concentración de  $10^9$  conidias/ml.

Insectos adultos se colocaron en las jaulas de crianza que contenían en su interior, colgando una malla de plástico de color oscuro, previo a la introducción de los insectos ésta fue asperjada con 10 ml de una suspensión azucarada de

cada hongo a evaluar a una concentración de  $10^9$  conidias/ml, se retiró el exceso del líquido de cada trozo de malla y se colgó al centro de la jaula, dejando espacio en los bordes y piso de la jaula para el desplazamiento de las moscas. Fueron alimentadas con azúcar, leche descremada y frascos con agua. En el testigo se asperjó la malla con agua azucarada, sin el hongo. Las jaulas se mantuvieron a temperatura ambiente y se evaluaron por 20-25 días la tasa de mortalidad de los insectos en cada tratamiento, observado la presencia de los hongos desde el cuerpo de los insectos una vez esterilizados y colocados en cámara húmeda.

**4.2a.3) Tratamiento por aspersión acuosa y leche en polvo** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml

**Método.**

Para este ensayo se tomaron pupas próximas a emerger, desde una bandeja de crianza del insecto. Las pupas se dispusieron individualmente en frascos con tapón y luego de 48 horas de eclosionadas las moscas, se anestesiaron con frío, por 3 minutos. Una vez extraídas desde los frascos, se depositaron en una malla y se asperjaron con rociador, 8 ml de una suspensión de la mezcla de las cepas de *B. bassiana* F2 y C2 a una concentración de  $10^9$  conidias/ml y leche en polvo a razón de 3g/l de suspensión (Cova et al, 2009) escurrido el exceso de líquido, los insectos se depositaron en jaulas de plástico, con alimento (azúcar y leche descremada) y agua ad libitum. Se mantuvieron a temperatura ambiente por 15 días, evaluando el porcentaje de insectos muertos en el tiempo. El testigo, sólo fueron asperjados con agua

**4.2a.4) Tratamiento por aspersión acuosa y melaza** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml

Se tomó un número conocido de pupas próximas a eclosionar, a las 48 horas de emergidos los adultos, se anestesiaron con frío y luego se asperjaron con una suspensión de  $10^9$  conidias/ml, de los hongos entomopatógenos *B.*

*bassiana* F2 y C2, mezclado con 0,5 ml de melaza por litro de suspensión. Los insectos tratados se dispusieron en jaulas, al igual que lo descrito en el tratamiento anterior.

**4.2a.5) Tratamiento por aspersión acuosa y melaza y leche en polvo sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml**

**Método.**

Al igual que en los casos anteriores se trabajó con un número definido de insectos adultos de 48 horas de vida, se anestesiaron con frío y luego se asperjaron con una suspensión de los hongos a evaluar, mas la mezcla de leche en polvo (3g/l) y melaza (0,1ml/l), los insectos se colocaron en jaulas de plástico las que contenías placas con azúcar y leche en polvo, además de envases con agua. El grupo testigo fue asperjado con agua sin los hongos y alimentado con leche y azúcar. Se evaluó por 15 días la mortalidad de los insectos en cada tratamiento, evaluando la presencia de éstos desde los cadáveres, previa esterilización de los cuerpos e incubados a 25°C en cámara húmeda.

**4.2.a6.1) Evaluación in vitro del efecto del aceite miscible (Winspray®) sobre el crecimiento y desarrollo de *B. bassiana***

Para evaluar el posible efecto inhibitorio del aceite miscible en el crecimiento y germinación de *B. bassiana*, se determino el número de unidades formadoras de colonias del hongo (UFC) en placas con medio de cultivo agar-agar. Para ello se prepararon suspensiones del hongo en aceite miscible al 2% y sólo en agua estéril, la concentración del hongo en ambas suspensiones fue de  $1,5 \times 10^5$  conidias/ml, se dejaron en reposo 10 horas a temperatura ambiente y luego de cada una se tomó 0,1ml y se sembró en placas con agar-agar, se realizaron cuatro replicas por ensayo y se incubaron a 25°C evaluando el número de colonias formadas a las 72 horas

#### **4.2a.6) Tratamiento por aspersión acuosa y aceite miscible sobre huevos.**

Se evaluó la Patogenicidad y virulencia de los hongos mejor evaluados (*Beauveria bassiana* cepa F2 y C2) sobre huevos de mosca domestica en tratamientos con aceite

##### **Método:**

Huevos recién ovipuestos por hembras adultas de *M. domestica*, se separaron en grupos de 11 mg, se distribuyeron en un pequeño trozo de papel aluminio, fueron depositados en envase que contenían 85 g de alimento para las larvas. Sobre los huevos en el papel se les inoculó 12 gotas de una suspensión de cada tratamiento a evaluar, suspensión de aceite miscible (Winspray®) al 2%; suspensión de *Beauveria bassiana* de ambas cepas (F2 y C2) mezcladas, en una concentración de  $10^9$  conidias/ml; mezcla de Beauveria con aceite a concentraciones antes señaladas y un testigo, asperjadas sólo con agua. Los envases con tres repeticiones por tratamiento, se incubaron a 25°C y se determinó el número de larvas eclosionas y porcentaje de mortalidad.

#### **4.2a.7).- Tratamiento por aspersión acuosa y aceite miscible sobre larvas.**

Evaluación del efecto de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, sobre la sobrevivencia de larvas de *M. domestica* expuestos a diferentes formulaciones con aceite

##### **Método.**

Grupo de 15 larvas del insecto de los estados L2 y L3, provenientes de la crianza artificial, se dispusieron en envases de plástico con 85 gramos de comida, mas 10ml de una suspensión de las cepas *B. bassiana* F2 y C2 a una concentración de  $10^9$  conidias/ml, una mezcla de esta formulación de hongos más aceite al 2% y un grupo testigo, solo asperjado con agua. Los envases de cada tratamiento y estadio larval, se mantuvieron a temperatura ambiente y cubiertos por malla hasta la formación de pupas y emergencia de adultos

evaluando el porcentaje de eclosión de las pupas en cada tratamiento o formulación.

#### **4.2a.8) Tratamiento por aspersión acuosa y aceite miscible sobre adultos.**

Evaluación del efecto en la sobrevivencia de los insectos adultos expuestos a la aplicación de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, mezclados con aceite (1 y 2%)

##### **Método:**

Para este ensayo se tomaron pupas próximas a emerger, desde una bandeja de crianza del insecto. Grupos de pupas de número conocido se dispusieron individualmente en frascos con tapón y luego de 48 horas de eclosionadas las moscas, se anestesiaron con frío, por 3 minutos y se sometieron a tratamientos de aspersión con las cepas de *Beauveria* mas dos concentraciones de aceite (2,0 y 1%).

Anestesiadas las moscas, se depositaron en una malla y se asperjaron con rociador, aproximadamente 8 ml de una suspensión de la mezcla de las cepas de *B. bassiana* F2 y C2 a una concentración de  $10^9$  conidias/ml, otro grupo fue asperjado con una mezcla de *Beauveria* en la concentración antes indicada y aceite a concentraciones de 2% y 1%. Asperjados los insectos adultos se escurrió el exceso de líquido y se depositaron en jaulas de plástico, con alimento (azúcar y leche descremada) y agua ad libitum. Se mantuvieron a temperatura ambiente por 15 días, evaluando el porcentaje de insectos muertos en el tiempo. Los cadáveres se sumergieron en hipoclorito al 0.5%, se lavaron con agua destilada estéril y se dispusieron en cámara húmeda a 25°C para determinar la presencia de los hongos entomopatógenos evaluados. El testigo, sólo fueron asperjados con agua y cada tratamiento tubo tres repeticiones

## **4.2.b) Conidias en Cebos para insectos adultos**

**4.2b.1) Tratamiento con cebo** para alimentación de insectos adultos con una formulación de azúcar más esporas de los hongos entomopatógenos.

Se tomó un número conocido de pupas próximas a eclosionar, a las 24 horas de emergidos los adultos, se les dio a comer sobre un vidrio reloj azúcar con leche descremada y agua dispuesta en botellas con algodón. A cada jaula de plástico con las moscas se les dio a consumir un cebo que consistía en 15 gramos de azúcar mezclada con esporas de los hongos controladores a evaluar, la concentración de la mezcla fue de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/g. Estas se mantuvieron a temperatura ambiente y se evaluó por 20 días el porcentaje de moscas muertas y la presencia de los hongos evaluados en los cadáveres luego de ser montados en cámara húmeda.

El grupo testigo, no recibió a consumir el cebo, solo la alimentación habitual.

**4.2b.2) Tratamiento con aspersión más cebo** con los diferentes hongos controladores en insectos adultos, a concentraciones de  $10^9$  conidias/g/ml.

Al igual que en los casos anteriores se trabajó con un número definido de adultos de 24 horas de vida, se anestesiaron con frío y luego se asperjaron con suspensión de los hongos a evaluar y se colocaron en jaulas de plástico las que contenían placas con 15 gramos de azúcar mezcladas con el hongo a evaluar y placas con el alimento habitual; leche descremada y azúcar, además de envases con agua. El grupo testigo fue asperjado con agua sin los hongos y alimentado con leche y azúcar. Se evaluó por 20 días la mortalidad de los insectos en cada tratamiento, evaluando la presencia de éstos desde los cadáveres, previa esterilización de los cuerpos e incubados a  $25^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda.

**4.2b.3)- Tratamiento con cebo y nitrato de amonio** como atrayente de los insectos adultos.

Se distribuyeron 400 moscas adultas de 24 horas de vida en jaulas de crianza que contenían los cebos, mezcla de 15 g de azúcar y esporas de hongos, con una concentración de  $10^9$  conidias/g. Esta mezcla se depositó sobre un vidrio reloj, el que fue colocado en el centro de una tapa de una placa petri, que contenía 0,3 g de nitrato de amonio disuelto en 2ml de agua. Cada jaula también contenían placas con comida (leche y azúcar) y frascos con algodón con agua, estas se dejaron a temperatura ambiente por 20 días, evaluando la tasa de mortalidad de cada tratamiento y la presencia de los hongos desde el cadáver de los insectos.

#### **4.2 c) Evaluación a de las formulaciones en aves de experimentación**

Evaluación del efecto controlador de los hongos *B. bassiana* que arrojaron los mejores resultados en las evaluaciones previas, F2 y C2, asperjado sobre insectos adultos en galpones de experimentación.

##### **4.2c.1) Evaluación del efecto los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, mezclados con aceite miscible (Winspray®) al 2% sobre la sobrevivencia de insectos adultos de *M. domestica* en un gallinero experimental.**

#### **Método:**

**Tratamiento por aspersión acuosa de Beauveria** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml y aceite miscible al 2% .

Para este ensayo se consideraron tres grupos de aves en jaula, con 60 animales cada uno, todos ellos separados por mallas antiáfido lo que permite introducir insectos adultos en cada grupo y evaluar su comportamiento posterior.

A nivel de tres baterías experimentales con aves de postura, de 3x3 metros con 30 jaulas cada una con 60 gallinas se realizaron liberaciones de moscas adultas de 72 horas de vida, provenientes de la crianza artificial establecida y en mantención en el centro, a las 24 horas de la liberación se realizaron las

aplicaciones semanales por aspersión de los hongos mejor evaluados en los informes anteriores (*B. bassiana* F2 y C2) mezclados con aceite miscible al 2%. La suspensión de los hongos se realizó a partir de conidias de las dos cepas de hongos, desarrolladas en sustrato sólido.

Se preparó una suspensión de 12L de agua que contenía una concentración de  $10^9$  conidias/ml, Tween 80 (0,1ml/L) y se asperjó con una bomba de espalda en dos de los galpones experimentales, rociando todas las áreas cubiertas por la malla, comederos y bebederos, aplicando en cada galpón 6 L de la suspensión preparada. El último galpón correspondió al testigo el que sólo se asperjó con agua.

Los tratamientos fueron los siguientes:

Grupo 1. Testigo absoluto.

Grupo 2. Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml más un 2% de aceite miscible.

Grupo 3. Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml. Sin adición de aceite.

Estas aplicaciones se realizaron semanalmente, los rangos de temperaturas medias fueron los siguientes: T° min. media 7,71 - T° max media 20,48 °

En cada uno de los tres recintos con animales se liberaron dos bandeja de crianza con insectos adultos, estableciéndose el número de de insectos liberado por metro cuadrado posteriormente se evaluó la variación semanal de insectos por metro cuadrado. Los resultados se sometieron a análisis de varianza y test de Duncan para realizar la evaluación estadística de los tratamientos.

**4.2c.2).- Tratamiento por aspersión acuosa de *B. bassiana* sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml adicionada con un 2% de Aceite miscible o 4% de melaza.**

## **Método.**

Para este ensayo se consideraron tres grupos de aves en jaula con 60 animales cada uno, todos ellos separados por mallas antiafido lo que permite introducir insectos adultos en cada grupo y evaluar su comportamiento posterior.

Los grupos considerados fueron:

**Grupo 1.** Testigo absoluto.

**Grupo 2.** Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml más un 2% de aceite miscible.

**Grupo 3.** Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml más 4% de melaza.

Estas aplicaciones se realizaron semanalmente, la temperatura mínima media registrada fue de  $4,7 \pm 1,99^\circ\text{C}$  y la máxima media de  $16,5 \pm 4,40$ .

En cada uno de los tres recintos con animales se liberaron dos bandeja de crianza con insectos adultos en cada grupo de aves, estableciéndose el número de de insectos liberado por metro cuadrado posteriormente se evaluó la variación semanal de insectos por metro cuadrado. Los resultados se sometieron a análisis de varianza y test de Duncan para realizar la evaluación estadística de los tratamientos.

## **Evaluación del efecto de los controladores.**

Se realizaron tres a cuatro aplicaciones de la suspensión de los controladores, una cada semana, efectuando el recuento de moscas adultas cada 5 días mediante un contador mecánico, determinando el número de moscas observadas en un área definida del gallinero, obteniendo el número de insectos por  $\text{m}^2$ .

El recuento de los insectos se realizo entre las 10:30 a 11:30am

#### **4.3) Evaluación a nivel de campo de las formulaciones sobre el control de la mosca**

**4.3.a) Control de *M. domestica* en un plantel avícola con aves de postura en jaula, comparando dos pabellones de 11000 aves cada uno, sometidos a control convencional y control biológico con *B. bassiana*.**

##### **Método.**

Se estableció un ensayo de campo para evaluar el efecto del controlador biológico *B. bassiana* (cepas F2 y C2), aplicado en un pabellón avícola con 11.000 aves de postura en jaula.

Para efectos de la evaluación se conformaron 2 grupos de aves en galpones separados con 11000 aves cada uno.

##### **Tratamiento grupo 1.**

Aplicación semanal en el galpón tratado de 60 litros de una suspensión de conidias de *B. bassiana* con una concentración de  $10^9$  conidias/ml. Esta aplicación se realizó con motobomba de espalda asperjando la estructura completa del galpón y los residuos fecales de ave que se acumulan bajo las jaulas.

**Tratamiento Grupo 2.** Este corresponde a un tratamiento químico con aplicación de un larvícida, Rush® (Piriproxyfén) y de un insecticida para adultos Cyperkill®. (Cipermetrina), aplicados semanalmente.

El conteo de moscas adultas por metro cuadrado de pabellón se realizó según el método de Scudder (1974), en el que se utilizan rejillas de un metro cuadrado las que se ubican en los lugares de mayor afluencia de moscas en ambos galpones evaluados, ubicándolas en lugares de características equivalentes en términos de luminosidad, temperatura y humedad, en cada galpón evaluado. Estas rejillas se distribuyeron en número de 8, cuatro en

cada galpón ubicándolas separadas cada 10 metros, bajo las jaulas en lugares soleados y luminosos

En este ensayo no se utilizó un testigo absoluto debido al alto costo que genera el impacto del parasito sobre una unidad de producción de huevos, si el insecto se deja sin control.

Las mediciones de la población de moscas por metro cuadrado se realizaron durante 8 semanas, (viernes consecutivos) realizándose cada vez a las 10:30 de de la mañana.

Las aplicación de los preparados tanto químicos como biológicos se llevó a cabo a las 18 horas cada vez , evitando las horas de mayor calor que puede producir daño a los hongos aplicados.

**4.3.b) Evaluación de campo del efecto controlador de una suspensión del hongo *B. bassiana* F2 y C2,+ 2% de aceite miscible, asperjado sobre insectos adultos en galpones comerciales de 1.000 m<sup>2</sup> y 11.000 aves en condiciones de temperatura mínima media de 8,89 °C en relación a testigo absoluto,.**

**Método.**

Se estableció un ensayo de campo para evaluar el efecto del controlador biológico *B. bassiana* (cepas F2 y C2), aplicado en un pabellón avícola con 11.000 aves de postura en jaula.

Para efectos de la evaluación se conformaron 2 grupos de aves en galpones separados con 11.000 aves cada uno.

**Tratamiento grupo 1.**

Aplicación semanal, en el galpón tratado con métodos biológicos, de 60 litros de una suspensión de conidias de *B .bassiana* con una concentración de 10<sup>9</sup> conidias/ ml. Esta aplicación se realizó con bomba manual de espalda asperjando la cama de estiércol de las aves que se acumula bajo las jaulas. El

uso de bomba manual de espalda se debe a que el plantel recién establecido, con animales de 20 semanas, tiene una gran sensibilidad al stress y en esta etapa se ha evitado el ruido del motor.

**Tratamiento Grupo 2.** Este corresponde a un testigo absoluto sin aplicación de un controlador químico.

El conteo de moscas adultas se realizó según el método de Schlapbach 2007 en el que se utilizan tarjetas de cartulina que se ubican en los lugares de mayor afluencia de moscas en ambos galpones evaluados, ubicándolas en lugares de características equivalentes en términos de luminosidad, temperatura y humedad, en cada galpón. Estas cartulinas de 7,5cm x 10cm se distribuyeron en número de 14 en cada galpón ubicándolas de manera equidistante, en las cerchas de la estructura en lugares soleados y luminosos. Este conteo se realizó cada 7-10 días.

En este ensayo, a diferencia de la etapa realizada en el verano de 2014, se utilizó un testigo absoluto debido a que en la fecha actual la carga parasitaria de los insectos no es tan alta como en primavera y verano y por lo tanto se reduce el impacto de la ausencia de control químico en el grupo testigo.

### **Evaluación del efecto de los controladores.**

Se realizaron aplicaciones de la suspensión de los controladores, una cada semana, efectuando el recuento de moscas adultas cada siete días de acuerdo a dos modalidades: una mediante el empleo de rejillas de madera, según Scudder (1974), estas se disponen inclinadas en puntos del galpón y se cuenta por un minuto el número de moscas presentes entre las 10 a 12 de la mañana. La otra modalidad fue la utilización de un número definido de tarjetas de cartulina de color blanco de 7X10 cm., las que se dispusieron en la parte superior de los galpones y distribuidas de manera homogénea. Semanalmente se retiran las tarjetas y se remplazan por nuevas, contando las manchas fecales observadas en cada tarjeta.

#### **4.3c) Evaluación a nivel experimental y de campo, en galpones de postura del efecto de los biocontroladores en cuatro condiciones de temperatura y humedad a lo largo del año**

Las tres pruebas enunciadas abajo, se llevaron a cabo como una experiencia continua entre los meses Agosto y Diciembre de 2014.

**4.3c1. Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 70-75 % HR y temperaturas medias de 24 y 19 C° Realizable durante los meses de Mayo y Junio (Otoño)**

**4.3c2. Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 74-66 % HR y temperaturas medias de 16-19 C° Realizable durante los meses de Agosto y Septiembre (Primavera temprana)**

**4.3c3. Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de humedad entre 59-52 % HR y temperaturas medias de 22-26 C° Realizable durante los meses de Octubre y Noviembre (Primavera Tardía)**

En esta parte del trabajo se utilizaron 2 unidades de producción de huevos de 11.000 aves cada una. De estos galpones se estableció que los tratamientos serian los siguientes.

##### **Galpón 1**

**Unidad 1. Tratada con *Beauveria bassiana* (F2 y C2).** Galpón con 11000, aves. Esta unidad se trató con una aspersión semanal de una suspensión de *B. bassiana* con las cepas F2 y C2. con una concentración de 10<sup>9</sup> conidias por ml. y un volumen de 60 litros por galpón. Las cepas F2 y C2 fueron las cepas mejor evaluadas. El tratamiento estuvo dirigido a las acumulaciones de estiércol bajo las jaulas y a la totalidad de la estructura del galpón, en especial

techumbre y cercas que es donde se ubican los preferentemente insectos, durante la tarde y noche cuando la temperatura desciende.

El experimento de campo se extendió entre el 9 de agosto y el 18 de Diciembre de 2014.

La aspersión se aplicó durante los meses de Agosto y Septiembre previa evaluación de la cantidad de insectos por metro cuadrado y recambio de tarjetas de monitoreo a las 11 de la mañana. A partir de octubre las aplicaciones se realizaron por la tarde y las evaluaciones durante la mañana del mismo día de aplicación.

A partir del mes de Octubre se complementó la aplicación de los controladores biológicos con la aplicación de un larvícida hormonal, (Juvenoide, RUSH ®). Orientado a las acumulaciones de estiércol.

## **Galpón 2.**

**Unidad 2.** Testigo. Durante los meses de Agosto Septiembre y Octubre se mantuvo como testigo absoluto, sin aplicaciones de insecticidas y a partir de Noviembre se le introdujo el manejo normal de insectos que efectúa la industria avícola Cintazul, realizado por una empresa externa, que incluye Cyperkill ®, cipermetrina, como adulticida y Rush ®, piriproxifen, como larvícida, con aplicaciones semanales.

Las evaluaciones se realizaron semanalmente con el método de Scudder (1974), con rejillas de madera, para determinar la presencia de insectos por metro cuadrado y se usó el método de Schlapbach (2007) con tarjetas de monitoreo a través de las cuales se establece la presencia y evolución de las poblaciones de insectos a través de las manchas fecales depositadas por estos parásitos.

**5 Elaboración y diseño de etiquetas en función de las formulaciones desarrolladas. Trabajo en grupo con profesionales del centro veterinario CENTROVET**

### **Actividades objetivo específico N° 5.**

Documentar el protocolo de Requisitos Técnicos para la evaluación de plaguicidas de acuerdo a la resolución N° 3670 del 23 de Diciembre de 1999, Ministerio de agricultura. Esta documentación esta constituoda principalmente por el presente trabajo.

## **METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS.**

### **PRIMERA ETAPA**

Durante la primera etapa se realizó un trabajo evaluado cualitativamente.

- 1) Muestreo y colección de distintos estados de desarrollo de, *M domestica* para la detección de patologías originadas por hongos Entomopatógenos.
- 2) Establecimiento de crianza artificial de *M. domestica* y evaluación de patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en distintos estadios de mosca domestica.
  - 2a) Establecimiento de crianza artificial de *M. domestica*
  - 2b) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas de mosca domestica.
  - 2c) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en pupas de mosca domestica.
- 3) Diseño de ingeniería y puesta en marcha de Biorreactor para la producción masiva de hongos entomopatógenos.

#### **Método:**

- 1) Diseño ingenieril y construcción.
- 2) Puesta en marcha de Biorreactor para la producción masiva de hongos entomopatógenos.
- 3) Ajuste de parámetros bioecológicos para las cepas a reproducir.
- 4) El diseño del Biorreactor contempla: autoclaveado durante una hora a 121 C° y dos atmósferas de presión, control de los parámetros térmicos de los procesos de esterilización, incubación y secado, control de rangos de pH, rotación o agitación del sustrato, liberación tanto de CO2 como humedad y finalmente secado del medio de cultivo con los inóculos esporulados. Los que finalmente se muelen y formulan.

### **SEGUNDA ETAPA**

**2.2- Establecer el nivel de patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas e identificadas sobre los distintos estados de desarrollo de la mosca domestica (larva, pupa y adulto) obtenidas a partir de una crianza artificial.**

La patogenicidad y virulencia de los hongos aislados sobre larvas L2 y L3, pupas y adultos de mosca domestica, se realizó con una suspensión de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidias/ml. De cada aislado de hongo, se preparó una suspensión ajustando su concentración mediante recuento de conidias en cámara de Neubauer.

Los aislados evaluados fueron: *B.bassiana* A,B,C,D,E,F,M1,M2 y *M.anisopliae*

2b) patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas de mosca domestica

2c) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en pupas de mosca domestica de 24 y 72 horas de vida

2d) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en adultos de mosca domestica. 1) aspersion a grupos de insectos adultos con suspensiones de los hongos a concentración de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml.

**2.2.3 Evaluación del comportamiento de los hongos en el control de larva de moscas L2 a nivel fecal.**

En recipientes de plástico con 30 gramo de fecas de aves más 4ml de una suspensión de  $10^9$  conidias/ml de cada hongo a evaluar, se depositaron 15 larvas L2, tres repeticiones por tratamiento se incubaron a 25°C por 8-9 días hasta evaluar porcentaje de pupas y adultos emergidos.

**4.2 Evaluación in vitro de las diferentes formulaciones sobre los estados de desarrollo de la mosca**

4.2b) Cebos. (6g azúcar, 2 g leche en polvo y 2ml suspensión de hongos a concentración de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml )

**TERCERA ETAPA.**

## **2.2) Evaluación de patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en distintos estadios de mosca domestica.**

La evaluación de la patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas y huevos de mosca domestica, se realizó con una suspensión de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidias/ml. De cada aislado de hongo, se preparó una suspensión ajustando su concentración mediante recuento de conidias en cámara de Neubauer.

Las cepas a evaluadas son (*B.bassiana* C1,C2,F2,G,H, *M.aisopliae* y *P. lilacinus*

### **2a) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en huevos de mosca domestica.**

A grupos de huevos con número conocido se asperja una suspensión de los hongos a una concentración de  $10^9$  conidias/ml

### **2b) Evaluación de patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas mosca domestica.**

### **2d) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en adultos de mosca domestica.**

**2.2.d1.-Tratamiento por aspersión acuosa** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml, los hongos a evaluados: *B.bassiana* C1,C2.F2, mezcla de C2 y F2 y *M. anisopliae*

## **4.2 Evaluación in vitro de las diferentes formulaciones sobre los estados de desarrollo de la mosca**

**4.2a1.- Tratamiento de aspersión azucarada sobre una superficie** de los hongos controladores a concentración de  $10^9$  conidias/ml.

**4.2b1.- Tratamiento con cebo** para alimentación de insectos adultos se formulo un cebo con 15 gramos de azúcar mezclada con esporas de los hongos controladores a concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/g.

**4.2b2.- Tratamiento con aspersión más cebo** con los diferentes hongos con concentraciones de  $10^9$  conidias/g/ml

**4.2b3.- Tratamiento con cebo y nitrato de amonio** como atrayente de los insectos adultos.

### **2.2.3) Evaluación del tránsito gastrointestinal y supervivencia de conidias de hongos entomopatógenos en aves de experimentación.**

Los hongos evaluados fueron *B. bassiana* F2 y C1 a una concentración de  $10^9$  conidias/g y mezclado con el alimento, este se les entrego diariamente a las aves

## **CUARTA ETAPA**

**2a) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en huevos de mosca domestica. Pochonia**

### **2.2.3) Evaluación del tránsito gastrointestinal y supervivencia de conidias de hongos entomopatógenos en aves de experimentación.**

Las cepas a evaluar corresponden a *B. bassiana* C2; *P. lilacinus* A y *M. anisopliae* B, los hongos fueron entregados diariamente con el alimento a las aves.

**4.2) Evaluación del efecto en la sobrevivencia de los insectos adultos expuestos a diferentes formulaciones y aplicación de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2**

**4.2 a3- Tratamiento por aspersión acuosa** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml y leche en polvo.

**4.2 a4.- Tratamiento por aspersión acuosa** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, con una

concentración de  $10^9$  conidias/ml y mezclado con 0,5 ml de melaza por litro de suspensión.

**4.2 a5.- Tratamiento por aspersión acuosa** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml y melaza (0,1ml/l) y leche en polvo (3g/l).

Iguals formulaciones se emplearon para tratar grupos de pupas, las que se asperjaron con 5 ml de cada formulación.

#### **4.2.c) Evaluación del efecto controlador de los hongos *B. bassiana* F2 y C2, asperjado sobre insectos adultos en galpones de experimentación.**

A nivel de tres baterías experimentales con aves de postura, de 3 x3 metros con 30 jaulas cada una con 60 gallinas se realizaron liberaciones de moscas adultas de 72 horas de vida, provenientes de la crianza artificial, a las 24 horas de la liberación se realizaron aplicaciones semanales por aspersión de los hongos mejor evaluados en las etapas anteriores (*B. bassiana* F2 y C2)

- 1.- Aplicación de una suspensión de Entomopatógenos y aplicación conjunta de Cebos
- 2.- Aspersión de una suspensión de entomopatógenos, en una concentración de  $10^9$  conidias por ml., mas 3 gramos de leche en polvo por litro.
- 3.- Testigo. Solo aspersión con agua.

### **QUINTA ETAPA**

**4.2.a6)** Evaluación in vitro del efecto del aceite miscible (Winspray®) sobre el crecimiento y desarrollo de *B. bassiana*

**4.2.a6a)** Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados (*Beauveria* cepa F2 y C2) sobre huevos de mosca domestica en tratamientos con aceite

**4.4.a6b).**- Evaluación del efecto de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, sobre la sobrevivencia de larvas de *M. domestica* expuestos a diferentes formulaciones con aceite (Winspray®) al 2%;

**4.2.a6d)** Evaluación del efecto en la sobrevivencia de los insectos adultos expuestos a la aplicación de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, mezclados con aceite miscible(Winspray®) al 2%.

- **Tratamiento por aspersión acuosa de Beauveria** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml y aceite

**4.2.c1) Evaluación del efecto controlador de los hongos *B. bassiana* F2 y C2, asperjado solo y con mezcla de aceite sobre insectos adultos en galpones de experimentación.**

A nivel de tres baterías experimentales con aves de postura, se realizaron aplicaciones semanales por aspersión de los hongos mejor evaluados en los informes anteriores (*B. bassiana* F2 y C2) mezclados con aceite miscible al 2% y sin aceite.

1.- Aplicación de una suspensión de entomopatógenos y aceite miscible: Aspersión de una suspensión de entomopatógenos, *B. bassiana* F2 y C2, en una concentración de  $10^9$  conidias/ ml. mezclado con aceite miscible al 2%

2.- Aplicación de una suspensión de Entomopatógenos: Aspersión de una suspensión de entomopatógenos, *B. bassiana* F2 y C2, en una concentración de  $10^9$  conidias/ ml.

3.- Testigo.

Solo aspersión con agua.

**Evaluación del efecto de los controladores.**

Se realizaron tres aplicaciones de la suspensión de los controladores, una cada semana, efectuando el recuento de moscas adultas cada 5 días mediante un contador mecánico, determinando el número de moscas observadas en un área definida del gallinero, obteniendo el número de insectos por  $m^2$ .

#### **4.3) Evaluación de campo del efecto controlador de una suspensión del hongo *B. bassiana* F2 y C2,+ 2% de aceite miscible, asperjado sobre insectos adultos en galpones comerciales de 1.000 m<sup>2</sup> y 11.000 aves.**

a) Se estableció un ensayo de campo para evaluar el efecto del controlador biológico *B. bassiana* (cepas F2 y C2), aplicado en un pabellón avícola con 11.000 aves de postura en jaula.

Para efectos de la evaluación se conformaron 2 grupos de aves en galpones separados con 11.000 aves cada uno.

##### **Tratamiento grupo 1.**

Aplicación semanal, por 7 semanas, en el galpón tratado con métodos biológicos, de 60 litros de una suspensión de conidias de *B. bassiana* con una concentración de 10<sup>9</sup> conidias/ ml.

**Tratamiento Grupo 2.** Este corresponde a un tratamiento químico con aplicación de un larvícida, Rush® (Piriproxyfén) y de un insecticida para adultos Cyperkill®. (Cipermetrina), aplicados semanalmente.

El conteo de moscas adultas por metro cuadrado de pabellón se realizó según el método de Scudder (1974), no se utilizó un testigo absoluto debido al alto costo que genera el impacto del parasito sobre una unidad de producción de huevos, si el insecto se deja sin control.

## **SEXTA ETAPA**

**4.2.c) Evaluación del efecto los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, mezclados con aceite miscible (Winspray®) al 2% sobre la sobrevivencia de insectos adultos de *M. domestica* en un gallinero experimental.**

**C1.- Tratamiento por aspersión acuosa de Beauveria** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml y aceite miscible al 2%.

Los grupos considerados fueron:

**Grupo 1.** Testigo absoluto.

**Grupo 2.** Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml más un 2% de aceite miscible.

**Grupo 3.** Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml. Sin adición de aceite.

**C2.- Tratamiento por aspersión acuosa de *B. bassiana*** sobre insectos adultos con una suspensión de hongos con una concentración de  $10^9$  conidias/ml adicionada con un 2% de Aceite miscible o 4% de melaza.

Los grupos considerados fueron:

**Grupo 1.** Testigo absoluto.

**Grupo 2.** Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml más un 2% de aceite miscible.

**Grupo 3.** Aplicación de una suspensión de *B. bassiana*, con  $10^9$  conidias por ml más 4% de melaza.

**4.3) Evaluación de campo del efecto controlador de una suspensión del hongo *B. bassiana* F2 y C2,+ 2% de aceite miscible, asperjado sobre insectos adultos en galpones comerciales de 1.000 m<sup>2</sup> y 11.000 aves en condiciones de temperatura mínima media de 8,89 °C en relación a testigo absoluto.**

b) Se estableció un ensayo de campo para evaluar el efecto del controlador biológico *B. bassiana* (cepas F2 y C2), aplicado en un pabellón avícola con 11.000 aves de postura en jaula.

Para efectos de la evaluación se conformaron 2 grupos de aves en galpones separados con 11.000 aves cada uno.

### **Tratamiento grupo 1.**

Aplicación semanal, en el galpón tratado con métodos biológicos, de 40 litros de una suspensión de conidias de *B .bassiana* con una concentración de  $10^9$  conidias/ ml.

**Tratamiento Grupo 2.** Este corresponde a un testigo absoluto sin aplicación de un controlador químico.

El conteo de moscas adultas se realizó a través de tarjetas de cartulina, según el método de Schlapbach (2007). En este ensayo, a diferencia de la etapa realizada en el verano de 2014, se utilizó un testigo absoluto debido a que en la fecha actual la carga parasitaria de los insectos no es tan alta como en primavera y verano y por lo tanto se reduce el impacto de la ausencia de control químico en el grupo testigo.

### **4.3c) Evaluación a nivel experimental y de campo, en galpones de postura del efecto de los biocontroladores en cuatro condiciones de temperatura y humedad a lo largo del año,**

**4.3c1.** Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 70-75 % HR y temperaturas medias de 24 y 19 C° Realizable durante los meses de Mayo y Junio (Otoño)

**4.3c2.** Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 74-66 % HR y temperaturas medias de 16-19 C° Realizable durante los meses de Agosto y Septiembre ( Primavera temprana)

**4.3c3.** Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de humedad de 59-52% HR y temperaturas medias de 22-26 C° Realizable durante los meses de Octubre y Noviembre ( Primavera Tardía)

- 5.- Resultados del proyecto: descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión; utilizando gráficos, tablas, esquemas y figuras y material gráfico que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones relevantes del desarrollo del proyecto.

### **Resultados primera etapa.**

En esta etapa inicial se trató principalmente de resultados cualitativos por cuanto esta fase es de establecimiento de las condiciones y métodos para llevar adelante las evaluaciones cuantitativas que permitan establecer la posibilidad de desarrollar un método de control biológico de la mosca domestica en planteles avícolas.

#### **1) Muestreo y colección de distintos estados de desarrollo de, *M domestica* para la detección de patologías originadas por hongos Entomopatógenos.**

Se ha muestreado bimensualmente las poblaciones de moscas presentes en galpones con aves de postura en la empresa agrícola el Toco, Huevos Cintazul, con el objeto de tener ejemplares de campo de *M. domestica* que permitan iniciar la crianza de insectos en la central experimental de Colina.

De los ejemplares colectados se ha podido extraer inóculos de *Enthomophthora muscae*, hongo que genera mortalidad en poblaciones de *M.domestica* y se está tratando de desarrollar los cultivos de este patógeno de manera masiva. Esta reproducción es de particular complejidad por el comportamiento del hongo en su fase reproductiva, lento en medios artificiales específicos, con esporas eyectadas del conidióforo y sensible a condiciones ambientales. Complementariamente

se han estado haciendo evaluaciones preliminares de hongos que se habían aislado con anterioridad sobre fauna entomófila nativa.



Galpón donde se han realizado las colectas de *M.domestica* adultas.



Frascos con moscas capturadas como medio de transporte.



Moscas afectadas por *E. muscae*, aislada en plantel avícola de postura de Agrícola el Toco.



Detalle de moscas afectadas por *E. muscae*, ubicados en espacios intersegmentales del abdomen con presencia de micelio del hongo *E. muscae*.

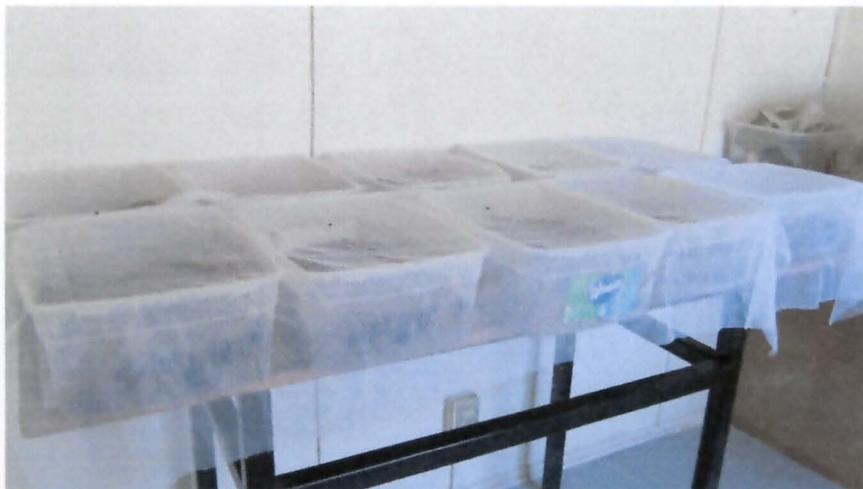
**2.) Establecimiento de crianza artificial de *M. domestica* y evaluación de patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en distintos estadios de mosca domestica.**

**2.1) Establecimiento de crianza artificial de *M. domestica***

Se ha establecido una crianza artificial de *M. domestica* a partir de poblaciones da campo extraídas de plantel avícola de la empresa Agrícola el Toco, esos individuos de colectaron con red entomológica se introdujeron en frascos de vidrio y se llevaron a jaulas de material plástico y malla mosquitera donde se alimentaron machos y hembras para obtener huevos fértiles y desarrollar los distintos estadios de desarrollo del insecto lo que permitirá evaluar los hongos que se obtengan de los muestreos de campo en el plantel o en fauna entomófila nativa.

Para la alimentación de estas poblaciones se desarrollaron dietas artificiales para estadios juveniles en base a afrechillo de trigo, levadura de cerveza, melaza o miel, leche descremada y agua.

Esta actividad se realizó durante todo el periodo de desarrollo del proyecto, renovando el material genético de la crianza con incorporación de ejemplares silvestres del insecto a la colonia de crianza del laboratorio.



**Sistema de alimentación de larvas de *M. domestica***



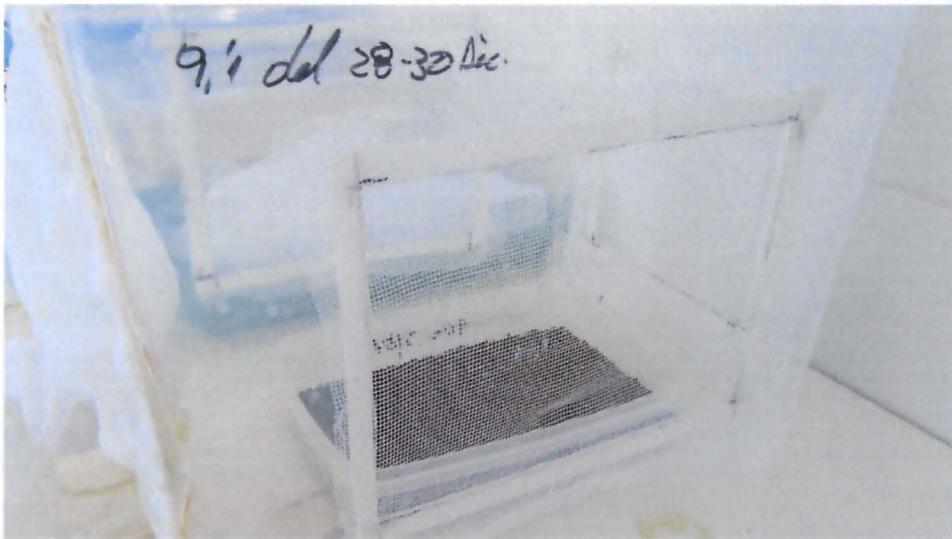
Masa de huevos para incubación.



Larvas en crecimiento sobre mezcla de alimentación en base a afrechillo de trigo melaza, leche y levadura de cerveza.



Pupas obtenidas a partir de crianza de *M. domestica*.



Jaula para emergencia de adultos de *M. domestica* desde pupas colectadas a partir de crianza artificial.

2b) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas de mosca domestica.

Esta fase era inicial, inoculándose larvas de *M. domestica* con cepas de hongos entomopatógenos en suspensión con una concentración de  $10^7$  y  $10^8$  esporas por ml, las cepas de hongos evaluados corresponden a los géneros *Beauveria*, *Paecilomyces* y *Metarhizium*. En cada prueba se utilizaron larvas L3, estas se sumergieron en suspensiones con distintas concentraciones de cada hongo evaluado, durante 2 minutos, luego se incubaron a 25 °C hasta que logran el estado de pupa y posteriormente de adultos.

Estas pruebas preliminares permitirán ajustar a nivel experimental dosis y frecuencia de las aplicaciones.



Batería de placas con larvas inoculadas con hongos entomopatógenos.



Larvas inoculadas con hongos entomopatógenos.

2c) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en pupas de mosca domestica.

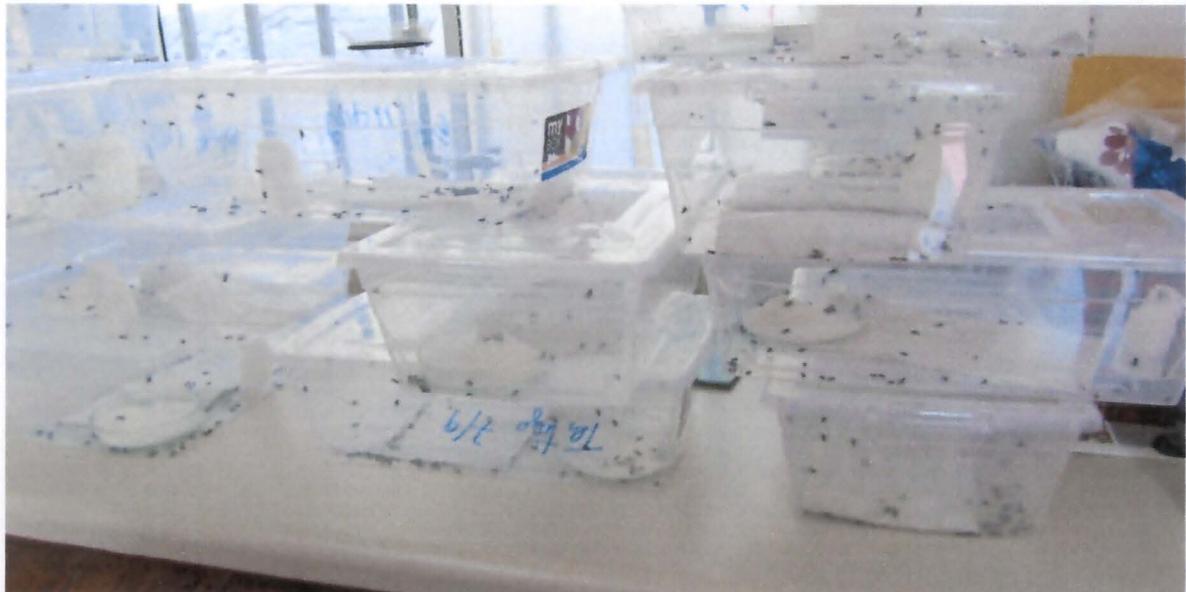


Aplicación de Hongos entomopatógenos en pupas de *M. domestica*. Se ha iniciado un set preliminar de pruebas para determinar la forma de aplicación la frecuencia y la concentración de hongos que puedan frenar el desarrollo de pupas de *M. domestica*. Aún no se tienen resultados.

2d) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en adultos de mosca domestica.

Se han realizado pruebas con adultos inoculándolos con *M. anisopliae* y *B.bassiana* mediante la entrega de una suspensión de estos hongos a través del agua de bebida. Se han obtenido resultados variables con una mortalidad media, por lo que se debe a continuación, establecer cuál es la respuesta a modificaciones de la concentración y en la frecuencia de las aplicaciones.

Jaulas para alimentación de insectos adultos con dieta inoculada con hongos entomopatógenos.



Adultos en cámara húmeda para ver el desarrollo de los hongos y conocer el impacto sobre los insectos que fueron alimentados con dieta inoculada con esporas de *B. bassiana*.



Adultos de *M. domestica* afectados con *B. bassiana*



*M. domestica* afectados con *B. bassiana*

3) Diseño de ingeniería y puesta en marcha de Biorreactor para la producción masiva de hongos entomopatógenos.

Para el diseño y desarrollo de Biorreactor se estableció un contrato con la empresa Ausind Ltda.

### **Resultados Segunda Etapa**

**1) Muestreo y colección de distintos estados de desarrollo de, *M domestica* para la detección de patologías originadas por hongos Entomopatógenos.**

A partir de poblaciones de moscas muestreadas en galpones con aves de postura y de muestras de suelo de áreas aledañas, se estableció la crianza de *M. domestica* a nivel de laboratorio. A partir de cadáveres de moscas se aislaron dos cepas de hongos entomopatógenos del género *Beauveria*, así también de insectos de la familia *Buprestidae*. Estos tres tipos de hongos, junto a otras siete cepas aisladas desde fauna entomófila, fueron utilizados en los diferentes ensayos, los diferentes aislados corresponden a los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*.

Cuadro N°1

<b>Hongos entomopatógenos evaluados en el proyecto y clasificados en Lab. Micología Fac. Medicina U de Valparaíso</b>	
0.07	<i>Beauveria bassiana A</i>
0.01	<i>Beauveria bassiana B</i>
0.05	<i>Beauveria bassiana C</i>
0.09	<i>Beauveria bassiana C1</i>
0.20	<i>Beauveria bassiana C2</i>
0.06	<i>Beauveria bassiana D</i>
0.02	<i>Beauveria bassiana E</i>
0.03	<i>Beauveria bassiana F</i>
0.10	<i>Beauveria bassiana F2</i>
0.40	<i>Beauveria bassiana G</i>
0.30	<i>Beauveria bassiana H</i>
0.04	<i>Beauveria bassiana M1</i>
0.08	<i>Beauveria bassiana M2</i>
0.70	<i>Beauveria bassiana Buprestido</i>
0.02	<i>Metarhizium anisopliae A</i>
0.01	<i>Metarhizium anisopliae B</i>
0.60	<i>Paecilomyces lilacinus A</i>
	<i>Pochonia chlamidospora</i>

**2.2- Establecer el nivel de patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas e identificadas sobre los distintos estados de desarrollo de la mosca domestica (larva, pupa y adulto) obtenidas a partir de una crianza artificial.**

**2.2b) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados sobre larvas de mosca domestica.**

Para llevar adelante estas actividades se prepararon suspensiones de cada aislado en tres concentraciones  $10^6$ ,  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml, cada concentración y aislado se evaluó con grupos de 25 larvas de 72 horas de vida (L<sub>2</sub>), sumergiéndolas por 3 minutos e incubándolas en 70 grs. de medio para larvas a 25°C hasta el término de su desarrollo. Evaluando el nivel de mortalidad de las larvas en los diferentes aislados

En el cuadro N°2 se observa el nivel de mortalidad de las larvas L2, cuando se aplica una concentración de  $10^6$ ,  $10^8$  o  $10^9$  conidias/ml, expresadas en porcentaje.

Cuadro N°2

Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>M. domestica</i> , sumergidas en suspensión de diferentes aislados de hongos en dosis de $10^6$ , $10^8$ , y $10^9$ conidias/ml			
Aislados de hongos entomopatógenos	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> expuestas a $10^6$ conidias/ml	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> expuestas a $10^8$ conidias/ml	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> expuestas a $10^9$ conidias/ml
<i>B. bassiana M1</i>	30,66 ± 1,54 a	47,33 ± 1,92 bcd	54,67 ± 1,05 bcd
<i>B. bassiana M2</i>	31,29 ± 1,53a	50,0 ± 2,78 ab	50,09 ± 1,26 cd
<i>B. bassiana A</i>	34,66 ± 2,00a	58,30 ± 1,75 ab	62,77 ± 1,26 abc
<i>B. bassiana B</i>	34,66 ± 1,00a	51,28 ± 2,25abcd	60,05 ± 1,53 abc
<i>B. bassiana C</i>	20,00 ± 1,00 bc	49,33 ± 3,55 abcd	54,67 ± 0,93 bcd
<i>M. anisopliae A</i>	32,00 ± 1,53a	59,34 ± 1,82 a	64,67 ± 2,75 a
<i>B. bassiana Buprestido</i>	25,33 ± 0,57 ab	54,67 ± 1,61 abc	61,33 ± 1,91 ab
<i>B. bassiana D</i>	12,00 ± 1,00d	42,00 ± 2,48 d	48,66 ± 2,04 d
<i>B. bassiana E</i>	13,33 ± 1,53cd	50,66 ± 1,96 abcd	53,33 ± 1,33 cd
<i>B. bassiana F</i>	8,00 ± 1,00 d	43,33 ± 3,35 cd	49,33 ± 0,78 d
Testigo	31,29 ± 1,53e	8,44 ± 1,57 e	8,00 ± 1,29 e

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

Los niveles de mortalidad sobre *M. domestica* generados por los diferentes aislados aplicados, en una concentración de  $10^6$  conidias por ml. reflejaron un nivel bajo y medio de patogenicidad, alcanzándose solo un 34% de control sobre las larvas con dos cepas de *Beauveria bassiana* cuando se aplican concentraciones de  $10^6$  conidias/ml

Dada la baja respuesta de las larvas a una concentración de  $10^6$  conidias /ml en las suspensiones utilizadas con los hongos aislados, con patogenicidades que no alcanzan el 40% de la población de insectos, se evaluó la respuesta de los insectos a concentraciones más altas.

En el mismo cuadro se presenta el incremento en el nivel de mortalidad de las larvas de mosca con concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml. En ambos ensayos, se observa la participación de un mismo grupo de hongos con una respuesta mayor en la mortalidad de larvas.

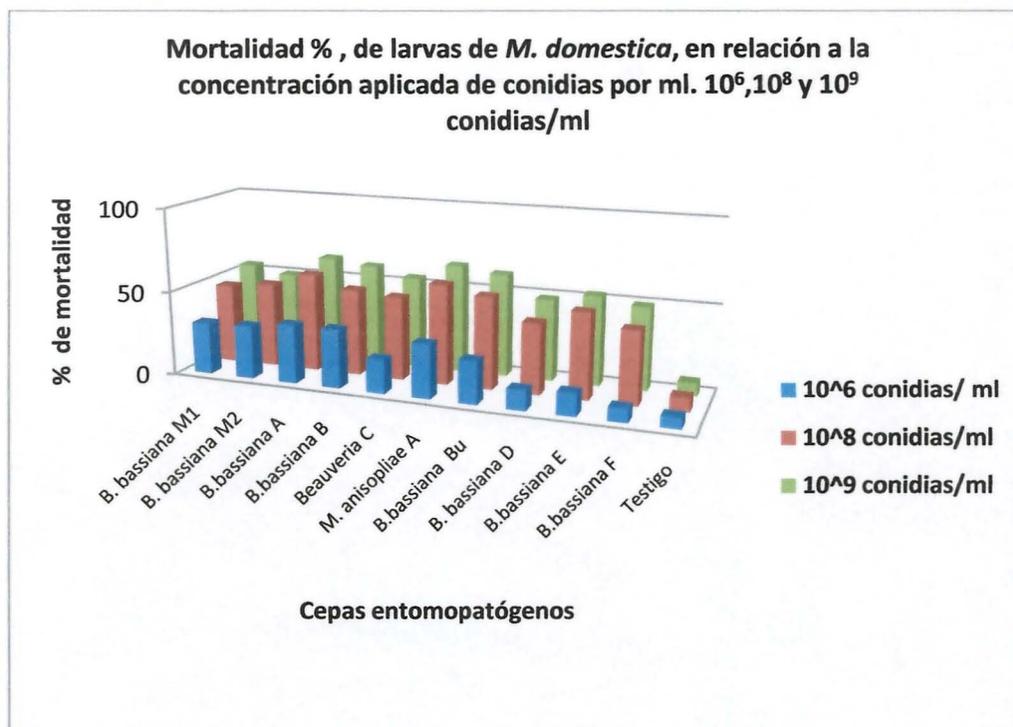
En el cuadro anterior se observa un aumento de la mortalidad en las larvas como respuesta a una concentración de  $10^8$  conidias/ml, aumento concentrado en el

grupo de *Beauveria* (A, B, buprestido) y *Metarhizium*, patrón que se repite cuando se aumenta a  $10^9$  conidias/ml la concentración del inóculo.

En el mismo cuadro se observa un mayor control expresado en el porcentaje de mortalidad en larvas de segundo estado con niveles de 60 a 65% alcanzado por el mismo grupo de aislados que cuando se aplica una concentración de  $10^8$  (*Beauveria* A, B, *Buprestido* y *Metarhizium* A). En relación al resto de los aislados, si bien todos presentan un leve aumento en su efecto sobre la tasa de mortalidad de las larvas en relación al aumento de la concentración de los hongos, este aumento no supera el 60% de mortalidad. En consecuencia sólo se podría considerar estos cuatro aislados antes mencionados, como los más promisorios o de mayor potencialidad, en el control del estado larval de *M. domestica*.

En el gráfico siguiente (Nº1) se aprecia una visión general de la efectividad de los hongos entomopatógenos aplicados en tres concentraciones diferentes  $10^6$ ,  $10^8$ , y  $10^9$ /conidias por ml.

Gráfico Nº1



### 2.2c) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados sobre pupas de *M. domestica*.

Se evaluó el efecto de los diferentes aislados de hongos sobre pupas de *M. domestica*, en dos etapas de su desarrollo, a las 24 horas y a 72 horas de desarrollo, los grupos de pupas se sumergieron por 3 minutos en una suspensión de  $10^9$  conidias/ml, evaluando el nivel de sobrevivencia y emergencia de insectos adultos.

Los resultados obtenidos indican una patogenicidad de los hongos aislados que varía entre un 55 % y un 23,33 % sobre este estado de desarrollo del insecto (Cuadro N°4), se observa un leve aumento en la mortalidad de las pupas cuando estas son tratadas en concentración más alta y en las primeras 24 horas de vida, momento en que las pupas son más sensibles y con menos concentración de quitina en su cubierta externa.

Cuadro N° 3

<b>Porcentaje de mortalidad de pupas de <i>M. domestica</i> de 24 y 72 horas de desarrollo, inoculadas con una suspensión de los diferentes aislados de hongos a concentración de <math>10^9</math> conidias/ml.</b>		
<b>Cepas de hongos evaluadas en una concentración de <math>10^9</math> conidias/ml</b>	<b>Estado de desarrollo de pupas (horas)</b>	
	<b>24 horas</b>	<b>72 horas</b>
<i>B. bassiana M1</i>	23,33 c	20,00 e
<i>B. bassiana M2</i>	28,33 c	25,00 de
<i>B. bassiana A</i>	50,00 ab	43,33 ab
<i>B. bassiana B</i>	53,33 a	45,00 a
<i>B. bassiana C</i>	31,67 c	28,33 cde
<i>M. anisopliae A</i>	51,67 a	45,00 a
<i>B. bassiana Buprestido</i>	55,00 a	51,67 a
<i>B. bassiana D</i>	43,33 bc	31,67 abc
<i>B. bassiana E</i>	38,33 bc	31,67 bcd
<i>B. bassiana F</i>	31,67 c	30,00 cde
Testigo	5,00 d	3,33 f

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

El cuadro anterior indica que los individuos sometidos al efecto de los controladores tienen una mortalidad mas alta que los testigos que no estuvieron expuestos a los entomopatogenos evaluados, existen diferencias significativas en los niveles de mortalidad y control de los diferentes aislados a estos niveles de desarrollo del insecto. Los niveles más altos de control de pupas alcanzan el 55% de la población, valores que los hacen controladores de nivel medio para controlar los estados de pupa en *M. domestica*.

## 2.2d) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en adultos de mosca domestica.

### 1- Tratamiento por aspersión:

Se realizaron pruebas con ejemplares adultos de *M. domestica*, inoculándolos por aspersión con los diferentes hongos entomopatógenos en concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml. Los insectos adultos primero se adormecieron en frio, se asperjados por 20 seg. con cada aislado y se colocaron en jaulas con alimento. Evaluando la tasa de mortalidad de los insectos al cabo de 7 días.

Cuadro N° 4

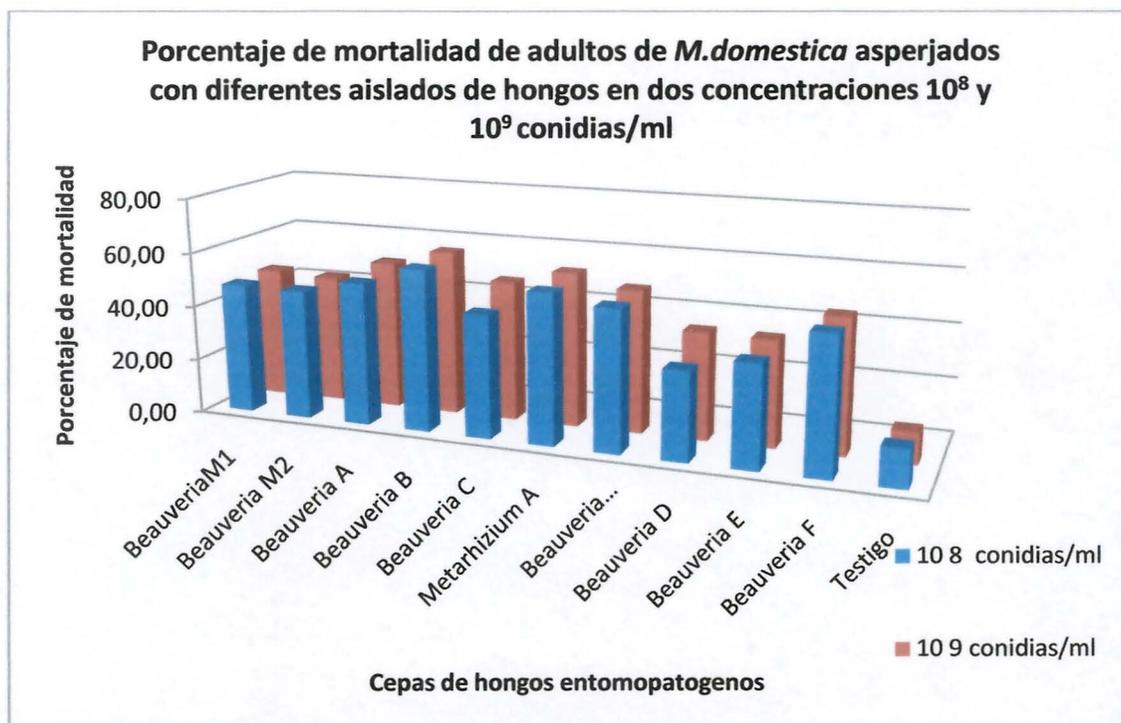
Efecto de diferentes aislados de <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i> sobre la mortalidad de adultos de <i>M. domestica</i> , asperjados con suspensión de $10^8$ y $10^9$ conidias/ml		
Aislados de hongos entomopatógenos	Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>M. domestica</i>	
	Suspensión de $10^8$ conidias/ml	Suspensión de $10^9$ conidias/ml
<i>Beauveria M1</i>	47,62 ± 1,00 cd	48,44 ± 0,57 cd
<i>Beauveria M2</i>	47,18 ± 2,08 c	47,11 ± 0,57 c
<i>Beauveria A</i>	51,90 ± 1,00 ef	54,66 ± 1,00 ef
<i>Beauveria B</i>	59,08 ± 2,08 g	60,44 ± 1,53 g
<i>Beauveria C</i>	44,08 ± 2,08 de	51,11 ± 1,53 de
<i>Metarhizium A</i>	54,54 ± 1,53 f	56,44 ± 2,08 f
<i>Beauveria Buprestido</i>	51,23 ± 0,57 de	52,00 ± 1,00 de
<i>Beauveria D</i>	31,92 ± 1,00 c	39,11 ± 2,52 b
<i>Beauveria E</i>	36,92 ± 1,53 b	38,66 ± 2,00 b
<i>Beauveria F</i>	49,07 ± 3,05 cd	48,88 ± 2,52 cd
Testigo	13,58 ± 2,52 a	11,55 ± 1,52 a

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se aprecia una mortalidad máxima de 51 a 59% dentro del mismo grupo de hongos observados con aplicaciones de una concentración de  $10^8$  conidias por ml. La mitad de la población de moscas muere al cabo de 7 días al ser asperjadas con estos cuatro aislados de *Beauveria A, B, Buprestido* y *Metarhizium A*, en tanto en el grupo control solo el 13% de la población de moscas ha muerto, en igual periodo de tiempo.

Al observar los datos del ensayo de aspersión de las moscas con mayor concentración de inóculo se aprecia que la tendencia en la tasa de mortalidad de los insectos adultos luego de ser asperjados por una concentración de  $10^9$  conidias/ml. es la misma que en el primer ensayo realizado, si bien los porcentajes de mortalidad son un poco mayores, alcanzando un máximo de 60%, son provocados por el mismo grupo de cepas de hongos (*Beauveria A, B, Buprestido* y *Metarhizium A*) que exhiben los niveles más altos de control de insectos adultos in vitro.

Gráfico N°2



En el grafico anterior se presentan los niveles de mortalidad de los insectos adultos luego de ser asperjados con dos concentraciones de inóculo. Los datos indican la tendencia ya observada en los tratamientos anteriores en esta etapa del proyecto, a mayor concentración más alta es la mortalidad, principalmente la cepa *B. bassiana-B*, dentro del grupo de los cuatro aislados de hongos con mayor potencial de control.

### **2.2.2) Evaluación del comportamiento de los hongos en el control de larva de moscas a nivel fecal.**

Previo a la ingesta de las conidias por las aves, se determino el nivel de control de los hongos sobre larvas L2 a nivel fecal. Para ello se colectó fecas de ave, se les asperjó una suspensión de los hongos a evaluar con una concentración de  $10^9$  conidias/ml, luego se depositaron larvas L2 y se evaluó el porcentaje de adultos emergidos.

En el cuadro siguiente se observa un elevado porcentaje de emergencia, con un bajo efecto control a nivel fecal de los hongos entomopatógenos evaluados.

En el cuadro siguiente N° 5. Se observa un elevado porcentaje de emergencia de insectos adultos, superior a 60%, producto de un bajo nivel de control de los diferentes aislados de hongos a nivel fecal.

El control a nivel fecal de los insectos en estado larval por parte de los hongos es de menor eficiencia que lo observado en los niveles de control de las larvas, a igual concentración, pero en un sustrato artificial para larvas.

CuadroN°5

Porcentaje de insectos adultos emergidos desde fecas inoculadas con los diferentes aislados de hongos a concentración de $10^9$ conidias/ml	
Aislados de hongos entomopatógenos	Porcentaje de adultos eclosionados
<i>B. bassiana M1</i>	86,67± 2,00 def
<i>B. bassiana M2</i>	82,22± 2,66 cde
<i>B. bassiana A</i>	65,56± 0,75 ab
<i>B. bassiana B</i>	64,44 ± 1,21 a
<i>B. bassiana C</i>	78,89 ± 1,47 bcde
<i>M. anisopliae A</i>	67,78 ± 1,94 ab
<i>B. bassiana (Buprestido)</i>	68,89± 1,21 abc
<i>B. bassiana D</i>	83,33± 2,26 def
<i>B. bassiana E</i>	91,11± 1,03 ef
<i>B. bassiana F</i>	76,67± 2,43 abcd
Testigo	96,67± 0,84 f

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

Los niveles de control exhibidos por los hongos entomopatógenos evaluados, son relativamente inferiores a lo referenciado en la literatura, donde se indican niveles de mortalidad de larvas y adultos de 90 a 100% a nivel experimental (Lecuona et al, 2005; Sharififard et al, 2011).

#### 4.2.- Evaluación in vitro de las diferentes formulaciones sobre los estados de desarrollo de *M.domestica*

##### 4.2b) Tratamiento mediante cebos

##### b.1) Cebos (alimento más suspensión de hongos)

Se evaluó una segunda modalidad de control de insectos adultos, para ello, grupos de 70 moscas de dos a tres días de vida se dispusieron en cajas con cebo como alimento, leche y azúcar en polvo, agua y 2ml de una suspensión de los diferentes hongos evaluados con una concentración de  $10^8$  conidias/ml, al cabo de 72 horas se cambió el cebo por el alimento habitual y se evaluó la tasa de mortalidad de los insectos a los siete días de montado el ensayo.

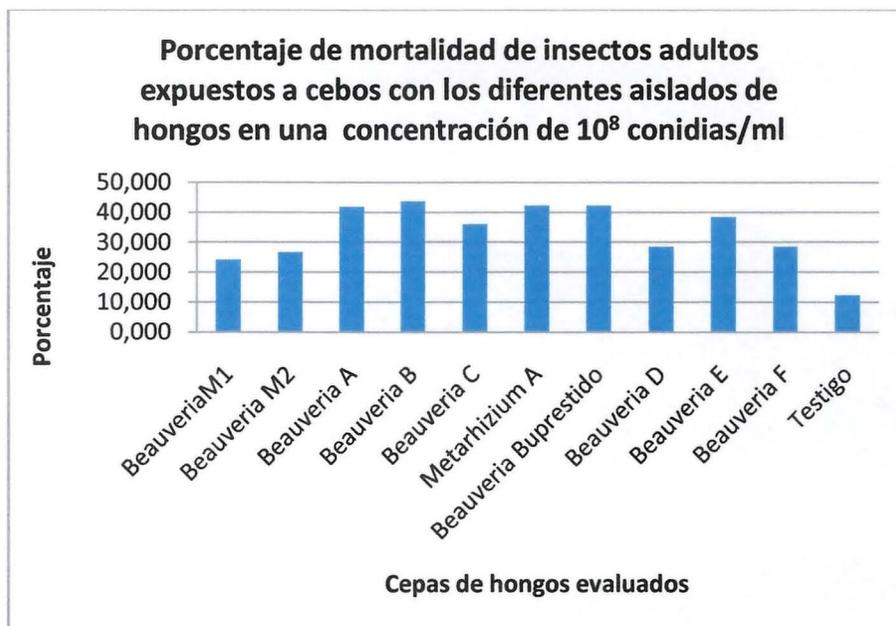
En el cuadro siguiente (N°6) se presentan los niveles de mortalidad de cada uno de los aislados, observando niveles relativamente bajos de control, menores que los obtenidos a igual concentración por aspersión. La tasa de mortalidad de los adultos no supera el 42%, es probable que una de las razones de este bajo nivel se deba a que la mezcla del cebo se compacta rápidamente, por lo tanto la ingesta del hongo se dificulta, razón por la que se evaluaron distintas formulaciones para la elaboración de los cebos, como mezclas solo en polvo o uso de sustratos alternativos para efectuar las mezclas.

Cuadro N°6

<b>Efecto de diferentes aislados de <i>Beauveria</i> y <i>Metarhizium</i> sobre la mortalidad de adultos de <i>M. domestica</i>, usando cebos en dosis de <math>10^8</math> conidias/ml</b>	
<b>Aislados de hongos entomopatógenos</b>	<b>Porcentaje de mortalidad de Adultos de <i>M. domestica</i></b>
<i>B.bassiana</i> M1	24,28 ± 2,00 b
<i>B.bassiana</i> M2	26,66 ± 1,54 b
<i>B.bassiana</i> A	41,91 ± 1,53 de
<i>B.bassiana</i> B	43,81 ± 1,53 e
<i>B.bassiana</i> C	36,19 ± 3,51 c
<i>M.anisopliae</i> A	42,38 ± 1,53 de
<i>B.bassiana</i> Buprestido	42,38 ± 2,08 de
<i>B.bassiana</i> D	28,57 ± 1,00 b
<i>B.bassiana</i> E	40,00 ± 1,00 cd
<i>B.bassiana</i> F	28,75 ± 2,00 b
Testigo	12,38 ± 1,52 a

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

GráficoNº3



En el gráfico anterior se puede apreciar que esta modalidad de control con cebo, logra un bajo nivel de control de los estados adultos del insecto, ninguna cepa alcanzó el 50% de control.

### **Resultados tercera etapa**

#### **2.2. Evaluación de patogenicidad y virulencia, de los aislados sobre en los diferentes estados de desarrollo de *M.domestica***

##### **2b) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados sobre huevos de mosca domestica.**

Se evaluó el efecto de los diferentes entomopatógenos aislados sobre los huevos del insecto, grupos de huevos de pesos similares ( $\pm 18$ mg) se inocularon con una suspensión con  $10^9$  conidias/ml, de los diferentes hongos, evaluándose los niveles de eclosión de los mismos y el porcentaje de control sobre la eclosión.

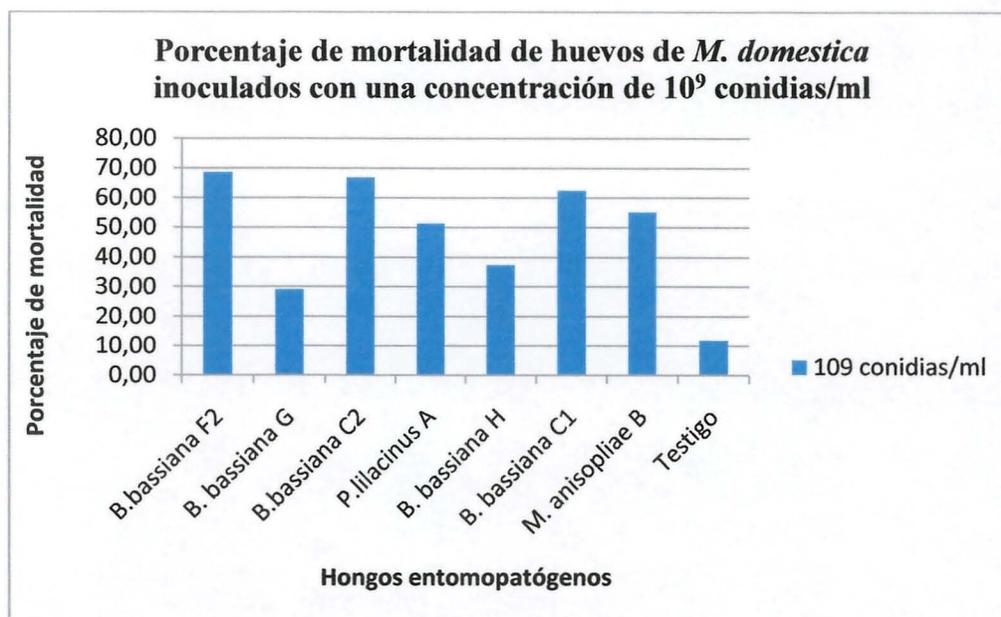
Cuadro N°7

Porcentaje de mortalidad de huevos de <i>M. domestica</i> , inoculados con una suspensión de los diferentes aislados de hongos a concentración de $10^9$ conidias/ml.	
Cepas de hongos evaluadas a concentración de $10^9$ conidias/ml	Porcentaje de larvas muertas s
<i>B.bassiana</i> F2	68,62 ± 4,73 a
<i>B.bassiana</i> G	29,03 ± 16,07 d
<i>B.bassiana</i> C2	66,95 ± 3,21 a
<i>P. lilacinus</i> A	51,38 ± 9,87 b
<i>B. bassiana</i> H	37,50 ± 8,00 c
<i>B. bassiana</i> C1	62,50 ± 5,29 a
<i>M. anisopliae</i> B	55,14 ± 15,04 b
Testigo	11,94 ± 10,58 e

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior y gráfico N°4 se observa el mayor efecto en el control de este estado de desarrollo del insecto, de los mismos cuatro aislados anteriores, (*B.bassiana* F2, *B.bassiana* G, *B. bassiana* C1, *M. anisopliae* B) con un porcentaje de control superior de las cepas *Beauveria* F2 y C2, con niveles sobre 65%, Los huevos no alcanzan a eclosionar o las larvas nacen no se desarrollarse y mueren.

GráficoN°4



Los valores observados en el control de los diferentes estados de desarrollo del insecto, permiten claramente separar dos grupos de potenciales controladores, las cepas *Beauveria* F2,C2 con los mejores niveles de mortalidad en los insectos y el grupo de *Beauveria* C1, *Metarhizium* B y *Paecilomyces*, con resultados menos significativos, pero el conjunto de estos cinco hongos, mas una mezcla de *Beauveria* F2 y C2 son los que se evaluaron en las etapas posteriores del proyecto para el control de los estados adultos del insecto.

## **2.2b) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas de mosca domestica.**

En esta etapa se prepararon suspensiones de cada aislado en tres concentraciones  $10^6$ ,  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml, cada concentración y aislado se evaluó con grupos de 20 larvas de 72 horas de vida ( $L_2$ ), sumergiéndolas por 3 minutos e incubándolas en 70 g de medio alimentario para larvas y a 25°C hasta el término de su desarrollo. Evaluando el nivel de mortalidad de las larvas en los diferentes aislados

En el cuadro N°7 se observa el nivel de mortalidad de las larvas  $L_2$ , cuando se aplica una concentración de  $10^6$   $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml, expresadas en porcentaje. Los niveles de mortalidad de los diferentes aislados revelan en la concentración de  $10^6$  un bajo nivel de control con valores de patogenicidad reducidos alcanzándose solo valores superiores 30% de control con dos cepas de *Beauveria* (F2y C2) y *Metarhizium* B

CuadroNº8

Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>M. domestica</i> , sumergidas en suspensión de diferentes aislados de hongos en dosis de $10^6$ , $10^8$ y $10^9$ conidias/ml			
Aislados de hongos entomopatógenos	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> tratadas con $10^6$ conidias/ml	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> tratadas con $10^8$ conidias/ml	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> tratadas con $10^9$ conidias/ml
<i>B.bassiana F2</i>	35,00 ± 1,00 a	61,67 ± 0,57 a	71,67 ± 0,57 a
<i>B.bassiana G</i>	16,66 ± 2,08 bc	38,33 ± 1,53 c	48,33 ± 1,53 c
<i>B.bassiana C2</i>	33,33 ± 1,53 a	61,66 ± 1,53 a	68,00 ± 0,57 a
<i>P. lilacinus A</i>	13,33 ± 0,57 bc	26,66 ± 1,53 d	58,33 ± 0,57 b
<i>B. bassiana H</i>	8,33 ± 1,53 cd	15,00 ± 1,00 e	21,67 ± 1,15 d
<i>B. bassiana C1</i>	21,66 ± 0,57 b	51,67 ± 0,57 b	65,00 ± 1,00 ab
<i>M. anisopliae B</i>	35,00 ± 1,00 a	46,67 ± 1,15 bc	66,67 ± 0,57 a
<i>Testigo</i>	1,66 ± 0,57 d	0,00 ± 0,00 f	5,00 ± 1,00 e

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

Debido al bajo efecto obtenido sobre las larvas con la exposición a los hongos en concentración de  $10^6$  conidias por ml, se evaluó la respuesta de los insectos a concentraciones más altas.

En el cuadro anterior y gráfico siguientes se presenta el nivel de mortalidad de las larvas de mosca utilizando concentraciones de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml. En ambos ensayos, se observa la participación de un mismo grupo de hongos con una respuesta mayor en la mortalidad de larvas. Se aprecia también que al cambiar el orden de magnitud de la concentración de  $10^6$  a  $10^9$  se duplica e incluso triplica el efecto patogénico de los hongos controladores.

En el cuadro anterior se observa un aumento de la mortalidad en las larvas como respuesta a una concentración de  $10^8$  conidias/ml, aumento concentrado en el grupo de *Beauveria* (F2 y C2), seguido de *Beauveria* C1 y *Metarhizium* B, aunque este último no logró buena respuestas de control. Patrón que se repite con una concentración más alta del inoculo.

En el mismo cuadro se observa un mayor control expresado en el porcentaje de mortalidad en larvas de segundo estado con niveles de 65 a 71% alcanzado por el grupo de hongos con mayor eficiencia y mayor concentración. En relación al resto de los aislados, si bien todos producen un leve aumento en la tasa de mortalidad de las larvas en relación al aumento de la concentración de los hongos, este

aumento en el control de los insectos no supera el 60% de mortalidad. En consecuencia solo se podría considerar estos cuatro aislados antes mencionados, como los más promisorios o de mayor potencial, en el control del estado larval de *M. domestica*. Finalmente se obtuvieron los mejores resultados con las cepas F2 y C2

## **2.2d) Patogenicidad y virulencia de los hongos entomopatógenos aislados, sobre insectos adultos**

### **1.- Tratamiento por aspersión:**

Se realizaron pruebas con ejemplares adultos de mosca, inoculándolos por aspersión con los diferentes hongos entomopatógenos en concentraciones de  $10^9$  conidias/ml. Los insectos adultos primero se adormecieron en frío, se asperjaron con 8ml de suspensión de cada aislado y se colocaron en jaulas con alimento. Evaluando la tasa de mortalidad de los insectos.

En el cuadro siguiente se muestra el efecto de la aplicación de una aspersión con una suspensión hongos entomopatógenos sobre una población de 400 adultos de *M. domestica*. Se hizo una aplicación única que contenía  $10^9$  conidias por ml.

CuadroN°9

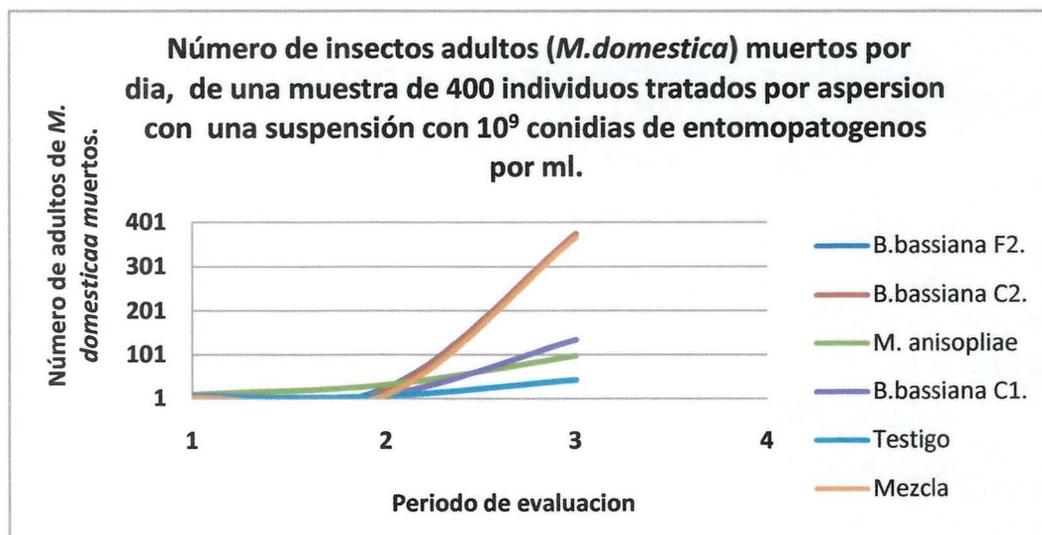
<b>Número de insectos adultos (<i>M. domestica</i>) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados por aspersion de una suspensión con 10<sup>9</sup> conidias de entomopatógenos por ml.</b>			
	Día -3	Día -5	Día -7
<i>B.bassiana</i> F2. <i>a</i>	3,5	25	371
<i>B.bassiana</i> C2. <i>a</i>	4	21	375
<i>M. anisopliae</i> <i>b</i>	10	32	99
<i>B.bassiana</i> C1 <i>b</i>	7,5	10	135,5
Testigo <i>b</i>	3	7	43
<i>B.bassiana</i> F2+C2 <i>a</i>	2,5	9,5	367

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

La observaciones del incremento de individuos muertos se hizo hasta el día 21 de la aplicación y lo que se entrega en el cuadro es el efecto más relevante que ocurre hasta el día 7 post aplicación, El mayor impacto sobre la población de *M. domestica* se logra con *B. bassiana* F2, *B. bassiana* C2 y la mezcla de ambas. Aunque estadísticamente presentan efectos similares hay una leve superioridad de *B. bassiana* C2. Los otros entomopatógenos utilizados presentan un efecto débil sobre las poblaciones afectadas por su utilización.

En el gráfico siguiente, N° 5, se entregan los valores de insectos muertos entre el día 1 y 7 de la aplicación, evidenciándose la capacidad controladora de *B. bassiana* F2, *B. bassiana* C2 y consecuentemente de la mezcla de ambos.

Gráfico N°5



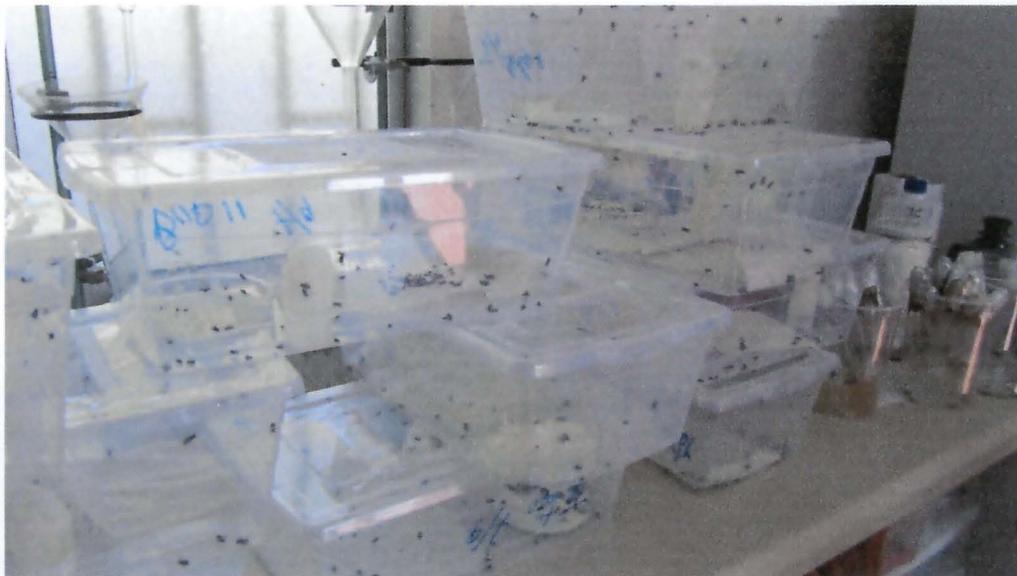
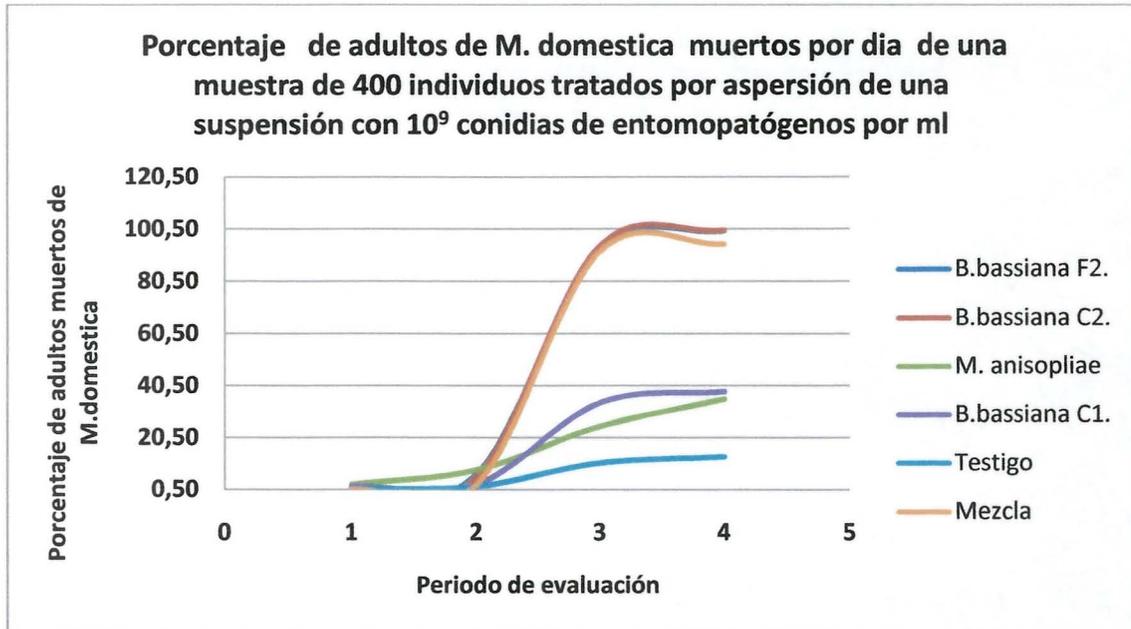
CuadroN°10

Cuadro 10. Porcentaje de insectos adultos ( <i>M. domestica</i> ) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados por aspersión de una suspensión con $10^9$ conidias de entomopatógenos por ml.				
	Día -3	Día -5	Día -7	% Total
<i>B.bassiana F2.</i>	0,88	6,25	92,75	99,88
<i>B.bassiana C2.</i>	1,00	5,25	93,75	100,00
<i>M. anisopliae B</i>	2,50	8,00	24,75	35,25
<i>B.bassiana C1</i>	1,88	2,50	33,88	38,25
<i>Testigo</i>	0,75	1,75	10,75	13,25
<i>B.bassiana F2+C2</i>	0,63	2,38	91,75	94,75

En el cuadro N° 10. se aprecia el valor porcentual del efecto de los distintos entomopatógenos evaluados en esta etapa del trabajo, en el se evidencia la gran disminución de la población de *M. domestica* al día 7 de la aplicación de, *B.bassiana F2* y *B.bassiana C2*, lográndose un 100% de control con *B.bassiana C2*, levemente superior en su capacidad de control a *B.bassiana F2*.

En el gráfico 6 se entrega el efecto relativo de las aplicaciones de entomopatógenos evaluados destacándose la diferencia en sus efectos de *B.bassiana F2* y *B.bassiana C2* y consecuentemente de la mezcla de ambas.

Gráfico N° 6



Baterías de crianza para realizar la aspersión de Hongos entomopatógenos sobre poblaciones de *M. domestica*

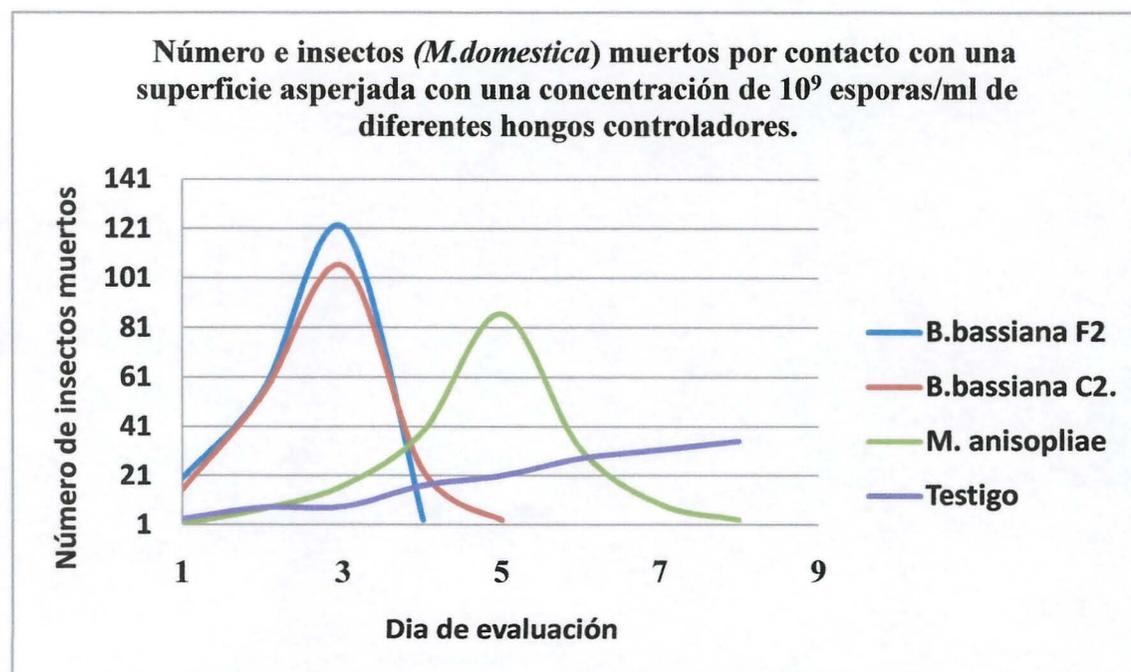
## 4.2.- Evaluación in vitro de los diferentes formulados sobre los estados de desarrollo de mosca domestica

4.2. a1 Tratamiento por aspersión de suspensión azucarada sobre una superficie plástica

Se evaluó la mortalidad de las moscas al tratar con una suspensión azucarada de cada hongo una malla plástica dispuesta en el interior de las jaulas de crianza, evaluando al igual que en los casos anteriores la tasa de mortalidad alcanzada con esta modalidad de control.

Cuadro N° 11 .Número e insectos ( <i>M. domestica</i> ) muertos por contacto con una superficie asperjada con una concentración de $10^9$ esporas/ml de diferentes hongos controladores.								
	Día3	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15	Día 17	Día 21
<b><i>B.bassiana</i> F2 a</b>	20	55,5	121,5	3				
<b><i>B.bassiana</i> C2. a</b>	15,5	54	106	23	3			
<b><i>M. anisopliae</i> a</b>	1,5	7,5	17	39	86,5	32	9,5	3
<b>Testigo a</b>	3,5	8	8,5	17	21	28	31,5	35

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan  
Gráfico N° 7

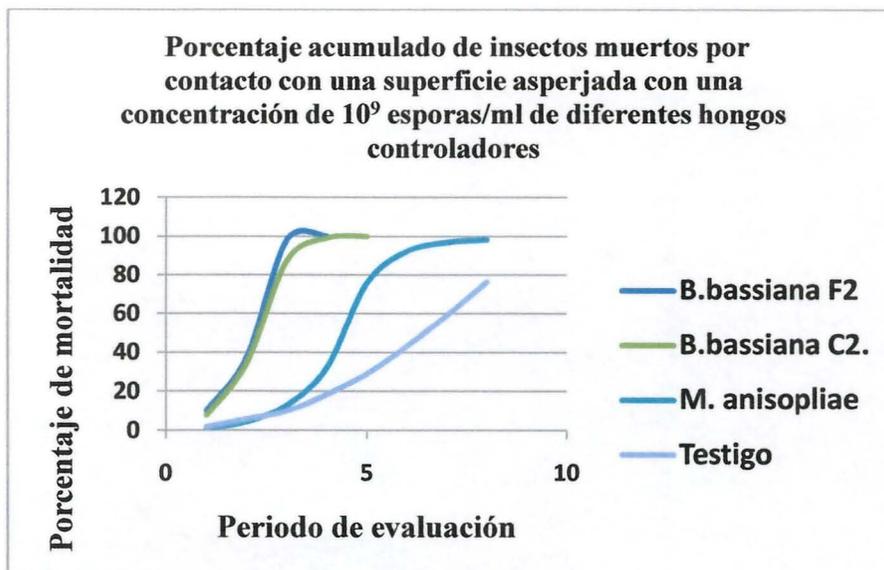


En el cuadro 11y grafico N° 7 se aprecia el efecto generado por el contacto de los insectos adultos (*M. domestica*) con una superficie asperjada con hongos entomopatógenos en una concentración de  $10^9$  conidias por ml. produciéndose la mayor mortalidad de adultos entre el día 5 y 7 luego de la aplicación de la suspensión con entomopatógenos. Las cepas mejor evaluadas corresponden nuevamente a *B.bassiana* F2 y C2

Cuadro N° 12

Porcentaje acumulado de insectos muertos por contacto con una superficie asperjada con una concentración de $10^9$ esporas/ml de diferentes hongos controladores.								
	Día3	Día5	Día7	Día 9	Día12	Día15	Día17	Día21
<i>B.bassiana</i> F2	10	37,75	98,5	100				
<i>B.bassiana</i> C2.	7,75	34,75	87,75	99,25	100			
<i>M. anisopliae</i>	0,75	4,5	13	32,5	75,75	92	96,75	98,25
Testigo	1,75	5,75	10	18,5	29	43	58,75	76,25

Gráfico N° 8



En el cuadro N° 12 y grafico N° 8 se aprecia con claridad la capacidad de control sobre insectos adultos (*M. domestica*) por parte de una suspensión con hongos entomopatógenos en una concentración de  $10^9$  conidias por ml asperjada sobre una superficie sobre la cual se posarán los insectos, produciéndose la mayor mortalidad de adultos entre el día 5 y 7, que alcanza prácticamente un 100% para las cepas de *B.bassiana* F2 y C2. La cepa de *M. anisopliae* evaluada tarda un poco más en alcanzar niveles equivalentes a las anteriores, sin embargo lo logra alrededor del día 15 post aplicación. Los productos finales deben estar constituidos por mezclas de entomopatógenos que aunque tengan efecto en plazos diferidos evitarán la aparición de resistencias por parte de las poblaciones de Insectos al enfrentarlos a conjuntos genéticos diversificados de patógenos.

#### **4.2b.- Tratamiento mediante cebos**

##### **4.2b1- Aplicación de Hongos entomopatógenos con una formulación en polvo, utilizado como cebo y una concentración de $10^9$ conidias por gramo.**

Se evaluó una segunda modalidad de control de insectos adultos, para ello, grupos de 200 y 400 moscas de 24 horas de vida se dispusieron en cajas con cebo como alimento, azúcar y conidias de los hongos en una concentración de  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml. Evaluando la tasa de mortalidad de los insectos.

En el cuadro siguiente se muestra el efecto de la utilización de cebos conteniendo entomopatógenos sobre una población de 400 adultos de *M. domestica*. El cebo utilizado contenía  $10^9$  conidias por gr.

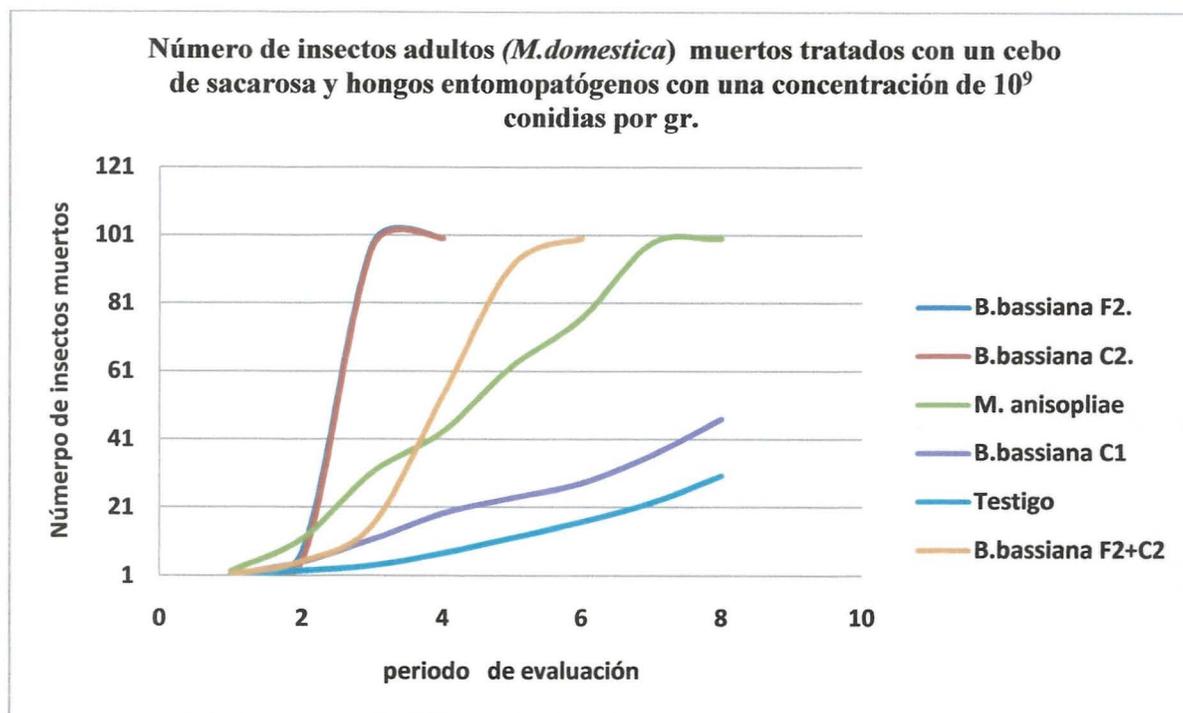
**Cuadro N°13. Número de insectos adultos (*M. domestica*) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de sacarosa y Conidias de entomopatógenos con 10<sup>9</sup> conidias de entomopatógenos por gr.**

	Día-3	Día -5	Día7	Día 9	Día12	Día 15	Día 17	Día 19	Día-21
<i>B.bassiana F2 a</i>	6	25	363	6					
<i>B.bassiana C2. a</i>	4	18	366	12					
<i>M. anisopliae b</i>	10	32	92	64	105	52	40	8	
<i>B.bassiana C1 b</i>	5	13	19	26	30	32	36	45	50
<i>Testigo b</i>	4	5	6	15	18	19	22	31	32
<i>B.bassiana F2+C2 a</i>	5	15	43	152	153	94			

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

La determinación del incremento de individuos muertos se hizo hasta el día 19 de la introducción de cebos en las baterías de evaluación, lo que se aprecia en el cuadro es el efecto más relevante que ocurre en el día 9 post aplicación, El mayor impacto sobre la población de *M. domestica* se logra con *B. bassiana* C2 y F2, de manera similar a lo que ocurre en la aplicación de hongos entomopatógenos asperjados sobre las poblaciones de *M. domestica* Los otros entomopatógenos utilizados presentan un efecto menor y más tardío sobre las poblaciones evaluadas. De todas formas en una aplicación de cebos, lo que se espera es que exista un efecto permanente sobre las poblaciones blanco y de tal forma que también aunque sean efectos menores mantienen en este marco alguna importancia como herramienta de control.

GráficoN°9



En el grafico 9 se entrega una visión del impacto de los distintos entomopatógenos evaluados aplicados en una formulación en polvo como cebo destacándose principalmente la capacidad de *B.bassiana* F2 y C2 de reducir las poblaciones de insectos adultos

Cuadro 14.

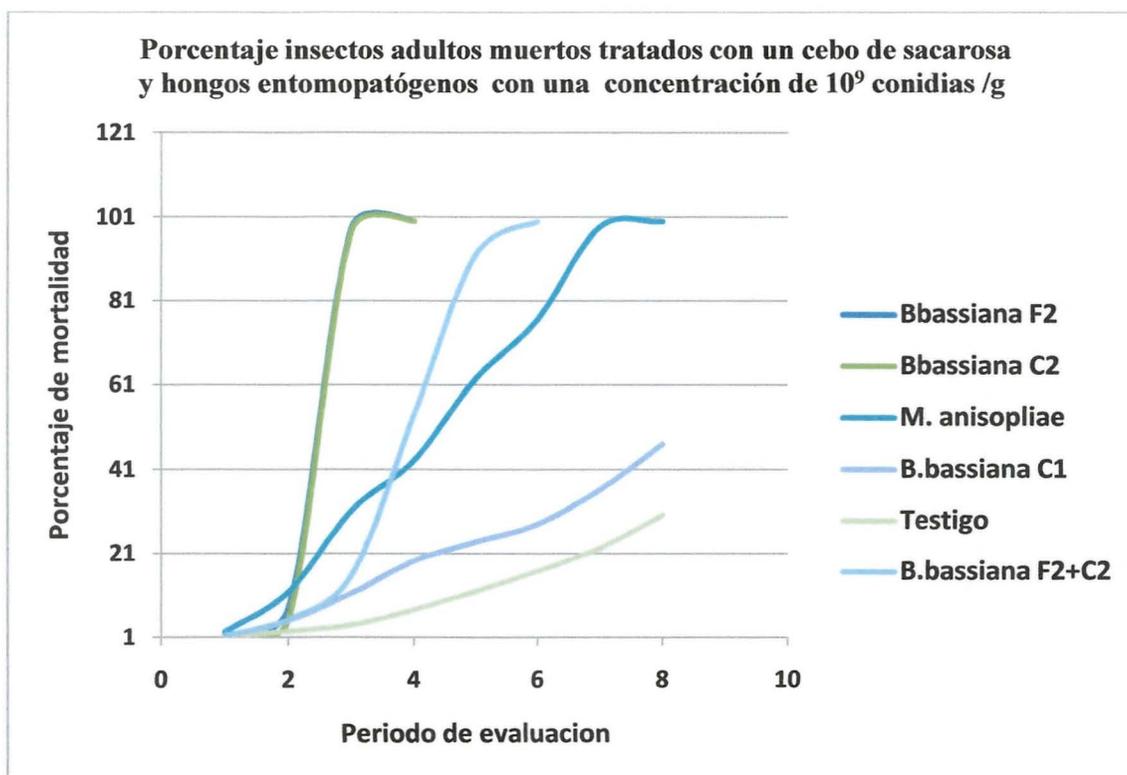
**Porcentaje de insectos adultos (*M. domestica*) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de sacarosa y Conidias de entomopatógenos con  $10^9$  conidias de entomopatógenos por gr.**

	Día-3	Día -5	Día7	Día 9	Día12	Día 15	Día 17	Día 19
<i>B.bassiana F2.</i>	1,5	7,75	98,5	100				
<i>B.bassiana C2.</i>	1	5,25	97,75	100				
<i>M. anisopliae</i>	2,25	11,75	31,25	43,25	62,5	76,5	98,75	100
<i>B.bassiana C1</i>	1,25	5	11,5	19,25	23,75	28	36,25	47
<i>B.bassiana F2+C2</i>	1,33	5,17	15,83	53,92	92,17	100,00		
<i>Testigo</i>	1,08	2,42	3,92	7,58	12,00	16,75	22,33	30,17

En el cuadro 14 se aprecia el valor porcentual del efecto de los distintos entomopatógenos evaluados en esta etapa del trabajo, en el se evidencia la gran disminución de la población de *M. domestica* al día 9 de la aplicación de, *B.bassiana* F2y *B.bassiana* C2, lográndose un 100% de control con ambas cepas de *B.bassiana*, las otras cepas evaluadas logran su efecto con posterioridad como *M. anisopliae* y también la mezcla que en este caso se demora 6 días mas en lograr el efecto total de control .

En el gráfico siguiente se observa el efecto de los controladores utilizados en una formulación en polvo, como cebo atractor con una concentración de  $10^9$  conidias por gr. en este caso también se evidencia el impacto de las cepas *B.bassiana* F2 y *B.bassiana* C2 sobre las poblaciones de *M. domestica*., aunque en esta modalidad el mayor efecto de esas cepas se atrasa unos días respecto de la formulación en suspensión que se aplica por aspersion.

Gráfico N°10



**b1.- Aplicación de Hongos entomopatógenos con una formulación en polvo, utilizado como cebo y una concentración de  $10^8$  conidias por gramo.**

En el cuadro siguiente, N° 15, se aprecia el efecto de un cebo, con una concentración de  $10^8$  conidias por gr. El control alcanzado se retarda en el tiempo, respecto de las aplicaciones con concentraciones mayores, de  $10^9$  lográndose disminuciones importantes después de los 15 días de la aplicación y solamente con *B.bassiana* F2 y C2.

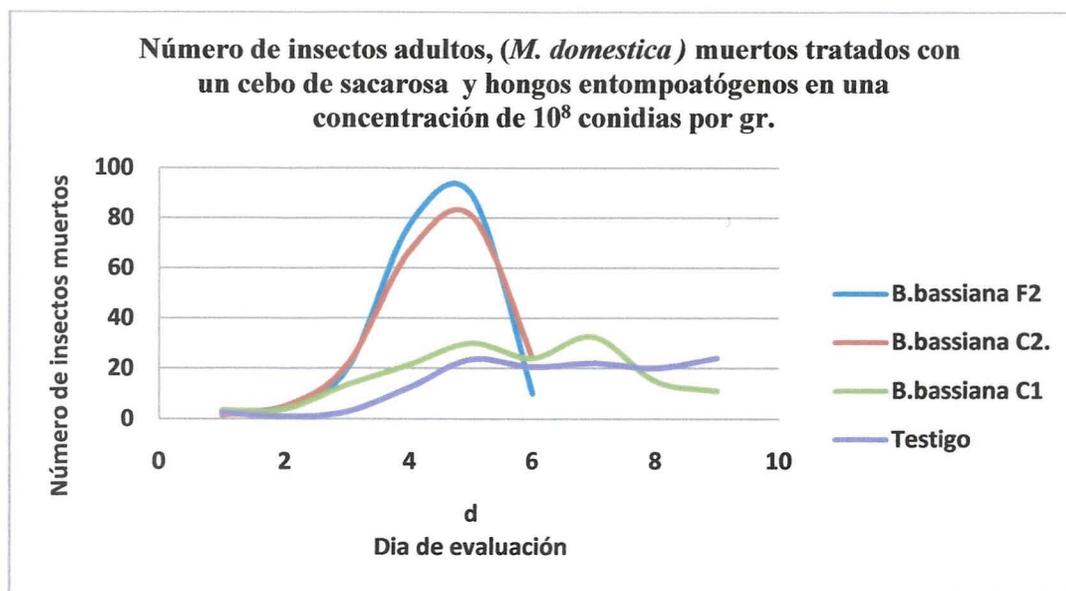
Cuadro N°15

<b>Número de insectos adultos (<i>M. domestica</i>) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de sacarosa y Conidias de entomopatógenos con <math>10^8</math> conidias de entomopatógenos por gr</b>									
	Día-3	Día -5	Día7	Día 9	Día12	Día 15	Día 17	Día 19	Día 21
<i>B.bassiana</i> F2. <i>b</i>	3	5	20	77,5	89,5	10			
<i>B.bassiana</i> C2. <i>b</i>	1,5	5	21,5	67	81	24			
<i>B.bassiana</i> C1 <i>ab</i>	3,5	4	13,5	21,5	30	24	32,5	15	11
Testigo <i>a</i>	2,5	1	3	12,5	23,5	20,5	22	20	24

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el grafico N°11 se entrega una visión general del comportamiento de los controladores donde es evidente la mayor potencia de las cepa de *B. bassiana* F2 y C2 a pesar del retardo en el tiempo de control.

Gráfico N°11



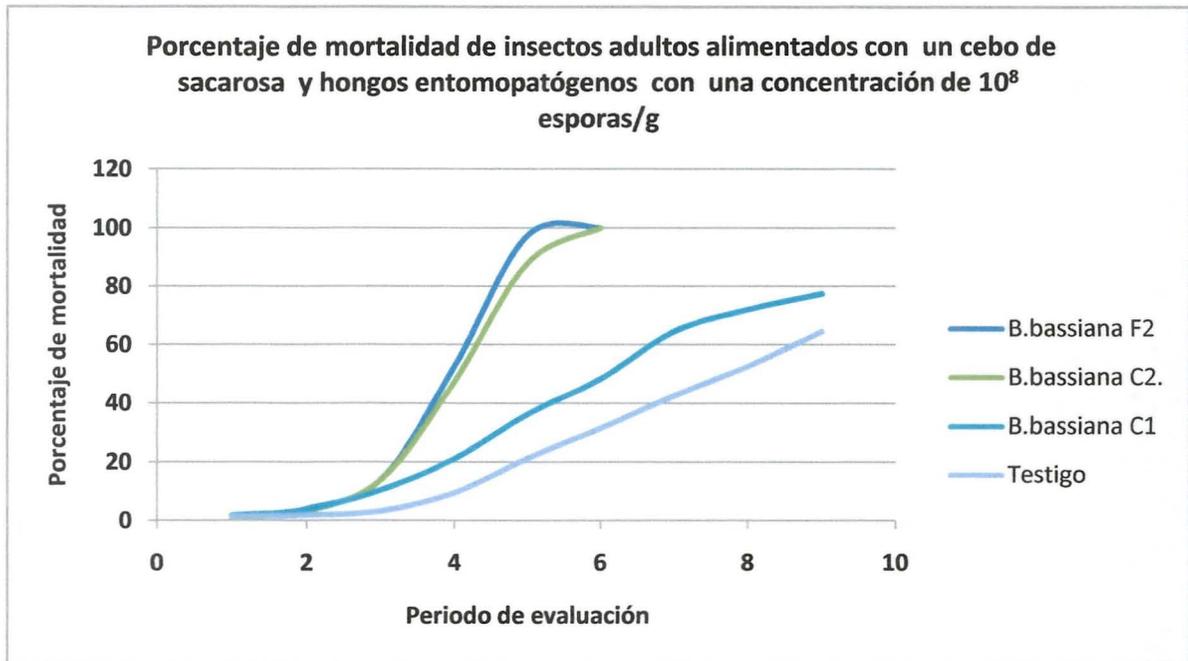
Cuadro N°16.

**Porcentaje de insectos adultos (*M. domestica*) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de sacarosa y Conidias de entomopatógenos con  $10^8$  conidias de entomopatógenos por gr.**

	Día3	Día 5	Día7	Día 9	Día12	Día 15	Día 17	Día 19	Día21
<i>B.bassiana F2</i>	1,5	4	14	52,75	97,5	100			
<i>B.bassiana C2.</i>	0,75	3,25	14	47,5	88	100			
<i>B.bassiana C1</i>	1,75	3,75	10,5	21,25	36,25	48,25	64,5	72	77,5
<i>Testigo</i>	1,25	1,75	3,25	9,50	21,25	31,50	42,50	52,50	64,5

En el cuadro anterior N°16 se aprecia el efecto relativo de las cepas de entomopatógenos utilizadas, evidenciándose el control completo que logra *B.bassiana F2* y *C2* al día 15 de aplicación. Este resultado demuestra la relación directa que existe entre concentración de conidias y la mortalidad de las poblaciones de *M. domestica* sobre las cuales se aplica.

Gráfico N°12



En el grafico anterior se aprecia la evolución de las poblaciones de *M. domestica* expuestas a una suspensión de hongos entomopatógenos con una concentración de  $10^8$  conidias por ml.

#### 4.2 b2. Tratamiento mediante cebo y aspersión

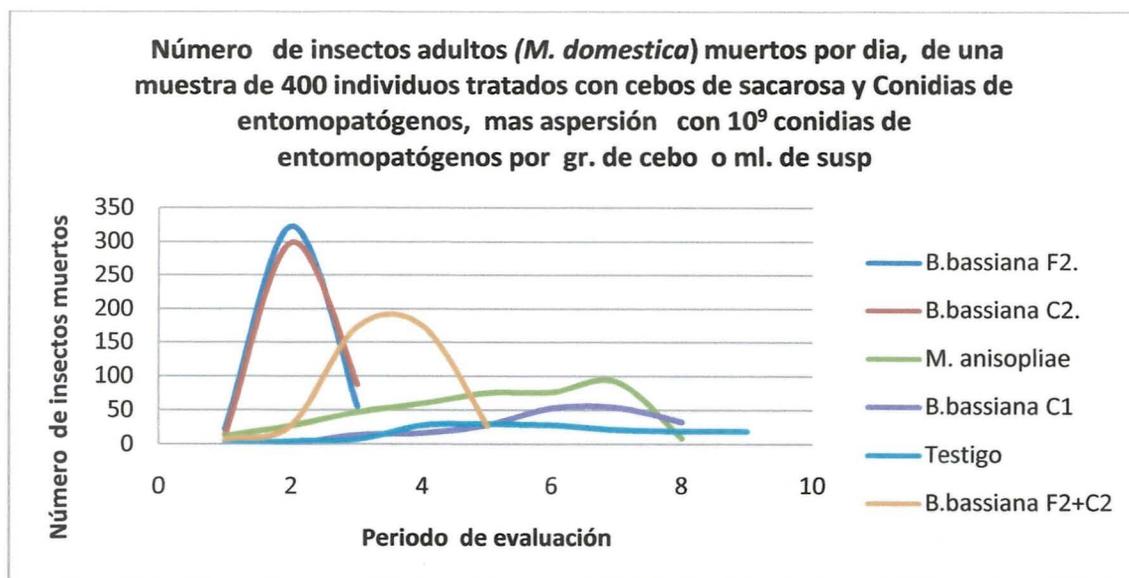
Se evaluó el efecto de los hongos entomopatógenos en la mortalidad de los insectos en un tratamiento donde se combinó la aspersión de insectos adultos más la alimentación con cebos, la concentración de estos fue de  $10^9$  conidias/ml o g. Los ejemplares fueron mantenidos a temperatura ambiente evaluando la tasa de mortalidad en el tiempo

Cuadro 17.

Número de insectos adultos ( <i>M. domestica</i> ) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de sacarosa y Conidias de entomopatógenos mas aspersión con $10^9$ conidias de entomopatógenos por gr de cebo o ml. de suspensión										
		Día3	Día 5	Día7	Día 9	Día12	Día 15	Día 17	Día 19	Día 21
<i>B.bassiana</i> F2.	c	22	323	55						
<i>B.bassiana</i> C2.	c	13,5	299	87,5						
<i>M. anisopliae</i>	b	12,5	27,5	47	60	75,5	76,5	92	9	
<i>B.bassiana</i> C1	a	5	2	14	17	28,5	53	54	33	
Testigo	a	0,7	4,7	7,3	28	29,7	28,3	21,7	19,3	19,3
<i>B.bassiana</i> F2+C2	b	7	28	173	174	27				

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

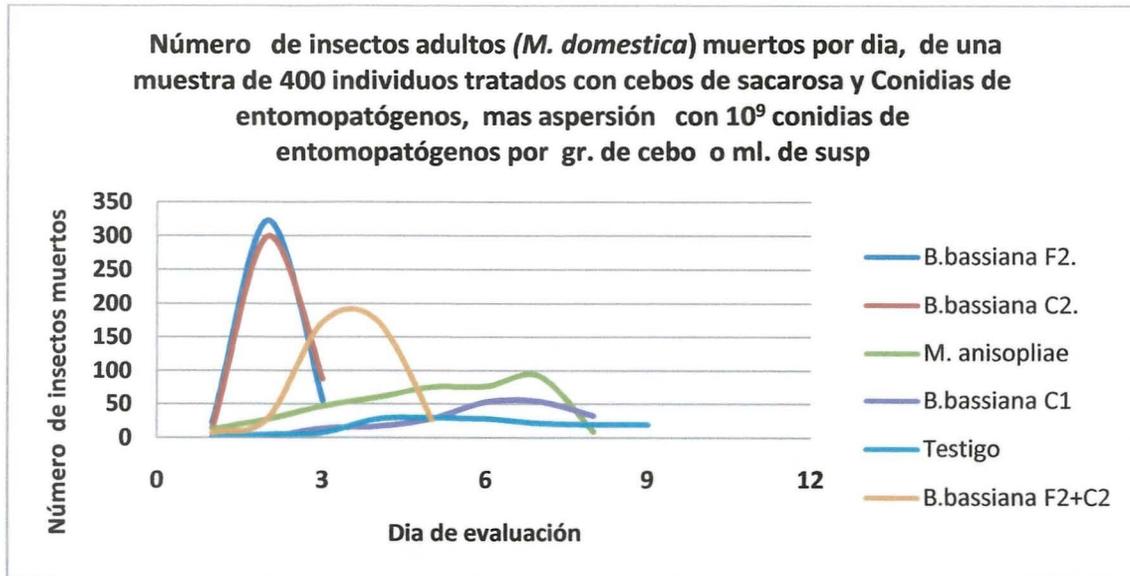
Gráfico N° 13



Cuadro N°18.

Porcentaje de insectos adultos ( <i>M. domestica</i> ) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de sacarosa y Conidias de entomopatógenos mas aspersion con $10^9$ conidias de entomopatógenos por gr de cebo o ml. de suspensión								
	Dia3	Dia5	Dia7	Dia9	Dia12	Dia15	Dia17	Dia19
<i>B.bassiana</i> F2.	5,5	86,25	100					
<i>B.bassiana</i> C2.	3,375	78,125	100					
<i>M. anisopliae</i>	3,125	10	21,75	36,75	55,625	74,75	97,75	100
<i>B.bassiana</i> C1	1,25	1,75	5,25	9,5	16,625	29,875	43,375	51,625
Testigo	0,17	1,33	3,17	10,17	17,58	24,67	30,08	34,92
<i>B.bassiana</i> F2+C2	1,67	8,67	52,00	95,50	100,00			

Gráfico N°14



En los cuadros y gráficos anteriores, se puede evidenciar el impacto sobre adultos de *M. domestica* que tiene la aplicación combinada de aspersion y cebos con hongos entomopatógenos, en ellos se puede establecer que las cepas de *B.bassiana* F2 y C2 tienen la mayor capacidad de control al aplicarse de manera combinada como cebo y suspensión logrando un 100% de control a los 7 días de

aplicación de los productos evaluados y la mayor mortalidad al día 5, siendo este el lapso más corto de tiempo para lograr tal efecto.

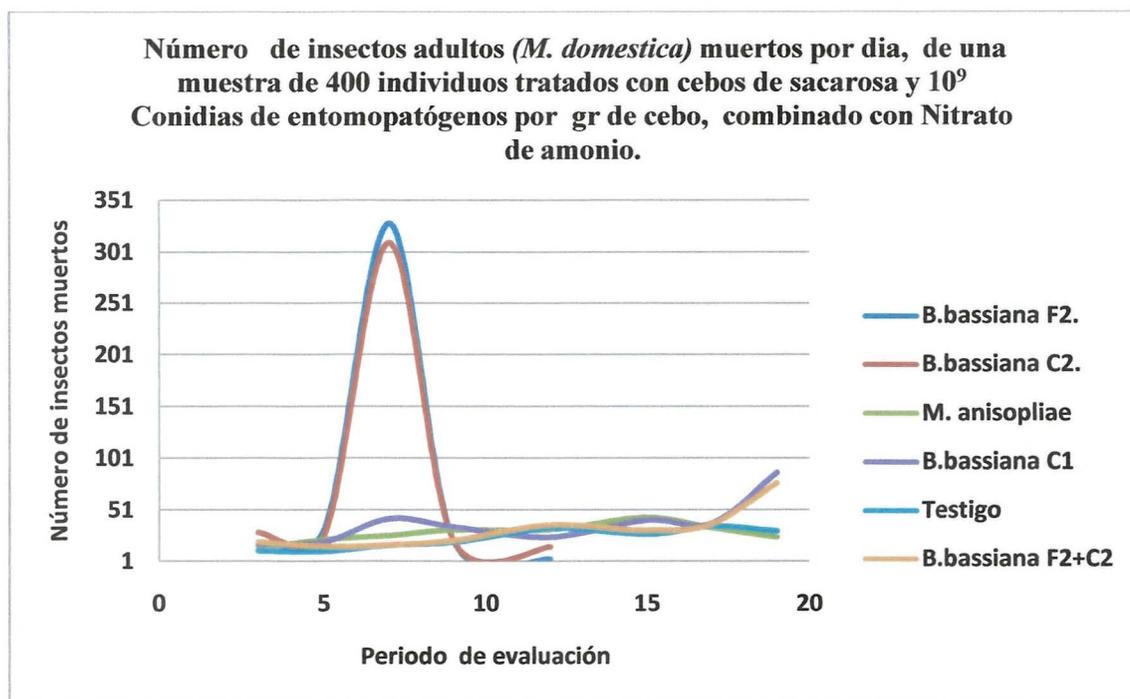
#### 4.2b3.- Tratamiento con cebo más una atrayente de insectos (Nitrato de amonio)

Se evaluó el efecto del nitrato de amonio como atrayente de los adultos hacia los cebos dispuestos en las jaulas para determinar si el efecto de este atrayente podría mejorar la ingesta del alimento contaminado con los hongos y su efecto en la tasa de mortalidad exhibida en el tiempo.

Cuadro N°19.

<b>Número de insectos adultos (<i>M. domestica</i>) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de glucosa y 10<sup>9</sup> Conidias de entomopatógenos por gr de cebo, combinado con Nitrato de amonio.</b>								
	<b>Dia3</b>	<b>Dia5</b>	<b>Dia7</b>	<b>Dia9</b>	<b>Dia12</b>	<b>Dia15</b>	<b>Dia17</b>	<b>Dia19</b>
<b>B.bassiana F2.</b>	19	31,5	328,5	19,5	3			
<b>B.bassiana C2.</b>	29	26	310	20	15			
<b>M. anisopliae</b>	14	22	26	31,5	32	43,5	33,5	24,5
<b>B.bassiana C1</b>	17,5	20	42,5	34,5	24,5	41	38	87,5
<b>B.bassiana F2+C2</b>	20	15,5	17	21,5	36,5	31	37,5	77,5
<b>Testigo</b>	11	10,5	16,5	19,5	33	27,5	35	30,5

Gráfico N° 15



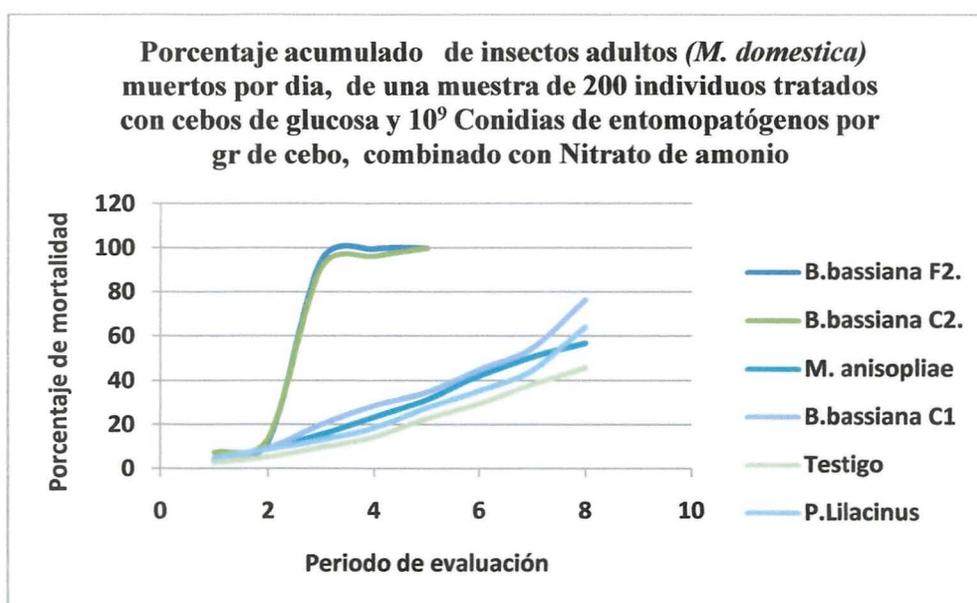
En los cuadros anteriores, Cuadro N°19 y Grafico N°15 se observa el número de individuos adultos de *M. domestica*, afectados por un cebo conteniendo  $10^9$  conidias por gramo de hongos entomopatógenos asociado a un atractor como es el Nitrato de amonio, lo que aparentemente se produce es una concentración del efecto en el caso de *B. bassiana* F2 y C2 con una mayor mortalidad entre el día 5 y 7 desde la aplicación, las otras cepas manifiestan un comportamiento de menor relevancia a los largo de la evaluación

Cuadro N°20

Porcentaje acumulado de insectos adultos ( <i>M. domestica</i> ) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de glucosa y 10 <sup>9</sup> Conidias de entomopatógenos por gr de cebo, combinado con Nitrato de amonio								
	Dia3	Dia5	Dia7	Dia9	Dia12	Dia15	Dia17	Dia21
<i>B.bassiana</i> F2. <i>b</i>	4,75	12,625	94,75	99,625	100			
<i>B.bassiana</i> C2. <i>b</i>	7,25	13,75	91,25	96,25	100			
<i>M. anisopliae</i> <i>a</i>	3,5	9	15,5	23,375	31,375	42,25	50,625	56,75
<i>B.bassiana</i> C1 <i>a</i>	4,38	9,38	20,00	28,63	34,75	45,00	54,50	76,38
Testigo <i>a</i>	2,75	5,38	9,5	14,38	22,63	29,50	38,25	45,88
<i>P. lilacinus</i> <i>a</i>	5	8,88	13,13	18,50	27,63	35,38	44,75	64,13

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

Gráfico N° 16



En los cuadros anteriores, Cuadro N°20 y Grafico N°16 se observa el número de individuos adultos de *M. domestica*, afectados por un cebo conteniendo 10<sup>9</sup> conidias por gramo de hongos entomopatógenos asociado a un atrayente de insectos como es el Nitrato de amonio. En los cuadros y gráficos N° 20 y16 respectivamente se hace evidente el grado de control que puede ejercer un

preparado como el descrito en que se asocia un atrayente como nitrato de amonio con los cebos compuestos por sacarosa más los hongos entomopatógenos. Lográndose el mayor efecto entre el día 5 y 7 de la aplicación

### **2.2.3) Evaluación del comportamiento de los hongos el paso gastrointestinal de las aves.**

Se evaluó el tránsito gastrointestinal de los entomopatógenos en las aves, dándoles a ingerir los hongos junto con el alimento y colectando las fecas para determinar la capacidad de sobrevivencia de los mismos y los niveles de sobrevivencia de las conidias en el tiempo

Se realizó un primer ensayo con 9 aves, 3 testigos y dos grupos de 3 aves, a las que se les incorporó el organismo en el alimento en cantidad de 1 gramo del hongo de la cepa *Beauveria* F2 y C1, con una concentración de  $10^9$  conidias/g, por un periodo de 6 días.

Las muestras fecales fueron tomadas el día 3 desde la ingesta del hongo, el día 4 y 6, un gramo de cada muestra de fecha se llevó a dilución y se sembró en placas con agar agua, para contar el número de unidades formadoras de colonias.

Este primer ensayo no se encontró presencia de esporas a nivel fecal. Sin detección de colonias de hongos en las placas para análisis microbiológico.

Se repitió el ensayo anterior con 24 gallinas de postura, adicionando 4 gramos de la formulación con  $10^9$  conidias por gramo del biocontrolador, por ave y siguiendo la misma metodología descrita. Este grupo de aves se distribuyó en 18 aves tratadas y 6 aves testigos separadas en grupos o jaulas de 2 aves cada una.

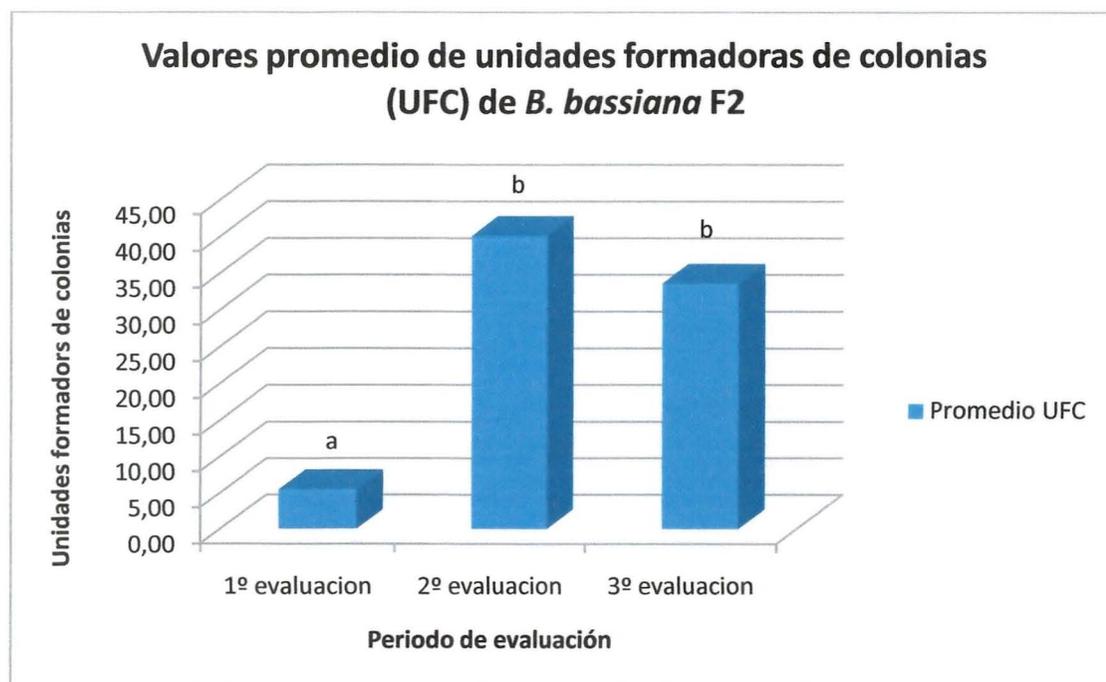
Esta nueva evaluación arrojó la detección de entomopatógenos en las fecas, desde el primer muestro con una máxima aparición a nivel fecal en el segundo muestreo Cuadro y gráfico siguiente

Cuadro N° 21

<b>Valores promedio de unidades formadoras de colonias a nivel fecal, observadas en 18 gallinas y alimentadas diariamente con 4 g del formulado con el biocontrolador conteniendo <math>10^9</math> conidias/gr. del hongo <i>Beauveria</i> F2</b>			
Unidades formadoras de colonias	1° muestreo a	2° muestreo b	3° muestreo b
	5,48 ± 4,29	40,04 ± 3,77	33,56 ± 3,03

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

Gráfico N° 17



De acuerdo a lo observado el segundo muestro que corresponde al cuarto día de la ingesta de los hongos, se obtiene el mayor número de colonias presentes a nivel fecal que correspondería a una concentración de  $4 \times 10^4$  conidias/g de fecas, seguido por  $3 \times 10^4$  conidias/g fecal en el último muestro, en consecuencia, se produce una fuerte reducción en las concentraciones de conidias durante el paso por el intestino, desde  $10^9$  a  $10^4$  conidias, valores que deberán ser considerados en la futuras evaluaciones.

La cepa *Beauveria* C1 fue también evaluada, sin embargo, no hubo resistencia por parte de las conidias al paso gastrointestinal de las aves, con muestreos sin formación de colonias en las placas.

## **Resultados Cuarta etapa**

### **1) Muestreo y colección de distintos estados de desarrollo de, *M domestica* para la detección de patologías originadas por hongos Entomopatógenos.**

A partir de muestras de diferentes suelos se han aislado hongos del género *Pochonia* junto a otras tres cepas; *Beauveria bassiana* C2, *M. anisopliae* B y *P. lilacinus* A, aisladas con anterioridad sobre fauna entomófila, fueron utilizados en los diferentes ensayos. Los aislados a evaluar corresponden a los géneros *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Metarhizium* y *Pochonia*

### **2.2 Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados sobre los diferentes estados de desarrollo de mosca domestica.**

#### **2a) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados sobre huevos de mosca domestica.**

Se evaluó el efecto del aislado fúngico del género *Pochonia* sobre huevos de *M.domestica*, para esto, grupos de huevos de pesos similares ( $\pm 18\text{mg}$ ) se inocularon con una concentración ( $10^9$  conidias/ml) de la cepa del hongo aislado. Evaluando los niveles de eclosión de los mismos y por tanto el porcentaje de control sobre la eclosión de las larvas.

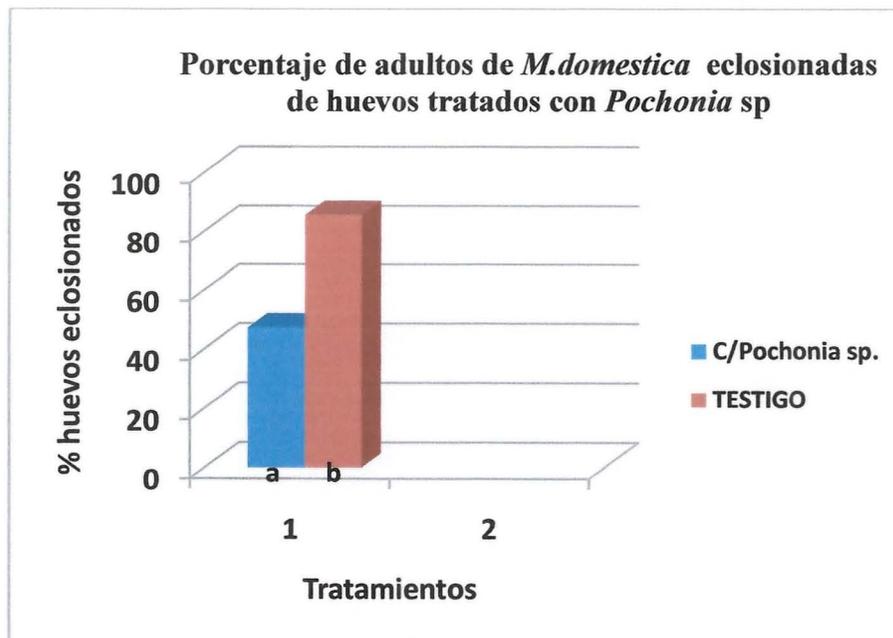
CuadroN°22.-

Porcentaje de mortalidad de huevos de <i>M. domestica</i> , inoculados con una suspensión de la cepa de hongo del género <i>Pochonia</i> en una concentración de $10^9$ conidias/ml. y testigo tratado con agua.			
Aplicaciones	N° de huevos	N° Huevos eclosionados	% de eclosión
Tratamiento Pochonia, $10^9$ conidias/ml.	233,4±57,7	128,8±42,6	47,3±3,5a
Testigo	250,8±43,3	215,6±50	85,52±8,3b

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se observa el efecto controlador del hongo *Pochonia sp.*, este hongo se ha reconocido como un buen controlador de huevos de nematodos, en este caso se ha evaluado sobre huevos de *M.domestica* lográndose una rebaja en la viabilidad de los huevos

Grafico N°18



En la figura anterior se grafica la respuesta que existe entre el grupo de insectos testigo y los insectos tratados con el hongo del genero *Pochonia*, apreciándose la

disminución de la viabilidad de los huevos de *M. domestica* por el efecto del hongo aplicado.

### **2.2.3) Evaluación del tránsito gastrointestinal y supervivencia de conidias de hongos entomopatógenos en aves de experimentación con las cepas de los hongos *B. bassiana* C2, *Paecilomyces lilacinus* A y *Metarhizium anisopliae* B**

Se evaluó el tránsito de tres cepas de hongos entomopatógenos a través del tracto gastrointestinal de aves de postura en experimentación (*B. bassiana* C2, *M. anisopliae* B y *P. lilacinus* A), administrándoles los hongos por vía oral en mezcla con el alimento y colectando las fecas para determinar la capacidad de sobrevivencia de los mismos y los niveles de sobrevivencia de las conidias en el tiempo

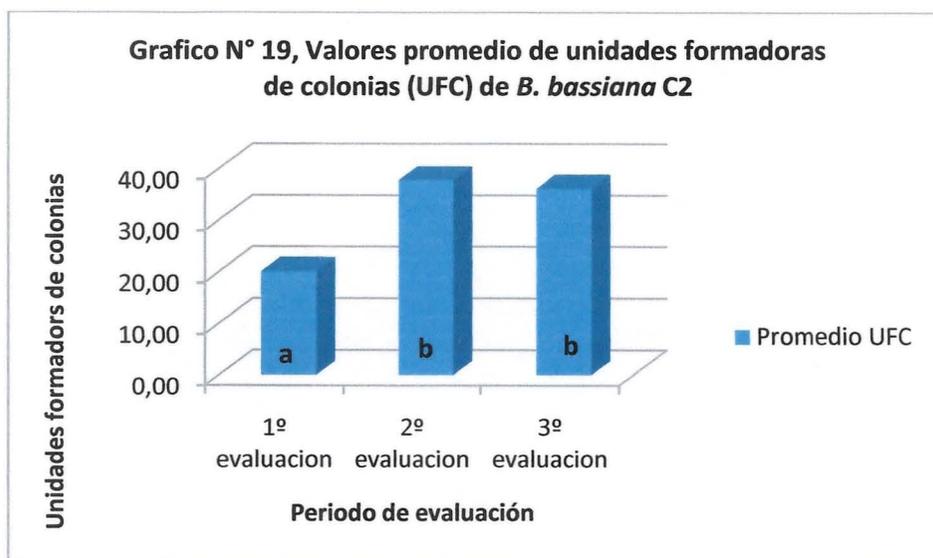
Se realizaron tres ensayos con 18 aves cada vez, 6 testigos y cuatro grupos de 3 aves, a las que fue incorporado en su alimento el hongo a evaluar, a las aves del tratamiento se les administró 4 gramos de sustrato con el hongo entomopatógeno por ave, de cada una de las tres cepas a evaluar en cada ensayo, con una concentración de  $10^9$  conidias/g, por un periodo de 6 días. Las muestras fecales fueron tomadas el día 3 desde la ingesta del hongo, el día 4 y 6, un gramo de cada muestra de cada día de muestreo se diluyó y se sembró en placas con agar agua, para establecer el número de unidades formadoras de colonias presentes en las fecas.

Cuadro N° 23

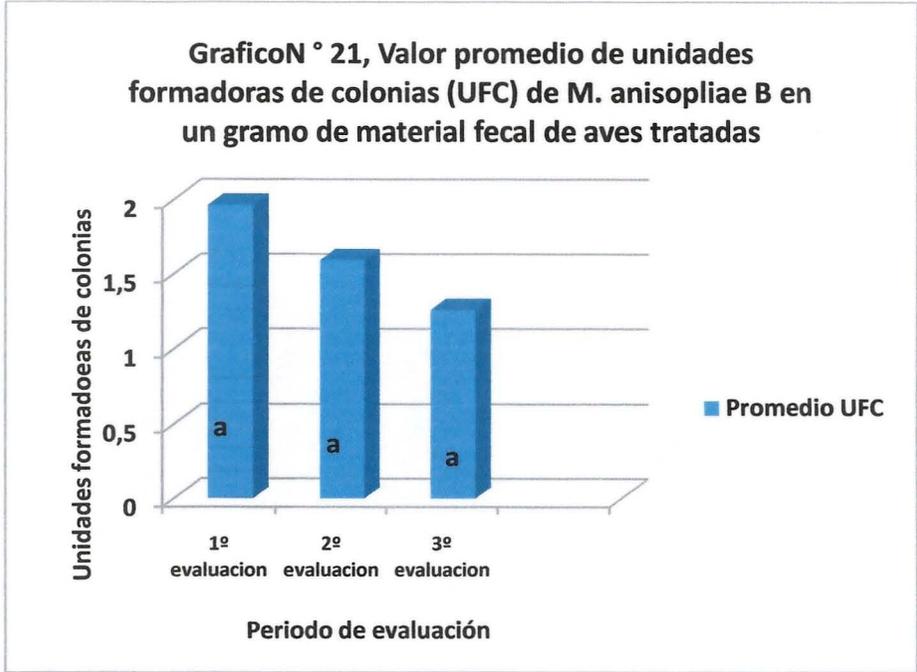
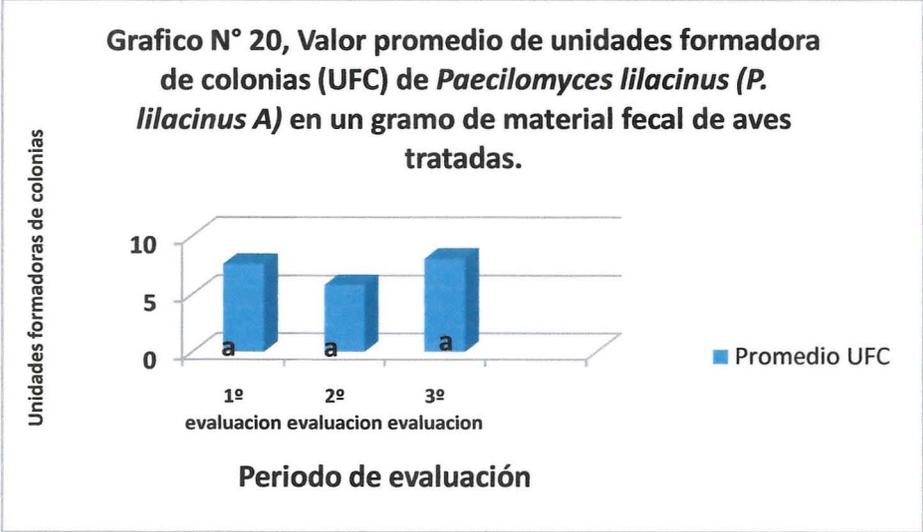
<b>Valor promedio por gramo de material fecal de unidades formadoras de colonias (UFC) observadas en 18 gallinas, que recibieron diariamente en la dieta 4 g de conidias del hongo <i>Beauveria</i> C2, <i>Paecilomyces</i> A y <i>Metarhizium</i> B</b>			
Entomopatógeno	UFC 1° muestreo	UFC 2° muestreo	UFC 3° muestreo
<i>B. bassiana</i> C2	20,0 ± 2,89	37,70 ± 3,59	36,11 ± 2,60 <b>b</b>
<i>P. lilacinus</i> A	7,59 ± 1,93	5,77 ± 1,78	8,04 ± 0,94 <b>a</b>
<i>M. anisopliae</i> B	1,96 ± 0,89	1,59 ± 1,11	1,25 ± 0,62 <b>a</b>

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se aprecia la mayor capacidad de tránsito de *B. bassiana* C2, a través del tracto gastrointestinal en aves de postura, de todas formas hay una gran disminución del inoculo, este correspondía a  $10^9$  conidias por gramo de producto que se entregó a las aves. Finalmente el orden de magnitud de las concentraciones obtenidas a nivel fecal corresponden a  $3,6 \times 10^5$  conidias por gramo de fecas para *B. bassiana* (C2);  $8 \times 10^3$  conidias/ gramo de fecas para *P. Lilacinus* y  $1 \times 10^3$  conidias/ gramo de fecas para *P. lilacinus* *P. lilacinus* y *M. anisopliae* presentan niveles muy bajo de tránsito, y además presentan bajo niveles de control.



En el grafico anterior se observan los niveles de transito de esporas o conidias a través del intestino de aves a las que se les administró *B.bassiana* en la dieta. Este hongo presentó la mayor eficiencia en el transito gastrointestinal. En ninguna de las aves se observaron síntomas de alteración de la salud, con ausencia de diarreas o problemas respiratorios, que pudiesen ocurrir tanto por la presencia de micotoxinas como por la ingestión o aspiración de conidias.



En los dos gráficos Anteriores se aprecia la baja eficiencia de tránsito de los hongos *M. anisopliae* y *P. lilacinus*. Con esta baja capacidad no es posible incorporarlo en tratamientos que se pudieran diseñar introduciéndolo en la dieta de aves. Llama la atención la baja eficiencia, esto se debería a la gran capacidad digestiva (estómago verdadero molleja y ciegos) de las aves ya que en rumiantes estos organismos presentan mejores rendimientos.

#### **4.2a) Evaluación del efecto de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F y C2 Sobre la sobrevivencia de los individuos adultos de *M. domestica* expuestos a diferentes formulaciones.**

Se realizaron distintas formulaciones con compuestos adherentes/nutrientes con el fin de conocer el desempeño de los entomopatógenos respecto de su capacidad controladora para los estados de adultos y pupas

##### **Ensayo con individuos Adultos**

4.2.a3) Mortalidad de los insectos adultos asperjados con una suspensión de los hongos entomopatógenos en una concentración de  $10^9$  conidias/ml y preparada con Tween 80(0,1ml/l) y leche en polvo (3g/l)

4.2.a4) Mortalidad de los insectos adultos asperjados con una suspensión de hongos entomopatógenos en una concentración de  $10^9$  conidias/ml y preparada con Tween 80(0,1ml/l) y melaza (0,5ml/l)

4.2.a5) Mortalidad de los insectos adultos asperjados con una suspensión de los hongos entomopatógenos en una concentración de  $10^9$  conidias/ml y preparada con Tween 80(0,1ml/l) más leche en polvo y melaza

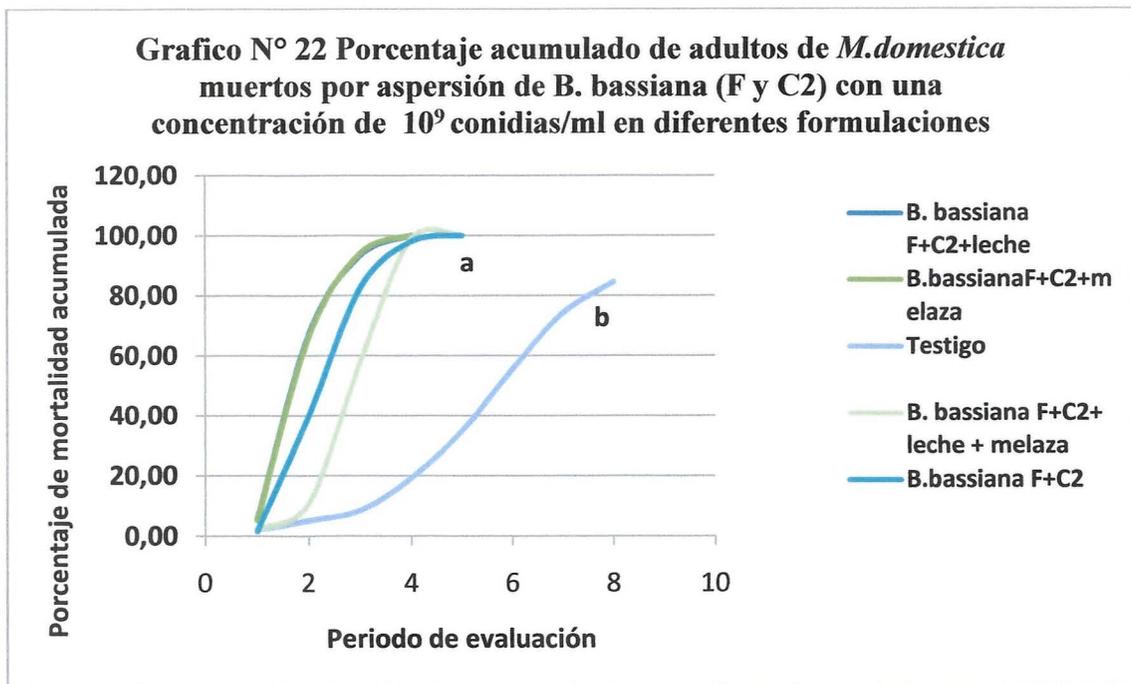
Cuadro N°24.

Porcentaje de mortalidad acumulada de insectos adultos asperjados con una concentración de $10^9$ conidias/ml en diferentes formulados								
Entomopatógenos aplicados.	Día de evaluación, % insectos muertos							
	3	5	7	9	12	15	17	19
<i>B. bassiana</i> F+C2+leche	5,50	67,17	93,33	100,00				b
<i>B. bassiana</i> F+C2+melaza	5,17	66,33	94,00	100,00				b
<i>B. bassiana</i> F+C2	1,67	40,17	82,50	98,00	100,00			b
Testigo	2,20	5,08	8,54	19,31	34,97	55,56	74,18	84,48 a
<i>B. bassiana</i> F2+C2+ leche + melaza	2,00	11,00	58,00	98,89	100,00			b

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se aprecia el efecto de distintas formulaciones del Hongo *B. bassiana*, con leche y/ o melaza sobre poblaciones experimentales de *M. domestica* en baterías de crianza, encontrándose diferencias cuando los adherentes/nutrientes se incorporan de manera aislada, leche o melaza, que cuando se entregan mezclados o cuando no se adicionan. Se aprecia también que el grupo testigo presenta una larga sobrevivencia. Los grupos tratados con adición de leche o melaza presentan una eliminación total de la población de *M. domestica* en baterías de crianza a los 9 días, Cuando el preparado contiene la mezcla de nutrientes hay una demora de dos días más en obtener el mismo resultado.

Grafico N°22



En el grafico anterior se aprecia el comportamiento de poblaciones de *M. domestica* tratados con distintos formulados del hongo entomopatógeno *B. bassiana*, aplicados en suspensión.

**4.2.a) Evaluación del efecto de los hongos *B. bassiana* F y C2 en formulaciones elaboradas con leche en polvo, melaza y mezcla de ambas sobre la mortalidad de pupas de *M. domestica*.**

### Ensayo con Pupas

4.2.a3) Mortalidad de pupas asperjados con una suspensión de los hongos entomopatógenos a una concentración de  $10^9$  conidias/ml y preparada con Tween 80(0,1ml/l) y leche en polvo (3g/l)

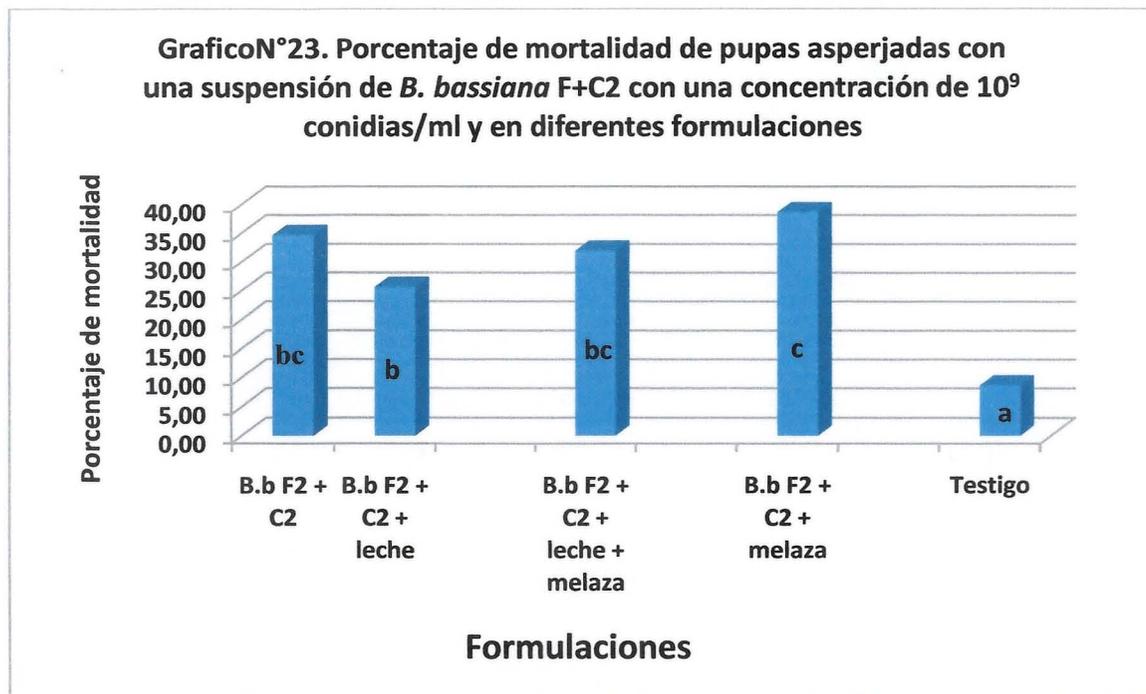
4.2.a4) Mortalidad de pupas asperjados con una suspensión de los hongos entomopatógenos a una concentración de  $10^9$  conidias/ml y preparada con Tween 80(0,1ml/l) y melaza (0,5ml/l)

4.2.a5) Mortalidad de pupas asperjados con una suspensión de los hongos entomopatógenos a una concentración de  $10^9$  conidias/ml y preparada con Tween 80(0,1ml/l) más leche en polvo y melaza

En el cuadro siguiente se aprecia la mortalidad o pérdida de viabilidad de pupas de *M. domestica* al someterlas a la aspersión de una suspensión de *B. bassiana* F+C2 con  $10^9$  conidias por ml, a la cual se le adicionan 2 adherentes/nutrientes leche y/o melaza.

El tratamiento con una relativa menor capacidad de control corresponde a B.bassianaF+C2+Leche, los cuatro son equivalentes y en general a pesar de que no son resultados de gran mortalidad todos se alejan del testigo en términos de mayor mortalidad.

Cuadro N°23.



En el grafico anterior se observan los efectos de las distintas formulaciones sobre la sobrevivencia de pupas de *M. domestica*

**4.2c) Evaluación experimental del nivel de control logrado con aspersiones del hongo *B.bassiana*; cepas F y C2, sobre *M. domestica*, insectos adultos, en baterías experimentales con aves de postura.**

En el cuadro siguiente se aprecia el efecto sobre el número de insectos por metro Cuadrado luego de 2 aplicaciones, una por semana en baterías experimentales con aves de postura, se aprecia que, las aplicaciones asociadas a cebo obtuvieron resultados equivalentes, esto puede deberse a que la atracción del cebo es insuficiente en un ambiente cargado de detritus animales que constituyen una alimentación permanente, lo que debilitaría el efecto atrayente del cebo, que se manifiesta perfectamente en ambientes aislados de desechos animales.

Cuadro N° 26.

Mortalidad de pupas de <i>M. domestica</i> asperjadas con hongos <i>B. bassiana</i> F y C2 en formulaciones elaboradas con leche en polvo, melaza y mezcla de ambas				
B. bassiana F+C2	B. bassiana F+C2+Leche	B. bassiana F+C2+Leche+Melaza	B. bassiana F+C2+Melaza	Testigo.
<b>34,67±4,2bc</b>	<b>25,67±11,0 b</b>	<b>32.00±4,0 bc</b>	<b>38,67±4,2 c</b>	<b>8,67±1,5 a</b>

En el siguiente cuadro se aprecia la disminución porcentual en la población de *M. domestica* en baterías con aves de postura, en términos absolutos aparece mejor posicionada la estrategia de aplicación de suspensiones de *B. bassiana* frente a la aplicación mixta de cebos mas suspensiones de entomopatógenos.

Cuadro N° 27.

**Disminución % de *M. domestica* por metro cuadrado en tres baterías de aves de postura en jaula tratadas con hongos entomopatógenos, suspensión  $10^9$  conidias/ml y cebos con  $10^9$  conidias /gr.**

Tratamiento	Población inicial de <i>M. domestica</i> /m <sup>2</sup>	Población a los 7 días y 1ª aplicación	Población a 14 los días y 2ª aplicación
Testigo	100%	91,88%	95,89%
Cebos y suspensión de <i>B. bassiana</i> .	100%	59,24%	32,39%
Suspensión de <i>B. bassiana</i> . $10^9$ con/ml.	100%	57,67%	29.74%

#### **Métodos para la evaluación del efecto de los controladores.**

**Las modalidades utilizadas en la evaluación del efecto fueron las ya enumeradas**

- a) Empleo de rejillas de madera, según Scudder (1974), estas se disponen inclinadas en puntos del galpón y se cuenta por un minuto el número de moscas presentes entre las 10 a 12 de la mañana.
- b) Contar un número de moscas presentes un área determinada y definida del galón y a las mismas horas antes indicadas.
- c) Utilización de un número definido de tarjetas de cartulina de color blanco de 7X10 cm., las que se dispusieron en la parte superior de los galpones y distribuidas de manera homogénea. Cada 5 días se retiran las tarjetas y se remplazan por nuevas, contando las manchas fecales observadas en cada tarjeta.

## **Resultados quinta etapa**

### **4.2.a6) Evaluación del efecto del aceite miscible sobre el crecimiento y desarrollo de *B. bassiana***

Se determinó el crecimiento del hongo en presencia de aceite miscible al 2%, evaluando las unidades formadoras de colonia formadas en placas con agar.

#### **A.- Evaluación in vitro del efecto de aceite miscible al 2% en el desarrollo de *B. bassiana*.**

Cuadro N°28

<b>Número promedio de unidades formadoras de colonias (ufc) de <i>B. bassiana</i> en tratamientos con y sin aceite miscible al 2%</b>	
<i>B. bassiana</i> sin aceite miscible	<i>B. bassiana</i> mezclado con aceite miscible al 2%
120	127
129	130
126	122
124	124
$1,2 \times 10^5 \pm 3,8$ a	$1,2 \times 10^5 \pm 3,5$ a

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se observa la falta de acción inhibitoria del aceite miscible (Winspray®) en el desarrollo de *B. bassiana* en placas con agar y evaluadas a las 72 horas de incubación. El aceite miscible no frenaría o retardaría la germinación y crecimiento del hongo, en consecuencia, no tendría ninguna contraindicación para ser usado en las evaluaciones y aspersiones sobre el insecto cumpliendo más bien una función emulsificadora y protectora de las conidias en el ambiente.

### **4.2.a6a) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados (*Beauveria bassiana* cepa F2 y C2) sobre huevos de mosca domestica en tratamientos con aceite miscible**

Se evaluó el efecto del aceite miscible sobre huevos de *M. domestica*, para esto, grupos de huevos de pesos similares ( $\pm 11$ mg) se inocularon con una

concentración ( $10^9$  conidias/ml) de la cepa del hongo. Evaluando los niveles de eclosión de los mismos y por tanto el porcentaje de control sobre la eclosión de las larvas.

**Sobrevivencia de de huevos de *M. domestica* al efecto del aceite miscible aplicado por aspersión.**

Cuadro29.-

<b>Sobrevivencia de 11 mgs. (141,75 unidades) de huevos de <i>M. domestica</i> asperjados con aceite miscible.</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>Huevos tratados</b>
<b>Testigo, huevos sin tratamiento.</b>	141,75±3,10    b
<b>Sobrevivencia huevos <i>M. domestica</i> tratados con Aceite.</b>	111,5±20,34    a
<b>% disminución de eclosión en huevos de <i>M. domestica</i></b>	21,34%

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

Con el objeto de establecer cuál es el efecto del aceite miscible adicionado a las suspensiones de *B. bassiana* se utilizó la misma proporción de aceite en una suspensión con agua y se asperjaron cuatro muestras de 11mgs de huevos de *M. domestica*, se incubaron y se dejaron eclosionar evidenciándose una reducción de un 21,34 % en el nivel de eclosión de los huevos de *M. domestica*. Complementariamente se hicieron cultivos de inóculos de *B. bassiana* en medios con aceite miscible evidenciándose por el crecimiento de las colonias que el complemento de aceite no tiene efecto sobre el controlador biológico.

**4.2.a6b).- Evaluación del efecto de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, sobre la sobrevivencia de larvas de *M. domestica* expuestos a diferentes formulaciones con aceite**

Se evaluó el efecto en el desarrollo de larvas de los estados L2 y L3 expuestas a dietas contaminadas con el hongo *B. bassiana* (F2 y C2) mezclado con aceite miscible al 2%

A) Evaluación del Efecto de una aplicación de *B. bassiana* y/o aceite miscible sobre la dieta de larvas L3 y evolución de 15 larvas L3 alimentadas con estas formulaciones. Evaluadas a los 7 días de tratamiento.

Cuadro 30.-

**Efecto de una aplicación de *B. bassiana* y/o aceite miscible sobre la dieta de larvas L3 y evolución de 15 larvas L3 alimentadas. Evaluadas a los 7 días de tratamiento. N° de pupas respecto de 15 larvas L3 tratadas.**

Tratamiento	Testigo	Aceite miscible	Aceite + <i>B. bassiana</i>	<i>B. bassiana</i>
Pupas.	10,56±1,1 b	9,67±1,3 ab	8,89±1,4 a	9,67±1,2 ab

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se observa el efecto de formulados en base a *B. bassiana* y aceite miscible aplicados en la dieta de larvas L3. Se observa una leve disminución en el número de pupas respecto del testigo que recibió una dieta normal.

Cuadro 31.-

**Efecto de una aplicación de *B. bassiana* y/o aceite miscible sobre la dieta de larvas L3. Evolución de 15 larvas L3. Alimentadas. Evaluación a los 7 días de tratamiento. % de mortalidad de larvas L3 respecto de 15 larvas tratadas.**

Tratamiento	Testigo	Aceite miscible	Aceite + <i>B. bassiana</i>	<i>B. bassiana</i>
% Pupas	15,48±7,50	21,88±8,84	25,93±11,37	21,88±7,63

Desde el punto de vista porcentual se observa un incremento en la mortalidad de las larvas sometidas a una dieta tratada con *B. bassiana* y/o aceite miscible. La mayor mortalidad está asociada a la presencia en la dieta, de la mezcla de *B. bassiana* y aceite miscible, llegando esta aplicación a generar un 25,93±11,37 % de mortalidad en las larvas tratadas.

**B) Efecto de una aplicación de *B. bassiana* y/o aceite miscible sobre la dieta de larvas L2 y evolución de 15 larvas L2. Alimentadas y evaluadas a los 7 días post tratamiento.**

Cuadro32.-

<b>Efecto de una aplicación de <i>B. bassiana</i> y/o aceite miscible sobre la dieta de larvas L2 y evolución de 15 larvas L2. Alimentadas y evaluadas a los 7 días de tratamiento. N° de pupas respecto de 15 larvas L2 tratadas.</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Testigo</b>	<b>Aceite</b>	<b>Aceite + <i>B. bassiana</i></b>	<b><i>B. bassiana</i></b>
<b>N° de pupas</b>	13,20±1,9 c	10,50±1,1 b	9,10±1,1 a	9,40±1,5 ab

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se observa el efecto de formulados en base a *B. bassiana* y aceite miscible aplicados en la dieta de larvas L2. A diferencia de la evaluación anterior con larvas L3, esta aplicación sobre larvas L2 presenta mayores efectos, con una mayor disminución del número absoluto de larvas y una menor población de pupas.

Cuadro 33.-

<b>Efecto de una aplicación de <i>B. bassiana</i> y/o aceite miscible sobre la dieta de larvas L2 y evolución de 15 larvas L2. Alimentadas y evaluadas a los 7 días post tratamiento.% de mortalidad larvas L2 respecto de 15 larvas tratadas.</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Testigo</b>	<b>Aceite</b>	<b>Aceite+B.bassiana</b>	<b><i>B. bassiana</i></b>
<b>% de pupas</b>	17,14±12,08	30,00 ±7,20	39,33±7,34	37,33±10,04

En el cuadro previo se observa un incremento en la mortalidad de las larvas sometidas a una dieta tratada con *B. bassiana* + aceite miscible y con la aplicación de una suspensión exclusiva de *B. bassiana* . La mayor mortalidad está asociada a la presencia en la dieta, de la mezcla de *B. bassiana* y aceite miscible, llegando esta aplicación a generar un 39,33±7,34 % de mortalidad sobre las larvas tratadas.

4.2.a6d) Evaluación del efecto en la sobrevivencia de los insectos adultos expuestos a la aplicación de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* F2 y C2, mezclados con aceite en dos concentraciones (1% y 2%)

A) Evaluación comparativa in vitro de un tratamiento de control de *M. domestica* en base a *B. bassiana* en suspensión con una concentración de  $10^9$  conidias/ml. Y de una suspensión de *B. bassiana* mas un 2% de aceite miscible.

Cuadro 34.-

<b>Evolución del número de individuos de una población de adultos de <i>M. domestica</i> sin tratamiento de control, N° de adultos</b>						
<b>Testigo</b>	<b>N° inicial <i>M. domestica</i></b>	<b>Adultos <i>M. domestica</i></b>				
<b>Evaluación</b>	23/I/2014	26/I/2014	30/I/2014	02/II/2014	04/II/2014	05/II/2014
<b>Muestra 1</b>	882	825	780	265	120	109
<b>Muestra 2</b>	882	830	784	260	138	104
<b>Muestra 3</b>	882	860	760	277	160	105
	<b>882</b>	<b>838±18,93</b>	<b>775±12,86</b>	<b>267±8,74</b>	<b>139±20,03</b>	<b>106±2,65</b>

En el cuadro anterior se aprecia la evolución natural en el número de adultos de *M. domestica* extraídos de una colonia artificial, de una muestra de 882 adultos sin aplicaciones de controladores, esta colonia se compara posteriormente con la evolución de insectos tratados con *B. bassiana* en suspensión con  $10^9$  conidias/ml. o *B. bassiana* mas aceite miscible en concentración v/v de 2%

Cuadro 35.-

<b>Evolución de una población de Adultos de <i>M. domestica</i> tratados con <i>B. bassiana</i> + aceite miscible 2% N° de adultos</b>						
<b><i>B. bassiana</i> + Aceite 2%</b>	<b>N° inicial <i>M. domestica</i></b>	<b>N° Adultos <i>M. domestica</i></b>				
<b>Evaluación</b>	23/I/2014	26/I/2014	30/I/2014	02/II/2014	04/II/2014	05/II/2014
<b>Muestra 1</b>	882	438	220	70	16	6
<b>Muestra 2</b>	882	470	285	90	13	2
<b>Muestra 3</b>	882	469	270	90	26	4
	<b>882</b>	<b>459±18,19</b>	<b>258±34,03</b>	<b>83±11,55</b>	<b>18±6,81</b>	<b>4±2,00</b>

En el cuadro anterior se aprecia el impacto de la aplicación de un controlador biológico como *B. bassiana* asociado a un aceite, evidenciándose una caída muy sustantiva de la población al 10° día desde la aplicación. La diferencia con el control es muy fuerte al día 10°.

En el cuadro siguiente se puede hacer la comparación con un tratamiento al que no se ha aplicado aceite encontrándose una diferencia positiva a favor de la introducción de este elemento en la suspensión de conidias en que se aplica el biocontrolador.

Cuadro 36.-

<b>Evolución de una población de Adultos de <i>M. domestica</i> tratados con una suspensión de <i>B. bassiana</i> con 10<sup>9</sup> conidias por ml. N° de adultos</b>						
<b>Suspensión <i>B. bassiana</i></b>	<b>N° inicial <i>M. domestica</i></b>	<b>N° Adultos <i>M. domestica</i></b>				
<b>Evaluación</b>	23/I/2014	26/I/2014	30/I/2014	02/II/2014	04/II/2014	05/II/2014
<b>Muestra 1</b>	882	498	260	99	30	10
<b>Muestra 2</b>	882	488	318	98	28	12
<b>Muestra 3</b>	882	500	330	120	37	17
	<b>882</b>	<b>495±6,43</b>	<b>303±37,43</b>	<b>106±12,42</b>	<b>32±4,73</b>	<b>13±3,61</b>

En el cuadro anterior se observa que del mismo modo en que *B. bassiana* +aceite miscible como formulado, provocan la caída en las poblaciones de *M. domestica*, la suspensión exclusiva de *B. bassiana* provoca una fuerte caída en el grupo de *M. domestica* tratadas con el biocontrolador aplicado sin aditivos. Ocurriendo la mayor reducción al 10 ° día de la aplicación.

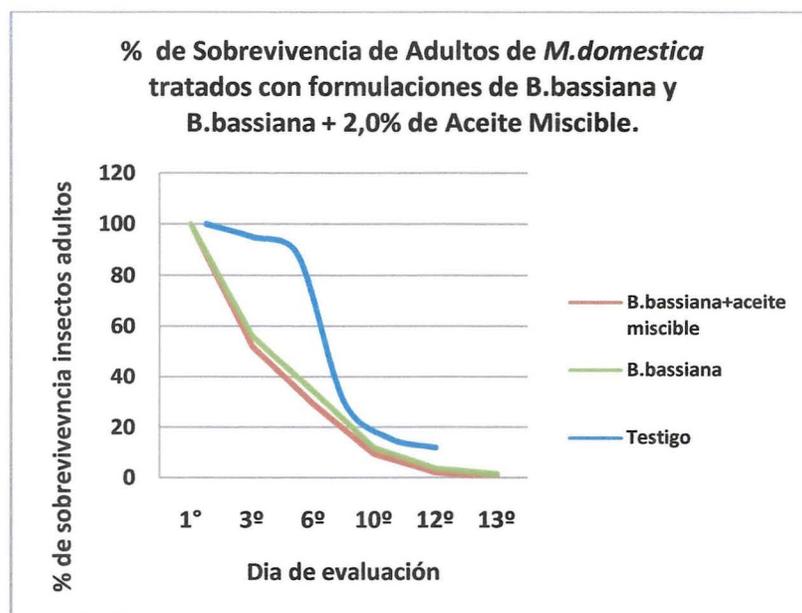
Cuadro 37.-

<b>Reducción porcentual de una población de <i>M. domestica</i> bajo control con una Suspensión de <i>B. bassiana</i> con 10<sup>9</sup> conidias por ml. O <i>B. bassiana</i> mas aceite miscible al 2%</b>						
<b>Tratamiento /Día</b>	<b>1°</b>	<b>3°</b>	<b>6°</b>	<b>10°</b>	<b>12°</b>	<b>13°</b>
<b>Testigo</b> a	100,00	95,05±2,15	87,83±1,46	30,31±0,99	15,80±2,27	12,02±0,30
<b>B. bassiana+ aceite miscible 2% b</b>	100,00	52,04±2,06	29,29±3,86	9,45±1,31	2,08±0,77	0,45±0,23
<b>B. bassiana</b> b	100,00	56,16±0,73	34,32±4,24	11,98±1,41	3,59±0,54	1,47±0,41

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se puede observar la evolución porcentual de tres grupos de una población de *M. domestica* sometidas a un tratamiento con *B. bassiana* o *B. bassiana* mas aceite, apreciándose como se produce una gran disminución de las poblaciones al tercer y sexto día post tratamiento. Esta caída es de mayor magnitud y significativamente más alta que la evolución normal de los insectos sin tratamiento. Se evidencia también el efecto levemente superior del tratamiento al que se le agregó aceite miscible.

Grafico 24.-



En el grafico anterior se puede ver la caída de las poblaciones tratadas con *B. bassiana* y *B. bassiana* mas aceite miscible, se puede apreciar también la diferencia positiva que existe a favor del efecto de *B. bassiana* mas aceite. Entre el primer y el sexto día post aplicación se hace muy visible el efecto del sistema de control. Se puede ver la gran pendiente de la curva que representa a los tratamientos en evaluación.

B) Evaluación comparativa in vitro de un tratamiento de control de *M. domestica* en base a *B. bassiana* en suspensión con una concentración de  $10^9$  conidias por ml. Y de una suspensión de *B. bassiana* mas un 1% de aceite miscible.

Cuadro 38.-

<b>Evolución de una población de Adultos de <i>M. domestica</i> sin tratamiento de control, N° de adultos</b>					
	<b>N° inicial M.domestica</b>	<b>N° Adultos M. domestica</b>	<b>N° Adultos M.domestica</b>	<b>N° Adultos M.domestica</b>	<b>N° Adultos M.domestica</b>
<b>Fecha</b>	<b>17-ene</b>	<b>21-ene</b>	<b>25-ene</b>	<b>28-ene</b>	<b>30-ene</b>
<b>Muestra 1</b>	411	360	260	190	185
<b>Muestra 2</b>	411	398	288	200	169
<b>Muestra 3</b>	411	340	220	120	95
	<b>411±00</b>	<b>366±29,46</b>	<b>256±34,18</b>	<b>170±43,59</b>	<b>150±48,01</b>

En el cuadro anterior se observa la evolución de una población de *M. domestica* extraídas de una colonia artificial de laboratorio que no se ha sometido a tratamiento.

Cuadro 39.-

<b>Evolución de una población de Adultos de <i>M. domestica</i> tratados con <i>B. bassiana</i> + aceite miscible 1% N° de adultos</b>					
<b>Aceite 0,5%</b>	<b>N° inicial M.domestica</b>	<b>N° Adultos M. domestica</b>	<b>N° Adultos M. domestica</b>	<b>N° Adultos M.domestica</b>	<b>N° Adultos M.domestica</b>
<b>Fecha</b>	<b>17-ene</b>	<b>21-ene</b>	<b>25-ene</b>	<b>28-ene</b>	<b>30-ene</b>
<b>Muestra 1</b>	411	260	120	60	24
<b>Muestra 2</b>	411	270	140	85	30
<b>Muestra 3</b>	411	255	150	64	33
	<b>411,00±00</b>	<b>261,67±7,64</b>	<b>136,67±15,28</b>	<b>69,67±13,43</b>	<b>29,00±4,58</b>

En el cuadro anterior se observa el efecto de una suspensión de *B. bassiana* +1% de aceite miscible, sobre una población de moscas, se aprecia la disminución del número de insectos que presenta una curva exponencial negativa (grafico 2).

Cuadro 40.-

<b>Evolución de una población de Adultos de <i>M. domestica</i> tratados con una suspensión de <i>B. bassiana</i> con <math>10^9</math> conidias por ml.</b>					
<b>N° de adultos</b>					
	<b>N° Adultos M. domestica</b>				
<b>Fecha</b>	<b>17-ene</b>	<b>21-ene</b>	<b>25-ene</b>	<b>28-ene</b>	<b>30-ene</b>
<b>Muestra 1</b>	411	270	130	52	26
<b>Muestra 2</b>	411	240	110	40	19
<b>Muestra 3</b>	411	250	130	58	28
	<b>411,00</b>	<b>253,33±15,28</b>	<b>123,33±11,55</b>	<b>50,00±9,17</b>	<b>24,33±4,73</b>

Del mismo modo que en el ensayo anterior en el cuadro precedente se ilustra el comportamiento de una población de moscas tratadas con una suspensión de *B. bassiana*, identificándose un comportamiento similar. En este caso también el efecto del aceite sería bajo y no habría diferencia entre la aplicación con un 2% o un 1%.

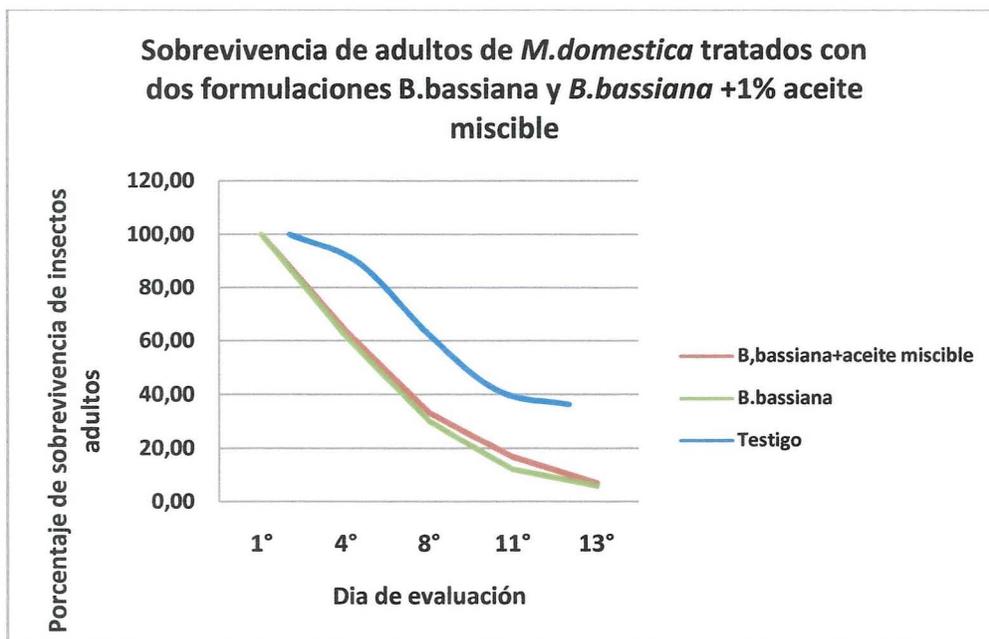
Cuadro 41.-

<b>Reducción porcentual de una población de <i>M. domestica</i> bajo control con una Suspensión de <i>B. bassiana</i> con <math>10^9</math> conidias por ml. O <i>B. bassiana</i> mas aceite miscible al 1%</b>					
<b>Tratamiento/Día</b>	<b>1°</b>	<b>4°</b>	<b>8°</b>	<b>10°</b>	<b>14°</b>
<b>Testigo a</b>	100	89,05	62,29	41,36	36,42
<b><i>B. bassiana</i> + Aceite miscible b</b>	100	63,67	33,25	16,95	7,06
<b><i>B. bassiana</i> b</b>	100	61,64	30,01	2,17	5,92

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se observa la reducción porcentual en las poblaciones tratadas presentándose un comportamiento equivalente, entre el efecto de la suspensión de *B. bassiana*, y la misma suspensión asociada a aceite miscible.

Gráfico 25.-



En el grafico anterior se observa el comportamiento de dos grupos de *M. domestica* tratados con *B. bassiana* o *B. bassiana* + aceite miscible, es posible evidenciar el efecto reductor de las poblaciones de ambos preparados y la similitud entre ellos.

4.2.c1) Evaluación del efecto controlador de los hongos *B. bassiana* F2 y C2, asperjado solo y con mezcla de aceite sobre insectos adultos en galpones de experimentación.

Evaluación de la aplicación de una suspensión de *B.bassiana* o de *B.bassiana* + 2% de aceite miscible sobre la población de *M. domestica* en un gallinero experimental con tres grupos de gallinas de 60 aves cada uno

Cuadro 42.-

N° Adultos de <i>M. domestica</i> /m <sup>2</sup> en un gallinero experimental tratado con una suspensión de <i>B. bassiana</i> con 10 <sup>9</sup> conidias/ml + 2% de aceite miscible o una suspensión de <i>B. bassiana</i> .				
Tratamiento/ fecha de aplicación	02-ene-14	07-ene-14	11-ene-14	15-ene-14
Testigo b	26,74±2,91	29,92±3,33	25,98±8,63	32,26±3,08
<i>B. bassiana</i> +2% A. miscible a	47,58±26,71	42,01±15,87	11,28±5,89	35,11±12,47
<i>B. bassiana</i> a	41,50±11,97	38,08±9,28	14,43±9,18	28,67±12,09

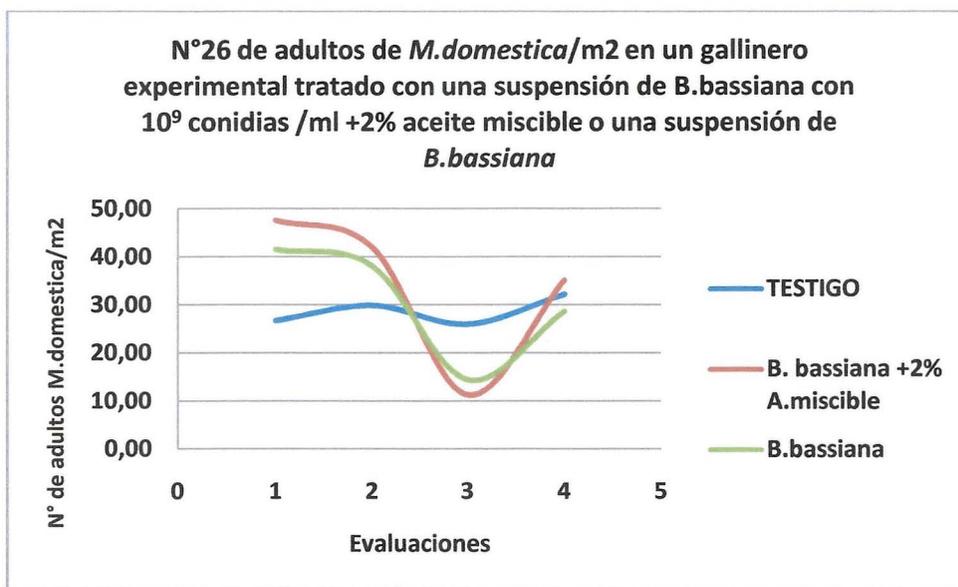
Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se aprecia la cantidad de individuos adultos de *M. domestica* por m<sup>2</sup> en un gallinero experimental tratado con una suspensión de *B. bassiana*, a la que se le se agregó un 2% de Aceite miscible, que tiene un efecto protector sobre las conidias, permite una mejor dispersión sobre ellas en el agua y además tendría un efecto insecticida. Se puede ver el cuadro un descenso en el número absoluto de los insectos tratados tanto con la suspensión con la adición de aceite como la suspensión solo de *B. bassiana*, fenómeno que ocurre hasta la tercera semana de tratamiento, luego se produjo un incremento de la población. Esta situación se debería a un efecto poco regulador del biopreparado sobre los estados larvales de la mosca por lo cual el incremento corresponde a un fenómeno de ese tipo que coincide con un nuevo ciclo de emergencia de adultos. Se debe agregar también el impacto de las condiciones climáticas del momento en que se desarrolló la experiencia de alta temperatura ambiente (superior a 30 C°) y de baja humedad relativa, condiciones detrimentales para los organismos en

evaluación. Esta situación no es de aparición constante pero es un fenómeno que se estudió en el transcurso del proyecto para regular este incremento, y se complementó el tratamiento en un esquema de manejo integrado de plagas que consideró la aplicación de un larvícida.

En la figura 26 se grafica el efecto de una aplicación semanal de *B. bassiana* en suspensión asociada a aceite o solo en suspensión, evidenciándose un mejor desempeño de la suspensión con el agregado de un 2% de aceite miscible. Se puede ver también el Incremento de la población en la última evaluación realizada en este ensayo.

Gráfico 26.-



Cuadro 43.-

<b>Evolución en % de Adultos de <i>M. domestica</i> /m2 en un gallinero experimental tratado con una suspensión de <i>B. bassiana</i> con 10<sup>9</sup> conidias/ml + 2% de aceite miscible o una suspensión de <i>B. bassiana</i>.</b>				
<b>Tratamiento /Fecha aplicación</b>	<b>2ºEnero</b>	<b>7 de Enero</b>	<b>11 de Enero</b>	<b>15 de Enero</b>
<b>Testigo</b>	100,00	111,89	97,18	120,66
<b>B. bassiana +2% A. miscible</b>	100,00	88,30	23,70	73,80
<b>B. bassiana</b>	100,00	91,76	34,77	69,07

En el cuadro anterior se aprecia la evolución porcentual de la población de *M. domestica* en un gallinero experimental tratado con *B. bassiana*, se puede ver la rápida disminución hasta el día 11, en ambos tratamientos en que se incluye *B. bassiana* y *B. bassiana* mas aceite miscible, llegando en ese día el porcentaje de sobrevivencia a un 23,70 y 34,77 en los tratamientos con *B. bassiana* y *B. bassiana* mas aceite respectivamente. Sin embargo se aprecia un posterior incremento de las poblaciones. Este comportamiento de las poblaciones de moscas, en esta etapa del trabajo en que se han hecho aplicaciones en pleno verano, puede responder a dos elementos, el primero de ellos puede ser un bajo rendimiento del biopreparado en el control de larvas con una aparición de insectos juveniles que no son controlados inmediatamente Y una segunda condición corresponden a las variables ambientales del verano con altas temperaturas y baja humedad relativa que limita el desarrollo de microorganismos, en este caso los hongos entomopatógenos utilizados para el control de *M. domestica*. Por lo tanto fue necesario realizar evaluaciones en otra condición ambiental como Otoño o Primavera que no limite el efecto o el desarrollo de los biocontroladores utilizados.

### Evaluación del efecto de aplicaciones de *B. bassiana* + aceite miscible sobre una población de *M. domestica* en un gallinero experimental.

Cuadro 44.-

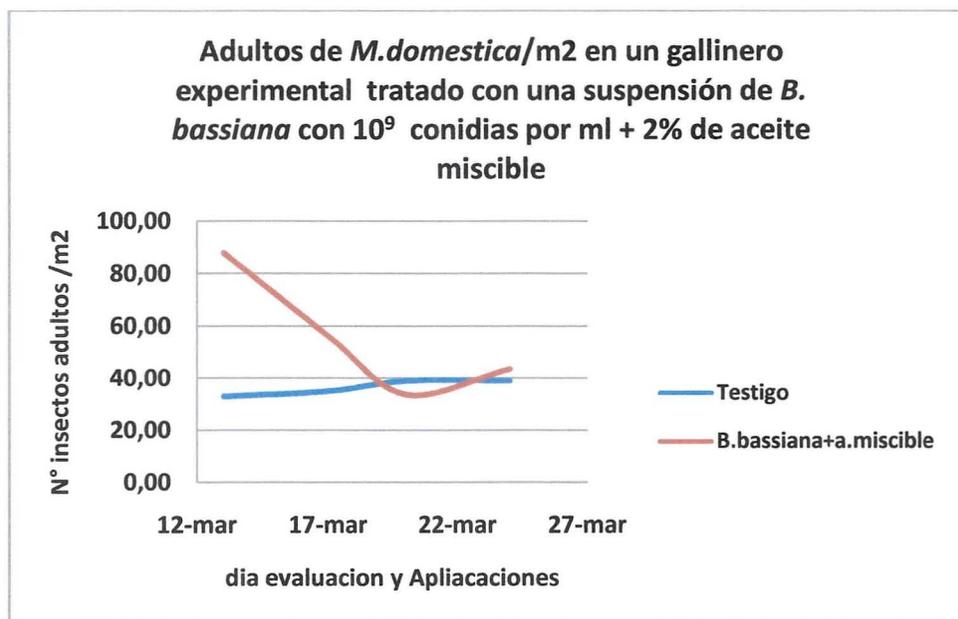
<b>N° Adultos de <i>M. domestica</i> /m<sup>2</sup> en un gallinero experimental tratado con una suspensión de <i>B. bassiana</i> con 10<sup>9</sup> conidias/ml + 2% de aceite miscible.</b>				
<b>Tratamientos/fecha aplicación</b>	<b>13-mar</b>	<b>17-mar</b>	<b>20-mar</b>	<b>24-mar</b>
<b>Testigo a</b>	32,95±11,36	35,00±15,51	38,96±12,73	39,04±12,81
<b>B. bassiana+ A. miscible 2% b</b>	87,91±43,46	56,18±36,10	33,71±31,55	43,52±38,37

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

En el cuadro anterior se observa el número de adultos de *M. domestica* en un gallinero experimental tratado con una suspensión de *B. bassiana* complementada con un 2% de aceite miscible, apreciándose el descenso del número de insectos por m<sup>2</sup> presentes en el sistema, se observa un descenso de la población de *M. domestica* en la infraestructura tratada luego de una semana de

aplicado el biopreparado, sin embargo nuevamente se produce un incremento posterior en el sistema, que coincide con altas temperaturas ambientales cercanas a 34 C°, lo que determinaría una reducción del efecto regulador y un aumento en el número de insectos presentes en el pabellón.

Gráfico 27.-



En la figura anterior se aprecia gráficamente el comportamiento de las poblaciones de *M. domestica*, tratadas y no tratadas evidenciándose el descenso del grupo tratado, la mantención de los niveles de adultos en el testigo y la posterior alza, en el número de individuos coincidente con las altas temperaturas.

Cuadro 45.-

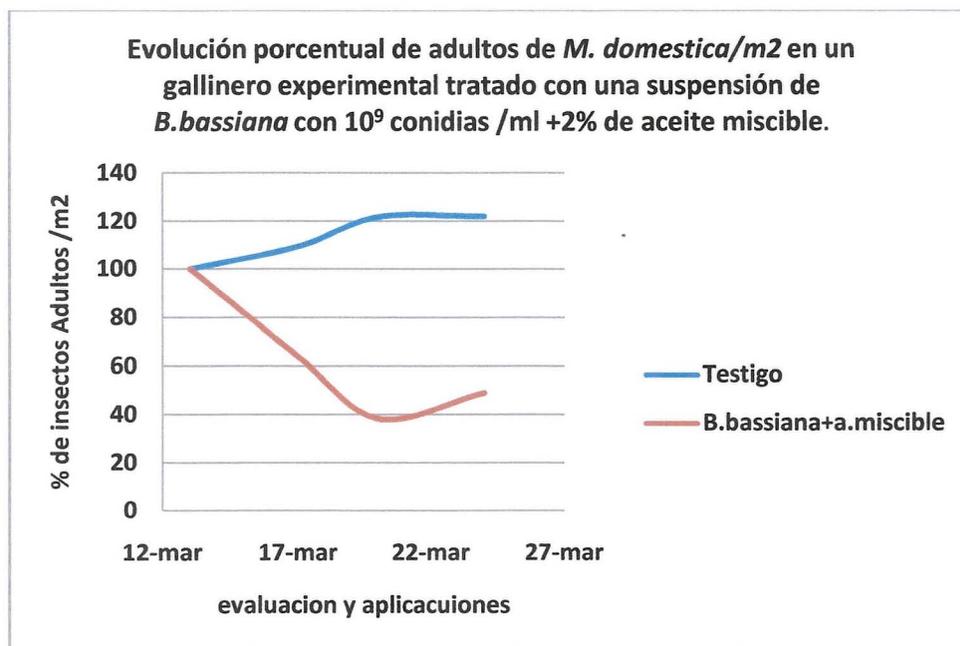
Tratamiento/fecha	13-mar	17-mar	20-mar	24-mar
<b>Testigo</b> a	100	109	122	122
<b>B.bassiana+A.miscible</b> b	100	64	38,34	48,91

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas. P ≤ 0,05. Test de Duncan

En el cuadro anterior se aprecia la evolución porcentual de adultos de *M. domestica* /m<sup>2</sup> en un gallinero experimental tratado con una suspensión de *B.*

*bassiana* con  $10^9$  conidias/ml + 2% de aceite miscible, se puede destacar el descenso de la población de insectos luego de una semana de aplicada la suspensión de *B. bassiana*+ aceite miscible, lográndose hasta un 61,66 % de control. Posteriormente se produce un aumento del cual ya se han explicado las posibles causas.

**Gráfico 28.-**



En el grafico precedente se observa la evolución porcentual de las poblaciones de mosca domestica tratadas con una suspensión de *B. bassiana* y aceite miscible evidenciándose un claro efecto de los biocontroladores aplicados.

**4.3) Evaluación de campo del efecto controlador de los hongos *B. bassiana* F2 y C2, asperjado con mezcla de aceite sobre insectos adultos en galpones comerciales de la empresa Cintazul**

**A) Control de *M. domestica* en un plantel avícola con aves de postura en jaula, comparando dos pabellones de 11.000 aves cada uno, sometidos a control convencional y control biológico con *B. bassiana*.**

En el cuadro siguiente se observa la evolución de la población de *M. domestica* por metro cuadrado en un pabellón avícola de postura. En esa etapa del trabajo se comparó el procedimiento de control desarrollado en el presente trabajo en base a *B. bassiana*, con el sistema de manejo habitual el insecto, que ha implementado la empresa Avícola Cintazul, que corresponde a la aplicación semanal de una mezcla insecticida que actúa sobre los adultos y larvas, conformado por Cyperkill® y Rush®, constituyendo este procedimiento el testigo contra el cual se comparó la aplicación de *B. bassiana*.

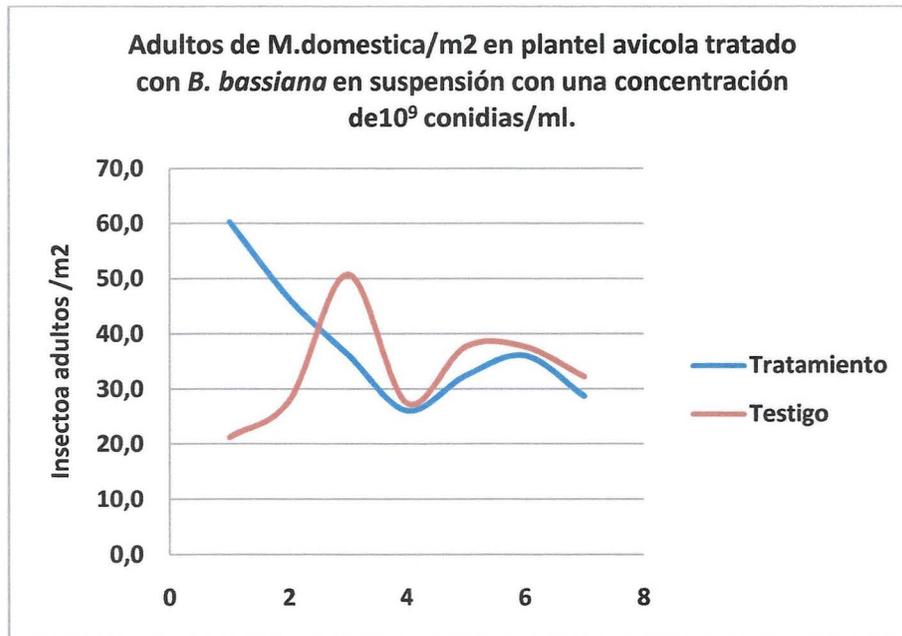
En el cuadro se aprecia en números absolutos de que manera la población de moscas tratadas con *B. bassiana* desciende y se iguala en el tiempo a la población de moscas, correspondiente al galpón tratado con la mezcla insecticida.

Cuadro 46.-

Adultos de <i>M. domestica</i> por metro cuadrado de pabellón avícola de postura tratado con <i>B. bassiana</i> en concentración de 10 <sup>9</sup> Conidias por ml.							
Tratamiento (a)	60,33±9,19	46,33±10,17	36,25±2,21	26,10±4,27	32,45±3,69	36,08±7,26	28,7±6,24
Testigo (a)	21,25±3,73	27,93±10,86	50,75±10,93	27,48±4,47	37,70±1,88	37,70±13,15	32,25±13,97

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas. P ≤ 0,05. Test de Duncan

Grafico 29.-



En la figura precedente se grafica el efecto de la aplicación semanal de *B. bassiana* en suspensión respecto del tratamiento químico convencional, que el plantel de aves de postura utiliza como forma de manejo habitual, de las poblaciones del insecto parásito, apreciándose el rápido descenso inicial del número de insectos por metro cuadrado de pabellón y la evolución posterior en que el preparado biológico alcanza mayor eficiencia que el tratamiento químico en base a Cyperkill® y Rush. ®

**Evolución porcentual de la población de *M. domestica* en un pabellón de aves de postura con 11,000 aves.**

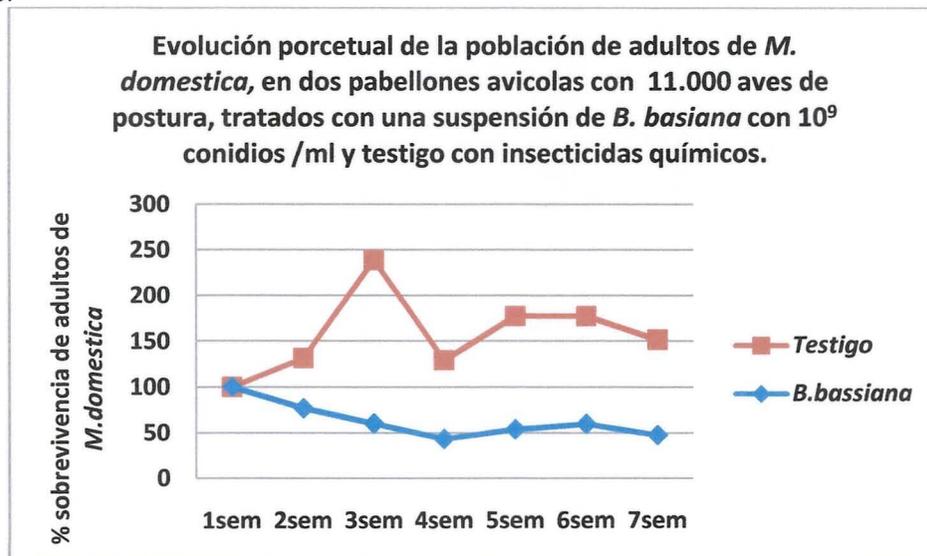
En el cuadro siguiente se hace evidente el efecto de las aplicaciones de *B. bassiana* sobre la población de *M. domestica* a pesar que, en números absolutos la carga inicial de insectos era mayor al iniciar la experiencia, esta se redujo en las primeras semanas de aplicación y posteriormente se igualó y redujo en relación a la población tratada con insecticidas convencionales. Sin embargo estos resultados son muy dependientes de las condiciones ambientales por lo fué necesario implementar nuevas experiencias en condiciones climáticas más favorables a los biocontroladores, estos presentan alta sensibilidad frente a las variables ambientales de temperatura y humedad relativa.

Cuadro 47.-

Evolución porcentual de la sobrevivencia de una población de <i>M. domestica</i> en un pabellón de aves de postura con 11.000 aves, tratado con una suspensión de <i>B. bassiana</i> con 10 <sup>9</sup> conidias /ml y 2% de aceite miscible, respecto de un tratamiento con insecticidas químicos.								
Tratamiento/aplicación		1sem	2sem	3sem	4sem	5sem	6sem	7sem
<i>B. bassiana</i>	a	100%	76,80%	60,08%	43,27%	53,80%	59,81%	47,57%
Testigo químico	b	100%	131,47%	238,82%	129,35%	177,45%	177,45%	151,76%

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

Grafico 30.-



En la figura anterior se grafica la evolución de la población de *M. domestica* en galpones tratados con métodos biológicos como *B. bassiana* y tratamientos en base a Cyperkill® y Rush® respectivamente. Lográndose reducciones con el sistema biológico que permiten llevar la población de moscas a un 43, 27% de la población inicial. Además de lograr una reducción de la población de *M. domestica* respecto del tratamiento químico.

**Resultados sexta etapa.**

**4.2c1) Evaluación del efecto controlador de los hongos *B. bassiana* F2 y C2, asperjado solo y con mezcla de aceite (Winspray®) al 2% sobre insectos adultos en galpones de experimentación.**

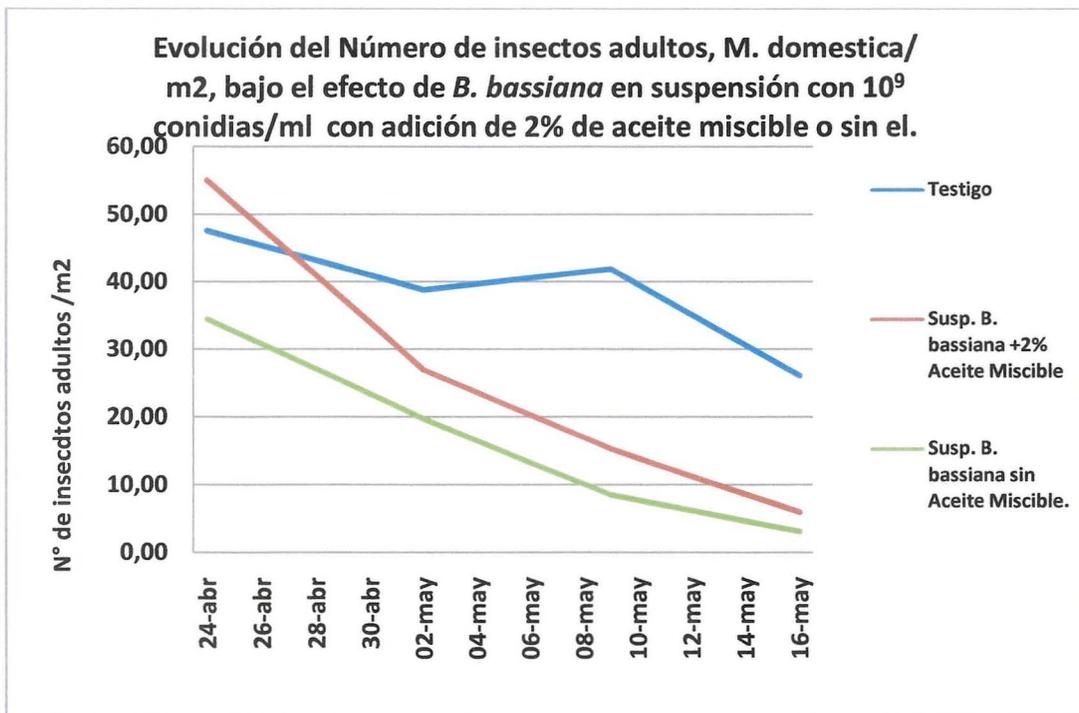
A continuación se entregan los resultados de un ensayo realizado en el gallinero experimental de ITAS S.A, este se llevo adelante entre el 24 de abril y el 16 de Mayo. En el cuadro siguiente se aprecia un disminución acentuada en el número de insectos por metro cuadrado, luego de 15 días de exposición, (9 de mayo) que se intensifica hasta el 16 de mayo con reducciones en el sector tratado cercano al 90% de reducción, tanto en la mezcla de *B. Bassiana* con aceite miscible como en la preparación sin el aditivo. Esta evolución se puede apreciar tanto en el cuadro como en el grafico siguientes.

Cuadro 48.-

<b>Evolución del Número de insectos adultos <i>M. domestica</i>/ m2 bajo el efecto de <i>B. bassiana</i> en suspensión con 10<sup>9</sup> conidias/ml con adición de 2% de aceite miscible o sin el.</b>				
<b>TRATAMIENTOS/Fecha</b>	<b>24-abr-14</b>	<b>02-may-14</b>	<b>09-may-14</b>	<b>16-may-14</b>
<b>Testigo</b>	47,61±41,65a	38,83±30,0 a	41,94±18,3 b	26,06±14,89 b
<b>Susp. <i>B. bassiana</i> +2% Aceite Miscible</b>	55,05±12,66a	26,97±16,22a	15,3±5,89 a	5,96±2,53 a
<b>Susp. <i>B. bassiana</i> sin A. Miscible.</b>	34,50±17,75a	19,68±8,00 a	8,52±3,89 a	3,07±2,08 a

Test de Duncan p<0.05 Letras distintas indica diferencias estadísticas

Gráfico31-



En la figura anterior se aprecia la evolución en el tiempo del efecto de los preparados en base a *B. bassiana* sobre el número de moscas por metro cuadrado en un gallinero experimental. Se observa que en las primeras dos semanas de aplicación no se producen diferencias estadísticamente significativas respecto del testigo, las que si se manifiestan a partir de la tercera semana de evaluación.

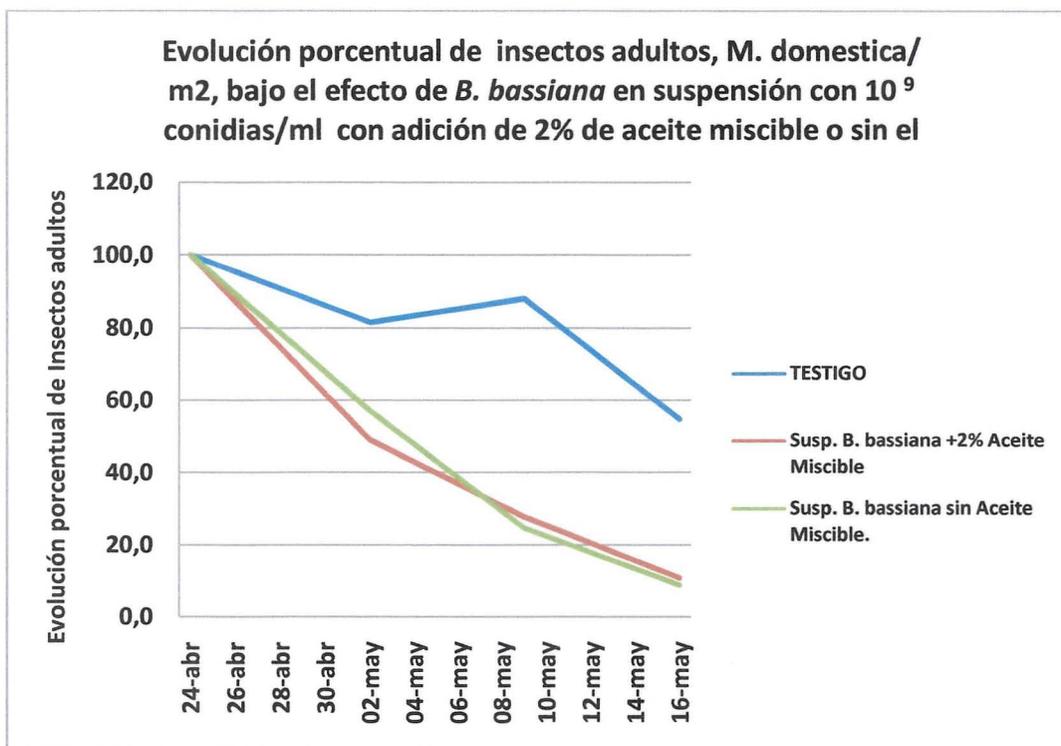
El siguiente cuadro se expresa de manera porcentual la variación en el número de moscas (*M. Domestica*) por metro cuadrado. Como ya se ha comentado al analizar los valores absolutos se produce un descenso de alrededor de un 90% en los sectores del gallinero tratados con preparados en base a *B. bassiana*.

Cuadro 49.-

Evolución porcentual de insectos adultos <i>M. domestica</i> / m2 bajo el efecto de <i>B. bassiana</i> en suspensión con $10^9$ conidias/ml con adición de 2% de aceite miscible o sin el.				
TRATAMIENTOS/Fecha	24-abr-14	02-may-14	09-may-14	16-may-14
TESTIGO b	100,0	81,55	88,09	54,75
Susp. <i>B. bassiana</i> +2% Aceite Miscible a	100,0	48,99	27,80	10,83
Susp. <i>B. bassiana</i> sin Aceite Miscible. a	100,0	57,04	24,71	8,92

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

Gráfico 32-

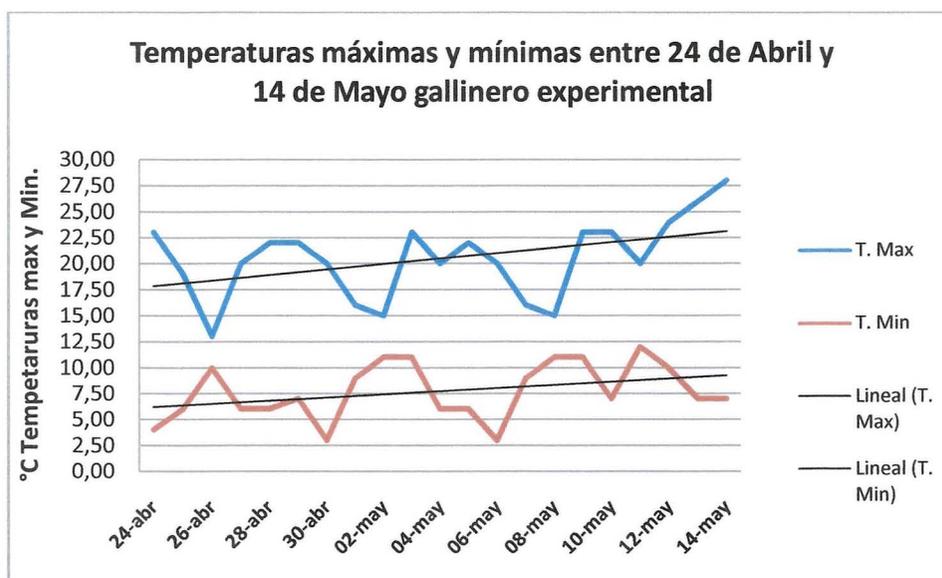


En la figura anterior se expresa gráficamente el comportamiento de los insectos sometidos al tratamiento con *B. bassiana*, observándose un comportamiento muy parecido en los preparados utilizados.

### c1) Efecto de la temperatura ambiente.

En el cuadro siguiente se entrega la información sobre las temperaturas máximas y mínimas durante el desarrollo de este ensayo, apreciándose en los días 8 y 12 de Mayo, descensos de las temperaturas mínimas, que pueden haber afectado el comportamiento del testigo y en general de los insectos en todos los tratamientos, solo que en los otros casos se suma el efecto de los preparados. Se aprecia una caída en el número de insectos del grupo testigo aproximadamente en el día 10 de Mayo lo que coincide con la disminución de la T° mínima en ese momento.

Gráfico 33.-



En el cuadro siguiente se observan las temperaturas máxima media y mínima media ocurridas durante el periodo en el que se desarrolló el ensayo respectivo

Cuadro 50.-

	Máxima media	Mínima Media
Temperaturas	20,48±3,82	7,71±2,74

4.2.c2) Evaluación de la aplicación de una suspensión de *B.bassiana* o de *B.bassiana* + 2% de aceite miscible y de una suspensión de *B. bassiana* con 4 % de melaza sobre la población de *M. domestica* en un gallinero experimental con tres grupos de gallinas de 60 aves cada uno.

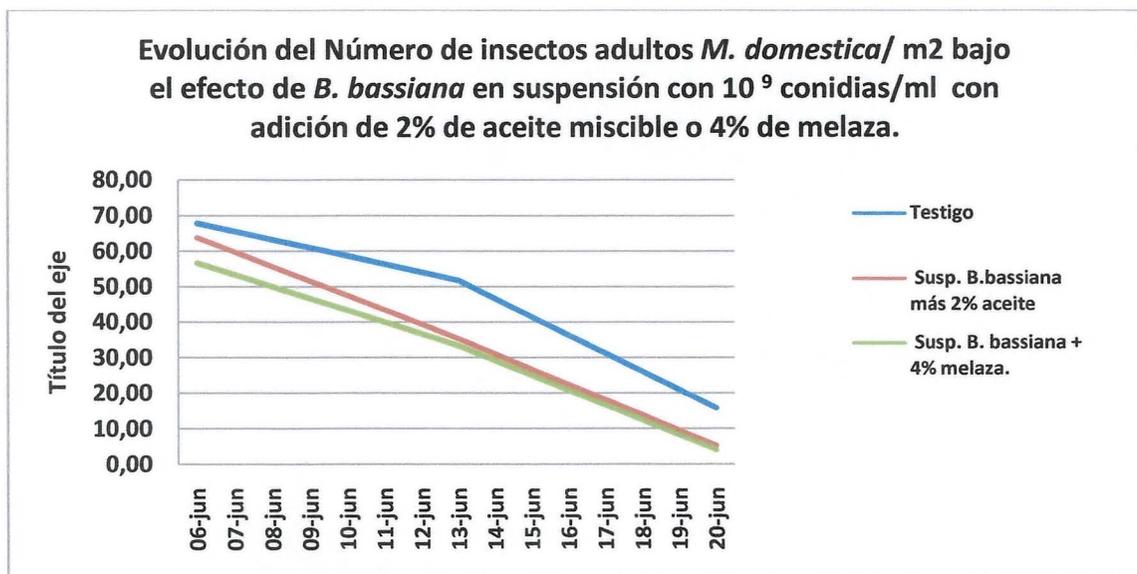
En el próximo cuadro se puede observar el cambio en el número de insectos por metro cuadrado cuando los establecimientos son sometidos a aplicaciones de *B. bassiana* con adición de Aceite miscible 2% o melaza 4%. Si bien es cierto el testigo también baja por condiciones de T° ambiental con mínimas de 4°C, el descenso de los insecto en los sectores tratados es mucho más acentuado, superando el 90% de control.

Cuadro 51.-

Evolución del Número de insectos adultos <i>M. domestica</i> / m2 bajo el efecto de <i>B. bassiana</i> en suspensión con 10 <sup>9</sup> conidias/ml con adición de 2% de aceite miscible o 4% de melaza.				
Tratamiento/Fecha		6-jun	13-jun	20-jun
Testigo	b	67,94±32,95a	51,80±17,63a	15,82±9,62a
Susp. <i>B. bassiana</i> más 2% aceite	a	63,89±5,32a	35,34±15,73b	5,25±3,30b
Susp. <i>B. bassiana</i> + 4% melaza.	a	56,77±15,04a	33,34±14,24b	4,05±1,81b

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas. P ≤ 0,05. Test de Duncan

Gráfico 33-



En el gráfico anterior se aprecia el descenso de las poblaciones de *M. domestica* sometidas al efecto de los preparados biológicos en base a *B. bassiana*, con adición de A. miscible 2% o 4% Melaza. Como en el ensayo anterior la mayor respuesta ocurre a las 3ra. Semana de aplicación.

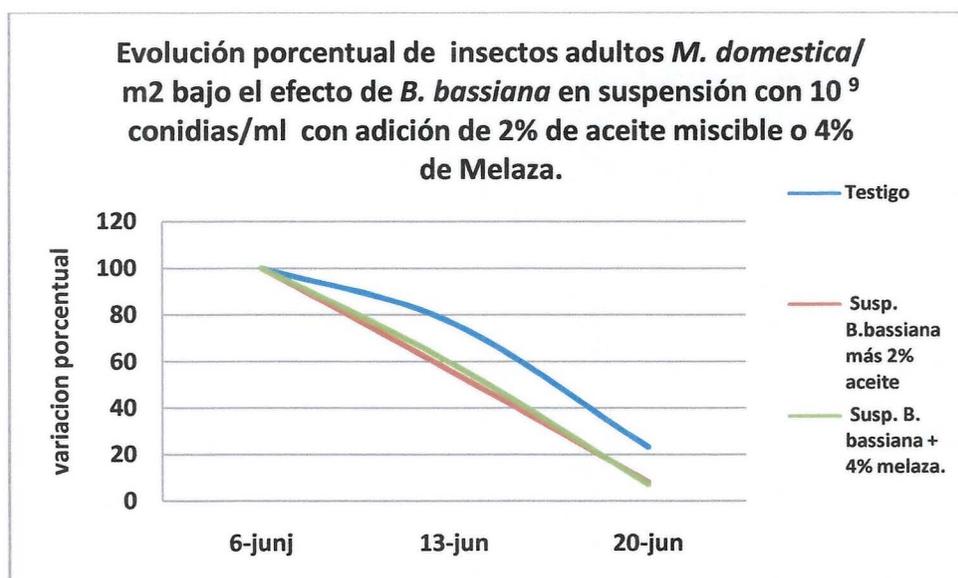
En el cuadro y gráfico siguientes se aprecia el cambio porcentual en las poblaciones de *M. domestica* por metro cuadrado de gallinero, llegando a superar el 90 % de control en el sistema tratado.

Cuadro 52.-

Evolución porcentual de insectos adultos <i>M. domestica</i> / m2 bajo el efecto de <i>B. bassiana</i> en suspensión con $10^9$ conidias/ml con adición de 2% de aceite miscible o 4% de Melaza.		6-jun	13-jun	20-jun
Testigo	b	100	76,24	23,28
Susp. <i>B. bassiana</i> más 2% aceite	a	100	55,32	8,22
Susp. <i>B. bassiana</i> + 4% melaza.	a	100	58,73	7,14

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

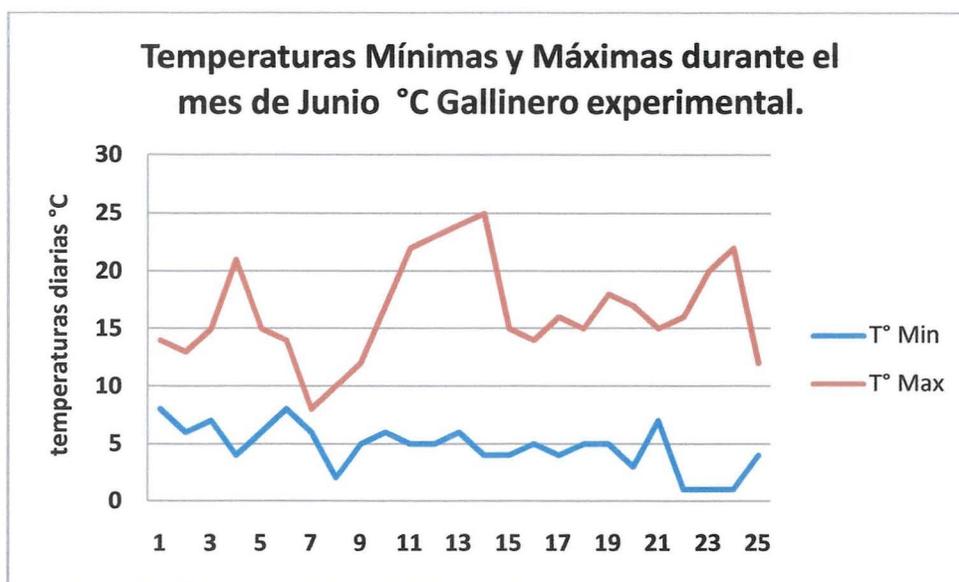
Gráfico 34-



**C2) Efecto de la temperatura Ambiente.**

En el grafico y cuadro siguiente se aprecia la banda de temperaturas bajo las cuales se dieron los resultados del mes de Junio a nivel experimental, en que se logra sobre un 90 % de control, esto indicaría que hay que realizar aplicaciones tempranas para reducir inicialmente las poblaciones de *M. domestica*. Este es un caso particular que debe ser validado a escala comercial.

Gráfico 35-



Cuadro 53.-

Temperaturas mínimas medias y máximas medias en el mes de Junio	
T° Mínima media	4,7±1,99 °C
T° máxima media	16,5±4,40°C

**4.3) Evaluación de campo del efecto controlador de los hongos *B. bassiana* F2 y C2, asperjado con mezcla de aceite sobre insectos adultos en galpones comerciales de la empresa Cintazul**

**B) Control de *M. domestica* en un plantel avícola con aves de postura en jaula, comparando dos pabellones de 11.000 aves cada uno, sometidos a control convencional y control biológico con *B. bassiana*.**

**Evolución de la población de *M. domestica* en un pabellón de aves de postura con 11,000 aves.**

**Cambio de la población de *M. domestica* en números absolutos.**

En el cuadro siguiente se observa la evolución de la población de *M. domestica* establecida a través del uso de tarjetas para monitoreo, distribuidas en los pabellones en estudio, se utilizaron 28 tarjetas, 14 en cada galpón, en ellas se evalúa la presencia de los insectos a través de las manchas fecales que ellos dejan en las tarjetas de monitorización de 7,5 X10 cm. Schlapbach (2007). Estas tarjetas están diseñadas para establecer con precisión el nivel crítico aceptable a partir del cual existe daño y se deben hacer aplicaciones químicas, este nivel es de 50 manchas por cartulina y semana como valor umbral.

En esta etapa del trabajo se comparó una unidad de producción de huevos de 11.000 aves, como testigo absoluto con otra unidad equivalente asperjada en la cama de estiércol con *B. bassiana*. Esta aplicación se realizó semanalmente como se indica en los cuadros respectivos.

Se aprecia en el próximo cuadro en números absolutos de que manera la población de moscas tratadas con *B. bassiana* tiene un comportamiento diferente a las poblaciones sin tratamiento evaluadas por el método de las tarjetas en que se determinan las manchas fecales y de vomito de los insectos en estudio.

Se aprecia en el cuadro siguiente que al inicio del programa de tratamiento existía una cantidad similar de manchas por semana de 16,12 manchas y un posterior

aumento hasta niveles críticos de 47,13 manchas por tarjeta, en la unidad testigo que indican para ese galpón la aplicación de un controlador químico.

Por otra parte en el mismo cuadro se aprecia que el tratamiento con *B. bassiana* a la cama de estiércol ha mantenido por este periodo el sistema bajo el umbral crítico, pero habiendo una tendencia al aumento de las poblaciones, por lo que se espera ampliar nuevamente las aplicaciones al conjunto de la estructura. Esto se había dejado de hacer por cuanto las poblaciones de *M. domestica* en esta época del año tienen casi como única fuente de alimentación el material fecal, por lo tanto las aplicaciones se habían centrado hasta el momento en este punto,

Cuadro 54.-

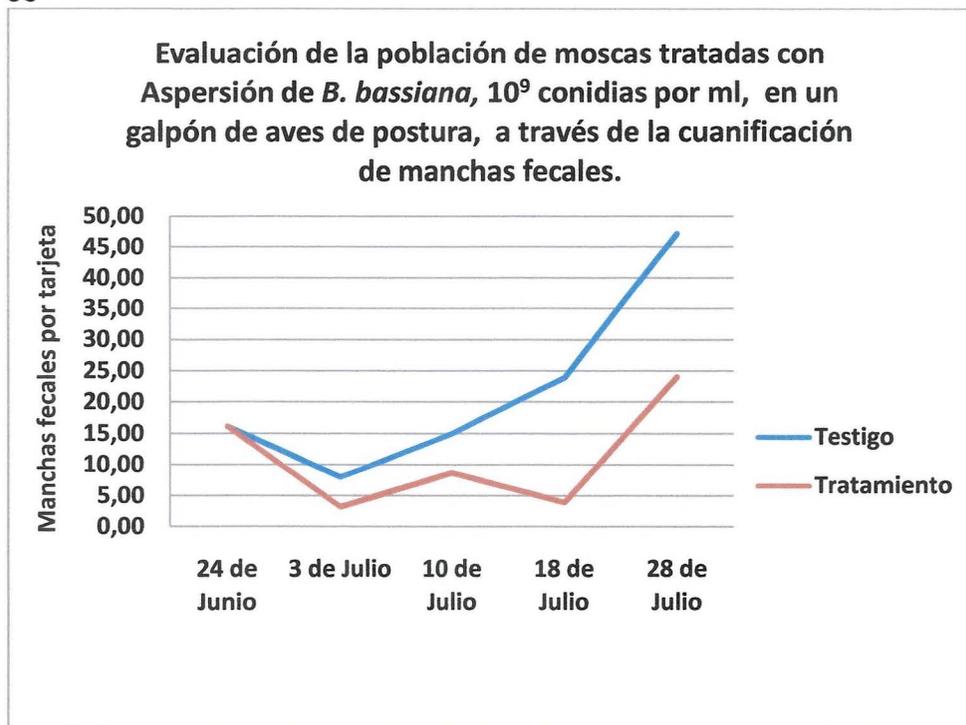
<b>Cuantificación de la población de <i>M. domestica</i> tratadas aspersión de <i>B. bassiana</i> 10<sup>9</sup> conidias por ml, en un galpón de aves de postura, a través de la cuantificación de manchas fecales.</b>					
	<b>24 de Junio</b>	<b>3 de Julio</b>	<b>10 de Julio</b>	<b>18 de Julio</b>	<b>28 de Julio</b>
<b>Testigo a</b>	<b>16,12±7,6a</b>	<b>8,00±4,3b</b>	<b>15±6,0b</b>	<b>23,92±13b</b>	<b>47,13±17,2b</b>
<b>Tratamiento b</b>	<b>16,12±7,6a</b>	<b>3,18±2,36a</b>	<b>8,7±9,13a</b>	<b>3,9±4,3a</b>	<b>24±7,9a</b>

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

La aplicación del controlador debiera ser complementaria a los tratamientos químicos dado que se amplía el espectro de acción de ambos sistemas, debiéndose integrar el uso de larvicidas como RUSH® y el hongo entomopatógeno.

En la figura siguiente se expresa gráficamente la evolución en el tiempo de los registros en las tarjetas de monitoreo evidenciándose los expresado anteriormente, de que el testigo sin tratamiento alcanzó niveles críticos en cinco semanas de evaluación y que se apreció una tendencia en la última semana evaluada de un incremento de las poblaciones en el sistema bajo la aplicación de *B. bassiana*. Por este motivo se indicó una modificación en la pauta de control, reintegrando las aplicaciones a toda la estructura del gallinero,

Gráfico 36-



### **Evolución porcentual de la población de *M. domestica*.**

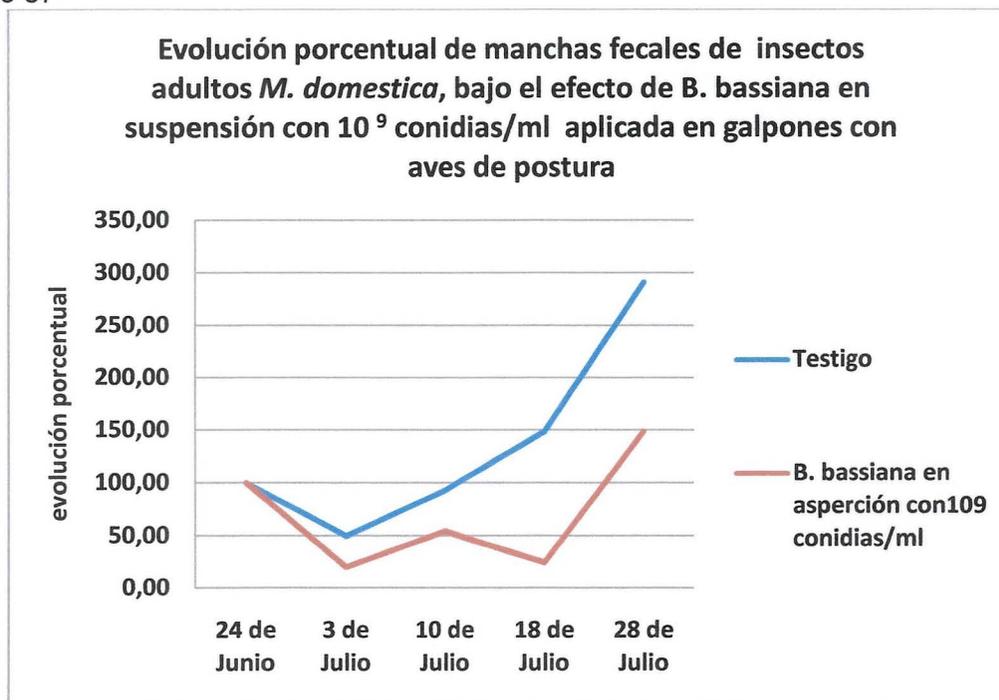
En el cuadro siguiente se observa la evolución porcentual de las manchas fecales en tarjetas de monitoreo y se hace evidente el incremento de la población de moscas en el sistema sin tratamiento biológico, tal como se indicó en los comentarios de los valores absolutos. Por otra parte se aprecia claramente el incremento generado en la última semana de observaciones.

Cuadro 55.-

<b>Evolución porcentual de la población de <i>M. domestica</i> tratadas por aspersión de <i>B. bassiana</i> <math>10^9</math> conidias por ml, en un galpón de aves de postura, a través de la cuantificación de manchas fecales.</b>					
	24 de Junio	3 de Julio	10 de Julio	18 de Julio	28 de Julio
Testigo	100,00	49,63	93,05	148,39	290,92
B. bassiana en aspersión	100,00	19,73	53,97	24,19	148,9

En el próximo grafico se entregan los valores de cambio porcentual obtenidas a partir de tarjetas de monitoreo. Schlapbach (2007)

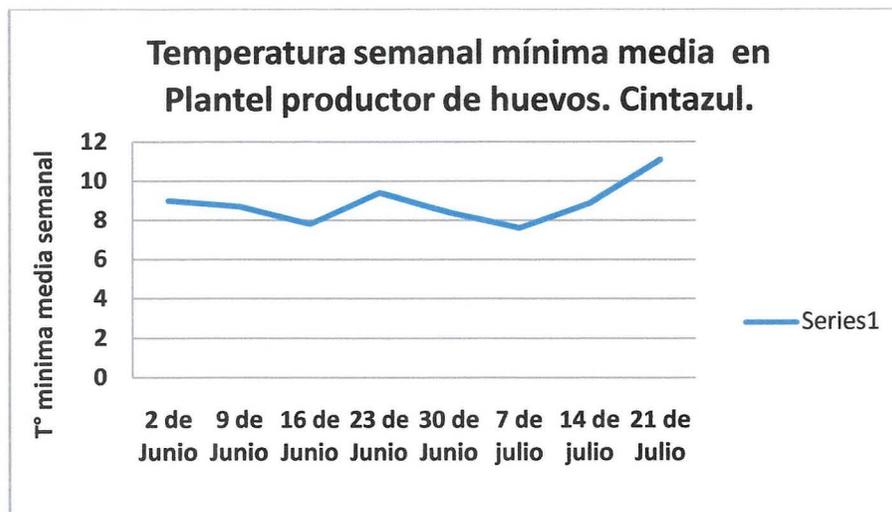
Gráfico 37-



#### 4.0.1) Temperaturas mínimas medias en galpón de producción industrial Cintazul.

En el siguiente grafico se entrega la variación semanal de la temperatura mínima media obtenida en el plantel industrial con el que se trabaja, se puede observar que a partir del la semana del 14 de junio un incremento sostenido en la temperatura mínima lo que se correlaciona muy estrechamente con el incremento en la población de *Mosca domestica* en los galpones en estudio, coincidiendo este incremento en las temperaturas mínimas con los niveles críticos alcanzados en las tarjetas de monitoreo cercanos a 50 manchas por tarjeta y semana. Schlapbach 2007.

Gráfico 38-



#### **4.3.c) Evaluación a nivel experimental y de campo, en galpones de postura del efecto de los biocontroladores en cuatro condiciones de temperatura y humedad a lo largo del año**

Las tres pruebas enunciadas mas adelante, se llevaron a cabo como una experiencia continua entre los meses Agosto y Diciembre de 2014.

4.3c1. Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 70-75 % HR y temperaturas medias de 24 y 19 C° Realizable durante los meses de Mayo y Junio (Otoño)

4.3c2. Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 74-66 % HR y temperaturas medias de 16-19 C° Realizable durante los meses de Agosto y Septiembre

( Primavera Temprana)

4.3c3. Pruebas experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 59-52 % HR y temperaturas medias de 22-26 C° Realizable durante los meses de Octubre y Noviembre. Primavera tardía, En esta etapa se indico el tratamiento integrado con el larvícida Rush ®. Que se empezó a aplicar a partir del 29 de Octubre. (Primavera Tardía)

## Resultados.

En el próximo cuadro se aprecia la evolución de la población de Mosca domestica por metro cuadrado de superficie en un Galpón de aves de postura con 11.000 aves, En los siguientes cuadros y grafico se aprecia el cambio de las densidades poblacionales de los insectos

Cuadro N°56.-

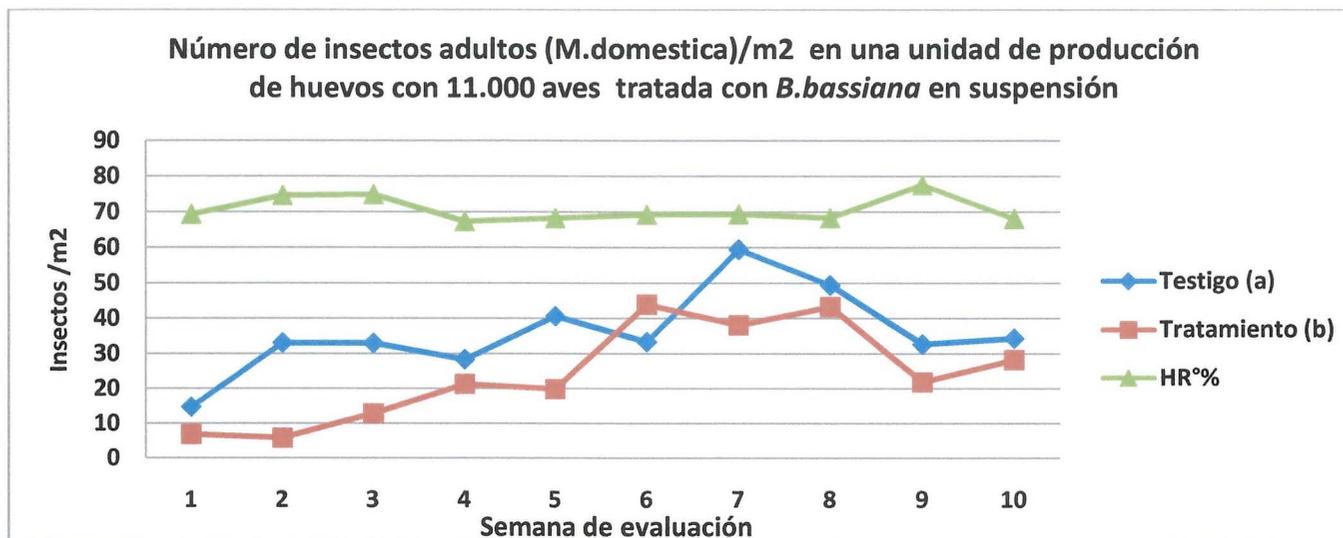
Evaluación de la población de M, domestica tratada con B, bassiana a través del recuento de insectos por metro cuadrado en un galpón de postura para 11000 aves										
Fecha evaluación	15-10-2014	22-10-2014	29-10-2014	05-11-2014	12-11-2014	21-11-2014	27-11-2014	04-12-2014	11-12-2014	18-12-2014
Testigo (a)	14.73±5.26	33.08±13.98	33±13.16	28.375±13.09	40.68±14.26	33.35±6.3	59.5±15.75	49.43±10.0	32.7±2.47	34.35±7.65
Tratamiento (b)	6.85±0.9	5.83±2.36	12.87±6.87	21.3125±9.71	19.875±5.51	43.95±21.68	38.1±2.45	43.3±19.45	21.9±2.27	28.25±4.01
HR° %	<b>69,35±0,52</b>	<b>74,675±6,13</b>	<b>74,95±3,41</b>	<b>67,35±1,60</b>	<b>68,225±1,35</b>	<b>69,25±2,34</b>	<b>69,375±3,41</b>	<b>68,32±11,9</b>	<b>77,55±1,21</b>	<b>68,07±11,74</b>
%Control	<b>53,50</b>	<b>82,38</b>	<b>61,00</b>	<b>24,90</b>	<b>51,14</b>	<b>-31,98</b>	<b>35,97</b>	<b>12,40</b>	<b>33,03</b>	<b>17,76</b>

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas.  $P \leq 0,05$ . Test de Duncan

La humedad relativa reportada en el cuadro anterior corresponde a la humedad relativa nocturna, promedio de 4 horas de mayor humedad, esto teóricamente permitiría la adhesión y desarrollo de los hongos sobre la superficie de los insectos, también en estas condiciones de mayor humedad se produjeron grandes mortalidades de insectos en el ambiente, haciéndose visibles en el piso de la infraestructura tratada, coinciden en los gráficos los aumentos de la HR°, con el descenso de las poblaciones.

Se aprecia en el cuadro anterior el nivel de control alcanzado cuando se compara con un testigo absoluto que corresponde a 82,32% situación que va acompañada de un nivel de humedad relativa de 74,68%. Cuando se compara con un testigo bajo tratamiento químico el nivel de superioridad del tratamiento integrado alcanza un 35,97% respecto del sistema convencional.

GráficoN°39.-



P<0,05 MR-anova; p<0,05 ; Test de Duncan , letras distintas indican diferencia estadística.

En el gráfico anterior se puede observar la evolución de la población de *M. Domestica* en un galpón con 11000 aves de postura, tratadas con *B. bassiana* exclusivamente, las cinco primeras semanas expresadas en la figura anterior, con posterioridad a ellas se realizó un manejo integrado agregando Rush ® a las aplicaciones semanales, el que se entregó asociado al controlador biológico orientándolo a los acumulos de estiércol bajo las jaulas de las ave. Se puede apreciar que permanentemente se obtuvieron poblaciones menores en el tratamiento biológico o integrado. Se aprecia también que en congruencia con los aumentos de la Humedad Relativa del ambiente se produjeron descenso de la población de *M.domestica*. En la medida que transcurre la temporada se va incrementando la población total de insectos en ambas situaciones de tratamiento, con tasas menores en el sistema regulado con un controlador biológico.

Evaluación de la población de mosca domestica a través de la determinación de manchas fecales en tarjetas de monitoreo de acuerdo a Schlapbach (2007)

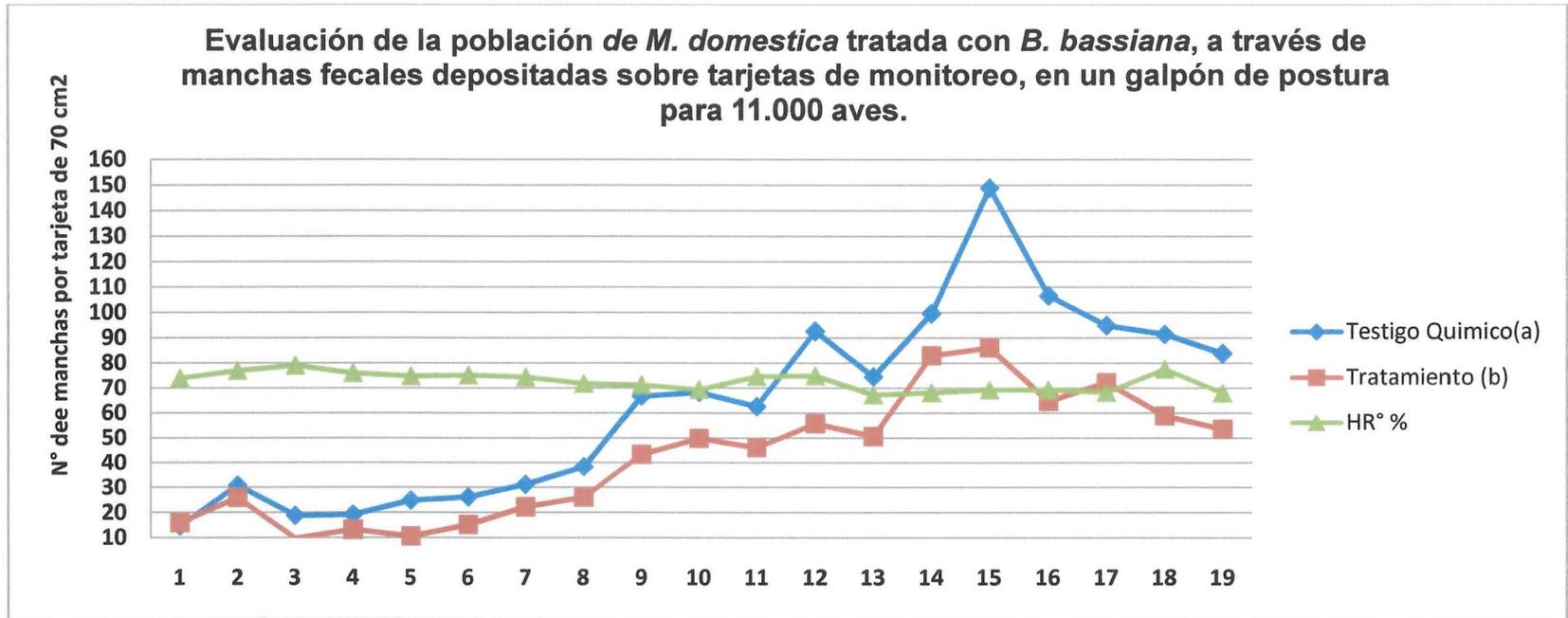
Cuadro N° 58.-

Evaluación de la población de M, domestica tratada cin B, bassiana a través de manchas fecales depositadas sobre tarjetas de monitoreo en un galpón de postura para 11000 aves.																			
Fecha	10-ago	20-ago	27-ago	03-sep	10-sep	16-sep	24-sep	01-oct	08-oct	15-oct	22-Oct	29-oct	05-nov	12-nov	20-nov	27-nov	04-dic	11-dic	18-dic
Testigo Químico(a)	14,66	30,92	18,84	19,21	24,92	26,22	31,23	38,31	66,71	68,26	62,58	92,60	74,54	99,59	148,85	106,62	94,91	91,43	83,81
Tratamiento(b)	16,00	26,00	9,81	13,24	10,67	15,22	22,29	26,13	43,38	49,83	46,15	55,79	50,64	83,03	86,19	64,67	72,23	58,86	53,58
HR%	74	77	79	76	74,85	75,15	74,40	71,8	71,28	69,35	74,675	74,95	67,35	68,225	69,25	69,38	68,32	77,55	68,07
% Control **	-	15,90	47,93	31,08	57,18	41,95	28,62	31,81	34,97	27,00	26,25	39,75	32,06	16,63	42,10	39,34	23,90	35,63	36,06

MR-anova  $p < 0,05$ ; Test de Duncan.  $P < 0,05$ , Letras distintas indican diferencia estadística.

\*\*comparación de %control sobre el tratamiento testigo.

GráficoN°40.-



MR-anova  $p < 0,05$ ; Test de Duncan.. $P < 0.05$ , Letras distintas indican diferencia estadística.

En los cuadros y gráfico anterior se aprecia el efecto del tratamiento biológico, que en todo el periodo tiene capacidad de regular las poblaciones de *M. domestica*, por sobre el tratamiento convencional, con adecuados niveles de control, este se relaciona con una humedad relativa del ambiente alta, durante algunas horas de la noche superior a 74%, correspondiendo además la estación a una primavera húmeda con episodios de lluvias esporádicas, esta situación decae a fines del año y se estrecha el nivel de control en relación al tratamiento químico que realiza la empresa avícola donde se realiza el proceso de investigación y desarrollo.

En el grafico se aprecia el cambio en la pendiente de la curva de humedad relativa coincidente con el cambio en las poblaciones de los adultos de *M. domestica*.

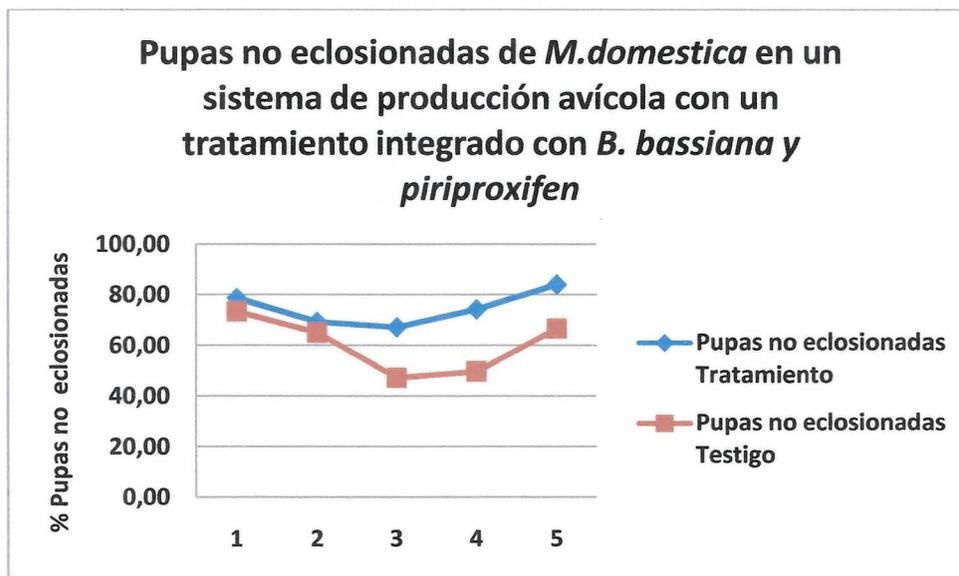
La evaluación de la población de mosca domestica se realizó a través de la determinación de manchas fecales en tarjetas de monitoreo de acuerdo a Schlapbach (2007)

En cada galpón en evaluación se dispusieron 14 tarjetas de 75 centímetros cuadrados cada una, esto en lugares iluminados y protegidos equivalentes en su ubicación en cada sector del trabajo. Estas tarjetas se cambiaron semanalmente y se hizo un recuento de las manchas fecales depositadas por los insectos.

De manera complementaria se evaluó el nivel de eclosión de las pupas recolectadas en ambos galpones de tratamiento, que se sometieron a la aplicación de *B.bassiana* y piriproxyfén. Se midió el número de pupas no eclosionadas en cada caso.

Pupas no eclosionadas de <i>M. domestica</i> en un sistema de producción avícola con un tratamiento químico o integrado con <i>B.bassiana</i> y piriproxyfén.					
Cyperkill+piriproxyfén (a)	73,33±4,16	65±6,08	47,30±5,12	49,75±9,63	66,67±10,41
Tratamiento <i>B.bassiana</i> + Piriproxyfén (b)	78,67±6,11	69,33±3,79	67,25±9,45	74,27±5,61	84,06±5,72

P<0.05: test de Duncan. letras distintas indican diferencia estadística.



En el cuadro y grafico anterior se aprecia el efecto sinérgico entre el tratamiento biológico mas el larvícida Piriproxyfén sobre l control de pupas de M.domestica, que superan al tratamiento químico convencional, esto explicaría en parte la reducción de la población en la fase final del tratamiento en los galpones comerciales de producción de huevos.

6. Fichas técnicas y análisis económico del cultivo, rubro, especie animal o tecnología que se desarrolló en el proyecto, junto con un análisis de las perspectivas del rubro después de finalizado el proyecto.

**Ficha técnica del producto.**

**CONBIOL-*M. domestica* WP**

**POLVO MOJABLE (WP)**

**CONBIOL- *M. domestica* WP:** es un insecticida biológico *en base a conidias de Beauveria bassiana* cepa F2 y C2 En polvo con  $1 \times 10^{10}$  conidias/gramo, Posee acción controladora de *M.domestica*

**CONBIOL- *M. domestica* WP esta compuesto po:**

*Beauveria bassiana*, cepas F2 y C2                      50 %p/p

Inertes c.s.p. 50 % p/p

Contiene:

*Beauveria bassiana* (cepas C2 y F2)                       $1 \times 10^{10}$  conidias/gr

**CONBIOL- *M. domestica* WP se presenta en Sachetes de 15 y 30 grs.**

**INSTRUCCIONES DE USO**

Las cepas de *B.bassiana* C2 y F2 presentan una acción controladora sobre *M.domestica*. Pueden controlar hasta un 80 % de poblaciones *M. domestica*.

Control Ambiental mosca	Uso o insecto a controlar	Dosis	Observaciones
Gallineros	<i>Mosca domestica</i>	2 gramos/litro de agua.	Aplicar sobre estiércol o materia orgánica

**Preparación de la mezcla:** aplicar agua hasta la mitad del equipo aplicador luego introducir el producto, llenar con agua y aplicar, mantener la mezcla en agitación.

**CONBIOL-*M. domestica* WP se aplica en aspersión, sobre estiércol, materia orgánica o estructuras donde de posan insectos adultos (*M. domestica*)**

**CONBIOL-*M. domestica* WP,** se aplica semanalmente, se puede asociar a larvicidas lo que potencia su acción reduciendo la eclosión de pupas de *M. domestica*.

**CONBIOL-*M. domestica* WP** No tiene días de carencia.

## PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

**Insecticida biológico** en base a conidias de los hongos Beauveria bassiana, cepa F2 y C2

**Medidas de protección personal durante la aplicación de la Pasta:** Utilizar guantes, botas de goma, protector de nariz y boca y delantal,

**Medidas de prevención después de la aplicación:**

Lávase minuciosamente después de trabajar con el insecticida biológico, Conbiol-*M. domestica* WP en especial antes de consumir alimentos. Use ropa especialmente destinada a este trabajo, lávela después de aplicar el producto.

**Destino de los envases vacíos:** inutilice y destruya el envase.

**Síntomas de Intoxicación:** En caso de ingestión posible diarrea, en caso de contacto con piel u ojos, posible irritación.

**Tratamiento médico de emergencia:**

En caso de contacto con los ojos o piel lavar inmediatamente con abundante agua, si existe irritación persistente, acudir al médico. En caso de ingestión no inducir vómitos, avisar y mostrar la etiqueta a un médico.

**Antídoto:** No posee antídoto específico, tratar sintomáticamente MANTENER FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS Y DE PERSONAS INEXPERTAS.

EN CASO DE INTOXICACION MOSTRAR LA ETIQUETA, EL FOLLETO O EL ENVASE AL PERSONAL DE SALUD. NO TRANSPORTAR NI ALMACENAR CON ALIMENTOS.

NO LAVAR LOS ENVASES O EQUIPOS DE APLICACIÓN EN LAGOS, RIOS Y OTRAS FUENTES DE AGUA.

No es tóxico a organismos acuáticos, aves, animales ni abejas.

**Almacenaje:** Conbiol-Ovino WP se debe mantener a temperatura ambiente en lugar fresco y seco. Siempre mantener este producto etiquetado y en su envase original. Durabilidad 6 meses en envase al vacío.

Mantener separado de alimentos

Teléfonos de Emergencia ITAS S.A. 02)-7455009

## CONBIOL-*M. domestica* WP

Controlador de *M. domestica*

### POLVO MOJABLE (WP)

CONBIOL-*M. domestica* WP: es un insecticida biológico en base a conidias de Beauveria bassiana cepa F2 y C2 En polvo con  $1 \times 10^{10}$  conidias/gramo. Posee acción controladora de *M. domestica*

### COMPOSICIÓN

*Beauveria bassiana*, cepas F2 y C2 50 %p/p  
Inertes c.s.p. 50 % p/p

### LEA ATENTAMENTE LA ETIQUETA, ANTES DE USAR EL PRODUCTO

Fabricado y Distribuido por: ITAS S.A.

Lote N° Fecha de Vencimiento  
Contenido Sachetes 15 y 30 grs.



Instituto Tecnológico para  
La Agricultura Sustentable

NO INFLAMABLE - NO CORROSIVO –NO EXPLOSIVO

NO INFLAMABLE - NO CORROSIVO –NO EXPLOSIVO  
INSTRUCCIONES DE USO

**Generalidades:** La cepas de *B. bassiana* del producto presentan principalmente una acción controladora sobre *M. domestica* adulta.

Control Ambiental mosca	Uso o insecto a controlar	Dosis	Observaciones
Gallineros	<i>Mosca domestica</i>	2 gramos/litro de agua	Aplicar sobre estiércol, materia orgánica e infraestructura

**Preparación de la mezcla:** aplicar agua hasta la mitad del equipo aplicador luego introducir el producto, llenar con agua y aplicar, mantener la mezcla en agitación.

**Aplicación:** Aplicar en aspersión, sobre estiércol, materia orgánica o estructuras donde de posan insectos adultos (*M. domestica*)

**Período de Carencia:** No tiene días de carencia.



CUIDADO



**Análisis económico.**

**16.2. II-FLUJO DE FONDOS DEL PROYECTO E INDICADOPRES DE RENTABILIDAD**

ITEM/AÑO	0	1	2	3	4	5	6
----------	---	---	---	---	---	---	---

**DESGLOSE DETALLADO DEL FLUJO DE CAJA**

<b>FLUJO DE INGRESOS</b>	<b>año- 1</b>	<b>año- 2</b>	<b>año- 3</b>	<b>año- 4</b>	<b>año- 5</b>	<b>año- 6</b>
--------------------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------

<b>FLUJO DE EGRESOS</b>	<b>año-1</b>	<b>año-2</b>	<b>año-3</b>	<b>año-4</b>	<b>año-5</b>	<b>año-6</b>
-------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

<b>GASTOS ADM Y VTAS</b>							
--------------------------	--	--	--	--	--	--	--

III-Flujo de fondos del proyecto

INDICADORES DE RENTABILIDAD

EVALUACIÓN PROYECTO PURO (\$/AÑO)

	A Ñ O S						
	0	año -1	año -2	año -3	año -4	año -5	año -6

Las perspectivas del producto desarrollado son muy favorables dado el interés manifestado por las principales empresas comercializadora de insumos pecuarios. Los insecticidas tradicionales presentan una gran resistencia por parte de las poblaciones de *M.domestica* que pretenden, controlar situación que mejora o estimula el interés por el producto que estamos desarrollando. Las empresas comercializadoras hablan de situación de crisis en relación al control de *M. domestica* en referencia al bajo efecto actual de las cipermetrinas en producción animal.

En particular se ha conversado con ANASAC sobre establecer una relación comercial que permita terminar el desarrollo del producto en términos comerciales añadiendo tecnologías que pueden facilitar y hacer más segura su utilización y manejo como son los envase hidrosolubles.

Por otra parte se han establecido contactos con la gerencia técnica y comercial de CENTROVET en el sentido de ampliar el uso del producto desarrollado a sistemas productores d cerdos para lo cual se deben implementar los ensayos respectivos.

7. Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto (legales, técnicos, administrativos, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

El mayor problema que se presentó correspondió a que por las fechas de inicio del proyecto se obtuvieron los inóculos finales en una época en que ya no se podía evaluar su efecto en condiciones de primavera con temperatura y humedad favorable a las necesidades de los organismos en uso y experimentación además de posibilitar la introducción temprana en la temporada de los biorreguladores de la población de *M. domestica*. Esta situación se corrigió favorablemente alargando el proyecto en seis meses, lo que permitió monitorear el efecto de los controladores en dos galpones comerciales de producción de huevos, bajo condiciones climáticas de primavera

8. Calendario de ejecución (programado, real) y cuadro resumen de costos (programados, efectivos) del proyecto. El cuadro de costos es el mismo que se presenta en el informe financiero final → financiamiento solicitado más financiamiento total.

Actividades	Fecha de término propuesta	Fecha termino real
1.1) Muestreo y colección de distintos estados de desarrollo de, <i>M domestica</i> para la detección de patologías originadas por hongos Entomopatógenos.	29/08/2014	29/08/2015
2a) Establecimiento de crianza artificial de <i>M. domestica</i> 2b) patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en larvas de mosca domestica. 2c) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en pupas de mosca domestica. 2d) Patogenicidad y virulencia de los hongos aislados en adultos de mosca domestica.	29/12/2015	29/12/2015
3.1) Evaluación del tránsito gastrointestinal y supervivencia de conidias de hongos entomopatógenos en aves de experimentación. 3.2) Control de los estados de desarrollo del insecto con diferentes concentraciones del patógeno A) Nivel de virulencia de los hongos aislados en larvas de mosca domestica B) Nivel de virulencia de los hongos aislados en pupas de mosca domestica. C) Nivel de virulencia de los hongos aislados en adultos de mosca domestica.	29/09/2014	15/12/2015
Diseño de ingeniería y puesta en marcha de Biorreactor para la producción masiva de hongos entomopatógenos.	30/01/2013	30/01/2013
Reproducción en Biorreactor prototipo, de las cepas patógenas en evaluación y ajuste del mecanismo de Autoclaveado, incubación y secado de medios de cultivos esporulados. Ajuste de parámetros de cultivo de los hongos en biorreactor,	30/07/2014	30/10/2014
4.1) Preparación de las formulaciones y control de calidad	15/12/2014	15/12/2014
4.2 a1) Evaluación in vitro de cada formulación en los estados de desarrollo de la mosca.	15/12/2014	15/12/2014
4.2 a2) Ingesta de conidias en suspensión para control de larvas de moscas	15/12/2014	15/12/2014

4.2.b) Conidias en Cebos para insectos adultos	15/12/2014	15/12/2014
4.2 c) Evaluación a de las formulaciones en aves de experimentación	15/12/2014	15/12/2014
4.3) Evaluación a nivel experimental y de campo, en galpones de postura del efecto de los biocontroladores en cuatro condiciones de temperatura y humedad a lo largo del año,	15/04/2014	
4.3a.Prueba experimental con Formulaciones en suspensión y cebos alimentarios, evaluadas respecto de su eficiencia en vivo, Realizable durante los meses de Marzo y Abril con temperaturas medias máximas de 28 y 24 C° respectivamente y humedad relativa de 53-60%	30/07/2014	15/04/2014
4.3b.Pruebas de experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 70-75 % HR y temperaturas medias de 24 y 19 C° Realizable durante los meses de Mayo y Junio (Otoño)	30/09/2014	30/07/2014
4.3c.Pruebas de experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 74-66 % HR y temperaturas medias de 16-19 C° Realizable durante los meses de Agosto y Septiembre ( Primavera temprana )	15/12/2014	30/09/2014
4.3d.Pruebas de experimentales con gallinas en condiciones de alta humedad 59-52 % HR y temperaturas medias de 22-26 C° Realizable durante los meses de Octubre y noviembre ( Primavera Tardia)	28/11/2014	15/12/2014
4.4) Elaboración y diseño de etiquetas en función de las formulaciones desarrolladas	28/11/2014	28/11/2014
Documentar el protocolo de Requisitos Técnicos para la evaluación de plaguicidas de acuerdo a la resolución N° 3670 del 23 de Diciembre de 1999, Ministerio de agricultura.	30/11/2014	30/11/2014
Seminario y presentación de resultados	22/12/14	22/12/14

Cuadro de costos del proyecto

Proyecto "Desarrollo y producción de un insecticida biológico para el control de la mosca doméstica ( <i>Musca domestica</i> L.) en planteles avícolas"						Codigo PYT-2011-0042		
Item	Sub Item	APORTE FIA	Aporte Pecuniario Contraparte	Aporte No Pecuniario Contraparte	Aporte Total	Gasto total	Saldo FIA	Saldo A.Propios

9. Difusión de los resultados obtenidos adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

A continuación se entrega el Power point utilizado en la presentación final del proyecto.



**“Desarrollo y producción de un insecticida biológico para el control de la mosca domestica (*Musca domestica* L.) en planteles avícolas.”**

Código: PYT-2011-0042

Raúl Venegas V.

ITAS  
Avícola el Toco Cintazul  
Centro Veterinario Centrovvet

Santiago 2014

## Objetivos

- 1.- Obtener aislados nativos de hongos entomopatógenos desde poblaciones de mosca domestica en planteles avícolas.
- 2.- Establecer el nivel de patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas e identificadas, sobre los distintos estados de desarrollo de la mosca domestica (larva, pupa y adulto) obtenidas a partir de una crianza artificial, evaluando *in vitro* la efectividad de los aislados obtenidos en función de la concentración de ellos.
- 3.- Diseño y desarrollo de un Biorreactor prototipo para la producción de hongos entomopatógenos.
- 4.- Formular y evaluar *in vitro* e *in vivo* las presentaciones finales que se espera obtener, tanto en polvo, suspensión y cebos.
- 5.- Presentar resultados finales ante autoridad sanitaria para registrar y patentar los productos finales, para su comercialización a nivel nacional.

Obtener aislados nativos de hongos entomopatógenos desde poblaciones de mosca domestica en planteles avícolas.

### Mosca domestica

**Clasificación taxonómica**  
**Orden:** Díptera  
**Suborden:** Brachycera  
**Superfamilia:** Muscoudea  
**Familia:** Muscidae  
**Género:** Musca  
**Especie:** domestica



### Entomopatógenos aislados y evaluados.

U. Valparaíso, Fac. de Medicina. Dep. Micología,

1	0.07	<i>Beauveria bassiana</i> A
2	0.01	<i>Beauveria bassiana</i> B
3	0.05	<i>Beauveria bassiana</i> C
4	0.09	<i>Beauveria bassiana</i> C1
5	0.20	<i>Beauveria bassiana</i> C2
6	0.06	<i>Beauveria bassiana</i> D
7	0.02	<i>Beauveria bassiana</i> E
8	0.03	<i>Beauveria bassiana</i> F
9	0.10	<i>Beauveria bassiana</i> F2
10	0.40	<i>Beauveria bassiana</i> G
11	0.30	<i>Beauveria bassiana</i> H
12	0.04	<i>Beauveria bassiana</i> M1
13	0.08	<i>Beauveria bassiana</i> M2
14	0.70	<i>Beauveria bassiana</i> Buprestido
15	0.02	<i>Metarhizium anisopliae</i> A
16	0.01	<i>Metarhizium anisopliae</i> B
17	0.60	<i>Paecilomyces lilacinus</i> A
18		<i>Pochonia chlamydosporia</i>

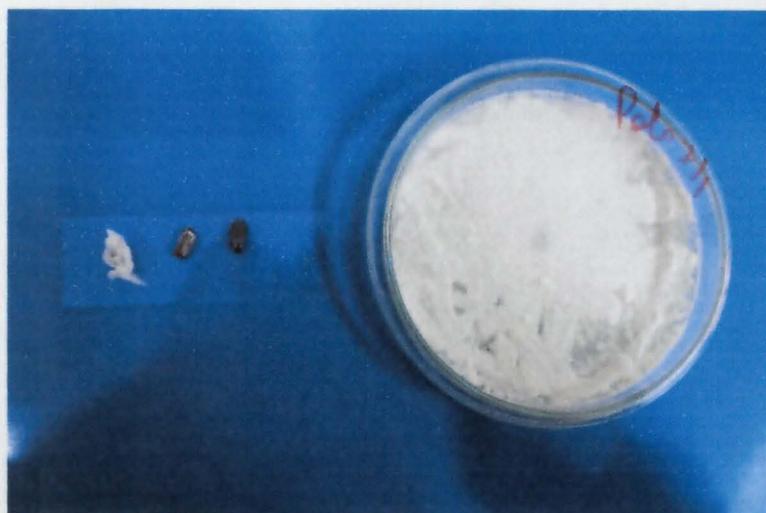
### Búsqueda de H. entomopatógenos en poblaciones locales de insectos.



**Búsqueda de Aislados en material entomófilo nativo .**



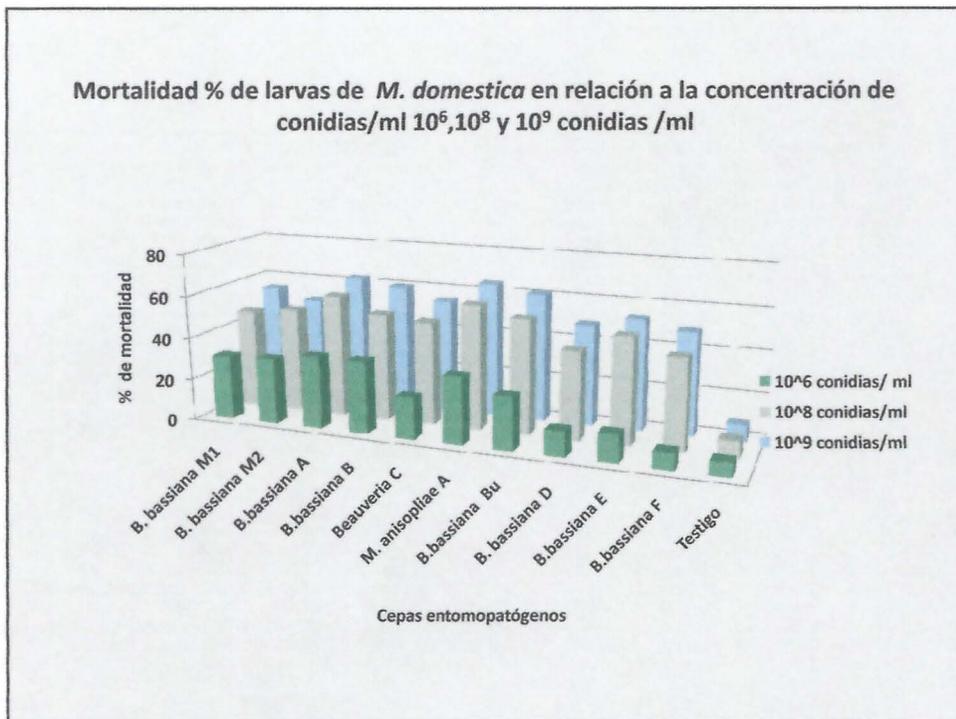
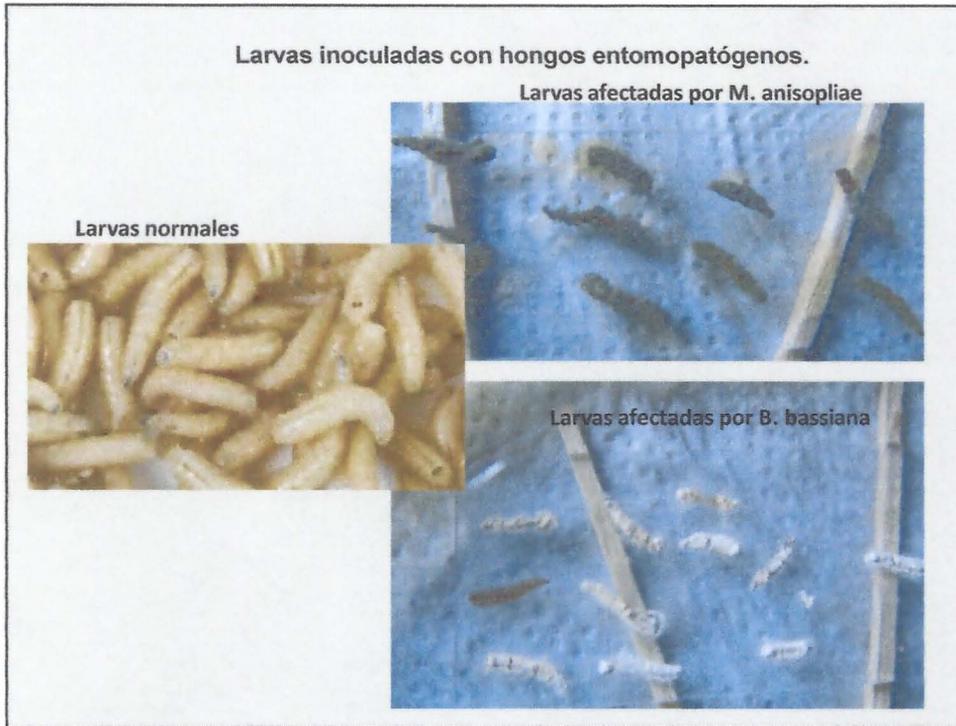
**Búsqueda de Aislados en material entomófilo nativo .**



Establecer el nivel de patogenicidad y virulencia de las cepas aisladas e identificadas sobre los distintos estados de desarrollo de la mosca domestica (larva, pupa y adulto) obtenidas a partir de una crianza artificial, evaluando in vitro la efectividad de los aislados obtenidos en función de la concentración de ellos.

Porcentaje de mortalidad de larvas de *M. domestica*, tratadas con una suspensión de diferentes aislados de hongos en dosis de  $10^6$ ,  $10^8$ , y  $10^9$  conidias/ml

Aislados de hongos entomopatógenos	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> expuestas a $10^6$ conidias/ml	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> expuestas a $10^8$ conidias/ml	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> expuestas a $10^9$ conidias/ml
<i>Beauveria M1</i>	30,66 ± 1,54	47,33 ± 1,92	54,67 ± 1,05
<i>Beauveria M2</i>	31,29 ± 1,53	50,0 ± 2,78	50,09 ± 1,26
<i>Beauveria A</i>	34,66 ± 2,00	58,30 ± 1,75	62,77 ± 1,26
<i>Beauveria B</i>	34,66 ± 1,00	51,28 ± 2,25	60,05 ± 1,53
<i>Beauveria C</i>	20,00 ± 1,00	49,33 ± 3,55	54,67 ± 0,93
<i>Metarhizium A</i>	32,00 ± 1,53	59,34 ± 1,82	64,67 ± 2,75
<i>Beauveria Buprestido</i>	25,33 ± 0,57	54,67 ± 1,61	61,33 ± 1,91
<i>Beauveria D</i>	12,00 ± 1,00	42,00 ± 2,48	48,66 ± 2,04
<i>Beauveria E</i>	13,33 ± 1,53	50,66 ± 1,96	53,33 ± 1,33
<i>Beauveria F</i>	8,00 ± 1,00	43,33 ± 3,35	49,33 ± 0,78
Testigo	31,29 ± 1,53	8,44 ± 1,57	8,00 ± 1,29



### Alimentación de larvas



### Dietas artificiales



**Pupas obtenidas a partir de crianza de *M. domestica*.**



**Jaulas para emergencia de adultos de *M. domestica* desde pupas colectadas a partir de crianza artificial, reproducción de *M. domestica*.**



Porcentaje de mortalidad de **pupas** de *M. domestica* de 24 y 72 horas de desarrollo, inoculadas con una suspensión de los diferentes aislados de hongos en una concentración de  $10^9$  conidias/ml.

Cepas de hongos evaluadas a una concentración de $10^9$ conidias/ml	Estado de desarrollo de pupas (horas)	
	24 horas	72 horas
<i>B. bassiana M1</i>	23,33c	20,00e
<i>B. bassiana M2</i>	28,33c	25,00de
<i>B. bassiana A</i>	50,00ab	43,33ab
<i>B. bassiana B</i>	53,33a	45,00a
<i>B. bassiana C</i>	31,67c	28,33cde
<i>M. anisopliae A</i>	51,67a	45,00a
<i>B. bassiana Buprestido</i>	55,00a	51,67a
<i>B. bassiana D</i>	43,33bc	31,67abc
<i>B. bassiana E</i>	38,33bc	31,67bcd
<i>B. bassiana F</i>	31,67c	30,00cde
Testigo	5,00d	3,33f

Letras distintas indican diferencias ,  $P < 0.05$  T. de Duncan

Efecto de diferentes aislados de *B. bassiana* y una cepa de *M. anisopliae* sobre la mortalidad de **adultos** de *M. domestica*, asperjados con suspensión de  $10^8$   $10^9$  conidias/ml

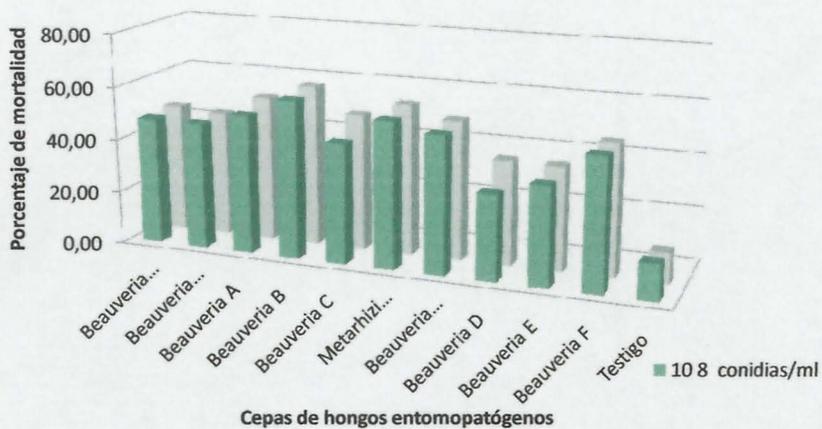
Aislados de hongos entomopatógenos	Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>M. domestica</i>	
	Suspensión de $10^8$ conidias/ml	Suspensión de $10^9$ conidias/ml
<i>Beauveria M1</i>	47,62 ± 1,00cd	48,44 ± 0,57cd
<i>Beauveria M2</i>	47,18 ± 2,08c	47,11 ± 0,57c
<i>Beauveria A</i>	51,90 ± 1,00ef	54,66 ± 1,00ef
<i>Beauveria B</i>	59,08 ± 2,08g	60,44 ± 1,53g
<i>Beauveria C</i>	44,08 ± 2,08de	51,11 ± 1,53de
<i>Metarhizium A</i>	54,54 ± 1,53f	56,44 ± 2,08f
<i>Beauveria Buprestido</i>	51,23 ± 0,57de	52,00 ± 1,00de
<i>Beauveria D</i>	31,92 ± 1,00b	39,11 ± 2,52c
<i>Beauveria E</i>	36,92 ± 1,53b	38,66 ± 2,00b
<i>Beauveria F</i>	49,07 ± 3,05cd	48,88 ± 2,52cd
Testigo	13,58 ± 2,52a	11,55 ± 1,52a

Letras distintas indican diferencias ,  $P < 0.05$  T. de Duncan

*M. domestica* afectada por *B. bassiana*



Porcentaje de mortalidad de adultos de *M. domestica* asperjados con diferentes aislados de hongos en dos concentraciones  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml.

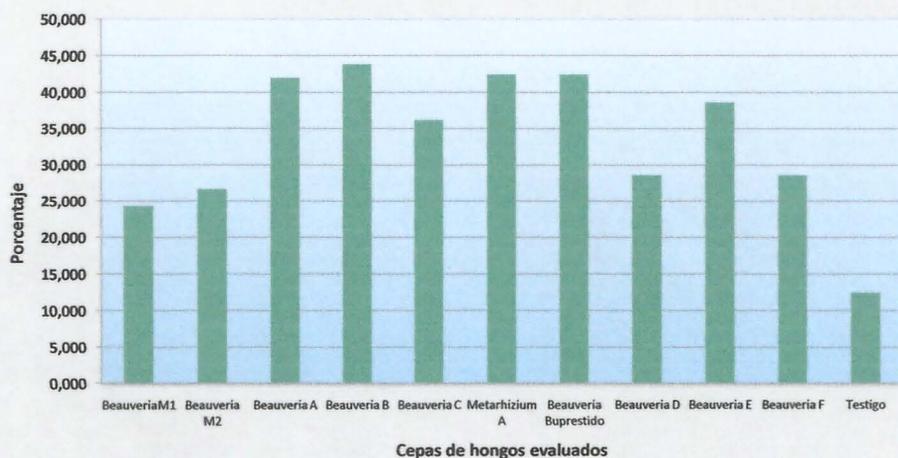


**Efecto de diferentes aislados de *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre la mortalidad de adultos de *M. domestica*, usando cebos en dosis de  $10^8$  conidias/gramo**

Aislados de hongos entomopatógenos	Mortalidad % ,de Adultos de <i>M. domestica</i>
<i>B.bassiana</i> M1	24,28 ± 2,00b
<i>B.bassiana</i> M2	26,66 ± 1,54b
<i>B.bassiana</i> A	41,91 ± 1,53dc
<i>B.bassiana</i> B	43,81 ± 1,53e
<i>B.bassiana</i> C	36,19 ± 3,51e
<i>M.anisopliae</i> A	42,38 ± 1,53de
<i>B.bassiana</i> Buprestido	42,38 ± 2,08de
<i>B.bassiana</i> D	28,57 ± 1,00b
<i>B.bassiana</i> E	40,00 ± 1,00cd
<i>B.bassiana</i> F	28,75 ± 2,00b
Testigo	12,38 ± 1,52a

Letras distintas indican diferencias , P<0.05 T. de Duncan

**Mortalidad % , de adultos de *M. domestica* expuestos a cebos con diferentes aislados de hongos en una concentración de  $10^8$  conidias/gramo.**



**Adultos en cámara húmeda para ver el desarrollo de los hongos sobre los insectos que fueron alimentados con dieta inoculada**



**Diseño y desarrollo de un fermentador prototipo para sustrato solido, para la producción de hongos entomopatógenos.**

### Puesta en marcha fermentador



### Fermentador y sustrato inoculado



Formular y evaluar *in vitro* e *in vivo* la presentaciones finales que se espera obtener, tanto en polvo, suspensión y cebos.

Porcentaje de mortalidad de huevos de *M. domestica*, inoculados con una suspensión de los diferentes aislados de entomopatógenos en una concentración de  $10^9$  conidias/ml.

Cepas de hongos evaluadas en una concentración de $10^9$ conidias/ml	Porcentaje de larvas muertas
<i>B.bassiana F2</i>	68,62 ± 4,73a
<i>B.bassiana G</i>	29,03 ± 16,07d
<i>B.bassiana C2</i>	66,95 ± 3,21a
<i>P. lilacinus A</i>	51,38 ± 9,87b
<i>B. bassiana H</i>	37,50 ± 8,00c
<i>B. bassiana C1</i>	62,50 ± 5,29a
<i>M. anisopliae B</i>	55,14 ± 15,04b
Testigo	11,94 ± 10,58e

Letras distintas indican diferencias,  $P < 0.05$  T. de Duncan

**Porcentaje de mortalidad de larvas de *M. domestica*, tratadas con una suspensión de diferentes aislados de hongos en dosis de  $10^6$ ,  $10^8$  y  $10^9$  conidias/ml**

Aislados de hongos entomopatógenos	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> $10^6$	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> $10^8$	Porcentaje de mortalidad de larvas L <sub>2</sub> $10^9$
<i>B. bassiana</i> F2	35,00 ± 1,00a	61,67 ± 0,57a	71,67 ± 0,57a
<i>B. bassiana</i> G	16,66 ± 2,08bc	38,33 ± 1,53c	48,33 ± 1,53c
<i>B. bassiana</i> C2	33,33 ± 1,53a	61,66 ± 1,53a	68,00 ± 0,57a
<i>P. lilacinus</i> A	13,33 ± 0,57bc	26,66 ± 1,53d	58,33 ± 0,57b
<i>B. bassiana</i> H	8,33 ± 1,53cd	15,00 ± 1,00e	21,67 ± 1,15d
<i>B. bassiana</i> C1	21,66 ± 0,57b	51,67 ± 0,57b	65,00 ± 1,00ab
<i>M. anisopliae</i> B	35,00 ± 1,00a	46,67 ± 1,15bc	66,67 ± 0,57a
Testigo	1,66 ± 0,57d	0,00 ± 0,00f	5,00 ± 1,00e

Letras distintas indican diferencias, P<0.05 T. de Duncan

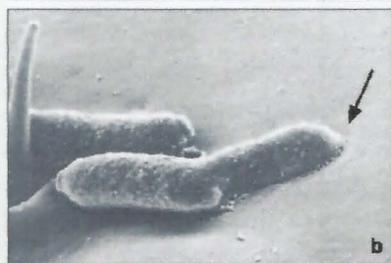
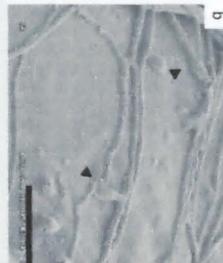
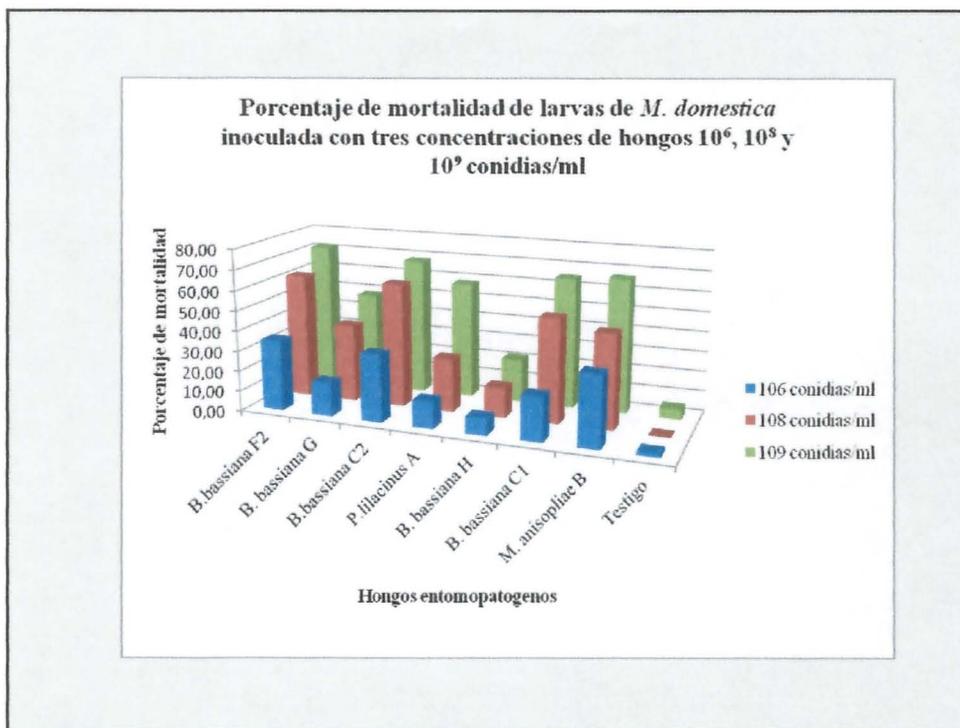


Figura 2. a: Conidias sobre la cutícula de un insecto, b: formación de apresorio.



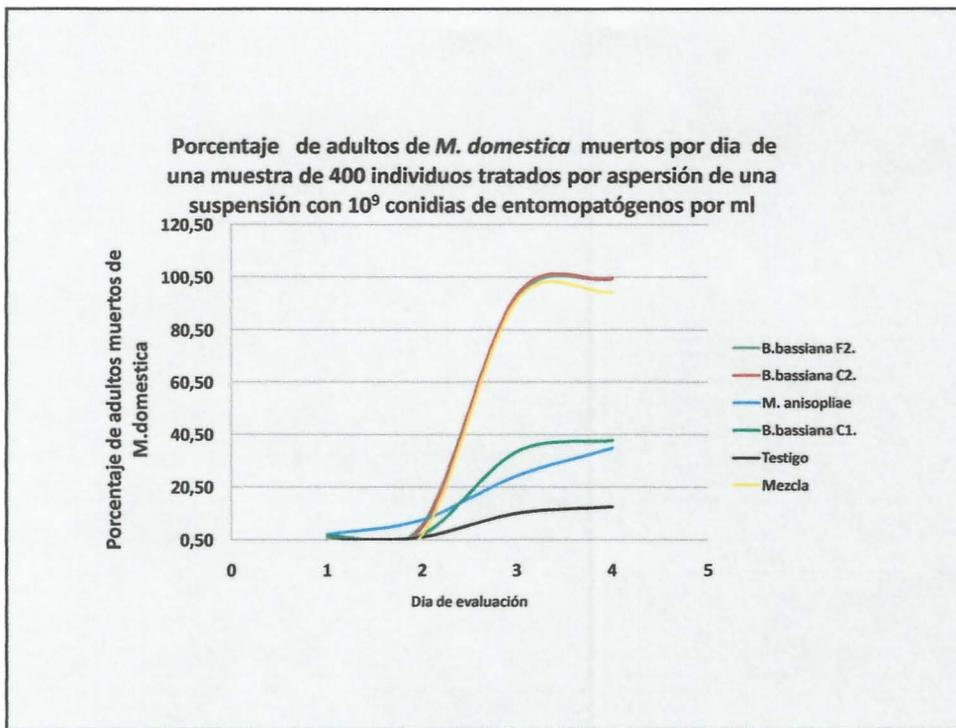
a) Zona bucal de larva invadida por *B. bassiana*. b) flechas indican los puntos de penetración, apresorios.



**Porcentaje de insectos adultos (*M. domestica*) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados por aspersión de una suspensión con  $10^9$  conidias de entomopatógenos por ml.**

	Día -3	Día -5	Día -7	% Total
<i>B. bassiana</i> F2 a	0,88	6,25	92,75	<b>99,88</b>
<i>B. bassiana</i> C2 a	1,00	5,25	93,75	<b>100,00</b>
<i>M. anisopliae</i> B b	2,50	8,00	24,75	<b>35,25</b>
<i>B. bassiana</i> C1 b	1,88	2,50	33,88	<b>38,25</b>
<i>B. bassiana</i> F2+C2 a	0,63	2,38	91,75	<b>94,75</b>
Testigo b	0,75	1,75	10,75	<b>13,25</b>

Letras distintas indican diferencias ,  $P < 0.05$  T. de Duncan

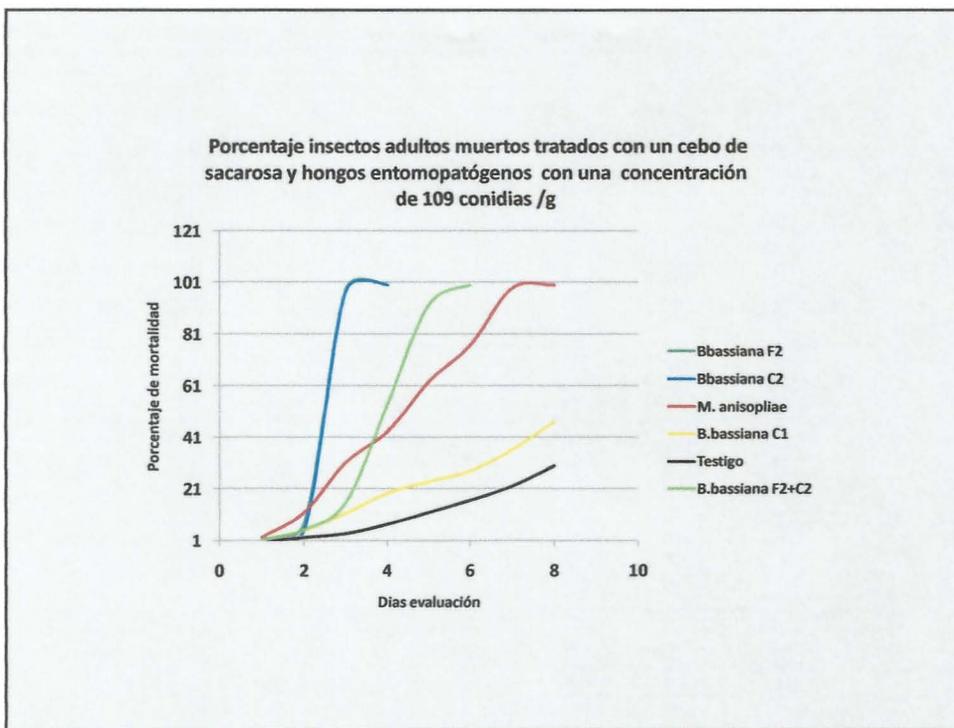


### Cebos

**Porcentaje de insectos adultos (*M. domestica*) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de sacarosa y Conidias de entomopatógenos con  $10^9$  conidias de entomopatógenos por gr.**

	Día-3	Día -5	Día7	Día 9	Día12	Día 15	Día 17	Día 19
<i>B.bassiana F2. a</i>	1,5	7,75	98,5	100				
<i>B.bassiana C2. a</i>	1	5,25	97,75	100				
<i>M. Anisopliae b</i>	2,25	11,75	31,25	43,25	62,5	76,5	98,75	100
<i>B.bassiana C1 b</i>	1,25	5	11,5	19,25	23,75	28	36,25	47
<i>Testigo b</i>	1,08	2,42	3,92	7,58	12,00	16,75	22,33	30,17
<i>B.bassiana F2+C2 b</i>	1,33	5,17	15,83	53,92	92,17	100,00		

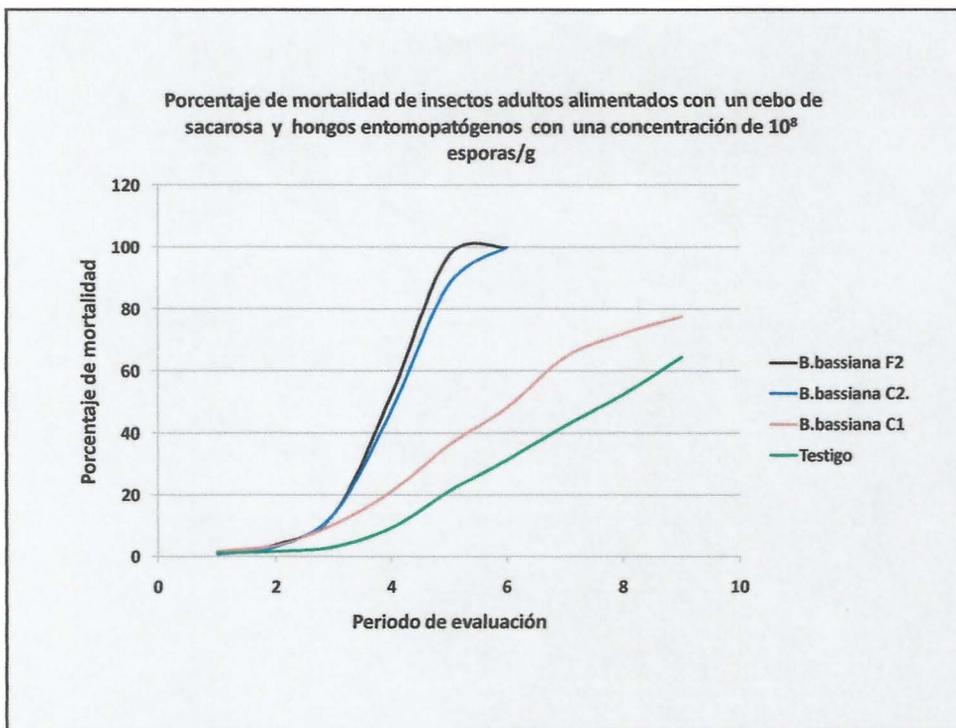
Letras distintas indican diferencias , P<0.05 T. de Duncan



**Porcentaje de insectos adultos (M. domestica) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de sacarosa y Conidias de entomopatógenos con 10<sup>8</sup> conidias de entomopatógenos por gr.**

	Día3	Día 5	Día7	Día 9	Día12	Día 15	Día 17	Día 19	Día21
<b>B.bassiana F2 b</b>	1,5	4	14	52,75	97,5	100			
<b>B.bassiana C2. b</b>	0,75	3,25	14	47,5	88	100			
<b>B.bassiana C1 ab</b>	1,75	3,75	10,5	21,25	36,25	48,25	64,5	72	77,5
<b>Testigo a</b>	1,25	1,75	3,25	9,50	21,25	31,50	42,50	52,50	64,5

Letras distintas indican diferencias , P<0.05 T. de Duncan

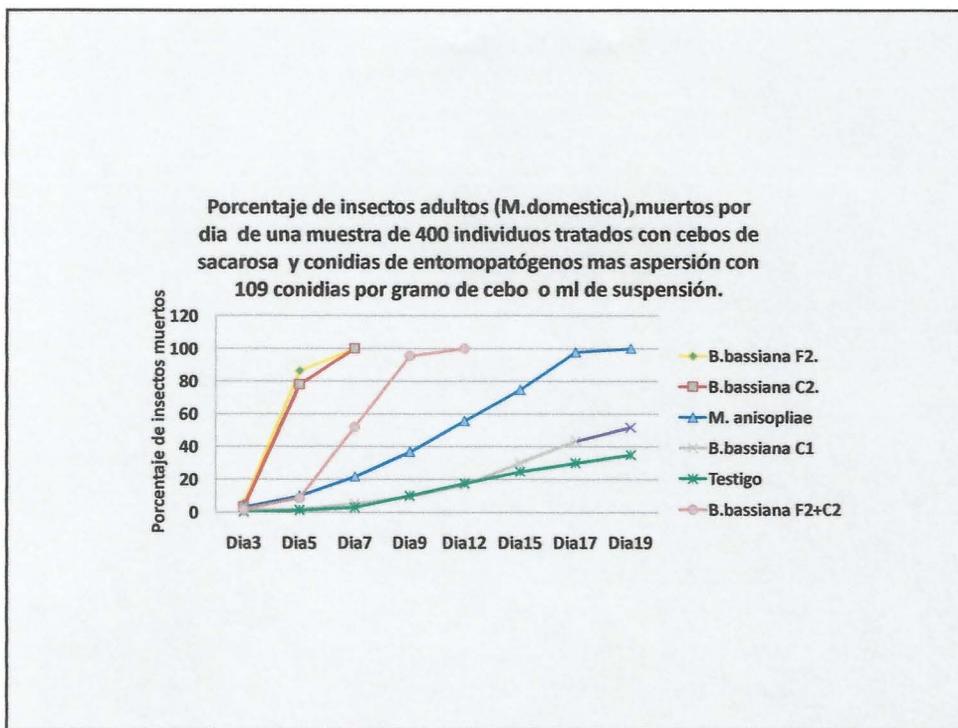


### Cebo mas aspersión

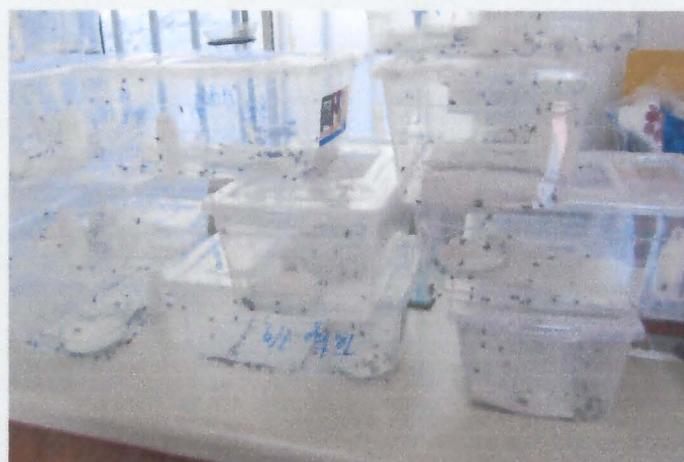
Porcentaje de insectos adultos (*M. domestica*) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de sacarosa y Conidias de entomopatógenos mas aspersión con  $10^9$  conidias de entomopatógenos por gr de cebo o ml. de suspensión

	Día3	Día5	Día7	Día9	Día12	Día15	Día17	Día19
<i>B.bassiana F2. c</i>	5,5	86,25	100					
<i>B.bassiana C2. c</i>	3,375	78,12	100					
<i>M. Anisopliae b</i>	3,125	10	21,75	36,75	55,62	74,75	97,75	100
<i>B.bassiana C1 a</i>	1,25	1,75	5,25	9,5	16,62	29,875	43,375	51,62
<i>Testigo a</i>	0,17	1,33	3,17	10,17	17,58	24,67	30,08	34,92
<i>B.Bassian F2+C2 b</i>	1,67	8,67	52,00	95,50	100,00			

Letras distintas indican diferencias,  $P < 0.05$  T. de Duncan



**Jaulas con ensayo de aspersión de insectos adultos con hongos entomopatógenos.**



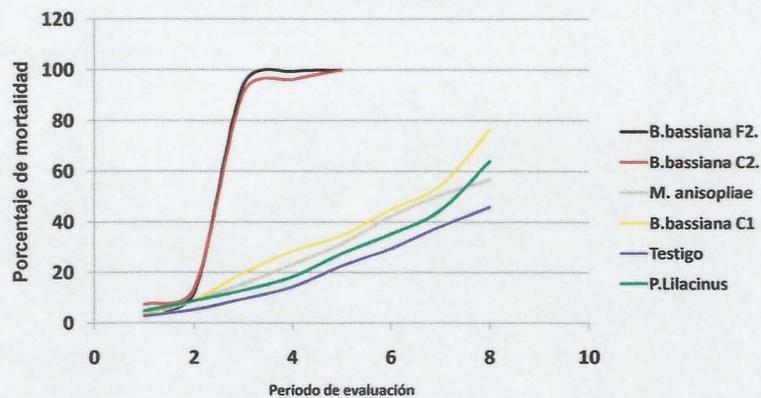
## Cebo mas atrayente

Porcentaje acumulado de insectos adultos (*M. domestica*) muertos por día, de una muestra de 400 individuos tratados con cebos de glucosa y  $10^9$  Conidias de entomopatógenos por gr de cebo, combinado con Nitrato de amonio

	Dia3	Dia5	Dia7	Dia9	Dia12	Dia15	Dia17	Dia21
<i>B.bassiana</i> F2. b	4,75	12,625	94,75	99,625	100			
<i>B.bassiana</i> C2. b	7,25	13,75	91,25	96,25	100			
<i>M. anisopliae</i> a	3,5	9	15,5	23,375	31,375	42,25	50,625	56,75
<i>B.bassiana</i> C1 a	4,38	9,38	20,00	28,63	34,75	45,00	54,50	76,38
Testigo a	2,75	5,38	9,5	14,38	22,63	29,50	38,25	45,88
<i>P. Lilacinus</i> a	5	8,88	13,13	18,50	27,63	35,38	44,75	64,13

Letras distintas indican diferencias ,  $P < 0.05$  T. de Duncan

Porcentaje acumulado de insectos adultos (*M. domestica*) muertos por día, de una muestra de 200 individuos tratados con cebos de glucosa y  $10^9$  Conidias de entomopatógenos por gr de cebo, combinado con Nitrato de amonio



**Baterías de crianza para liberación en gallinero.**



**Liberación de *M. domestica* en gallinero experimental**



**Batería experimental de aves de postura  
selladas con malla antiafido.**



**Aplicación de suspensión con *B. bassiana***



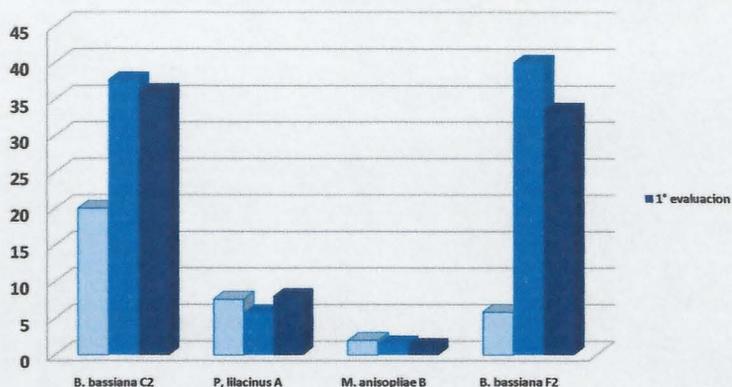
## Evaluación del comportamiento de los hongos el paso gastrointestinal de las aves.

Unidades formadoras de colonias (UFC), por gramo de material fecal , observadas en gallinas que recibieron diariamente en la dieta 4 g de conidias del hongo *Beauveria C2*, *Paecilomyces A* y *Metarhizium B*

Entomopatógeno	UFC		UFC
	1° muestreo	2° muestreo	3° muestreo
<i>B. bassiana C2</i>	20,0 ± 2,89 a	37,70 ± 3,59 b	36,11 ± 2,60b
<i>P. lilacinus A</i>	7,59 ± 1,93 a	5,77 ± 1,78 a	8,04 ± 0,94a
<i>M. anisopliae B a</i>	1,96 ± 0,89 a	1,59 ± 1,11 a	1,25 ± 0,62a
<i>B. bassiana F2</i>	5,84 ± 3,77a	40,04 ± 3,77b	33,56 ± 3,03b

Letras distintas indican diferencias , P<0.05 T. de Duncan

## Unidades formadoras de colonias (UFC) de H. entomopatógenos a nivel fecal



## Evaluación del tránsito gastrointestinal

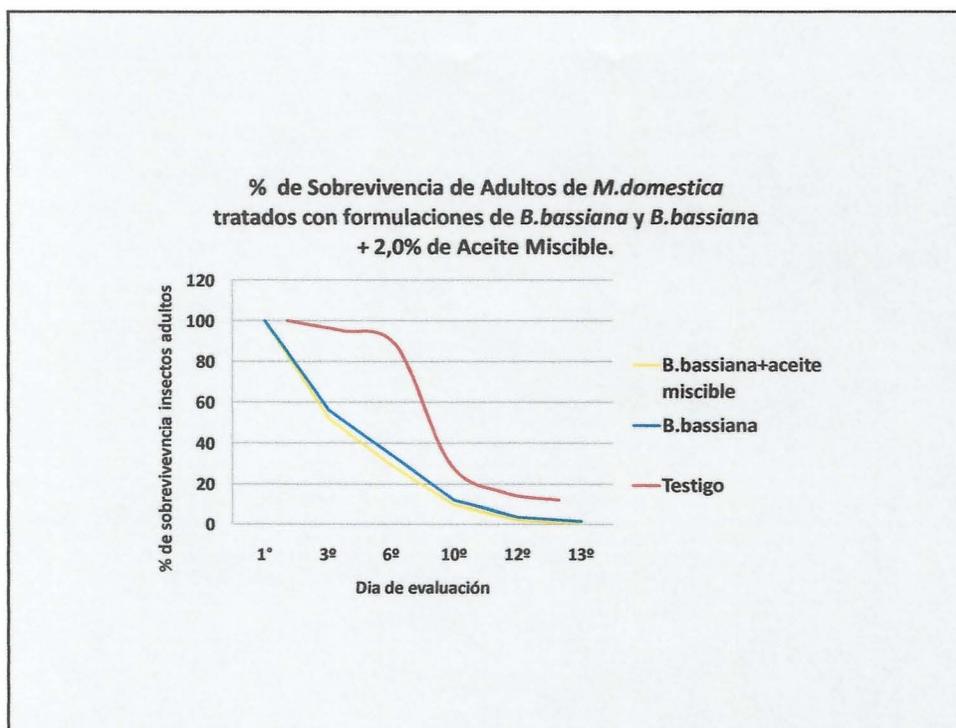


## Formulaciones

Reducción porcentual de una población de *M. domestica* bajo control con una Suspensión de *B. bassiana* con  $10^9$  conidias por ml. o *B. bassiana* mas aceite miscible al 2%

Reducción porcentual de una población de <i>M. domestica</i> bajo control con una Suspensión de <i>B. bassiana</i> con $10^9$ conidias por ml. o <i>B. bassiana</i> mas aceite miscible al 2%						
Tratamiento /Día	1°	3º	6º	10º	12º	13º
<i>Testigo a</i>	100,00	95,05±2,15	<b>87,83±1,46</b>	30,31±0,99	15,80±2,27	12,02±0,30
<i>B. bassiana</i> + aceite miscible 2% <i>b</i>	100,00	52,04±2,06	<b>29,29±3,86</b>	9,45±1,31	2,08±0,77	0,45±0,23
<i>B. bassiana b</i>	100,00	56,16±0,73	<b>34,32±4,24</b>	11,98±1,41	3,59±0,54	1,47±0,41

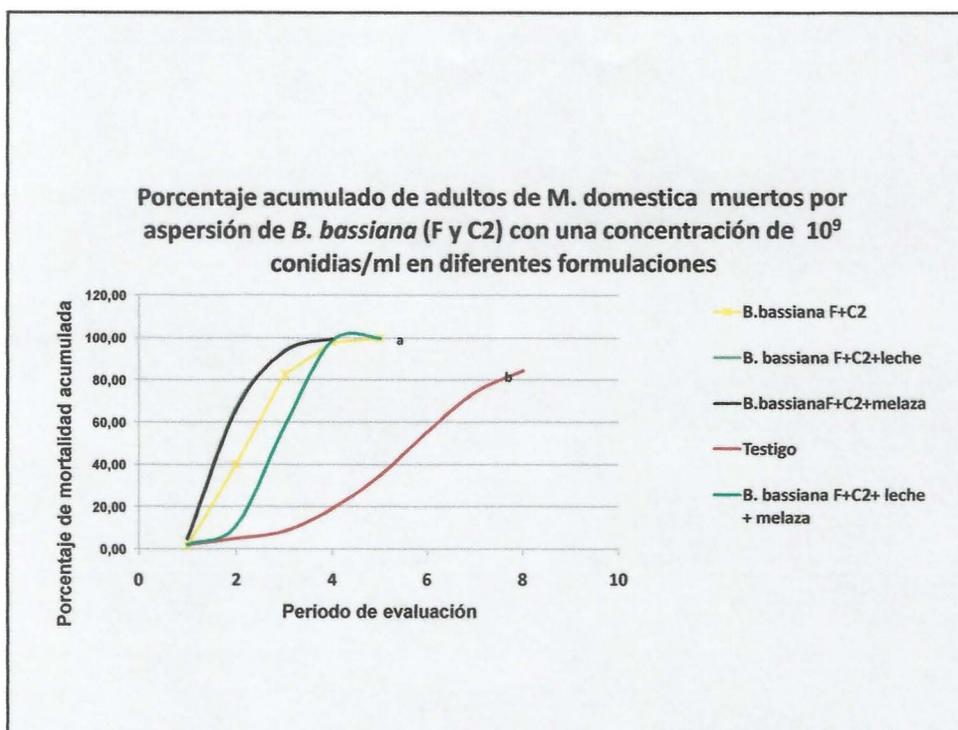
Letras distintas indican diferencias ,  $P < 0.05$  T. de Duncan



**% mortalidad acumulada de insectos adultos asperjados con una concentración de  $10^9$  conidias/ml en diferentes formulados**

Entomopatógenos aplicados.	Día de evaluación, % insectos muertos							
	3	5	7	9	12	15	17	19
<i>B bassiana</i> F2+C2+leche	5,50	67,17	93,33	100,00				b
<i>B. bassiana</i> F2+C2+melaza	5,17	66,33	94,00	100,00				b
<i>B. bassiana</i> F2+C2	1,67	40,17	82,50	98,00	100,00			b
<i>B. bassiana</i> F2+C2+ leche + melaza	2,00	11,00	58,00	98,89	100,00			b
Testigo	2,20	5,08	8,54	19,31	34,97	55,56	74,18	84,48a

Letras distintas indican diferencias ,  $P < 0.05$  T. de Duncan



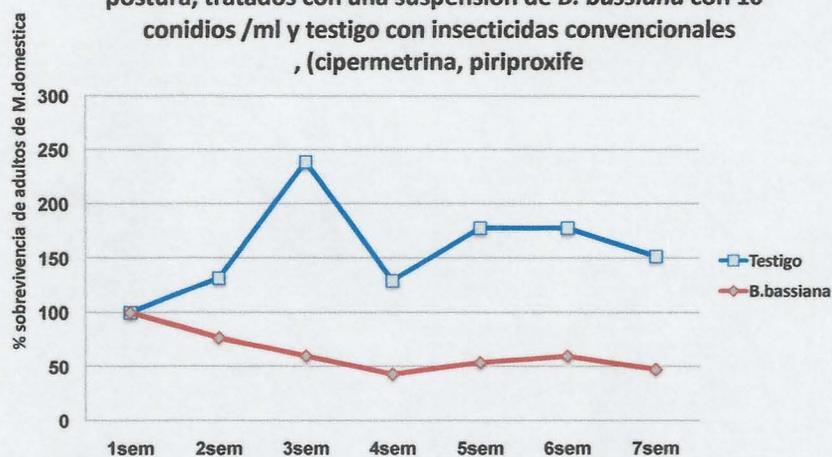
Evaluaciones de campo

Adultos de *M. domestica* por metro cuadrado de pabellón avícola de postura tratado con *B. bassiana* en concentración de  $10^9$  Conidias por ml.

Adultos de <i>M. domestica</i> por metro cuadrado en un pabellón avícola de postura tratado con <i>B. bassiana</i> en concentración de $10^9$ Conidias por ml.							
	24-01-2014	31-01-2014	07-02-2014	14-02-2014	21-02-2014	28-02-2014	11-03-2014
Tratam (a)	60,33±9,19	46,33±10,17	36,25±2,21	26,10±4,27	32,45±3,69	36,08±7,26	28,7±6,24
Testigo(b)	21,25±3,73	27,93±10,86	50,75±10,93	27,48±4,47	37,70±1,88	37,70±13,15	32,25±13,97

P<0.05 RM-anova P<0,05 test de Tukey

Evolución porcentual de la población de adultos de *M. domestica*, en dos pabellones avícolas con 11.000 aves de postura, tratados con una suspensión de *B. bassiana* con  $10^9$  conidios /ml y testigo con insecticidas convencionales, (cipermetrina, piriproxife

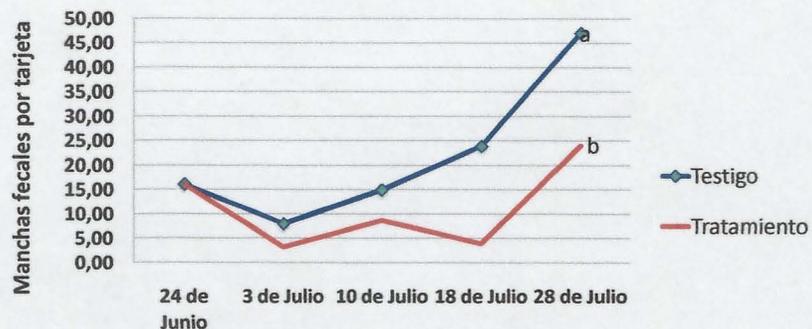


**Cuantificación de la población de *M. domestica* tratadas aspersion de *B. bassiana* 10<sup>9</sup> conidias por ml, en un galpón de aves de postura, a través de la cuantificación de manchas fecales.**

Ensayos	24 de Junio	3 de Julio	10 de Julio	18 de Julio	28 de Julio
Testigo (a)	16,12±7,6a	8,00±4,3b	15±6,0b	23,92±13b	47,13±17,2b
Tratamiento (b)	16,12±7,6a	3,18±2,36a	8,7±9,13a	3,9±4,3a	24±7,9a

Test de T. p<0.05 letras diferentes indica diferencia significativa.

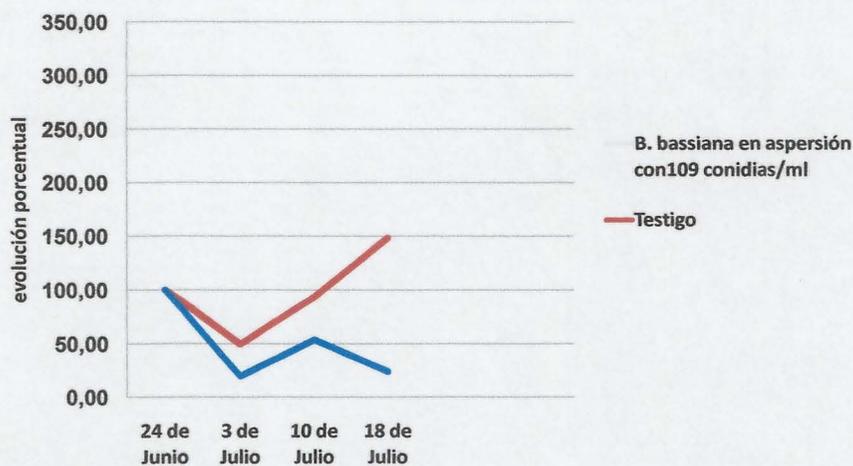
**Evaluación de la población de moscas tratadas con Aspersión de *B. bassiana*, 10<sup>9</sup> conidias por ml, en un galpón de aves de postura, a través de la cuantificación de manchas fecales.**



**Evolución porcentual de la población de *M. domestica* tratadas por aspersión de *B. bassiana* 10<sup>9</sup> conidias por ml, en un galpón de aves de postura, a través de la cuantificación de manchas fecales. (2014)**

	24 de Junio	3 de Julio	10 de Julio	18 de Julio
Testigo a	100,00	49,63	93,05	148,39
<i>B. bassiana</i> en aspersión b	100,00	19,73	53,97	24,19

**Evolución porcentual de manchas fecales de insectos adultos *M. domestica*, bajo el efecto de *B. bassiana* en suspensión con 10<sup>9</sup> conidias/ml aplicada en galpones con aves de postura**



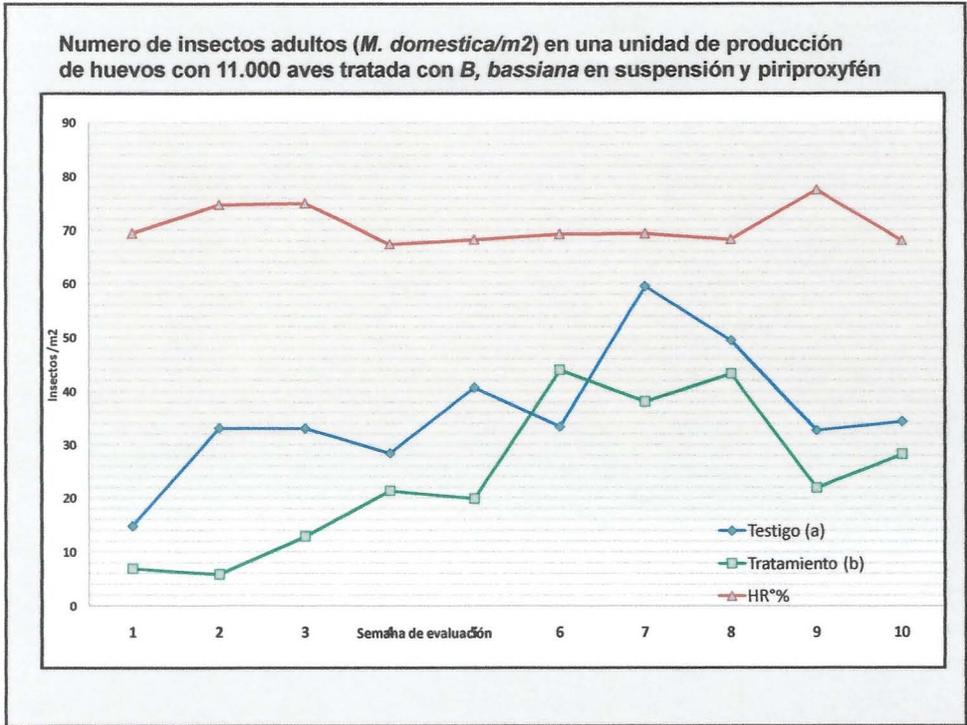
**Baterías con cebos de entomopatógenos para evaluar efecto sobre insectos adultos**



**Evaluación de la población de *M. domestica* tratada con *bassiana* a través del recuento de insectos /m2 en un galpón de postura para 11000 aves**

Fecha2014	15-10	22-10	29-10	05-11	12-11	21-11	27-11-	04-12	11-12	18-12
	14.73	33.08	33	28.375	40.68	33.35	59.5	49.43	32.7	34.35
<b>Testigo (a)</b>	±5.26	±13.98	±13.16	±13.09	±14.26	±6.3	±15.75	±10.0	±2.47	±7.65
	6.85	5.83	12.87	21.3125	19.875	43.95	38.1	43.3	21.9	28.25
<b>Tratam.(b)</b>	±0.9	±2.36	±6.87	±9.71	±5.51	±21.68	±2.45	±19.45	±2.27	±4.01
<b>% Control</b>	53,50	82,38	61,00	24,90	51,14	-31,78	35,97	12,40	33,03	17,76
	69,35	74,68	74,95	67,35	68,23	69,25	69,38	68,32	77,55	68,07
<b>HR° %</b>	±0,52	±6,13	±3,41	±1,60	±1,35	±2,34	±3,41	±11,9	±1,21	±11,74

Letras distintas indican diferencia estadística P<0.05 RM-anova



## Vista general Gallinero Industrial



**Rejillas de madera de 1m<sup>2</sup>, para evaluación de población de insectos.**



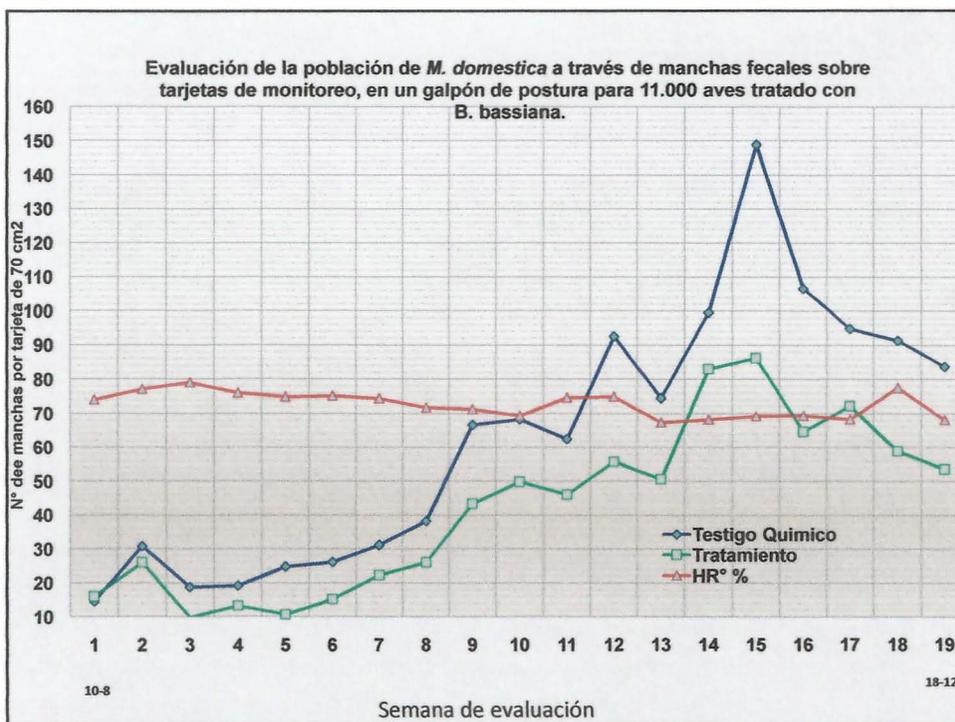
**Rejillas de monitoreo**



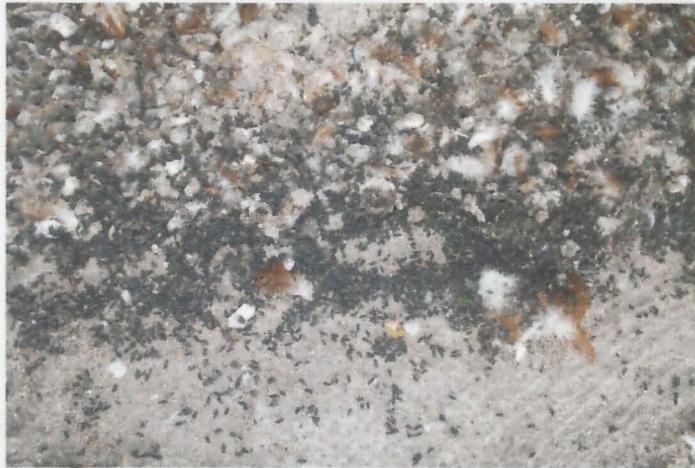
**Evaluación de la población de *M. domestica* tratada con *B. bassiana* a través de manchas fecales depositadas sobre tarjetas de monitoreo en un galpón de postura para 11.000 aves.**

Fecha	10-ago	20-ago	27-ago	03-sep	10-sep	16-sep	24-sep	01-oct	08-oct	15-oct	22-oct	29-oct	05-nov	12-nov	20-nov	27-nov	04-dic	11-dic	18-dic
Testigo(a)	14,66	30,92	18,84	19,21	24,92	26,22	31,23	38,31	66,71	68,26	62,58	92,60	74,54	99,59	148,85	106,62	94,91	91,43	83,81
Trat (b)	16,00	26,00	9,81	13,24	10,67	15,22	22,29	26,13	43,38	49,83	46,15	55,79	50,64	83,03	86,19	64,67	72,23	58,86	53,58
HR%	74	77	76	76	74,85	75,15	74,40	71,8	71,28	69,35	74,68	74,95	67,35	68,23	69,3	69,4	68,3	77,6	68,1
% Control	-	15,9	47,93	31	57,18	41,95	28,62	31,81	34,97	27,0	26,25	39,75	32,06	16,63	42,1	39,3	23,0	35,6	36,1

Letras distintas indican diferencias significativas P<0.05 RM-anova



## Mortalidad de pupas



## Mortalidad pupas



Mortalidad de adultos *M. domestica*



*Fannia canicularis*



*Larvas de F. canicularis y de M. domestica*



**Tarjetas de monitoreo**



**Mortalidad de pupas**



**Productos**



Sustratos e inóculos deshidratados

Formulación en polvo seco *B.bassiana*



## Envases



Sachetes de 15 y 30 gramos

## Conclusiones

- Se desarrolló un biopreparado en polvo concentrado en base a *B. bassiana* que controla respecto de un testigo absoluto hasta un 82% de las poblaciones de *M. domestica*.
- Se aislaron 18 cepas potencialmente efectivas en el control de *M. domestica*.
- Se estableció que la asociación de *B. bassiana* con piriproxyfén reduce la viabilidad de las pupas de *M. domestica* en una relación sinérgica.
- Se desarrolló un prototipo de fermentador para la producción de hongos entomopatógenos. Se estableció un sistema de crianza para mosca domestica.

## Agradecimientos

1. **Nuestros agradecimientos al personal de campo de Avícola el Toco y de ITAS.**
2. **A la fundación para a Innovación Agraria y a su equipo ejecutivo en particular a I. Briones por su apoyo profesional y permanente visión constructiva.**
1. **A los profesionales de Centrovét y Avícola el Toco por su apoyo y amistad .**

**10. Impactos del proyecto:** descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.

Se logro establecer un alto nivel de control sobre *M. domestica* 82,38 % en ensayos con testigo absoluto y de un sobre el testigo convencional en la última etapa del proyecto, Este sistema implementado constituye un complemento de otras herramientas de regulación de las poblaciones de *M. domestica* y de otros géneros de dípteros que podemos encontrar cohabitando junto a esta especie en los planteles de producción de huevos.

A pesar de lograr un incremento en términos del control con la aplicación de los biopreparados se debe establecer que es fundamental para lograr el éxito en la regulación de las poblaciones de *M. domestica* el manejo de los desechos orgánicos destinado a rebajar la humedad de estos residuos, como evitar la pérdida de agua en los bebederos, mejorar el drenaje y agregar elementos desecantes con posterioridad a episodios de diarrea.

Como resultado del trabajo se logro desarrollar una formulación en polvo seco que permite su conservación en el tiempo y facilidad el transporte de cantidades concentradas del producto. Complementariamente se logró la obtención de una suspensión obtenida directamente a partir de los cultivos esporulados que se aplica sobre las estructuras del plantel o sobre los depósitos de estiércol.

Inicialmente se planteó el desarrollo de un Cebo atractor con el biopreparado de hongos entomopatógenos, este objetivo si bien se logro a nivel experimental no tuvo éxito en su aplicación práctica a nivel de campo donde la acumulación de residuos orgánicos hace muy difícil atraer las poblaciones de insectos a puntos específicos del galpón de producción de huevos, donde se ubiquen los sistemas de de aplicación de cebos.

Se ha validado la hipótesis subyacente a esta innovación, de encontrar reguladores de las poblaciones insectiles, en todos los sistemas agropecuarios o aislarlos en sistemas naturales e introducirlos en las unidades intensivas de

producción animal, donde puedan regular poblaciones de parásitos de interés económico.

Se ha desarrollado un prototipo de biorreactor para sustratos sólidos que permite la incubación de hongos antagonistas y entomopatógenos. Este es un sistema en evolución que de manera iterativa se va ajustando tecnológicamente a las necesidades bioecológicas de los inóculos en estudio o en producción.

## 11. Conclusiones

- Se desarrolló un insecticida biológico en polvo para controlar la mosca doméstica en base a *B. bassiana* con una capacidad de control respecto de un testigo absoluto hasta un 82,38% de las poblaciones de *M. domestica*. Evaluados en galpones con 11.000 aves de postura.
- El insecticida desarrollado controla un 35,97% más que el sistema de control convencional en base a insecticidas químicos contra los cuales se comparó.
- Se aislaron 18 cepas potencialmente efectivas en el control de *M. domestica*.
- Se desarrolló un prototipo de fermentador para la producción de hongos entomopatógenos.
- Se estableció un sistema de crianza para mosca doméstica.
- No se desarrolló sistema de incorporación de Hongos entomopatógenos en la dieta por cuanto en las cepas de los géneros de interés se observó una baja resistencia al efecto del sistema digestivo de las aves, presentándose un bajo número de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de fecas.
- Los sistemas de cebos para los insectos adultos funcionaron bien a nivel experimental pero mostraron un bajo efecto en experimentos de campo, por cuanto no atraen a las poblaciones de mosca doméstica al introducirlos en un ambiente sobre cargado con desechos orgánicos y estiércol.

## 12.Recomendaciones

Se deben realizar ensayos estableciendo mezclas de cebos asociados a hongos entomopatógenos y atractores hormonales para *M. domestica*, esto para neutralizar el efecto que tiene la materia orgánica y estiércol sobre las poblaciones de *M. domestica*, en tanto no permite que los cebos con el biocontrolador atraigan las poblaciones del insecto.

Se debe intentar una micro encapsulación de los hongos entomopatógenos para mejorar la resistencia al paso gastrointestinal como por ejemplo el uso alginato de sodio empleado en la encapsulación de varios tipos de hongos controladores y antagonistas.

## 13.Otros aspectos de interés

Las cepas seleccionadas en el control de *M. domestica* en aves, se evaluarán en rumiantes para establecer si es posible la regulación de poblaciones de *H. irritans* (mosca del cuerno) con las cepas ya evaluadas en *M. domestica*.

## 14.Anexos

## 15.Bibliografía Consultada

Alves, S.B. 1986. Controle Microbiano de Insectos. Sao Paulo, Manole. 407p.

Barson , G., Renn, N., and Bywater, A. 1994. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of house fly (*Musca domestica* (L)), a pest of intensive animal units. Journal of Invertebrate Pathology 64, 107-113.

Cova, L., Scorza, J., García, D., Cañizales,L., Guedez, C., Avendaño,M., Medina, M. 2009. Efecto de *Beauveria Bassiana*, *Beauveria brongniartii* y la aplicación de gasoil en el control de moscas caseras en galpones avícola. Avances en Investigación Agropecuaria. 13(2): 41-53

Cova, L., Scorza, J., García, D., Cañizales,L., Guedez, C., Avendaño,M., Medina, M. 2009a. Efecto de *Beauveria Bassiana* y *Beauveria brongniartii* en el control de moscas (*Musca domestica*) en condiciones de laboratorio y en galpones avícolas. Boletín de Malariología y Salud ambiental. XLVI (1):151-160.

Cova, L., Scorza, J., García, D., Cañizales,L., Guedez, C., Maffey, M., Medina, M. 2009b. Patogenicidad in vitro de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch en *Musca*

*domestica* (L.) como posible estrategia de control biológico en áreas ganaderas. *Zootecnia Trop.* 27(2): 113-120.

Cova, L., Scorza, J., García, D., Cañizales, L., Guedez, C., Maffey, M., Medina, M. 2010. Control temporal de moscas (*Musca domestica*) en galpones avícolas mediante nebulizaciones con conidias de *Beauveria brongniartii*. *Zootecnia Trop.* 28(1).

Crespo, D., Leucuona, R., and Hogsette, J., 1998. Biological Control: An important component in integrated management of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in caged-layer poultry house in Buenos Aires, Argentina. *Biological Control* 13, 16-24

Geden, C., Rutz, D., and Steinkraus, D. 1995. Virulence of Different isolates and formulations of *Beauveria bassiana* for House flies and parasitoid *Muscidifurax raptor*. *Biological Control* 5, 615-621

Jenkins, N., heviefo, G., Langewald, J., Cherry, A., and Lomer, Ch. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol New and Information* 19(1):21-31

Kaaya, G., and Munyinyi, D. 1995. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology* 66, 237-241.

Kalsbeek, V., Mullens, B., and Jespersen J. 2001. Field studies of entomophthora (*Zygomycetes: Entomophthorales*) induced Behavioral fever in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Denmark. *Biological Control* 21, 264-273.

Kaufman, P., Reasor, C., Rutz, D., Ketzis, J., Arends. 2005. Evaluation of *Beauveria Bassiana* applications against adult house fly, *Musca domestica*, in commercial caged-layer poultry facilities in New York state. *Biological Control* 33 , 360-367.

Mochi, D., Monteiro, A., Machado, A., and Yoshida, L. 2010. Efficiency of entomopathogenic fungi in the control of eggs and larvae of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology* 167, 62-66.

Scorza J. and Cova L. 2006. Acción patogénica de una cepa venezolana de *Beauveria bassiana* para *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental XLVI* (2).

Steinkraus, D., Geden, C., and Rutz, D. 1993. Prevalence of *Entomophthora muscae* (Cohn) Fresenius (*Zygomycetes: Entomophthoraceae*) in house flies (Diptera: Muscidae) on dairy farms in New York and Induction of Epizootics. *Biological Control* 3, 93-100.

Tefera, T. and Pringle, K. 2003. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, miosis and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 84, 90-95

Watson, D., Geden, C., Long, S., and Rutz, D. 1995. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). *Biological Control* 5, 405-411.

Watson, D., Rutz, D., and Long, S. *Beauveria bassiana* and sawdust bedding for the management of the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in calf hutches. 1996. *Biological Control*. 7, 221-227.