



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*  
(Clase Hyphomycetes) en el control de *Musca domestica*  
*Linneaus* (Diptera: Muscidae) en galpones avícolas.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Aurelio Agustin Gomes Pinto como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dr. Blas Dorta

CARACAS, VENEZUELA  
OCTUBRE - 2010

## Agradecimientos

Primero comenzaré por agradecer a Dios y a La Virgen María por su ayuda, guía y fuerza.

A mi familia, siendo mis Padres y Hermana las personas que más aprecio, a ellos GRACIAS por soportarme, instruirme, apoyarme, sencillamente por estar allí. Siempre los querré y algún día les retribuiré todo lo que han hecho por mí.

Al Dr. Blas Dorta, tutor y amigo, por la oportunidad que me concedió al darme el tema de este trabajo y cuyos consejos y motivación fueron indispensables durante el desarrollo del mismo y mi carrera como biólogo.

A Any Quintero, por ser mi amiga, apoyarme y aconsejarme en aquellos momentos difíciles que nos encontramos en el transcurso de nuestros TEG. También agradezco a mis amigos, Rodmar y Jesús por la colaboración y sugerencias durante toda la carrera. A la Lic. Arianna Thomas por la ayuda en el laboratorio y por enseñarme a criar moscas, proceso esencial para el desarrollo de éste trabajo.

A la Prof. Roxana Gajardo y la Técnico Dayanara del laboratorio de procesos fermentativos, por los consejos y sugerencias.

Al jurado, el Dr. Juan Carlos Navarro y el Prof. Domenico Pavone, cuyas críticas constructivas han sido elementales en la elaboración de éste trabajo.

A todos los trabajadores del I.B.E, especialmente a los vigilantes, por abrirme las puertas los fines de semana y hasta días feriados.

Por último, a la ilustre Universidad Central de Venezuela por ser mi casa de estudio, por formar el biólogo que soy y el futuro científico que seré.

# Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>ii</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>i</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>v</b>
<b>1. Resumen</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>- 3 -</b>
2.1 <i>Musca domestica</i> L. ....	- 4 -
2.1.1 Clasificación taxonómica y Morfología.....	- 4 -
2.1.2 Ciclo de vida.....	- 6 -
2.2 <i>M. domestica</i> y salud pública. ....	- 8 -
2.3 Granjas avícolas.....	- 8 -
2.4 Hongos entomopatógenos. ....	- 10 -
2.4.1 Mecanismo de infección.....	- 11 -
2.4.2 <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	- 14 -
2.4.3 Seguridad en mamíferos. ....	- 16 -
<b>3. Antecedentes</b> .....	<b>- 17 -</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>- 22 -</b>
<b>5. Materiales y Métodos</b> .....	<b>- 23 -</b>
5.1 Zona de estudio.....	- 23 -

5.2 Material biológico. ....	- 25 -
5.3 Medios de cultivos.....	- 25 -
5.4 Producción del hongo <i>M. anisopliae</i> .....	- 26 -
5.5 Cría de <i>M. domestica</i> en condiciones de laboratorio.....	- 27 -
5.5.1 Colecta de ejemplares adultos de <i>M. domestica</i> .....	- 27 -
5.5.2 Condiciones en el laboratorio para el mantenimiento de los ejemplares colectados. ....	- 28 -
5.5.3 Obtención de individuos homogéneos (F <sub>1</sub> ). ....	- 28 -
5.5.4 Medio de cría para larvas de <i>M. domestica</i> en condiciones de laboratorio. ....	- 29 -
5.6 Bioensayos en condiciones de laboratorio. ....	- 30 -
5.6.1 Determinación del color de tela a usar. ....	- 30 -
5.6.2 Densidad de conidias de <i>Metarhizium anisopliae</i> por centímetro cuadrado de tela. ....	- 31 -
5.6.3 Evaluación de la tela como medio para la infección de <i>M. domestica</i> con <i>M. anisopliae</i> . .-	- 32 -
5.6.4 Evaluación a través del tiempo de la tela como medio para la infección de <i>M. domestica</i> con <i>M. anisopliae</i> . ....	- 34 -
5.6.5 Evaluación de la patogenicidad de <i>M. anisopliae</i> sobre diferentes grupos etarios de <i>M. domestica</i> .....	- 34 -
5.7 Experimentos en campo.....	- 35 -
5.7.1 Estimación de las variables temperatura y humedad relativa. ....	- 35 -
5.7.2 Contaje de moscas adultas. ....	- 35 -
5.7.3 Elaboración de los montajes para los galpones.....	- 37 -
5.8 Análisis estadísticos. ....	- 38 -
<b>6. Resultados y Discusiones.....</b>	<b>- 40 -</b>

6.1 Establecimiento de la cría de <i>M. domestica</i> .....	- 40 -
6.2 Bioensayos en condiciones de laboratorio.....	- 42 -
A. Determinación del color de tela a usar.....	- 42 -
B. Densidad de conidias de <i>Metarhizium anisopliae</i> por centímetro cuadrado de tela.....	- 45 -
C. Evaluación de la tela como medio para la infección de <i>M. domestica</i> con <i>M. anisopliae</i> .....	- 49 -
D. Evaluación a través del tiempo de la tela como medio para la infección de <i>M. domestica</i> con <i>M. anisopliae</i> .....	- 56 -
E. Evaluación de la patogenicidad de <i>M. anisopliae</i> sobre diferentes grupos etarios de <i>M. domestica</i> .....	- 66 -
6.3. Experimentos en campo.....	- 75 -
A. Variables temperatura y humedad relativa (H.R.) en el galpón. ....	- 76 -
B. Contaje de moscas adultas.....	- 78 -
C. Contajes de moscas pre-tratamiento. ....	- 85 -
D. Elaboración, colocación y evaluación de los montajes en los galpones. ....	- 86 -
<b>7. Conclusiones generales .....</b>	<b>- 95 -</b>
<b>8. Recomendaciones.....</b>	<b>- 97 -</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>- 99 -</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Características morfológicas de <i>Musca domestica</i> .....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Morfología de la cabeza de adultos de <i>Musca domestica</i> .....	<b>5</b>
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de la <i>M. domestica</i> .....	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Ciclo general de desarrollo de los hongos entomopatógenos en insectos.....	<b>12</b>
<b>Figura 5.</b> Conidióforo del género <i>Metarhizium</i> .....	<b>15</b>
<b>Figura 6.</b> Mapa político territorial del estado Miranda .....	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Galpón avícola de la granja "Los Roa". Se observan: la vista exterior (A), vista interior sin aves de corral ni lecho (B), (C) vista interior con aves de corral...	<b>25</b>
<b>Figura 8.</b> Rejilla de Scudder.....	<b>36</b>
<b>Figura 9.</b> Colecta de adultos de <i>M. domestica</i> . A la izquierda: pases con malla. A la derecha: jaula con moscas capturadas.....	<b>40</b>
<b>Figura 10.</b> Porcentajes de moscas que fueron atraídas y no atraídas hacia las telas.....	<b>42</b>
<b>Figura 11.</b> Ensayo para determinar el color de tela a usar. Vista desde arriba de las moscas adultas no atraídas, posadas sobre la tapa del recipiente. ....	<b>43</b>
<b>Figura 12.</b> (a) Ensayo para determinar el color de tela a usar. (b) Vista desde arriba de las moscas adultas posadas sobre el área del trozo de tela amarillo.....	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b> Densidades de conidias por cm <sup>2</sup> estimadas por cada suspensión de conidias utilizada. ....	<b>46</b>
<b>Figura 14.</b> Conidia germinada (a) y su tubo germinativo (línea continua). Foto tomada y modificada con una cámara acoplada al microscopio (400x) a las 24 horas.....	<b>47</b>
<b>Figura 15.</b> Germinación de conidias (%) a través del tiempo (horas).....	<b>48</b>
<b>Figura 16.</b> Montaje con trozo de tela amarillo. (a) Triángulo de alambre, (b) Trozo de tela amarillo 10 x 4 cm, (c) Trozo de metal.....	<b>49</b>
<b>Figura 17.</b> Montajes con diferentes densidades de conidias por cm <sup>2</sup> . Tratamientos DMA1: 3,89 x 10 <sup>5</sup> conidias/cm <sup>2</sup> . DMA2: 2,72 x 10 <sup>6</sup> conidias/cm <sup>2</sup> . DMA3: 6,33 x 10 <sup>6</sup> conidias/cm <sup>2</sup> . DMA4: 1,45 x 10 <sup>7</sup> conidias/cm <sup>2</sup> .....	<b>50</b>

<b>Figura 18.</b> Esquema de recipiente post-tratamiento. (a) Montaje sujetado, (b) Capa de toallín húmedo, (c) Solución de sacarosa. ....	<b>51</b>
<b>Figura 19.</b> a) Extracción de los cadáveres de <i>M. domestica</i> . (b) Desinfección de los cadáveres, (1) Solución de amonio cuaternario al 10%, (2) Agua estéril destilada. (c) Colocación de los mismos en cámaras húmedas. ....	<b>52</b>
<b>Figura 20.</b> Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) ( <b>E1</b> ). Se notan los cuatro tratamientos aplicados (DMA1, DMA2, DMA3 y DMA4) y los Controles A y B... .	<b>53</b>
<b>Figura 21.</b> Cadáveres de adultos de <i>Musca domestica</i> cubiertos por esporulación de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 22.</b> Adultos de <i>M. domestica</i> posados sobre el montaje preparado.....	<b>55</b>
<b>Figura 23.</b> Análisis de Probit de <b>E1</b> con los tratamientos: DMA1, DMA2, DMA3 y DMA4. Se muestran los TL <sub>50</sub> y TL <sub>95</sub> e intervalos de confianza.....	<b>55</b>
<b>Figura 24.</b> Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) ( <b>E2</b> ). Se notan los cuatro tratamientos aplicados (DMA1, DMA2, DMA3 y DMA4) y los Controles A y B ....	<b>57</b>
<b>Figura 25.</b> Análisis de Probit de <b>E2</b> con los tratamientos: DMA2, DMA3 y DMA4. Se muestran los TL <sub>50</sub> y TL <sub>95</sub> e intervalos de confianza.....	<b>58</b>
<b>Figura 26.</b> Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) ( <b>E3</b> ). Se notan los cuatro tratamientos aplicados (DMA2, DMA3 y DMA4) y los Controles A y B.....	<b>59</b>
<b>Figura 27.</b> Análisis de Probit de <b>E3</b> con los tratamientos: DMA2, DMA3 y DMA4. Se muestran los TL <sub>50</sub> y TL <sub>95</sub> e intervalos de confianza.....	<b>60</b>
<b>Figura 28.</b> Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) ( <b>E4</b> ). Se notan los cuatro tratamientos aplicados (DMA2, DMA3 y DMA4) y los Controles A y B.....	<b>61</b>
<b>Figura 29.</b> Análisis de Probit de <b>E4</b> con los tratamientos: DMA3 y DMA4. Se muestran los TL <sub>50</sub> y TL <sub>95</sub> e intervalos de confianza.....	<b>62</b>
<b>Figura 30.</b> Fibras del tejido amarillo del tratamiento DMA2 en <b>E4</b> . Foto tomada y modificada con una cámara acoplada al microscopio (400x).....	<b>63</b>
<b>Figura 31.</b> Crecimiento de <i>M. anisopliae</i> en algodón embebido en solución de sacarosa..	<b>63</b>

<b>Figura 32.</b> Comparación entre los valores estimados de TL <sub>50</sub> obtenidos en <b>E1, E2, E3</b> y <b>E4</b> de DMA3 y DMA4.....	<b>64</b>
<b>Figura 33.</b> Comparación entre los valores estimados de TL <sub>95</sub> obtenidos en <b>E1, E2, E3</b> y <b>E4</b> de DMA3 y DMA4.....	<b>64</b>
<b>Figura 34.</b> (A) Trozo de tela con DMA3. (B) Trozo de tela sin tratamiento. (C) Algunos ensayos realizados.....	<b>65</b>
<b>Figura 35.</b> Porcentajes de moscas no atraídas y atraídas hacia los trozos de tela con y sin DMA3.....	<b>66</b>
<b>Figura 36.</b> Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días).....	<b>68</b>
<b>Figura 37.</b> Análisis de Probit de los <b>grupos A, B, C, D, E</b> . Se muestran los TL <sub>50</sub> y TL <sub>95</sub> e intervalos de confianza.....	<b>69</b>
<b>Figura 38.</b> Bioensayos con <b>grupo A</b> . (Día 1).....	<b>71</b>
<b>Figura 39.</b> Cámara húmeda del <b>grupo G</b> con presencia de cadáveres debido a <i>M. anisopliae</i> y por causas naturales. ....	<b>72</b>
<b>Figura 40.</b> Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) en el Grupo F y el Control B.....	<b>73</b>
<b>Figura 41.</b> Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) en el Grupo G y el Control B. ....	<b>74</b>
<b>Figura 42.</b> Galpones a utilizar en el trabajo de campo.....	<b>76</b>
<b>Figura 43.</b> Contaje de moscas con rejilla de Scudder en centro y extremo del galpón a 1m. ....	<b>79</b>
<b>Figura 44.</b> Análisis de varianza entre ubicaciones del galpón.....	<b>81</b>
<b>Figura 45.</b> Contaje de moscas con rejilla de Scudder a diferentes alturas.. ....	<b>83</b>

<b>Figura 46.</b> Análisis de varianza entre alturas del galpón.....	<b>83</b>
<b>Figura 46.1.</b> Prueba de Tukey entre alturas del galpón.....	<b>84</b>
<b>Figura 47.</b> Obtención de suspensión de conidias. ....	<b>86</b>
<b>Figura 48.</b> Montaje preparado para el campo.....	<b>87</b>
<b>Figura 49.</b> Inmersión de montajes en la suspensión de conidias.....	<b>87</b>
<b>Figura 50.</b> Montajes colocados en el interior de los galpones A y B.....	<b>88</b>
<b>Figura 51.</b> Montaje del galpón A con presencia de adultos de <i>M. domestica</i> .....	<b>88</b>
<b>Figura 52.</b> Colecta de insectos.....	<b>89</b>
<b>Figura 53.</b> Análisis de varianza entre galpón A en pre-tratamiento y luego de aplicación I y II.....	<b>92</b>
<b>Figura 54.</b> Análisis de varianza entre galpón B en pre-tratamiento y luego de aplicación I y II.....	<b>93</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Densidades de conidias por cm <sup>2</sup> estimadas por cada suspensión de conidias utilizada. ....	<b>45</b>
<b>Tabla 2.</b> Germinación de conidias a través del tiempo.....	<b>48</b>
<b>Tabla 3.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado ( <b>E1</b> ) .....	<b>51</b>
<b>Tabla 4.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para los controles realizados .....	<b>51</b>
<b>Tabla 5.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado ( <b>E2</b> ).....	<b>57</b>
<b>Tabla 6.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para los controles realizados ...	<b>57</b>
<b>Tabla 7.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado ( <b>E3</b> )... ..	<b>59</b>
<b>Tabla 8.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para los controles realizados .....	<b>59</b>
<b>Tabla 9.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado ( <b>E4</b> ) .....	<b>61</b>
<b>Tabla 10.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para los controles realizados .....	<b>61</b>
<b>Tabla 11.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para los grupos <b>A, B, C, D, E</b> .....	<b>67</b>
<b>Tabla 12.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para los controles realizados.....	<b>67</b>
<b>Tabla 13.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para cada los grupos F y G.....	<b>72</b>
<b>Tabla 14.</b> Mortalidad acumulada por día (%) para los controles realizados. ....	<b>72</b>
<b>Tabla 15.</b> Promedios de temperaturas máx. y min. (°C) y H.R. (%) registradas durante la semana de pre-tratamiento.....	<b>77</b>
<b>Tabla 16.</b> Promedios de temperaturas máx. y min. (°C) y H.R. (%) registradas durante las semanas de la aplicación I.....	<b>77</b>
<b>Tabla 17.</b> Promedios de temperaturas máx. y min. (°C) y H.R. (%) registradas durante las semanas de la aplicación II.....	<b>78</b>
<b>Tabla 18.</b> Contaje de <i>M. domestica</i> en dos ubicaciones (centro y extremo) dentro del galpón.....	<b>80</b>

<b>Tabla 19.</b> Contaje de <i>M. domestica</i> a diferentes alturas (0, 1 y 2 m) dentro del galpón.....	<b>82</b>
<b>Tabla 20.</b> Contaje de <i>M. domestica</i> en galpones pre-tratamiento.....	<b>85</b>
<b>Tabla 21.</b> Insectos colectados durante aplicación I.....	<b>89</b>
<b>Tabla 22.</b> Contaje de <i>M. domestica</i> en galpones post-aplicación I. ....	<b>90</b>
<b>Tabla 23.</b> Insectos colectados durante aplicación II. ....	<b>91</b>
<b>Tabla 24.</b> Contaje de <i>M. domestica</i> en galpones post-aplicación II.....	<b>91</b>
<b>Tabla 25.</b> Insectos colectados tres semanas luego de retirar la aplicación II.....	<b>94</b>
<b>Tabla 26.</b> Contaje de <i>M. domestica</i> en galpones post-aplicación II. ....	<b>94</b>

## 1. Resumen

*Musca domestica* Linneaus es una de las plagas más comunes asociada a las actividades avícolas. Una de las estrategias de control más estudiadas en la actualidad es la basada en la utilización de hongos entomopatógenos. La capacidad de infección del hongo *Metarhizium anisopliae* sobre *M. domestica* es bastante conocida, sin embargo son pocos los trabajos realizados directamente en las granjas avícolas. Este trabajo tiene como objetivo general, desarrollar y evaluar una metodología para el control de *M. domestica* en los galpones avícolas, basada en la colocación de telas impregnadas con conidias del hongo *M. anisopliae*.

Se estableció una cría de *M. domestica* en condiciones de laboratorio y se evaluó a *M. anisopliae* como agente de infección sobre adultos de la mosca, utilizando para el contagio una superficie de tela, obteniéndose como mejor atrayente el color amarillo. Luego, se estimó la cantidad de conidias capaces de fijarse a la tela amarilla preparándose cuatro montajes con las siguientes densidades:  $3,89 \times 10^5$  (DMa1),  $2,72 \times 10^6$  (DMa2),  $6,33 \times 10^6$  (DMa3) y  $1,45 \times 10^7$  (DMa4) conidias por  $\text{cm}^2$  de tela amarilla y se colocaron en el interior de recipientes de vidrio con cincuenta individuos adultos de la mosca. Una vez el lienzo tratado produjo el 100% de mortalidad éste fue colocado en un recipiente nuevo con un nuevo grupo de moscas adultas y se procedió a evaluar la mortalidad diaria. Los tratamientos DMa3 y DMa4 fueron capaces de conseguir el 100% de mortalidad luego de cinco semanas de aplicados en la tela, siendo seleccionado para el trabajo en campo el tratamiento DMa3.

Para determinar la patogenicidad de *M. anisopliae* sobre diferentes grupos etarios de *M. domestica*, se realizaron ensayos con edades de 0 (recién eclosionados), 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días post-eclosión. Los tiempos letales estimados con el análisis de Probit, indicaron que la patogenicidad del hongo no se veía alterada en los grupos de 5, 10, 15 y 20 días (grupos **B**, **C**, **D** y **E**, respectivamente). En el grupo **A**, por tratarse de jóvenes recién eclosionados se presentó un retraso en producirse el 100% de mortalidad y en cuanto a los grupos **F** y **G** (25 y 30 días) se encontraron descensos debido a causas naturales, lo que redujo el número de individuos capaces de ser infectados por *M. anisopliae*. Sin embargo, según Keiding (1986) los grupos **A**, **F** y **G** no se encuentran representados de manera importante en la población presente en los galpones avícolas.

El trabajo en campo se realizó en dos galpones avícolas. Se realizaron dos aplicaciones del hongo *M. anisopliae*, mediante la colocación de los montajes de tela amarilla impregnados con conidias. En el centro de cada galpón y a 3 m de altura aprox., se colocaron cuatro montajes, siendo restituidos cada tres semanas. Con la rejilla de Scudder (Scudder, 1947) se estimó la población de mosca doméstica pre y post-tratamiento y también se realizaron pases con malla entomológica para evidenciar la infección fúngica en la población. Las aplicaciones realizadas condujeron a una reducción del 99% en la población de la mosca para ambos galpones y luego de nueve semanas a partir del inicio del tratamiento. Estos resultados indican que la metodología implementada constituye una alternativa viable para el control de *M. domestica*.

## 2. Introducción

*Musca domestica* L. suele estar relacionada con las regiones donde se realizan diversas actividades avícolas, debido a que parte de su ciclo de vida se desarrolla en desperdicios orgánicos, como el estiércol de aves, por tanto se ha convertido en una de las plagas más importantes asociada a la avicultura. Este múscido no sólo constituye un agente perturbador para trabajadores y pobladores cercanos a las granjas, sino que también puede actuar como agente transmisor de diferentes microorganismos causantes de enfermedades en humanos (Axtell, 1986a; Keiding, 1986; W.H.O., 1991; Capinera, 2008). Además, la proliferación de *M. domestica* se ve agravada por el desarrollo de resistencia a los insecticidas de uso común (Pospischil y col., 1996; Scott y col., 2000; Acevedo y col., 2009). Consecuentemente, ha surgido la necesidad de unificar varias estrategias de control (culturales, químicas y biológicas) para establecer un manejo integrado de *M. domestica* (Axtell, 1986a); siendo las estrategias biológicas, basadas en el control natural las de mayor relevancia, destacándose los hongos entomopatógenos como los mejores candidatos para el biocontrol de este insecto (Barson y col., 1994; Pinnock y Mullens, 2007).

## **2.1 *Musca domestica* L.**

### **2.1.1 Clasificación taxonómica y Morfología.**

*Musca domestica* Linnaeus pertenece según Capinera (2008) a:

**Phylum:** Arthropoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Diptera

**Suborden:** Brachycera

**Infraorden:** Cyclorrhapha (Muscomorpha)

**División:** Schizophora

**Sección:** Calyptrate

**Familia:** Muscidae

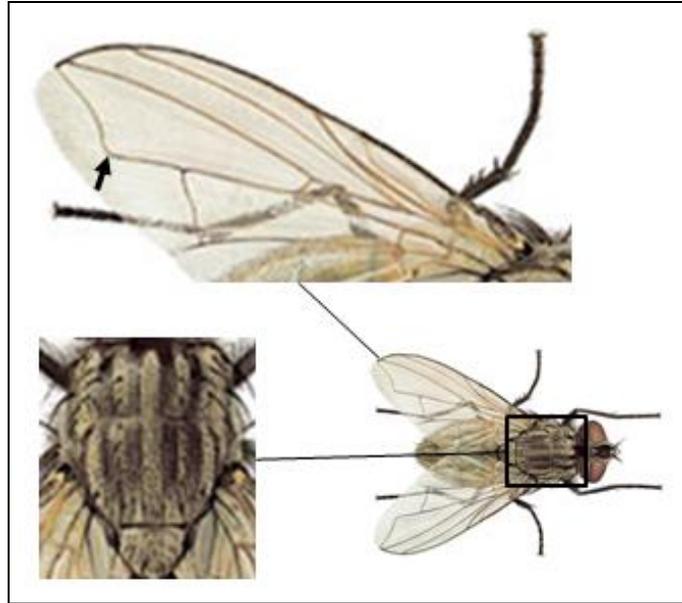
**Género:** *Musca*

**Especie:** *Musca domestica* Linnaeus.

Este insecto es originario de Asia central y su capacidad para adaptarse a una gran variedad de ambientes, desde cálidos a templados, rural o urbano, junto con la asociación a desperdicios generados por las actividades humanas, lo ha convertido en una especie sinantrópica (Capinera, 2008).

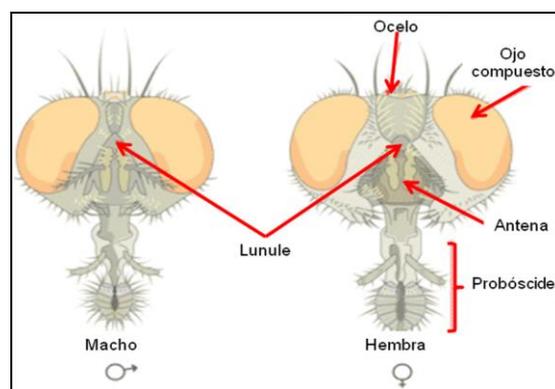
Las especies representantes del género *Musca* generalmente oscilan entre los 4 y 7,5 mm de longitud, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, humedad relativa y temperatura ambiental durante el desarrollo larval. Poseen ojos compuestos, antenas aristadas, aparato bucal tipo chupador esponja y dos pares de alas, las anteriores son membranosas y las posteriores están modificadas en estructuras denominadas balancines o halteres. Además presentan cuatro bandas negras en la zona dorsal del tórax y en las alas anteriores una cuarta vena

longitudinal angulosa como caracter autopomórfico de este género (O.P.S., 1962; Keiding, 1986; Capinera, 2008) (Figura 1).



**Figura 1. Características morfológicas de *Musca domestica*.** Tomado y modificado de <http://www.flycontrol.novartis.com/species/housefly/en/index.shtml>. Consultado: 14 de Octubre de 2009.

La hembra generalmente es más grande y puede ser distinguida del macho por la gran separación entre los ojos; en los machos los ojos están muy próximos entre sí (Capinera, 2008) (Figura 2).

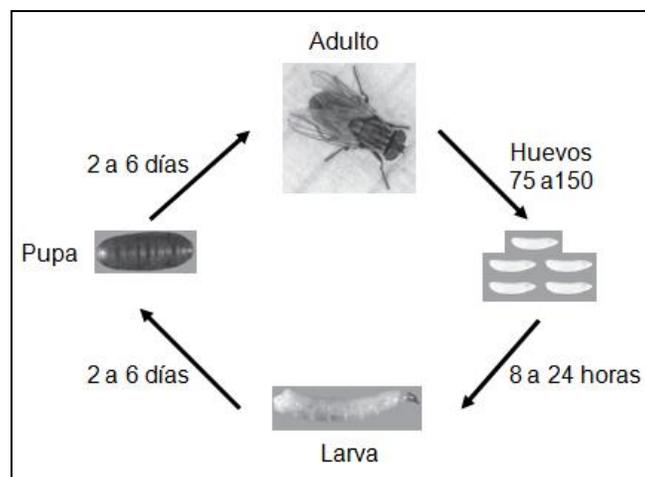


**Figura 2. Morfología de la cabeza de adultos de *Musca domestica*.** Hembra a la derecha, macho a la izquierda. Tomado y modificado de <http://www.flycontrol.novartis.com/species/housefly/en/index.shtml>. Consultado: 14 de Octubre de 2009.

*M. domestica* puede consumir gran diversidad de alimentos, entre los que se encuentran: frutas, restos de comida en descomposición, heces de humano y de animales, productos grasos como leche y mantequilla, entre otros (W.H.O, 1991; Capinera, 2008).

### 2.1.2 Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *M. domestica* es del tipo holometábolo, es decir, sufre una metamorfosis completa, compuesta por cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 3).



**Figura 3. Ciclo de vida de *M. domestica*.**

El paso de huevo a adulto puede ocurrir entre seis días a dos meses, dependiendo de las condiciones ambientales en que se da el desarrollo. Tales condiciones suelen ser: humedad relativa, temperatura ambiental y disponibilidad de alimento (W.H.O., 1991). En condiciones de laboratorio (temperatura entre 28-32 °C, humedad relativa entre 70-80% y foto-período con 12 horas de luz), el ciclo biológico

de *M. domestica*, tiene una duración aproximada de 9 días (Martiradonna y col., 2006).

La mayoría de las hembras suele oviponer entre 75-150 huevos de 2 a 6 veces durante toda su vida, en lugares ricos en nutrientes que por lo general son heces, restos de alimentos, entre otros. Son atraídas al sitio por su olor, donde el dióxido de carbono, amonio y otros compuestos característicos de materia en descomposición y en fermentación son los más atractivos. Los huevos son cilíndricos de color blanco-amarillento con longitud comprendida entre 1,0 y 1,2 mm (W.H.O, 1991; Capinera, 2008).

La eclosión de los huevos ocurre de 8 a 24 horas luego de haber sido depositados y las larvas son de tipo vermiforme de color amarillento. Esta fase del desarrollo presenta tres estadios larvales. La pupa es de forma redondeada de 8 mm de largo aproximadamente, y con el tiempo sufre cambios de color que van desde un amarillo, en sus primeras horas, hasta un color marrón oscuro o negro al final de la fase. La emergencia de los adultos se da después de 2 a 6 días, a 32-37 °C, de haber pupado las larvas (Capinera, 2008).

Los adultos o imagos sobreviven de tres a cuatro semanas en condiciones óptimas ambientales y nutricionales. Además, son más activos durante el día, y en la noche suelen posarse en paredes, árboles, postes u otro objeto que se encuentre elevado (W.H.O., 1991).

## **2.2 *M. domestica* y salud pública.**

A la mosca doméstica se le encuentran asociados gran diversidad de microorganismos, entre ellos: virus, bacterias, nemátodos y hongos, los cuales pueden permanecer adheridos a su cuerpo, patas, estructura bucal, etc. viajando con ella hasta ser transferidos a otra superficie, este proceso es denominado fosis. *M. domestica* también puede consumir alimentos contaminados con microorganismos patógenos para el hombre, y a su vez estos microorganismos pueden mantenerse en las glándulas salivares o en el aparato gastrointestinal de las mismas, siendo transferidos a otras superficies por medio de la regurgitación como preludeo a su alimentación o la defecación.

Este múscido puede comportarse como agente dispensor de diferentes microorganismos capaces de producir enfermedades como: las disenterías, la fiebre tifoidea, diarreas, el cólera, entre otras. De igual forma pueden transmitir agentes causantes de poliomielitis, infecciones en los ojos, piel y otras producidas por helmintos (Keiding, 1986; W.H.O, 1991)

## **2.3 Granjas avícolas**

La producción avícola mundial se encuentra en constante crecimiento y este auge en la industria implica el desarrollo de nuevas granjas, así como la mejora de las ya existentes. Las granjas avícolas están basadas en sistemas construidos y desarrollados por el hombre para crear ambientes artificiales y controlables, con el objetivo principal de producir eficientemente los huevos y la carne de aves de corral, pero también se genera gran cantidad de productos secundarios, que no son de

interés comercial, tales como aves muertas, estiércol, plumas y restos de alimentos; siendo el estiércol uno de los productos que trae mayor número de consecuencias desfavorables, ya que actúa como reservorio o sustrato de desarrollo para gran diversidad de insectos (Axtell, 1999).

Los sistemas de producción avícola suelen ser clasificados según el grado de contacto entre las aves y el ambiente exterior, pudiendo ser totalmente abierto, abierto limitado y cerrado (Axtell, 1986b). El sistema más utilizado es el de confinamiento de aves en un espacio cerrado, lo cual permite tener una alta densidad de animales por metro cuadrado. Estas “casas” de aves son construcciones usualmente con poca ventilación y pisos de cemento o concreto, que presentan varios problemas, uno de ellos, es la rápida acumulación de desechos por la alta densidad de aves en el espacio, lo que dificulta el aseo del galpón (Axtell, 1986b). Adicionalmente, si las aves tienen contacto directo y prolongado con el estiércol, pueden sufrir daños en las patas (llagas en la piel) e incluso debido a bacterias que transforman el ácido úrico del estiércol en amoníaco pueden presentar enfermedades respiratorias (A.T.T.R.A., 2007).

En la producción de aves para el consumo humano, una solución practicada por los avicultores para atenuar los problemas producidos por el estiércol, es el uso de una capa de cáscaras de arroz, paja o aserrín en el piso, conocida como cama o lecho para las aves, ejerciendo una función aislante entre éstas y sus desperdicios, además este lecho absorbe la humedad y disminuye los malos olores (Axtell, 1986b).

Si la producción avícola es dirigida hacia la producción de huevos, las aves son mantenidas en jaulas suspendidas del suelo, evitando el contacto directo entre las mismas y el estiércol, ya que éste cae directamente al suelo, por lo general acumulándose por semanas o meses, ofreciendo un hábitat ideal para larvas de moscas, entre otros insectos (Axtell, 1999).

Si bien para las granjas modernas el manejo de los desperdicios no es tan complicado, ya que poseen sistemas semi-automáticos de limpieza y tratamiento, en granjas rurales poco industrializadas y con estrategias deficientes, se generan problemas en la disposición del lecho y otros residuos, lo que produce condiciones suficientes para el establecimiento y proliferación de numerosos insectos. (Axtell, 1986a).

#### **2.4 Hongos entomopatógenos.**

Los hongos entomopatógenos comprenden una serie de microorganismos pertenecientes al Reino Fungi, que poseen como característica en común la capacidad de infectar a insectos en general (Lecuona, 1996). De hecho, cerca del 80% de las enfermedades de los insectos tienen como agentes etiológicos a los hongos y posiblemente todos los órdenes de ésta Clase son susceptibles a alguna infección micótica (Alves, 1986).

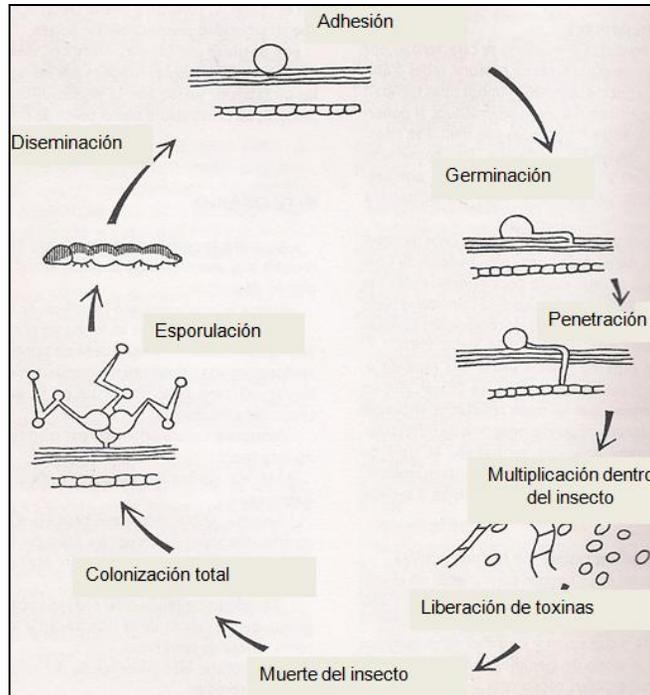
Los hongos entomopatógenos a diferencia de las bacterias, virus y la mayoría de los nemátodos entomopatógenos, los cuales deben ser ingeridos por el insecto para que la infección se realice, invaden generalmente a través de la cutícula. Esta es una estrategia de infección que pone en ventaja a dichos hongos sobre los

demás microorganismos utilizados en el control de plagas de insectos. Además, algunos hongos presentan diferentes grados de especificidad, pudiendo ser específicos a nivel de géneros hasta familias, lo que permite un menor impacto en poblaciones de insectos que no requieran un control (Alves, 1986; Deshpande, 1999).

El uso eficiente de hongos entomopatógenos en el control de plagas depende de su capacidad para generar epizootias, es decir, que sean capaces de infectar a gran parte de la población en control y ocasionar caídas abruptas en su abundancia, en un periodo de tiempo corto. La producción de epizootias depende de una serie de requerimientos, entre los que se encuentra la capacidad de las esporas para germinar sobre la cutícula del insecto, la capacidad de dispersión dentro del ambiente, la resistencia a condiciones adversas como: altas dosis de radiación UV, cambios bruscos de temperatura y humedad relativa, y la estabilidad frente a otros agentes de control (químico principalmente), entre otros (Dorta, 2008).

#### **2.4.1 Mecanismo de infección.**

Las esporas son las unidades infectivas por excelencia y dependiendo del tipo de hongo pueden ser: conidioesporas (esporas asexuales, también llamadas conidias) o ascosporas (esporas sexuales) (Lecuona y col., 1996). De forma general, los hongos entomopatógenos muestran diferentes fases durante su desarrollo sobre el hospedador, estas son: adhesión, germinación, penetración, colonización, muerte del insecto y reproducción y esporulación. Las distintas etapas se muestran en la figura 4:



**Figura 4. Ciclo general del desarrollo de los hongos entomopatógenos en insectos.**  
Tomado y modificado de Lecouana y col. (1996).

La adhesión consiste en la fijación de las esporas sobre la epicutícula del insecto debido a interacciones físicas, químicas y electrostáticas. En este proceso la especificidad es compleja, ya que involucra aspectos como la composición de la epicutícula, la presencia o no de regiones intersegmentales del insecto donde la estructura es más sensible a la infección y a las moléculas presentes en la superficie de las esporas (lectinas, mucopolisacáridos y lípidos) que refuerzan la fijación (Alves, 1986; Hajek y Leger, 1994; Lecuona y col., 1996).

Una vez adherida la espora y en condiciones favorables de humedad y temperatura comienza la fase de germinación, en la cual uno o varios pequeños tubos germinativos crecen y al alargarse funcionan como una hifa de penetración de la cutícula. Así mismo, se puede producir una estructura llamada apresorio, la cual

ayuda a la adhesión de la espora y debilita la cutícula. También existen componentes cuticulares, que pueden estimular, reducir o inhibir la germinación (Alves, 1986; Lecuona y col., 1996).

En la penetración ocurre una serie de procesos tanto a nivel del tegumento como del conidio que permiten al patógeno penetrar la cutícula del insecto; dichos procesos se pueden dividir en químicos, resultantes de la degradación por enzimas (proteasas, lipasas, quitinasas) de la cutícula, y procesos físicos debido a la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo que rompe las áreas membranosas o esclerotizadas. Además, la penetración depende de las propiedades de la cutícula como: grosor, esclerotización, presencia de sustancias nutricionales y antifúngicas y estado de desarrollo del insecto (Alves, 1986; Hajek y Leger, 1994; Lecuona y col., 1996).

Al atravesar la cutícula y llegar al hemocele se inicia la colonización del insecto, el hongo comienza a multiplicarse generando protoplastos (elementos sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante), y pequeñas células llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente. El patógeno también produce toxinas capaces de inhibir las defensas inmunológicas del insecto (Alves, 1986; Hajek y Leger, 1994).

La alta concentración de toxinas y el consumo de sustancias nutritivas por parte del hongo ocasionan síntomas fisiológicos en el insecto como: convulsiones, carencia de coordinación, obstrucciones mecánicas del aparato digestivo (conlleva a la reducción en la alimentación) y comportamientos alterados, entrando finalmente

en un estado letárgico hasta que muere. Apenas ocurre la muerte del insecto, termina el desarrollo parasítico del hongo y empieza la fase saprofítica, consumiendo y creciendo a través de los tejidos. Cuando la muerte del insecto ocurre, no se observan aún signos visibles de una enfermedad fúngica, tampoco la desintegración del cadáver, ya que el patógeno secreta sustancias antibacterianas que mantienen el exterior del insecto intacto (Alves, 1986; Hajek y Leger, 1994, Lecuona y col., 1996).

A las 48-60 horas de la muerte del insecto, y en presencia de un ambiente húmedo y cálido, emergen masas micelianas fundamentalmente por las regiones intersegmentales y por las aberturas naturales del insecto (espiráculos, boca y ano). La producción de conidias o esporas sobre el cadáver ocurre entre 24-48 horas posterior a la emergencia de las hifas, y generan una coloración sobre el insecto que será característica para cada especie de hongo. Pero, si las condiciones de humedad no son favorables, el hongo forma una gran masa miceliana en el interior del insecto, manteniéndose intacto el tegumento (Alves, 1986; Lecuona y col., 1996).

Cabe destacar que todas las fases de la infección son dependientes de las condiciones ambientales, tales como: la temperatura, la humedad relativa, entre otras y se encuentran relacionadas la mayoría de las veces con la especificidad patógeno-hospedador.

#### **2.4.2 *Metarhizium anisopliae*.**

Los hongos entomopatógenos más usados en el control microbiano de insectos son los representantes de la llamada Clase Hyphomycetes o Deuteromycota,

(Charnley y Collins, 2007). Uno de los más conocidos es el hongo *Metarhizium anisopliae*, actualmente incluido en la Clase Sordariomycetes del Orden Hypocreales dentro del Phylum Ascomycota (Charnley y Collins, 2007), el cual actúa naturalmente sobre más de 300 especies de insectos (Alves, 1986).

El género *Metarhizium*, (Figura 5), se caracteriza por poseer conidióforos en columnas compactadas, con fiálides alargadas simples y conidias generalmente uninucleadas y cilíndricas de dimensiones comprendidas entre 5 a 14  $\mu\text{m}$  que al esporular muestran una amplia gama de verdes sobre los cadáveres de los insectos, esto es conocido como la “muscardina verde”. Existen dos variedades de *M. anisopliae* ampliamente estudiadas, la principal diferencia entre ambas es el tamaño de la espora, de 5 a 8  $\mu\text{m}$  en *M. anisopliae* var *anisopliae* y de 10 a 14  $\mu\text{m}$  en *M. anisopliae* var *major* (O.M.S., 1984; Alves, 1986).

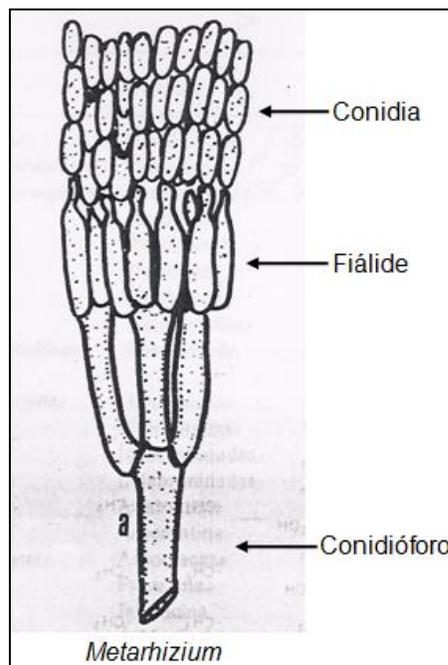


Figura 5. Conidióforo del género *Metarhizium*. Tomado y modificado de Alves (1986).

*Metarhizium anisopliae*, fue uno de los primeros microorganismos en ser usados en el control biológico de insectos, siendo aplicado en 1879 por el microbiólogo Ruso Metschnikoff en larvas de *Anisoplia austriaca*, una importante plaga de los cultivos de remolacha (O.M.S., 1984).

A partir de allí, se han realizado muchos trabajos que corroboran a *M. anisopliae* como excelente candidato para el biocontrol de especies representantes de ordenes como: Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Homoptera, entre otros (O.M.S., 1984; Lecuona y col., 1996).

En países como Brasil, este hongo se ha usado durante décadas en un gran número de programas y estrategias de control de plagas agrícolas, siendo uno de los ejemplos más resaltantes la chicharra de la caña de azúcar *Mahanarva posticata*, la cual es una de las principales plagas de ese cultivo; los resultados obtenidos con la utilización de *M. anisopliae* indican una alta eficacia en el control de ése insecto, y su aplicación se da a gran escala por todo el noreste del país (Alves, 1986).

#### **2.4.3 Seguridad en mamíferos.**

En general, los hongos entomopatógenos son seguros para la mayoría de los vertebrados, aunque un término absoluto no existe, ya que se han reportado casos de irritaciones de membranas y mucosas en experimentos con altas dosis de conidias sobre ratas (Ignoffo, 1973). Se puede decir que no generan grandes perjuicios, ya que, es difícil que se puedan desarrollar en el intervalo de temperatura de la mayoría de los mamíferos 34,5 a 44 °C (Alves, 1986).

### 3. Antecedentes

Un estudio realizado por Axtell (1986a) reveló que las moscas son la plaga más importante como consecuencia de la actividad avícola, ya que el estiércol proporciona un excelente medio para la proliferación de sus larvas, y este se acumula en grandes cantidades. Así mismo, entre ellas, *Musca domestica* suele ser la más abundante, por consiguiente los programas y estrategias de manejo y control deben dirigirse a ésta población.

En 1999, Axtell analizó los diferentes sistemas modernos de avicultura, indicando que todos los sistemas de producción, incluidos aquellos destinados para la producción de huevos, para engorde y crecimiento de aves, generan un ambiente perfecto para el incremento en la abundancia de artrópodos. También, el autor señala que la mosca doméstica se encuentra como una de las plagas más abundantes en los sistemas de producción, pero que en los otros sistemas que mantienen un lecho seco, la población de *M. domestica* es mucho más reducida.

La distribución de *M. domestica* en galpones avícolas fue indicada por Avancini y Silveira (2000), quienes realizaron colectas en diferentes espacios de la granja y encontraron que *M. domestica* presenta el siguiente comportamiento diario: a tempranas horas del día se congregaba en lugares próximos al galpón como vegetación y pasillos aledaños, mientras que al final de la tarde aumentaba la presencia de moscas dentro del galpón, posándose en el estiércol, cables, y paredes. Además Hecht y col., (1968), señalaron que la distribución de adultos de *M. domestica* en un espacio cerrado, se ve influenciada por el color de las superficies,

siendo el amarillo el que tiende a atraer a las moscas adultas. Adicionalmente Burg y Axtell en 1984 con el objetivo de monitorear la población de la mosca en galpones avícolas, desarrollaron una trampa tipo jarra, para luego evaluarla ante factores como: posición dentro del galpón, color de la superficie y tipo de cebo empleado; entre los resultados se destacan que la captura del insecto se incrementó al colocar las trampas en lugares altos y al utilizar el cebo constituido por la feromona (Z)-9-tricoseno; también se indica que al pintar la superficie de las trampas de color amarillo se aumentó la atracción de las moscas adultas hacia la trampa.

La Organización Mundial de la Salud ha presentado trabajos en los que se relacionan ciertas enfermedades gastrointestinales, en los trabajadores de las granjas avícolas y habitantes de comunidades aledañas, con la gran abundancia de moscas domésticas vinculada a la empresa avícola. Conjuntamente, se señala que *M. domestica* puede ser un vector mecánico importante de microorganismos. (Keiding, 1986; W.H.O, 1991). Se ha demostrado que el mÚscido puede transmitir especies de los géneros: *Shigella* (Levine y Levine, 1990), *Escherichia* (Kobayashi y col., 2000), *Salmonella* (Thomas, 2009), entre otros, que en general suelen ser patógenos para el hombre produciendo enfermedades gastrointestinales.

Son varias las estrategias que se utilizan para el control de *M. domestica*, una de ellas es el control químico, el cual ha venido perdiendo eficacia sobre éste insecto, ya que debido al uso indiscriminado e inadecuado, se ha observado resistencia a casi todos los compuestos químicos empleados para su control (Scott y col., 2000). Los primeros reportes de resistencia a insecticidas en *M. domestica*

surgieron en los años cincuenta con el uso del dicloro-difenil-cloroetano (DDT) (Pospischil y col., 1996), y actualmente son pocos los químicos eficaces en el control de esta peste multi-resistente en granjas avícolas (Scott y col., 2000; Kaufman y col., 2001; Acevedo y col., 2009).

Como alternativa al uso de insecticidas químicos, existe una gran variedad de trampas con diferentes elementos como: cebos o señuelos, superficies pegajosas, entre otros. Estos sistemas de captura son utilizados para atraer, y eliminar a la mosca doméstica, muchas veces utilizando un insecticida. Sin embargo, según Keiding (1986) una de las debilidades de este tipo de sistema es que su efecto sobre la densidad de la población de la mosca es relativamente baja y depende de la cantidad y calidad del cebo y el insecticida utilizado en las trampas, lo que implica en la mayoría de las veces un elevado gasto económico. También existen las trampas eléctricas, que utilizan luz fluorescente, como atrayente, pero éstas han dado resultados poco significativos sobre la población de *M. domestica* (Keiding, 1986). Además, se ha encontrado que al electrocutar a este múscido se liberan virus y bacterias que aun poseen capacidad infectiva (Urban y Broce, 2000).

Según Axtell (1986b) el biocontrol o control biológico surge como una opción eficaz y necesaria. Para Barson y col. (1994), de los agentes de biocontrol conocidos sobre *M. domestica*, los hongos entomopatógenos son uno de los más prometedores y estudiados, por ello estos autores evaluaron en condiciones de laboratorio la susceptibilidad de la mosca doméstica a la infección por *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces farinosus*, *Tolypocladium*

*Cylindrosporium* y *Veticillium lecanii*, mediante bioensayos sobre larvas en tercer estadio (72 horas luego de la eclosión) y adultos hembras de *M. domestica*. Las suspensiones de conidias se obtuvieron a partir de cultivos esporulados y emplearon individuos de una cría del laboratorio. A los adultos, se le colocó en la zona ventral del abdomen, una gota de la suspensión de conidias a diferentes concentraciones, y en seguida fueron llevados en grupos a recipientes plásticos. Por otro lado, las larvas en tercer estadio fueron sumergidas individualmente en suspensiones de conidias de los diferentes hongos y a distintas concentraciones, y posteriormente fueron colocadas en capsulas de Petri. Registraron la mortalidad diaria en los adultos y las larvas, así como el número de adultos emergentes de las mismas. Los resultados obtenidos indicaron que *M. domestica* fue susceptible a los seis hongos utilizados, pero tomando en cuenta el tiempo y la dosis empleada, fueron *Metarhizium anisopliae* y *Tolypocladium cylindrosporium* los más patógenos en larvas, mientras que los adultos fueron más susceptibles a *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana*.

Se han realizado en el Laboratorio de Procesos Fermentativos del Instituto de Biología experimental (I.B.E.), bioensayos de patogenicidad de *M. anisopliae* sobre adultos de *M. domestica*. El protocolo aplicado involucraba sumergir grupos de 50 individuos adultos, obtenidos a partir de una cría de laboratorio, en una suspensión de conidias del hongo ( $10^8$  conidias/mL), durante un segundo, para luego ser colocados en recipientes de vidrios post-tratamiento. El diseño utilizado permitió evaluar el efecto de *M. anisopliae* sobre los adultos de *M. domestica*, obteniéndose

un 100% de mortalidad a los 6 días post-tratamiento. Así mismo, los resultados de estos bioensayos motivaron a la búsqueda de una metodología para ser aplicada en campo basada en el uso de este hongo como agente de control de *M. domestica*.

Pocos son los trabajos que han efectuado experimentos en granjas avícolas para evaluar el control de las poblaciones de *M. domestica* con hongos entomopatógenos. No obstante, los autores Cova y Scorza-Dagert (2006) utilizaron nebulizaciones de conidias de *B. bassiana* sobre galpones avícolas del estado Trujillo, para controlar a *M. domestica*. Las aplicaciones se hicieron con suspensiones de  $9 \times 10^7$  conidias/mL, una vez por semana durante tres semanas. Determinaron la densidad de moscas domésticas pre- y post- tratamiento utilizando el recuento con rejillas según Scudder (1947). Los resultados obtenidos indicaron que hubo una reducción en un 100% en la densidad de *M. domestica* en un periodo de tres semanas, con un efecto prolongado de 94,96% de reducción de la población durante las tres semanas siguientes.

## 4. Objetivos

### Objetivo General

Desarrollar y evaluar una metodología para el control de *Musca domestica* (Diptera Muscidae) basada en la colocación de telas impregnadas con conidias del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Clase Hyphomycetes) en el interior de galpones avícolas de una granja rural ubicada en la comunidad de San José de los Altos, Municipio Guaicaipuro, Estado Miranda.

### Objetivos Específicos

-Establecer una cría de *Musca domestica* (Diptera Muscidae) en condiciones de laboratorio.

-Evaluar el efecto de usar telas de diferentes colores sobre la atracción de adultos de *M. domestica*.

-Diseñar bioensayos que permitan evaluar la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* sobre adultos de *M. domestica*, empleando tiras de tela impregnadas con conidias del hongo.

-Determinar el tratamiento con la densidad ideal de conidias por centímetro cuadrado que propicie los más altos índices de mortalidad. Así como evaluar su durabilidad en el tiempo.

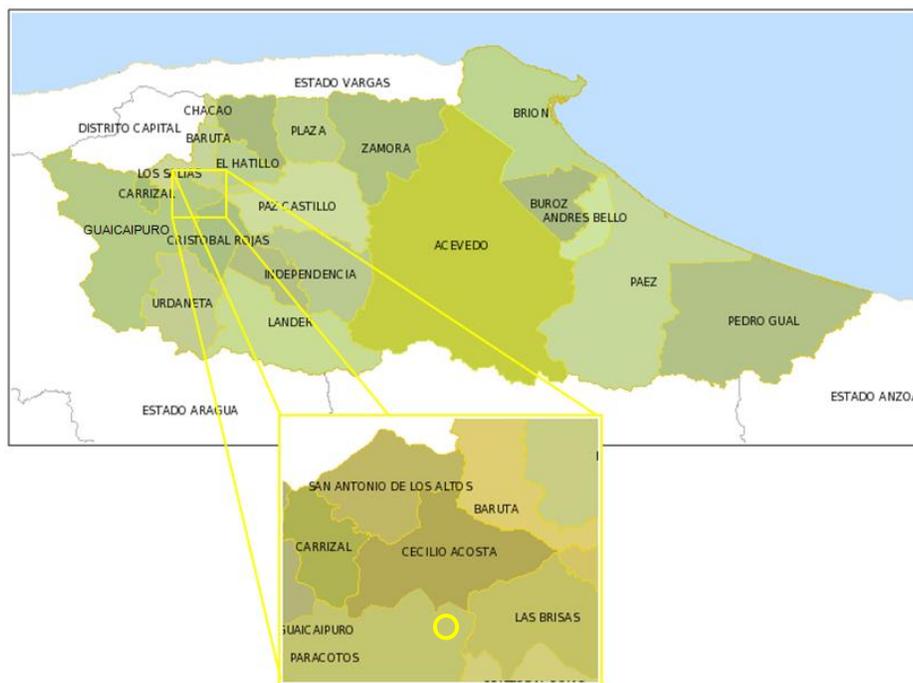
-Evaluar la patogenicidad de *M. anisopliae* sobre diferentes grupos etarios de adultos de *M. domestica*.

-Cultivar *M. anisopliae* a usar de manera masiva, para el desarrollo del protocolo en campo.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Zona de estudio.

El trabajo se realizó en la granja avícola “Los Roa” situada en los alrededores de la población de San José de los Altos de la Parroquia Cecilio Acosta, en el Municipio Guaicaipuro del Estado Miranda (Figura 6). La granja se encuentra ubicada a 10°21' Latitud Norte y 66°55' Longitud Oeste, a 1.267 m.s.n.m.



**Figura 6. Mapa político territorial del estado Miranda.** Tomado y modificado de: SIGMIRANDA Ver. 1.0. <http://200.44.156.149:82/gmap/gmap75.phtml>. Consultado: 14 de Octubre de 2009.

La granja está constituida por seis galpones, todos destinados a la cría de gallinas para su crecimiento y engorde, además para la producción de huevos. Las medidas de los galpones son: 10 m x 20 m y una altura de 4 m.





**Figura 7. Galpón avícola de la granja "Los Roa".** Se observan: la vista exterior (A), vista interior sin aves de corral ni lecho (B), (C) vista interior con aves de corral.

## **5.2 Material biológico.**

El hongo entomopatógeno empleado fue *Metarhizium anisopliae*, cepa LPFIBE-2, el cual fue suministrado por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (C.V.C.M.) para su posterior cultivo en el Laboratorio de Procesos Fermentativos, ubicado en el Instituto de Biología Experimental (I.B.E.).

Además se utilizaron adultos de *Musca domestica* obtenidos a partir de una cría mantenida en el insectario del I.B.E.

## **5.3 Medios de cultivos.**

*Agar Nutritivo Papa Dextrosa (ANPD).* Se preparó a partir de una infusión de papa obtenida mediante la ebullición (durante 15 minutos) de 200 gr de papas por cada litro de agua destilada. Para cada litro de medio se utilizaron 500 mL de la infusión, 2% de agar nutritivo, 2% de D(+)glucosa y cantidad suficiente de agua

destilada. El pH fue ajustado a 6,1 y el medio fue esterilizado en autoclave a 15 libras de presión, 121°C por 15 minutos. Antes de la solidificación del medio se agregaron 500 mg de cada uno de los siguientes antibióticos: amoxicilina y cloranfenicol.

*Medio sólido afrecho y cáscara de arroz.* Estará constituido por afrecho de arroz y cáscara de arroz en proporción 1:1, y será esterilizado dentro de bolsas de polipropileno a 15 libras de presión, 121°C durante 15 minutos.

#### **5.4 Producción del hongo *M. anisopliae*.**

1. *Producción en fiolas para los bioensayos en el laboratorio.* El hongo fue inoculado sobre fiolas de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio Agar Nutritivo Papa Dextrosa (ANPD), con un volumen de siembra de 0,1 mL de suspensión de conidias a  $10^8$  conidias/mL. Los cultivos se dejaron en crecimiento hasta lograr una adecuada esporulación, a los 15 días.

2. *Producción en masa para los experimentos en campo.* Se utilizó la metodología desarrollada por Dorta (1990) para la producción masiva. En éste caso sobre bandejas de aluminio de dimensiones 60 cm x 45 cm x 3 cm, se colocaron 750 gramos de la mezcla afrecho de arroz y cáscara de arroz (1:1), con un contenido de agua en base húmeda del 50% y se cubrió con bolsas de polipropileno para su esterilización. Una vez a temperatura ambiente, la mezcla se inoculó con esporas de *M. anisopliae* a razón de  $10^6$  esporas/g de sólido. Las esporas utilizadas fueron obtenidas a partir de cultivos esporulados de ANPD. Luego se incubó la bandeja con

la mezcla inoculada a temperatura ambiente, con luz artificial permanente y humedad relativa superior a 95%, durante dos semanas.

## **5.5 Cría de *M. domestica* en condiciones de laboratorio.**

Se usó una cría de *M. domestica* establecida y mantenida en el insectario del Laboratorio de Procesos Fermentativos según el protocolo de Martiradonna y col. (2006) con ciertas modificaciones, a partir de moscas colectadas en la granja.

### **5.5.1 Colecta de ejemplares adultos de *M. domestica*.**

La colecta de adultos de *M. domestica* se realizó en la granja, en horas de la mañana (11:00 am), con el uso de una malla entomológica, se hicieron varios pases de la misma en aquellas zonas de los gallineros que presentaron gran abundancia de individuos adultos. Los adultos atrapados fueron colocados en una jaula con dimensiones: 25 cm ancho x 25 cm alto x 35 cm largo, forrada de tela color blanco (doppio velo) debidamente identificada con el día de la colecta y hora. Seguidamente en el Laboratorio de Procesos Fermentativos en el I.B.E., se procedió a la identificación taxonómica de una muestra de lo colectado, empleando para esto la clave para múscidos neotropicales de Carvalho y Couri (2005) y la guía de adiestramiento para el saneamiento del medio en relación a las moscas de la O.P.S. (1962).

### **5.5.2 Condiciones en el laboratorio para el mantenimiento de los ejemplares colectados.**

La jaula se mantuvo en las siguientes condiciones: temperatura 28-32°C, humedad relativa entre 65-80% y un fotoperíodo de 12 horas de duración. Para ello se situó la jaula en el insectario del I.B.E., dentro de un estante y se colocaron bandejas con agua debajo de la misma para mantener una alta humedad relativa.

La fuente de alimento para las moscas adultas fue azúcar blanca comercial (aprox. 20 g), suministrada en una cápsula de Petri en cada jaula. Adicionalmente se colocaron dos cápsulas, una con algodón embebido en agua filtrada (aprox. 40 mL) y la otra con algodón embebido en leche pasteurizada (aprox. 40 mL). Ambas fueron cambiadas cada dos días.

### **5.5.3 Obtención de individuos homogéneos (F<sub>1</sub>).**

Para obtener una generación filial de la misma edad, a una de las jaulas con por lo menos 3 días en el laboratorio, se le retiró la cápsula con leche por toda una noche, luego se le introdujo otra cápsula con algodón embebido en leche para ser utilizada por las hembras para oviponer. La cápsula se retiró a la mañana del día siguiente para recolectar los huevos, se tomó una pequeña cantidad de éstos y se colocaron en el medio de cría para larvas. Los huevos que no fueron utilizados se descartaron en autoclave a 15 libras de presión y 121°C por 15 minutos.

#### **5.5.4 Medio de cría para larvas de *M. domestica* en condiciones de laboratorio.**

En una fiola se preparó una solución con 200 mL de leche pasteurizada y 2 g de levadura granulada (*Saccharomyces cerevisiae*), en agitación media, hasta que se disolvió el granulado. Posteriormente la solución se vertió en una pizeta.

Un frasco de boca ancha y capacidad de tres litros, identificado con fecha y generación filial, fue utilizado para contener el medio de cría. Se utilizaron 25 servilletas (sin procesamientos químicos para decoloración) y se rasgaron en tiras, éstas fueron colocadas dentro del recipiente de tal manera que por cada capa de papel, se añadió un poco de la mezcla de leche y levadura con la pizeta, asegurando que el papel quede uniformemente humedecido. Al completarse las 3/4 partes del frasco, se colocaron los huevos cuidadosamente extraídos, y por último se añadió una capa de tiras de papel secas. La boca del frasco fue tapada con un trozo de tela de franela, asegurado con una banda elástica.

Luego de cinco días se procedió a sacar las pupas del medio de cría. Éstas fueron contadas y colocadas en una jaula limpia. Pasados aproximadamente cuatro días, emergieron los adultos y se les suministró agua y alimento como fue indicado anteriormente. El material restante de la cría, así como aquellas larvas que no pasaron a fase de pupa, se colocaron en el autoclave a 15 libras de presión y 121°C por 15 minutos para descartar.

## **5.6 Bioensayos en condiciones de laboratorio.**

Como recipientes post-tratamiento se utilizaron envases de vidrio de boca ancha y capacidad de tres litros, dentro de los cuales se colocó papel humedecido en el fondo, así como solución de sacarosa embebida en un algodón para la alimentación de los adultos de *M. domestica*. Los recipientes fueron cubiertos con un trozo de tela sujeta con una banda elástica. Además cada recipiente contuvo, para facilitar su manejo, un máximo de 50 adultos del insecto, y fue mantenido bajo condiciones de laboratorio (humedad relativa mayor o igual al 60% y temperaturas mayores a 28°C). Lo mismo se aplicó en el caso de los controles.

Cabe mencionar que en cada bioensayo realizado, las moscas adultas utilizadas fueron de edades comprendidas entre 3 y 8 días y no fueron discriminadas según su sexo.

### **5.6.1 Determinación del color de tela a usar.**

Inicialmente, se realizaron ensayos en condiciones de laboratorio para determinar qué color es más atractivo para *M. domestica*, a fin de ser utilizado luego como atrayente para su infección con *M. anisopliae*.

#### **Procedimiento:**

Se colocaron en el exterior de un recipiente de vidrio de boca ancha y capacidad de tres litros, trozos de telas de tamaño: 4 cm x 4 cm, ubicados alrededor del mismo en la pared y sujetos con una cinta adhesiva transparente. En seguida se introdujeron 50 individuos adultos de *M. domestica* y cada 15 minutos se contaron

las moscas posadas sobre el área de cada trozo de tela colocado. Este procedimiento se realizó con telas de los colores: amarillo, blanco y negro, finalmente se promediaron las mediciones, para determinar el color de la tela que fue más atractivo para las moscas.

Como control se usó un recipiente post-tratamiento sin ningún trozo de tela en la superficie, conteniendo 50 individuos adultos de *M. domestica*, y se evaluó la distribución de las moscas en el recipiente post-tratamiento.

#### 5.6.2 Densidad de conidias de *Metarhizium anisopliae* por centímetro cuadrado de tela.

Este bioensayo permitió conocer la cantidad de conidias capaces de fijarse a la tela seleccionada, relacionando la concentración de la suspensión y la densidad por centímetro cuadrado en la tela.

Procedimiento:

1. A partir de un cultivo esporulado del hongo *M. anisopliae* en ANPD, se obtuvo una suspensión de conidias, agregando 40 mL de Tween 80<sup>®</sup> al 0,01% y agitación con barra magnética por un minuto aproximadamente.

La concentración de conidias se determinó mediante el uso de una cámara de Neubauer, utilizando un microscopio óptico a una magnificación de 400x, y se ajustó a  $10^{10}$  conidias/mL.

Para determinar el porcentaje de germinación de las esporas, se colocó 20 µL de una suspensión diluida sobre un portaobjetos conteniendo una delgada capa de agar-agua, luego se incubó en una cámara húmeda. El porcentaje de germinación de las esporas se evaluó en función del tiempo (cada 12 horas) mediante el registro del número de esporas que presentaron la aparición del tubo germinativo, cuya longitud fue igual o mayor que el doble del diámetro de la espora. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico a una magnificación de 400X.

2. Se prepararon suspensiones de conidias de *M. anisopliae* con las siguientes concentraciones:  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$  y  $10^6$  conidias/mL y se sumergió en cada una de ellas un trozo de tela de 2 cm x 2 cm, se dejó escurrir por 20 segundos y se lavó cada trozo en 20 mL de solución Tween 80<sup>®</sup> al 0,01%. Se extrajeron alícuotas de la solución de lavado y se determinó la concentración de conidias mediante el uso de una cámara de Neubauer, utilizando un microscopio óptico a una magnificación de 400X. Luego se calculó la densidad de éstas por centímetro cuadrado de cada trozo de tela utilizado.

### 5.6.3 Evaluación de la tela como medio para la infección de *M. domestica* con *M. anisopliae*.

Este bioensayo se llevó a cabo con la finalidad de evaluar la infección del insecto a diferentes densidades de conidias por centímetro cuadrado en trozos de telas, para determinar a qué densidad el porcentaje de mortalidad de los adultos fue del 100%.

Procedimiento:

1. Los trozos de tela del color amarillo, se ajustaron con las siguientes medidas: 12 cm de longitud x 4 cm de ancho, para mantener una forma estirada de la tela se colocó un trozo cilíndrico de metal en el borde inferior y superior.

2. Se sumergieron los trozos de tela en suspensiones de conidias a  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$  y  $10^6$  conidias/mL, para obtener distintas densidades de conidias por centímetro cuadrado de tela. Se dejó escurrir cada trozo de tela por 20 segundos y se colocó dentro de un recipiente de post-tratamiento a 10 cm de altura, de manera que cuelgue, siendo sujetado por un hilo grueso blanco colocado en el borde superior y en el borde inferior.

3. Por último, se colocó el grupo de moscas dentro del recipiente ya preparado y se realizaron evaluaciones diarias registrándose la mortalidad acumulada. Los cadáveres encontrados fueron extraídos del recipiente y desinfectados según el protocolo usado por Thomas (2009), realizándose lavados con amonio cuaternario al 10% y agua destilada estéril, para luego ser colocados en cámaras húmedas, a fin de observar el surgimiento o no del micelio del hongo, confirmando así la micosis como causa de muerte.

Como controles se prepararon dos montajes como el descrito anteriormente, colocando en uno de los recipiente un trozo de tela sumergido en Tween 80<sup>®</sup> al 0,01%, y en el otro un trozo de tela sumergido sólo en agua destilada. Se hicieron evaluaciones diarias registrándose la mortalidad acumulada.

#### 5.6.4 Evaluación a través del tiempo de la tela como medio para la infección de *M. domestica* con *M. anisopliae*.

Una vez determinada la densidad de conidias necesaria para alcanzar el 100% de mortalidad de moscas adultas (dosis diagnóstica), se procedió a evaluar la efectividad del montaje a través del tiempo.

Para ello, el montaje que produjo el 100% de mortalidad fue retirado del recipiente de post-tratamiento e introducido en un recipiente nuevo con un grupo de moscas adultas, se hicieron evaluaciones diarias registrándose la mortalidad acumulada. Los cadáveres encontrados fueron extraídos del recipiente y lavados con amonio cuaternario al 10% y agua destilada estéril, para luego ser colocados en cámaras húmedas y observar el surgimiento o no del micelio del hongo, confirmando así la micosis como causa de muerte. Igualmente se realizaron los análisis de Probit.

#### 5.6.5 Evaluación de la patogenicidad de *M. anisopliae* sobre diferentes grupos etarios de *M. domestica*.

Dado que la población de *M. domestica* presente en el gallinero está conformada por adultos de diferentes edades, fue necesario evaluar la infección de *M. anisopliae* sobre individuos con diferentes tiempos post-eclosión, esto a fin de evaluar la patogenicidad en cada grupo etario.

Se realizaron ensayos con los siguientes grupos etarios: **grupo A** (recién eclosionados), **grupo B** (5 días), **grupo C** (10 días), **grupo D** (15 días), **grupo E** (20 días), **grupo F** (25 días) y **grupo G** (30 días post-eclosionados).

Procedimiento:

Se utilizó la metodología descrita en la sección 5.6.3 empleándose únicamente el tratamiento DMA3. Igualmente se colocó un control (control B) para cada uno de los grupos. Se realizaron ocho bioensayos para cada grupo etario y se aplicó el análisis de Probit correspondiente.

## **5.7 Experimentos en campo.**

### 5.7.1 Estimación de las variables temperatura y humedad relativa.

La humedad relativa y la temperatura son variables ambientales importantes que determinan el proceso infeccioso de las conidias de *M. anisopliae*. Por ello se debió obtener un registro de ambas variables a fin de saber si dentro del galpón se daban las condiciones necesarias para el desarrollo vegetativo del hongo.

Para ello se realizaron estimaciones utilizando un termómetro de máx. y min., y un higrómetro. Se monitorearon ambas variables tres veces al día (9:00 am, 1:00 pm y 5:00 pm), tres veces a la semana, durante la semana previa a la primera aplicación del hongo y luego cada semana hasta el fin de las aplicaciones.

### 5.7.2 Contaje de moscas adultas.

Para la ejecución del experimento en el campo, se estimó la densidad de moscas según el método de rejilla de Scudder (1947), el cual consiste en el uso de una rejilla constituida por barras horizontales de madera, donde el insecto puede posarse y fácilmente ser contado. (**Figura 8**). La rejilla posee un tamaño de 91,44 cm x 91,44 cm.

Unos de los aspectos fundamentales a la hora de usar la rejilla dentro del galpón, es respecto a la localización de la misma; por ello, inicialmente se realizaron contajes dentro del galpón en las ubicaciones de extremo y centro, y luego a diferentes alturas (0 m, 1 m, 2,0 m), a fin de conocer el lugar donde fuese mayor el pose de adultos de mosca sobre la rejilla. Las estimaciones se hicieron entre las 9:00 am y 12:00 pm, y se contaron aquellas moscas que se mantuvieron posadas al menos 30 segundos sobre la rejilla, obviándose cualquier otro insecto. Esto se repitió cada media hora, seis veces en cada ubicación (extremo y centro), igual para las alturas.

Una vez conocida la ubicación idónea para la rejilla, se realizó el contaje tres veces por un periodo de una semana pre y post-tratamiento, de igual manera solo se contaron aquellas moscas que se mantuvieron posadas durante 30 segundos.



**Figura 8. Rejilla de Scudder.**

### 5.7.3 Elaboración de los montajes para los galpones.

#### **5.7.3.1 Obtención de la suspensión de conidias.**

Procedimiento a realizar:

A partir de cultivos esporulados de *M. anisopliae* en bandejas (sección **6.4**), se preparó una suspensión de conidias en el laboratorio, según Dorta (1990), el mismo día en que se realizó el experimento en el campo. Se transfirió todo el cultivo de la bandeja a un recipiente adecuado, se añadió 4 mL del surfactante Surfactron® al 0,1% por cada gramo de cultivo, y se agitó suavemente por 10 minutos, luego se tamizó con un tamiz de 16 Mesh, eliminando así la composición del medio sólido. Con el uso de una cámara de Neubauer se estimó la concentración de conidias, utilizando un microscopio óptico a una magnificación de 400X, y se ajustó la concentración a  $10^9$  conidias/mL.

Por último, la suspensión de conidias se colocó en un recipiente para su transporte a la granja avícola.

#### **5.7.3.1 Colocación y evaluación de los montajes dentro de los galpones.**

Una vez en la granja, se sumergió en la suspensión de conidias, trozos rectangulares de tela con dimensiones: 60 cm de ancho x 145 cm de longitud, a los cuales previamente se les ajustó en los lados más estrechos, un trozo cilíndrico de metal, para mantener una forma estirada del montaje. Luego se levantaron las telas, y se dejaron escurrir por 10 minutos. Una vez secas se colgaron cuatro montajes, con el uso de un gancho de alambre, en cada galpón y a una altura de 3 m del piso

del mismo. Cada tres semanas se restituyeron los montajes y se realizaron dos aplicaciones. Se estimó la densidad de *M. domestica* post- tratamiento con el uso la rejilla de Scudder (1947).

También, durante cada aplicación se realizaron dos veces a la semana dentro de los galpones avícolas y lugares cercanos varios pases con la malla entomológica, colocando luego lo colectado en recipientes de post-tratamiento y transportándolo al insectario del I.B.E., con el fin de conocer el número de moscas contagiadas por *M. anisopliae*.

Dada la utilización de gasoil o creolina por parte del productor avícola como paliativo de control, no hay posibilidad de tener controles absolutos sin ningún tratamiento.

### **5.8 Análisis estadísticos.**

Utilizando el programa SPSS versión 17.0, se realizaron los análisis de Probit para calcular los  $TL_{50}$ ,  $TL_{95}$  e intervalos de confianza en los bioensayos 6.6.3 y 6.6.4, se compararon los respectivos intervalos de confianza, siendo la superposición de los mismos un indicativo de la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Además, se efectuaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el programa STATISTICA versión 7, los parámetros y reglas utilizadas se presentan a continuación:

## Planteamiento de hipótesis estadística

*Hipótesis nula.*

**H<sub>0</sub>: M<sub>1</sub> = M<sub>2</sub> = ... = M<sub>k</sub>**      “Las poblaciones tienen medias iguales”.

Esto implica que el tratamiento no afectó las poblaciones.

*Hipótesis alternativa.*

**H<sub>1</sub>: alguna M<sub>k</sub> es diferente**      “Al menos alguna población tiene una media diferente”

Esto implica que el tratamiento ejerció efecto.

## Supuestos

-Los datos empleados forman muestras aleatorias, simples e independientes a partir de las poblaciones respectivas.

-Cada una de las poblaciones de las que se extraen las muestras siguen una distribución normal.

-Cada una de las poblaciones tiene la misma varianza (homogeneidad de varianza).

## Regla de decisión

Nivel de significación  $\alpha = 0,05$  (95% de confianza).

Se **acepta H<sub>0</sub>** si la probabilidad (**p**) es **> 0,05**. Esto indica que hay una alta variación producto del azar, por lo que el tratamiento no ejerció efectos sobre la población.

Se **rechaza H<sub>0</sub>** si **p < 0,05**. Esto indica que hay una alta variación producto del tratamiento, por lo que éste sí ejerció efectos sobre la población.

## 6. Resultados y Discusiones

### 6.1 Establecimiento de la cría de *M. domestica*.

En presencia del propietario de la granja avícola "Los Roa", se ubicaron los lugares en los que se observaron gran abundancia de moscas y se llevó a cabo la colecta de adultos de *M. domestica*, con el uso de una malla entomológica, como fue descrito en la sección 5.5.1 (Figura 9). Alrededor de 150 moscas fueron capturadas y colocadas en la jaula, para luego ser transportada y mantenida en el insectario del Laboratorio de Procesos Fermentativos (I.B.E.).



**Figura 9. Colecta de adultos de *M. domestica*.** A la izquierda: pases con malla. A la derecha: jaula con moscas capturadas.

Para realizar la clasificación taxonómica se tomó de la jaula una muestra de diez individuos adultos y se examinó cada uno de ellos en la lupa, usando la guía de Carvalho y Couri (2005) y la guía de adiestramiento de la O.P.S. (1962). De la muestra tomada, ocho individuos pertenecían a la especie *Musca domestica* y los otros dos a diferentes especies de dípteros. La presencia de estos dípteros no deseados en la jaula, donde se encontraba *M. domestica*, no presentó ningún

problema para el desarrollo de la cría, ya que estos son desplazados con el tiempo por ser minoría.

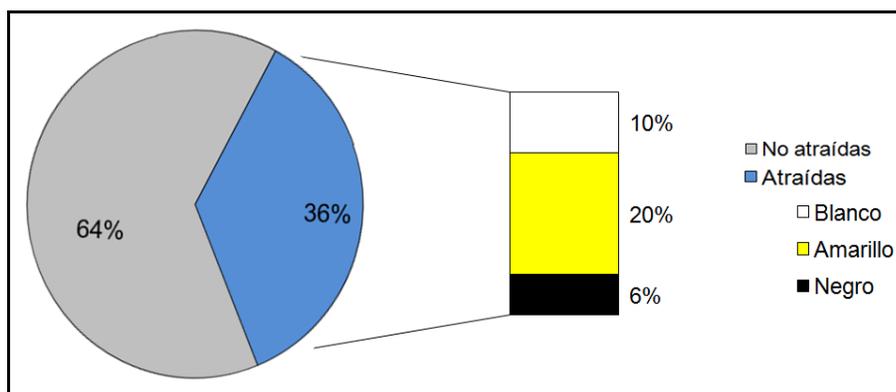
Una vez que la jaula se mantuvo tres días en el insectario, se realizó la obtención de individuos homogéneos utilizando el medio de cría para larvas, según lo descrito en las secciones **5.5.2** y **5.5.3**. Debido a que la temperatura ambiental se encontraba entre 28-32°C, el desarrollo de los huevos hasta los adultos de *M. domestica* tuvo una duración ligeramente mayor a la reportada por Martiradonna en el 2006, donde la temperatura era entre 30-35°C. Al evaluar bajo las condiciones del insectario la duración de las diferentes fases del desarrollo del insecto, se obtuvo que el paso de huevo al estado de pupa tuvo una duración de 5 días y el de éste al estado adulto, 8 días. Los resultados encontrados se ajustan a lo registrado por Keiding (1986), el cual demostró que la duración del ciclo de vida de *M. domestica* se ve afectada directamente por la temperatura ambiental, la humedad y la nutrición de las larvas, particularmente encontró que a medida que la temperatura disminuye, los diferentes estados del ciclo de desarrollo se prolongaban en el tiempo. El autor estimó que a temperaturas entre 30-35°C la fase larval y la pupal podrían durar entre 3 y 5 días, y a temperaturas entre 25-30°C de 5 a 9 días la fase larval y de 5 a 11 días la fase de pupa.

## 6.2 Bioensayos en condiciones de laboratorio.

### A. Determinación del color de tela a usar.

Con el fin de determinar qué color es más atractivo para *M. domestica*, se realizaron ensayos, tal como se describió en la sección 5.6.1. Se contaron cada quince minutos las moscas posadas sobre el área de tres trozos de tela (blanco, amarillo y negro) colocados en la superficie de un recipiente de vidrio. Se utilizaron una cantidad total de moscas adultas de cuatrocientos individuos, llevándose a cabo ocho ensayos. El control consistió en colocar a las moscas sin presencia de ningún trozo de tela para luego observar su distribución en el recipiente.

Una vez obtenidos los resultados se procedió a calcular los porcentajes de *M. domestica* que se posaron sobre cada trozo de tela, así como aquellas que no se posaron en alguno. **(Figura 10)**



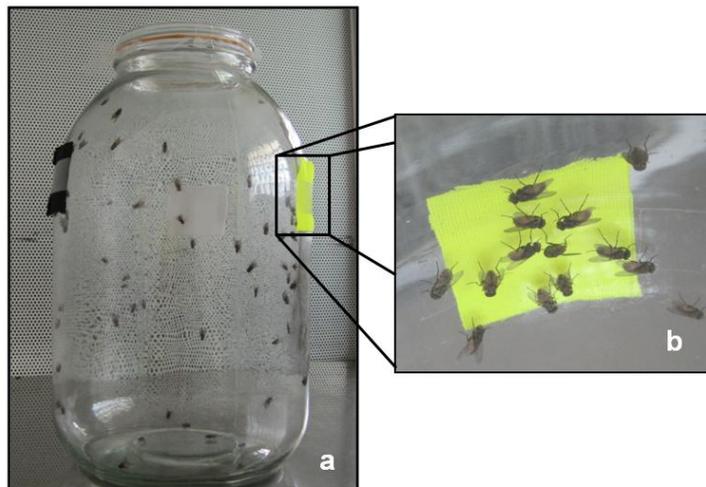
**Figura 10. Porcentajes de moscas que fueron atraídas y no atraídas hacia las telas.**

Se obtuvo que un 36% de la población estudiada se sintió atraída hacia un color, mientras que el 64% no fue atraída hacia ninguno. De los colores utilizados fue amarillo el que más moscas atrajo (20%), seguido del color blanco (10%) y por

último el negro (6%) (**Figura 10**). Las moscas no atraídas presentaron una distribución siempre hacia la abertura del frasco, posándose sobre la tela que actuaba como techo (**Figura 11**). Por otro lado, aquellas que sintieron preferencia por algún color se localizaban de manera aleatoria en toda el área que ocupaba el trozo de tela (**Figura 12**). En el control, los individuos se mantenían en el techo del recipiente, sin ninguna concentración importante en las paredes del mismo.



**Figura 11.** Ensayo para determinar el color de tela a usar. Vista desde arriba de las moscas adultas no atraídas, posadas sobre la tapa del recipiente.



**Figura 12.** (a) Ensayo para determinar el color de tela a usar. (b) Vista desde arriba de las moscas adultas posadas sobre el área del trozo de tela amarillo.

Los resultados demuestran que la mayoría de las moscas no se posaron sobre los trozos de telas, sin embargo este resultado es esperado y corrobora lo indicado por Hecht y col. (1968). Estos autores realizaron experimentos en ambientes luminosos y poco luminosos con *M. domestica*, donde se probaron diferentes tarjetas de colores para evaluar la atracción del insecto, y determinaron que en ambientes luminosos, si bien los colores como el blanco y el amarillo reflejan una longitud de onda que es atrayente para el insecto, no son lo suficientemente atractivos como lo es la luz que emiten bombillos y la luz solar, por tanto fue relativamente bajo el número de individuos atraídos. Sin embargo los autores destacan que dentro de los colores estudiados en ambientes luminosos, es el amarillo el que atrae a un mayor número de moscas.

Para Conlon y Bell (1991) en un ambiente bastante luminoso, el contraste entre colores oscuros y claros toma mayor relevancia en la atracción de *M. domestica* hacia una superficie en particular que una longitud específica de onda, por lo que sugieren que se estudien las superficies que forman el ambiente, para luego escoger los colores adecuados.

Tomando en consideración los resultados obtenidos y que el ambiente dentro de los galpones avícolas que se manejarán son bastante luminosos, pero con superficies de colores oscuros que permiten manipular el contraste para atraer aún más moscas, se utilizará el color amarillo en los montajes para la realización de los bioensayos tanto en el laboratorio como en el campo.

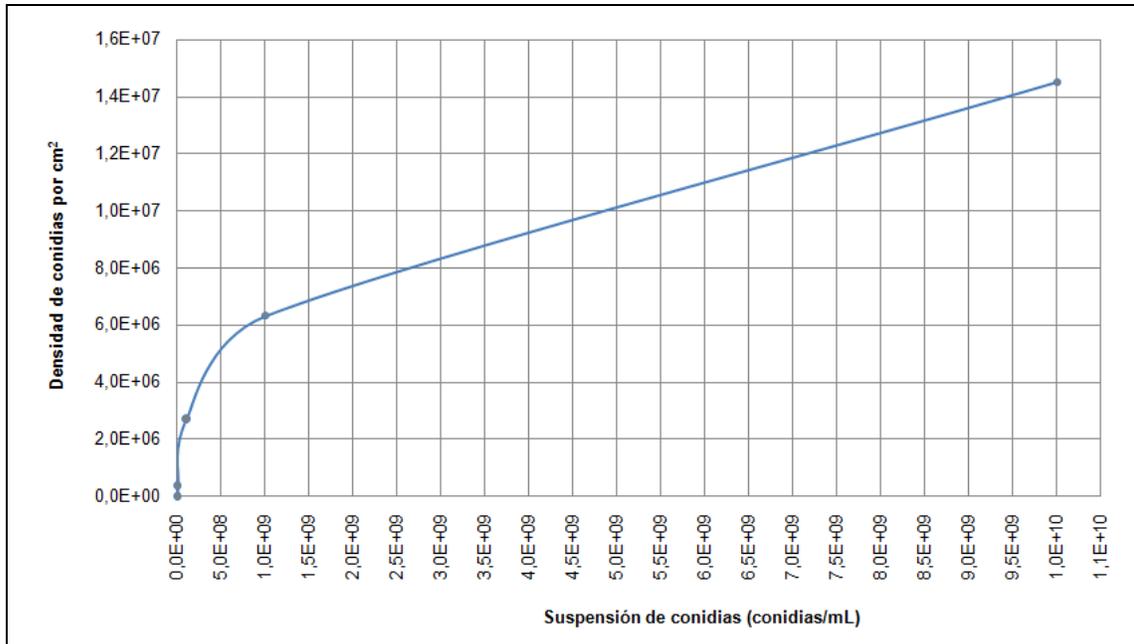
B. Densidad de conidias de *Metarhizium anisopliae* por centímetro cuadrado de tela.

A partir de un cultivo esporulado de *M. anisopliae* en ANDP se prepararon las siguientes suspensiones de conidias:  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$  y  $10^6$  conidias/mL. Se sumergió un trozo de tela 2 cm x 2 cm en cada dilución estudiada y luego se procedió a lavarla en Tween 80<sup>®</sup> al 0,01%, posteriormente se calculó la cantidad total de conidias en la solución de lavado con el uso de una cámara de Neubauer, tal como fue descrito en la sección 5.6.2. Los resultados que se presentan en la **Tabla 1** provienen de haber calculado la concentración de tres trozos de tela por cada dilución, realizándose cuatro estimaciones por cada trozo, para luego ser promediados.

**Tabla 1. Densidades de conidias por cm<sup>2</sup> estimadas por cada suspensión de conidias utilizada.**

Suspensión de conidias (conidias/mL)	Densidad de conidias por cm <sup>2</sup>
$\times 10^6$	$3,89 \times 10^5$
$\times 10^8$	$2,72 \times 10^6$
$\times 10^9$	$6,33 \times 10^6$
$\times 10^{10}$	$1,45 \times 10^7$

Con los resultados de la **Tabla 1** se construyó un gráfico para relacionar la concentración inicial de las diluciones utilizadas con las densidades por cm<sup>2</sup> de conidias estimadas en la tela (**Figura 13**). A medida que se aumentó la suspensión de conidias también lo hizo la densidad por cm<sup>2</sup> presente en la tela. Sin embargo, la presencia de un punto de inflexión, infiere un posible efecto de saturación, dada la capacidad limitada de la tela de soportar las conidias del hongo.

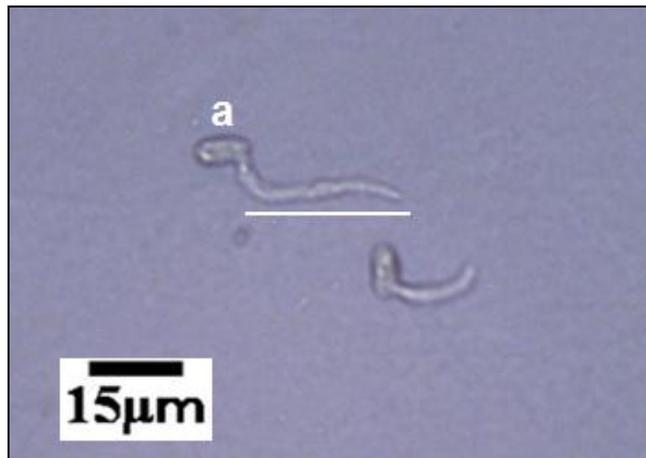


**Figura 13. Densidades de conidias por cm<sup>2</sup> estimadas por cada suspensión de conidias utilizada.**

Además, se encontró que la concentración de la solución de lavado calculada es de varios órdenes de magnitud menor, esto se debió a características intrínsecas de las moléculas del tejido y a la capacidad de adhesión de las esporas de *M. anisopliae*. Este aspecto debe considerarse a la hora de necesitar densidades altas de conidias por cm<sup>2</sup>, lo que necesitaría una adecuada masificación de *M. anisopliae*.

Para los fines de este trabajo, la densidad por cm<sup>2</sup> que se utilizó dependió de dos factores: uno relacionado a la mortalidad, es decir, aquella densidad necesaria para producir el mayor descenso en la población adulta de *M. domestica*, y el otro factor está relacionado a aquella densidad cuyo efecto tuvo mayor durabilidad a través del tiempo, reduciéndose así la necesidad de aplicar nuevamente el hongo.

Una vez conocida la cantidad de esporas capaz de quedar adherida al tejido de la tela, fue necesario determinar el porcentaje de germinación de las mismas, para conocer la viabilidad de las esporas. Para ello se colocó 20  $\mu\text{L}$  de una suspensión a  $10^5$  conidias/mL sobre un portaobjetos con una delgada capa de agar nutritivo, luego se incubó en una cámara húmeda (**Sección 5.6.2**). Cada 12 horas se determinó el porcentaje de germinación de las esporas, tomando en cuenta la medición del tubo germinativo, cuya longitud fue igual o mayor que el doble del diámetro de la espóra (**Figura 14**).

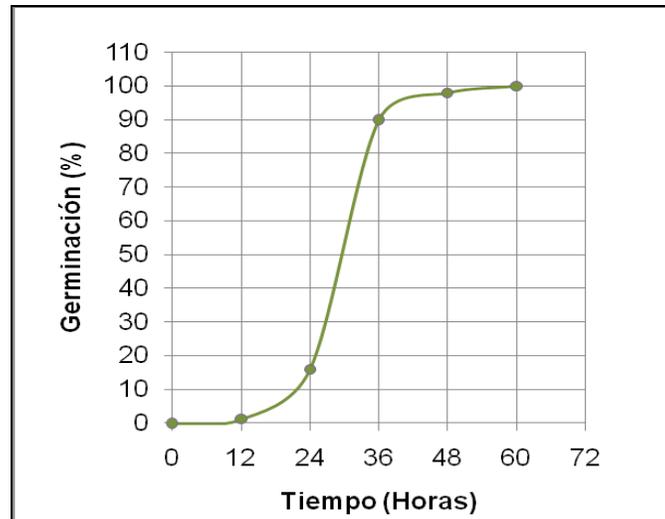


**Figura 14. Conidia germinada (a) y su tubo germinativo (línea continua).** Foto tomada y modificada con una cámara acoplada al microscopio (400x) a las 24 horas.

En la **Tabla 2** se muestran los porcentajes obtenidos de germinación a través del tiempo y con ello se elaboró la **Figura 15**.

**Tabla 2. Germinación de conidias a través del tiempo**

Tiempo (Horas)	Germinación (%)
0	0
12	2
24	16
36	90
48	98
60	100



**Figura 15. Germinación de conidias (%) a través del tiempo (horas).**

En la gráfica se muestra cómo la germinación se incrementa a medida que transcurre el tiempo. Según Alves (1986) en condiciones óptimas de humedad y temperatura, la germinación de las esporas requiere un tiempo mínimo de 12 horas para comenzar a producir el tubo germinativo y comenzar el proceso de germinación. En este caso a las 48 horas de haber comenzado el ensayo se encontró un 98% de germinación, lo que resulta un alto de número de conidias capaces de iniciar el desarrollo vegetativo.

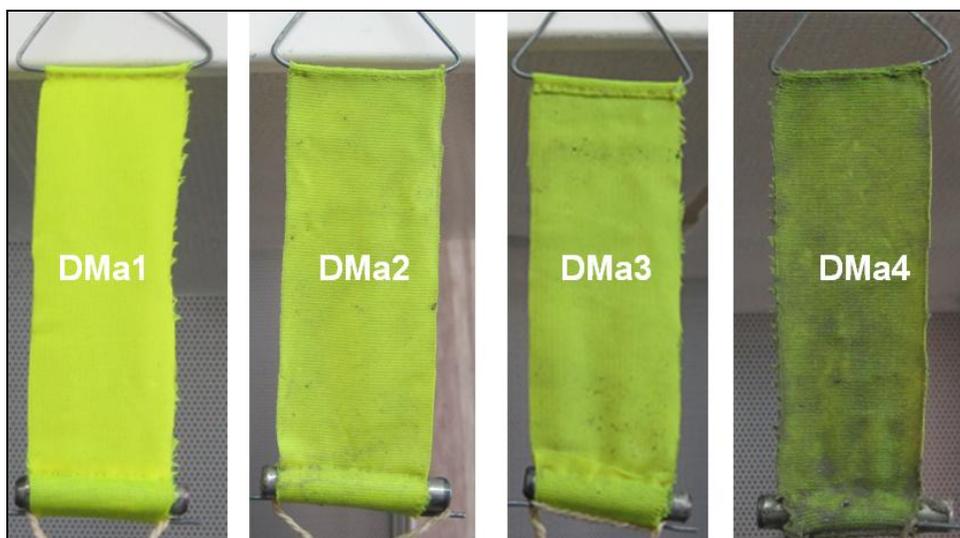
C. Evaluación de la tela como medio para la infección de *M. domestica* con *M. anisopliae*.

Con la finalidad de evaluar la infección de adultos de *M. domestica* al posarse en un lienzo impregnado de conidias de *M. anisopliae*, se llevaron a cabo los bioensayos descritos en la sección 5.6.3. Primeramente se elaboró un montaje donde queda sujeto un trozo de tela amarillo de 12 x 4 cm (**Figura 16**), luego se sumergió en una de las siguientes suspensiones de conidias:  $10^{10}$ ,  $10^9$ ,  $10^8$  y  $10^6$  conidias/mL, obteniéndose densidades de conidias por  $\text{cm}^2$  de  $3,89 \times 10^5$ ,  $2,72 \times 10^6$ ,  $6,33 \times 10^6$  y  $1,45 \times 10^7$  respectivamente.

Cada tratamiento constaba entonces de una densidad de conidias determinada y se asignó una abreviación para facilitar la escritura, denotada por DMA1, DMA2, DMA3, DMA4, respectivamente. Nótese la coloración que adquiere cada uno de ellos. (**Figura 17**).



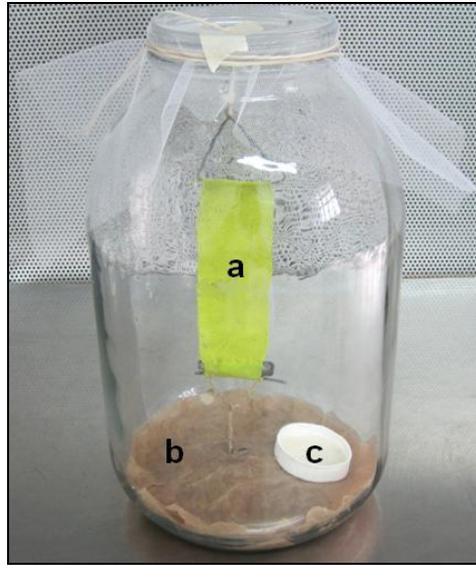
**Figura 16. Montaje con trozo de tela amarillo. (a)** Triángulo de alambre, **(b)** Trozo de tela amarillo 10 x 4 cm, **(c)** Trozo de metal.



**Figura 17. Montajes con diferentes densidades de conidias por cm<sup>2</sup>.** Tratamientos **DMA1**:  $3,89 \times 10^5$  conidias/cm<sup>2</sup>. **DMA2**:  $2,72 \times 10^6$  conidias/cm<sup>2</sup>. **DMA3**:  $6,33 \times 10^6$  conidias/cm<sup>2</sup>. **DMA4**:  $1,45 \times 10^7$  conidias/cm<sup>2</sup>.

El montaje preparado fue colocado dentro de un recipiente post-tratamiento a 10 cm de altura con las condiciones descritas en la sección **5.6.3. (Figura 18)**. Para cada tratamiento se realizaron ocho bioensayos, usando un total de 400 individuos adultos de la mosca.

Conjuntamente se montaron dos controles: **A**, control agua, donde el montaje fue sumergido únicamente en agua destilada estéril y **B** corresponde al control Tween 80<sup>®</sup> 0,01%, en el que el montaje se sumergió en el detergente.



**Figura 18. Esquema de recipiente post-tratamiento. (a)** Montaje sujetado, **(b)** Capa de toallín húmedo, **(c)** Solución de sacarosa.

Por último se colocó un grupo de moscas en cada recipiente post-tratamiento y se comenzó a registrar diariamente la mortalidad. Los resultados a continuación describen la mortalidad diaria acumulada para cada tratamiento, así como los controles realizados. (Tablas 3 y 4)

**Tabla 3. Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado (E1).**

Tratamiento	Densidad de conidias por cm <sup>2</sup>	Mortalidad acumulada por día (%)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DMa1	$3,89 \times 10^5$	0	0	0	0	0	5,25	28,75	39,5	59,5	81	94	100
DMa2	$2,72 \times 10^6$	0	0	0	1,75	46,25	89,75	97,25	100	—	—	—	—
DMa3	$6,33 \times 10^6$	0	0	0	3,25	50,75	97	100	—	—	—	—	—
DMa4	$1,45 \times 10^7$	0	0	6,75	56,5	89,75	100	—	—	—	—	—	—

**Tabla 4. Mortalidad acumulada por día (%) para los controles realizados.**

Control	Mortalidad acumulada por día (%)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Control A (Agua destilada)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control B (Tween 80® 0,01%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

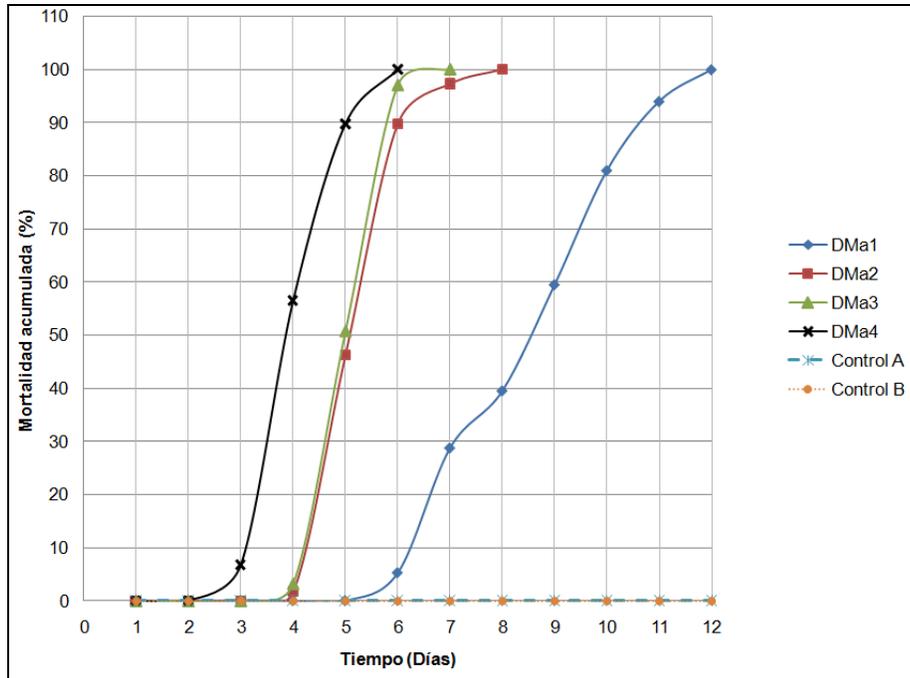
Los cadáveres encontrados en los recipientes de los tratamientos fueron extraídos y desinfectados siguiendo el protocolo usado por Thomas (2009), para

luego ser colocados en cámaras húmedas, a fin de confirmar la micosis como causa de muerte. (**Figura 19**)



**Figura 19. (a) Extracción de los cadáveres de *M. domestica*. (b) Desinfección de los cadáveres, (1) Solución de amonio cuaternario al 10%, (2) Agua estéril destilada. (c) Colocación de los mismos en cámaras húmedas.**

Con los resultados hallados en las cámaras húmedas se corroboró que la causa de muerte en cada uno de los individuos de *M. domestica* fue la micosis, ocasionada por *M. anisopliae*. Por tanto, los resultados presentados en la **Tabla 3**, representan la mortalidad acumulada diaria debido a la infección de *M. anisopliae*. Así mismo, en los controles A y B no hubo ningún descenso en la población estudiada. Con estos datos se elaboró la gráfica a continuación (**Figura 20**)



**Figura 20. Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) (E1).** Se notan los cuatro tratamientos aplicados (DMA1, DMA2, DMA3 y DMA4) y los Controles A y B.

Los resultados de la **Figura 20** demuestran la capacidad de *M. anisopliae* de producir la mortalidad de los adultos de *M. domestica*, alcanzándose en todos los tratamientos el 100% de mortalidad. Se pueden observar los cadáveres de *M. domestica*, donde al cabo de 12 días en cámara húmeda se presenta una importante esporulación de *M. anisopliae*. (**Figura 21**)



**Figura 21. Cadáveres de adultos de *M. domestica* cubiertos por esporulación de *M. anisopliae*.**

Es evidente que la comparación entre los tratamientos efectuados lleva a notar como DMA4, con la mayor densidad de conidias por  $\text{cm}^2$ , fue el que consiguió más rápido la mortalidad total, a los seis días. El tratamiento DMA1 requirió más tiempo en alcanzar el 100% de mortalidad, a los 12 días. En cuanto a DMA2 y DMA3, se evidencia una ligera diferencia en los tiempos requeridos para lograr la mortalidad completa, 7 y 8 días respectivamente.

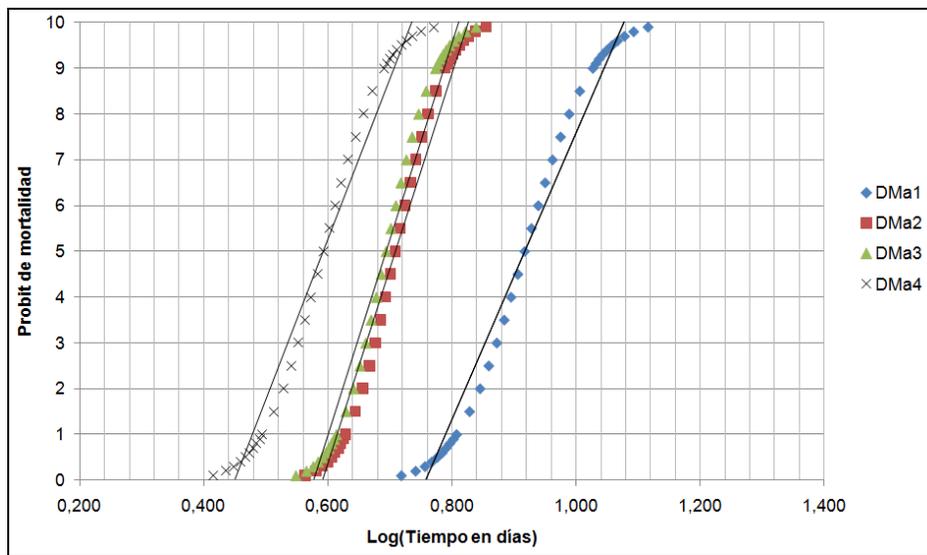
Las diferencias entre los tratamientos, son debidas a la cantidad de esporas que presenta cada uno de ellos por  $\text{cm}^2$ . Al sumergir el trozo de tela en una suspensión, las conidias son retenidas por los tejidos de la tela, formándose una superficie verdosa (**Figura 17**). A medida que la densidad iba incrementándose, se propiciaba aun más el contacto y posible infección de las esporas en el insecto. Si se observa detenidamente los tratamientos DMA2 y DMA3, a simple vista no se evidencia una diferencia importante entre ambos, esto debido a que no hay un margen importante entre sus densidades por  $\text{cm}^2$ ,  $2,72 \times 10^6$  conidias/ $\text{cm}^2$  y  $6,33 \times 10^6$ .

Cabe destacar que, para que se dé la infección del hongo en *M. domestica* esta debe posarse sobre el montaje, por tanto, con los resultados se pudo constatar que la utilización del montaje es lo suficientemente atractivo como para lograr la infección. En la **Figura 22** puede verse gran cantidad de adultos posados en el montaje, inclusive a ambas caras.



Figura 22. Adultos de *M. domestica* posados sobre el montaje preparado.

Posteriormente se realizó el análisis de Probit para calcular los  $TL_{50}$  y  $TL_{95}$  e intervalos de confianza, para realizar una comparación estadística. (Figura 21)



		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>50</sub>	DMA1	8,025	8,950	11,041
	DMA2	5,080	5,209	5,339
	DMA3	4,811	4,940	5,067
	DMA4	3,789	3,914	4,035

		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>95</sub>	DMA1	10,995	11,422	11,963
	DMA2	6,256	6,486	6,794
	DMA3	6,025	6,259	6,579
	DMA4	5,000	5,229	5,539

Figura 23. Análisis de Probit con los tratamientos: DMA1, DMA2, DMA3 y DMA4 (E1). Se muestran los  $TL_{50}$  y  $TL_{95}$  e intervalos de confianza.

La comparación de los intervalos de confianza de los cuatro tratamientos indican que los  $TL_{50}$  y  $TL_{95}$  de los tratamientos DMA2 y DMA3 no se superponen, por tanto son diferentes estadísticamente, sin embargo la gran similitud entre ambos tratamientos hace de esa diferencia muy baja. En el caso de DMA1 y DMA4 la no superposición de los límites es bastante acentuada, lo que hace evidente la diferencia en cuanto a los tratamientos, además se nota como DMA1 presenta el mayor valor en los intervalos y DMA4 es aquél con menor valor.

D. Evaluación a través del tiempo de la tela como medio para la infección de *M. domestica* con *M. anisopliae*.

Un aspecto importante a la hora de desarrollar la metodología en el campo, es lo referente al tiempo o durabilidad que posee el montaje cumpliendo su objetivo de infectar el mayor número de adultos de moscas. Por esta razón se decidió evaluar el montaje utilizado en los bioensayos anteriores a través del tiempo, para ello se retiró el montaje y se colocó en un recipiente post-tratamiento nuevo junto a un grupo de moscas adultas. Igual que en el experimento anterior, se utilizaron 400 moscas adultas para cada tratamiento y los controles A y B, así mismo se realizó el lavado de los cadáveres.

Las **Tablas 5 y 6** reflejan los resultados obtenidos. Si se compara la **Tabla 5** con los resultados obtenidos en la **Tabla 3**, fácilmente se evidencia como se ha prolongado el tiempo necesario para llegar al 100% de mortalidad. El tratamiento DMA1, por no conseguir el 100% de mortalidad durante el periodo de observación no fue introducido en el análisis de Probit.

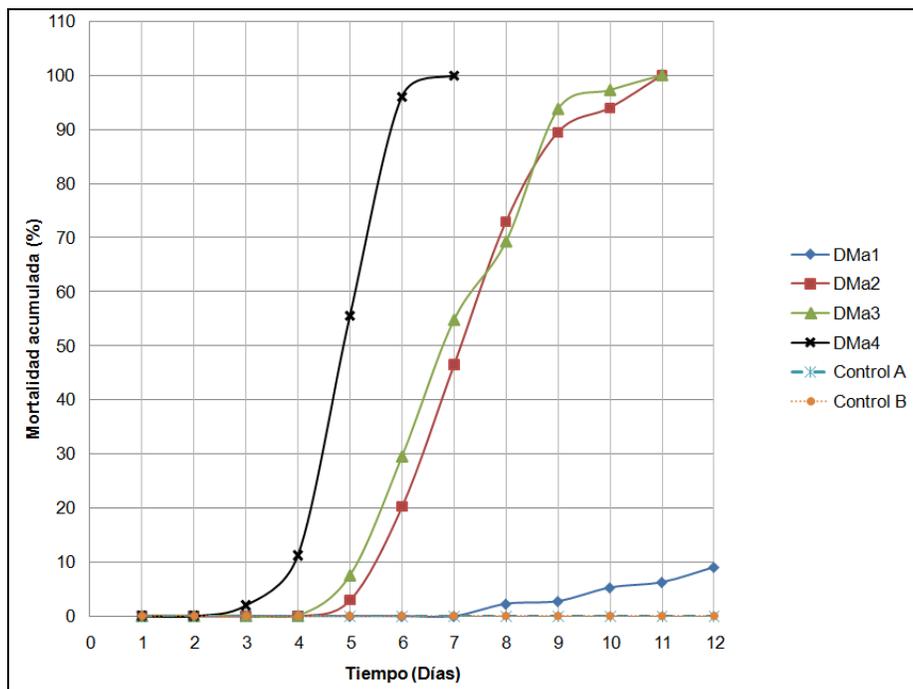
**Tabla 5. Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado. (E2)**

Tratamiento	Densidad de conidias por cm <sup>2</sup>	Mortalidad acumulada por día (%)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DMa1	3,89 x 10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	2,25	2,75	5,25	6,25	9
DMa2	2,72 x 10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	3	20,25	46,5	73	89,5	94	100	—
DMa3	6,33 x 10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	4,25	22,75	45,75	66,5	88,25	97,25	100	—
DMa4	1,45 x 10 <sup>7</sup>	0	0	2	11,25	55,5	96	100	100	100	—	—	—

**Tabla 6. Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado.**

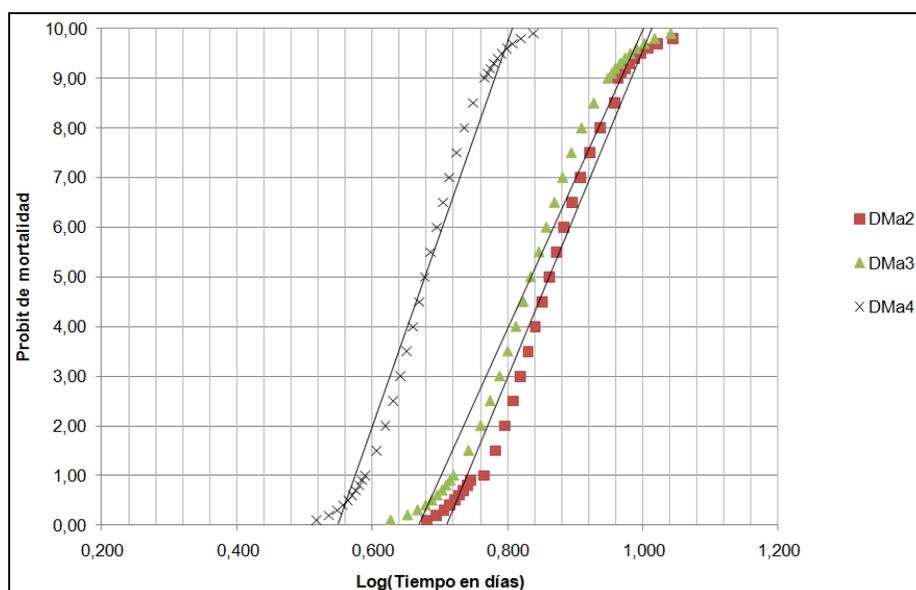
Control	Mortalidad acumulada por día (%)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Control A (Agua destilada)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control B (Tween 80® 0,01%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Con estos datos, se elaboró la **Figura 24**, donde se muestra la mortalidad acumulada por día en **E2**. DMA4 nuevamente alcanzó más rápido el 100% de mortalidad, mientras que DMA1 llegó al 9% durante el periodo de observación. DMA2 y 3 demoraron 3 y 4 días más, en lograr el 100% de mortalidad.



**Figura 24. Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) (E2)** . Se notan los cuatro tratamientos aplicados (DMA1, DMA2, DMA3 y DMA4) y los **Controles A y B**.

Igualmente se realizaron los análisis Probit para obtener los  $TL_{50}$  y  $TL_{95}$  e intervalos de confianza, y así realizar una comparación estadística. (Figura 25)



		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>50</sub>	DMA2	7,103	7,277	7,453
	DMA3	6,653	6,830	7,004
	DMA4	4,365	4,763	5,152

		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>95</sub>	DMA2	9,376	9,732	10,181
	DMA3	9,197	9,566	10,033
	DMA4	6,185	5,615	7,575

Figura 25. Análisis de Probit de E2 con los tratamientos: DMA1, DMA2, DMA3 y DMA4. Se muestran los  $TL_{50}$  y  $TL_{95}$  e intervalos de confianza.

En este caso la comparación de los intervalos de confianza en  $TL_{50}$  resultó en la no superposición de ninguno de los tratamientos. En los  $TL_{95}$  de DMA2 y DMA3 se observó la superposición, caso contrario con DMA4. Este último posee valores de  $TL_{50}$  y  $TL_{95}$  con apenas un día de diferencia respecto a los obtenidos en la Figura 23. DMA2 y DMA3 produjeron más altos  $TL_{50}$  y  $TL_{95}$  que los anteriormente conseguidos.

También se efectuaron los ensayos 3 y 4 (**E3** y **E4**) para continuar la evaluación del montaje. La **Tabla 7** muestra los porcentajes de mortalidad obtenidos en **E3**, así como los controles respectivos (**Tabla 8**).

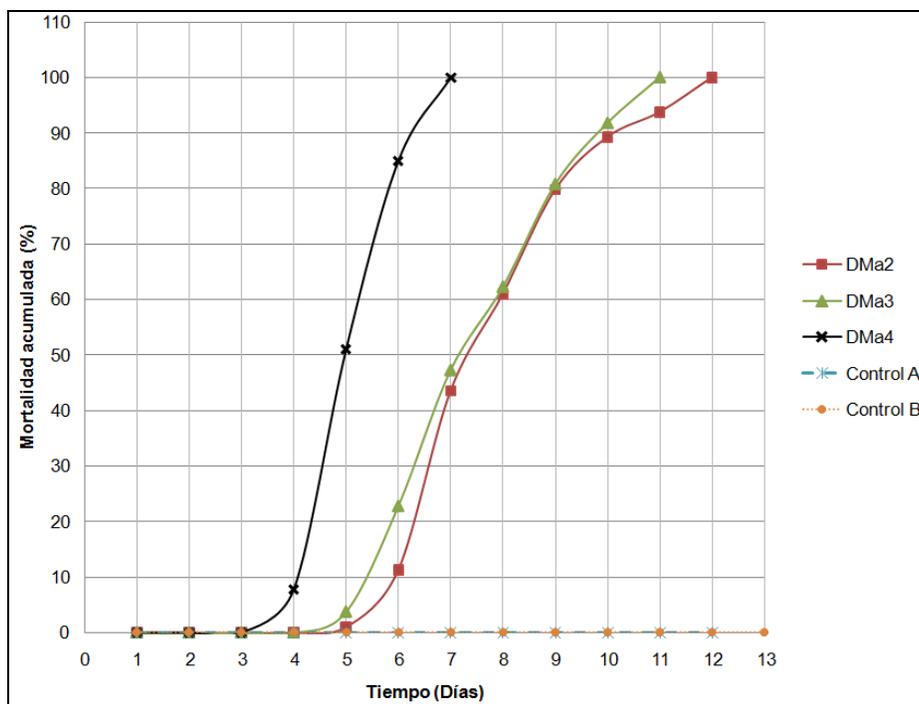
**Tabla 7. Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado. (E3)**

Tratamiento	Densidad de conidias por cm <sup>2</sup>	Mortalidad acumulada por día (%)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DMa2	2,72 x 10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	1	11,25	43,5	61	79,75	89,25	93,75	100
DMa3	6,33 x 10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	3,75	22,75	47,25	62,25	80,75	91,75	100	-
DMa4	1,45 x 10 <sup>7</sup>	0	0	0	7,75	51	85	100	-	-	-	-	-

**Tabla 8. Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado.**

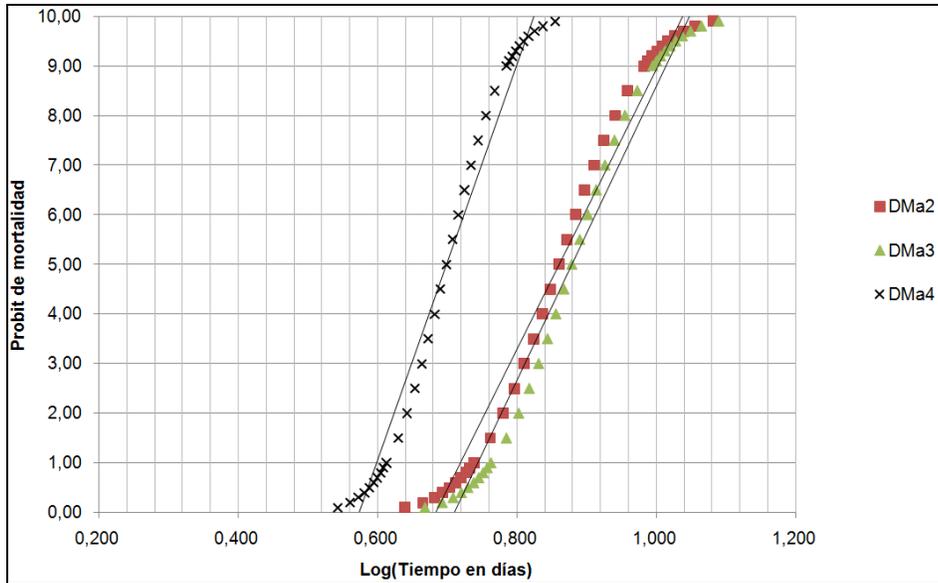
Control	Mortalidad acumulada por día (%)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Control A (Agua destilada)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control B (Tween 80® 0,01%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

La gráfica de la **Figura 26** muestra los porcentajes de mortalidad conseguidos en E3 a través del tiempo (días).



**Figura 26. Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) (E3).** Se notan los tres tratamientos aplicados (DMA2, DMA3 y DMA4) y los Controles A y B.

De igual forma se elaboró el análisis de Probit. (Figura 27)



		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>50</sub>	DMA2	7,373	7,562	7,748
	DMA3	7,063	7,252	7,440
	DMA4	4,867	4,998	5,128

		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>95</sub>	DMA2	10,263	10,660	11,157
	DMA3	9,973	10,402	10,950
	DMA4	6,198	6,447	6,784

**Figura 27. Análisis de Probit de E3 con los tratamientos: DMA2, DMA3 y DMA4.** Se muestran los TL<sub>50</sub> y TL<sub>95</sub> e intervalos de confianza.

Sigue manteniéndose la no superposición de los valores de TL<sub>50</sub> en DMA2 y DMA3, mientras que en TL<sub>95</sub> se hace más pronunciada. El tiempo requerido para que los tres tratamientos consiguiesen el 100% de mortalidad es de apenas un día mayor comparado con los valores de E2. DMA4 continuó registrando los menores valores de TL<sub>50</sub> y TL<sub>95</sub>.

De igual forma se realizaron los ensayos correspondientes a E4. Las tablas 9 y 10 muestran los resultados obtenidos.

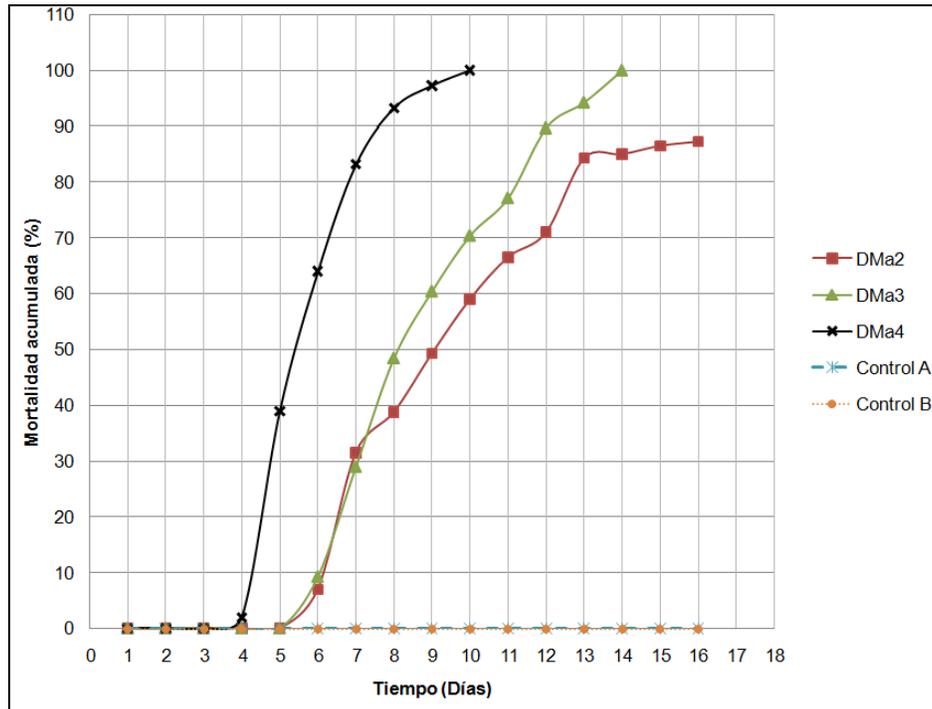
**Tabla 9. Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado. (E4)**

Tratamiento	Densidad de conidias por cm <sup>2</sup>	Mortalidad acumulada por día (%)															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Dma2	2,72 x 10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	7	31,5	38,75	49,25	59	66,5	71	84,25	85	86,5	87,25
Dma3	6,33 x 10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	9,25	29	48,5	60,5	70,5	77,25	89,75	94,25	100	-	-
Dma4	1,45 x 10 <sup>7</sup>	0	0	0	2	39	64	83,25	93,25	97,25	100	-	-	-	-	-	-

**Tabla 10. Mortalidad acumulada por día (%) para cada tratamiento realizado.**

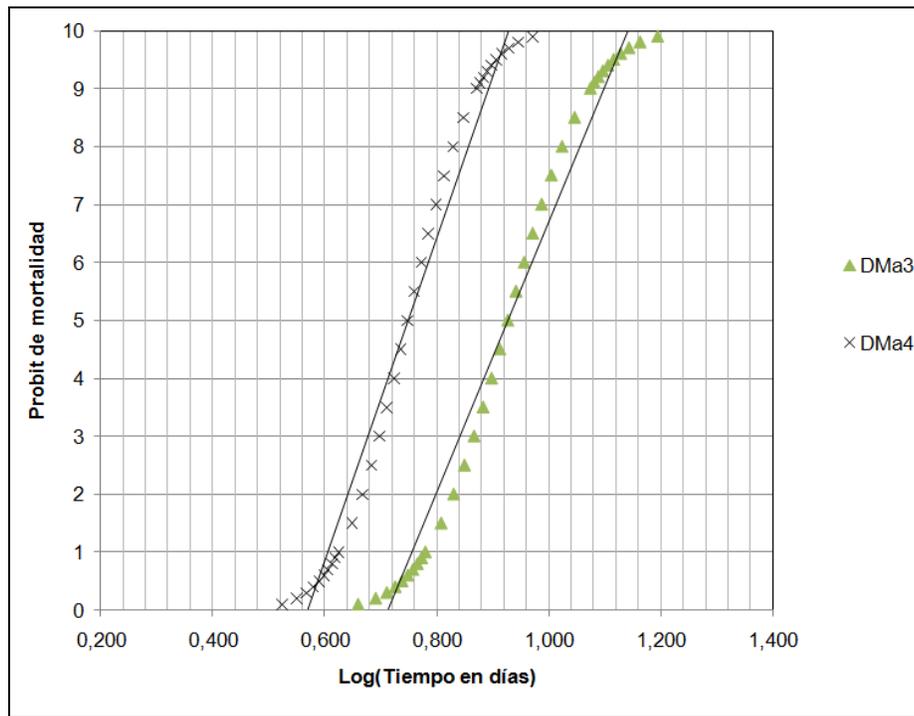
Control	Mortalidad acumulada por día (%)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Control A (Agua destilada)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control B (Tween 80® 0,01%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En la **Figura 28** se observa como el tratamiento Dma2 no logró alcanzar el ciento por ciento de mortalidad (**Tabla 9**), por lo que no fue incluido en el análisis de Probit. Además, es notable el aumento en el tiempo necesario para producir el 100% de mortalidad en los tres tratamientos.



**Figura 28. Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) (E4). Se notan los tres tratamientos aplicados (Dma2, Dma3 y Dma4) y los Controles A y B.**

La **figura 29** presenta el análisis de Probit correspondiente a **E4**.



		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>50</sub>	DMA3	7,718	8,056	8,485
	DMA4	5,428	5,598	5,762

		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>95</sub>	DMA3	13,075	12,522	13,761
	DMA4	8,226	8,453	8,676

**Figura 29. Análisis de Probit de E4 con los tratamientos: DMA3 y DMA4.** Se muestran los TL<sub>50</sub> y TL<sub>95</sub> e intervalos de confianza.

El análisis de Probit (**Figura 29**) indica valores de TL<sub>50</sub> y TL<sub>95</sub> de DMA3 y DMA4 mayores con respecto a los encontrados en **E3**, sin embargo la diferencia entre DMA3 y DMA4 indica la no superposición de los tratamientos.

Como era de esperarse los valores obtenidos de porcentaje de mortalidad encontrados en **E2**, **E3** y **E4**, son evidencia del decaimiento del poder infeccioso de los montajes sobre los adultos de la mosca, dicha pérdida, pudo deberse a la alta humedad y temperatura presente en el recipiente de post-tratamiento y en el

laboratorio, que generaron condiciones para que se diera la germinación de algunas conidias sobre la tela. (**Figura 30**)



**Figura 30. Fibras del tejido amarillo del tratamiento DMA2 en E4. Nótese la presencia de conidias germinadas.** Foto tomada y modificada con una cámara acoplada al microscopio (400x)

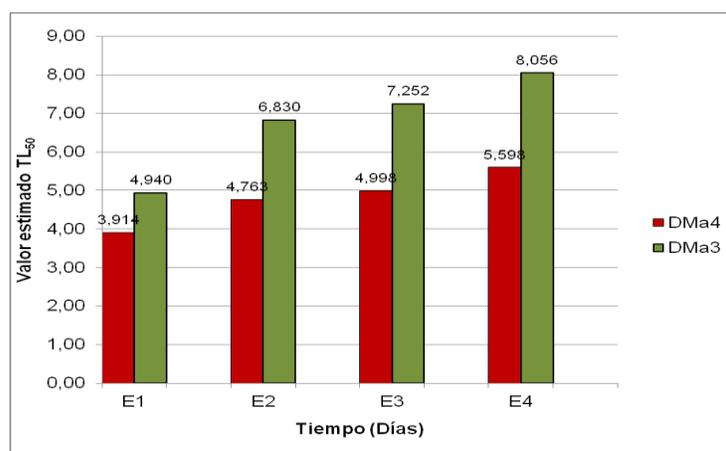
También se debe tomar en cuenta el crecimiento de *M. anisopliae* en el algodón embebido en solución de sacarosa, lo que demuestra que, si bien las conidias del hongo se adhirieron a la mosca cuando esta se posó en la tela, algunas fueron transportadas desde el cuerpo del insecto a otra superficie, por lo tanto no todas las conidias adheridas terminaron infectando a *M. domestica*. (**Figura 31**).



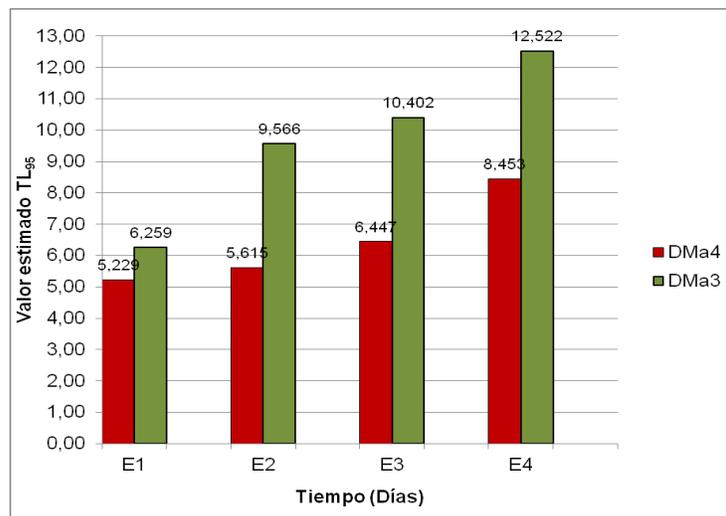
**Figura 31. Crecimiento de *M. anisopliae* en algodón embebido en solución de sacarosa.** Foto tomada y modificada con una cámara acoplada al microscopio (400x).

Con los resultados obtenidos se encontró que DMA3 y DMA4 consiguieron una mortalidad del 100% en todos los ensayos realizados. Sin embargo, existe una diferencia entre los  $TL_{50}$  y  $TL_{95}$  de DMA3 y DMA4, la cual, va aumentando en cada ensayo (**Figuras 32 y 33**). Dado que ambas densidades son eficaces, su selección va a depender del posible aspecto comercial de la metodología aquí explicada, por

lo que debe recordarse que para la obtención de DMA4 se requirió una suspensión de  $10^{10}$  conidias/mL, mientras en DMA3 fue de  $10^9$  conidias/mL, la diferencia en el orden de magnitud entre ambas suspensiones significaría un costo adicional, por lo tanto DMA3 fue la densidad seleccionada para los experimentos a desarrollar. Sin embargo, deben hacerse estudios más exhaustivos en relación con los costos de producción y los datos de mortalidad.

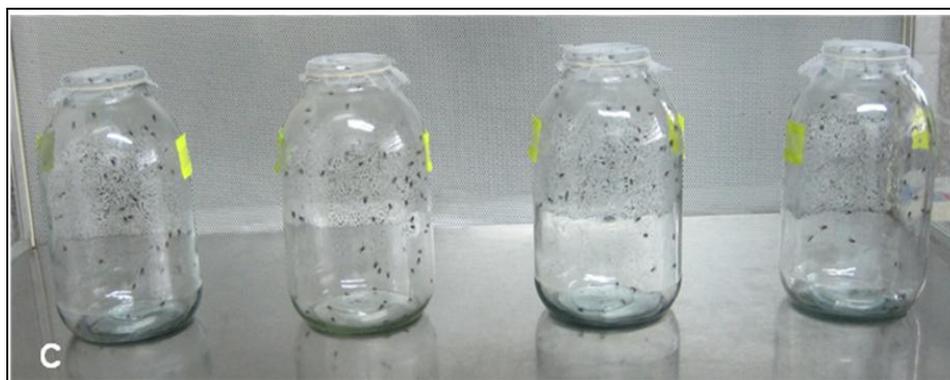
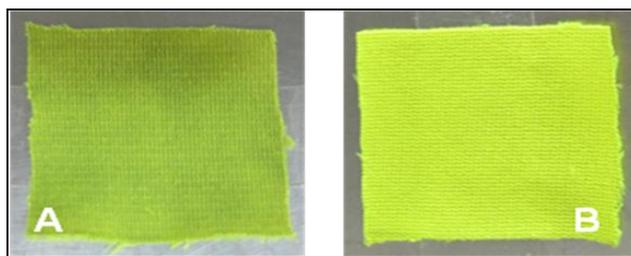


**Figura 32. Comparación entre los valores estimados de TL<sub>50</sub> obtenidos en E1, E2, E3 y E4 de DMA3 y DMA4.**



**Figura 33. Comparación entre los valores estimados de TL<sub>95</sub> obtenidos de E1, E2, E3 y E4 de DMA3 y DMA4.**

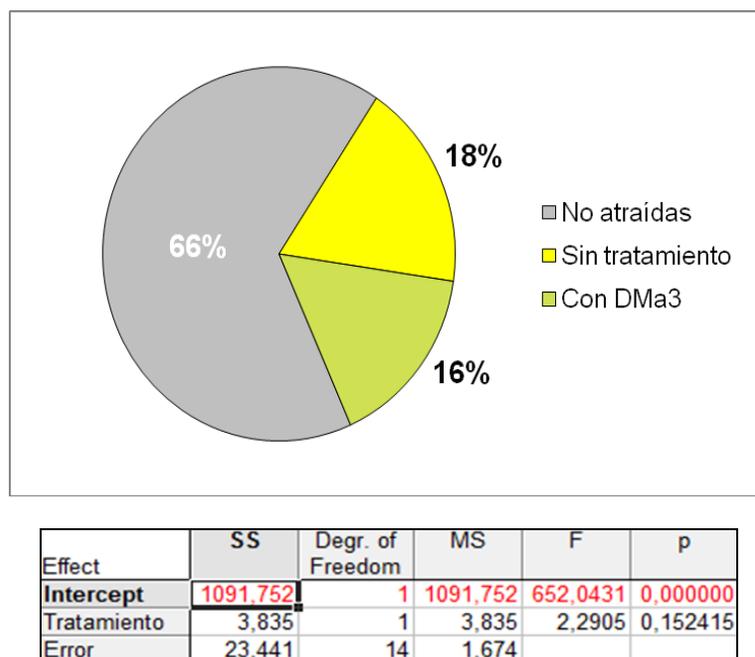
Al decidir trabajar con DMA3, un punto importante que debió estudiarse es lo referido a la tinción verdosa que sufre la tela del montaje al ser sumergida en la suspensión de conidias de  $10^9$  conidias/mL (**Figura 34**), por ello se realizó un ensayo similar al descrito en la sección **5.6.1**, para descartar un posible efecto que alterase la atracción de la mosca adulta hacia el montaje verdoso. En este caso, se realizaron los ocho ensayos utilizando trozos de tela de 4 x 4 cm sin tratamiento y trozos sumergidos en suspensión de  $10^9$  conidias/mL, se registró cada 15 minutos los adultos posados sobre el área de cada trozo de tela (**Figura 34**).



**Figura 34. (A) Trozo de tela con DMA3. (B) Trozo de tela sin tratamiento. (C) Algunos ensayos realizados.**

Se desarrolló la grafica a partir de los resultados registrados (**Figura 35**) y se encontró un 66% de moscas no atraídas hacia alguno de los trozos, la tela sin tratamiento atrajo un 18% y solo un 16% de los adultos se posó sobre el trozo con DMA3. Se realizó un prueba de análisis de varianza (ANOVA), estimándose un valor

de p mayor a 0,05 (**Figura 35**) con lo que se aceptó la hipótesis nula, entonces no existe una diferencia significativa entre los trozos de tela estudiados, lo que implica que la coloración verdosa en la tela no será un factor importante a la hora de evaluar la atracción del insecto al montaje en los experimentos siguientes.



**Figura 35. (A) Porcentajes de moscas no atraídas y atraídas hacia los trozos de tela con y sin DMA3. Abajo ANOVA correspondiente. (B) ANOVA.**

E. Evaluación de la patogenicidad de *M. anisopliae* sobre diferentes grupos etarios de *M. domestica*.

Se desarrollaron bioensayos usando la densidad DMA3 para determinar la patogenicidad de *M. anisopliae* sobre diferentes grupos etarios de adultos de *M. domestica*, tal como se describen en la sección **5.6.5**.

Se realizaron ocho bioensayos (400 individuos adultos) para cada grupo etario, y se implementó la siguiente clasificación: **grupo A** (recién eclosionados), **grupo B**

(5 días), **grupo C** (10 días), **grupo D** (15 días), **grupo E** (20 días), **grupo F** (25 días) y **grupo G** (30 días post-eclosión).

Como control se estableció el control B, ya descrito, para cada grupo e igualmente los cadáveres encontrados fueron lavados y desinfectados para determinar si la micosis fue la causa de muerte.

En la **Tabla 11** se observa la mortalidad acumulada por día, en cada grupo etario con el tratamiento DMA3, se aprecia como en los cinco casos se alcanza el 100% de mortalidad debido a la infección de *M. anisopliae*. Adicionalmente la **Tabla 12** muestra la mortalidad acumulada encontrada en los controles, donde no se reportó ningún descenso.

**Tabla 11. Mortalidad acumulada por día (%) para los grupos A, B, C, D, E.**

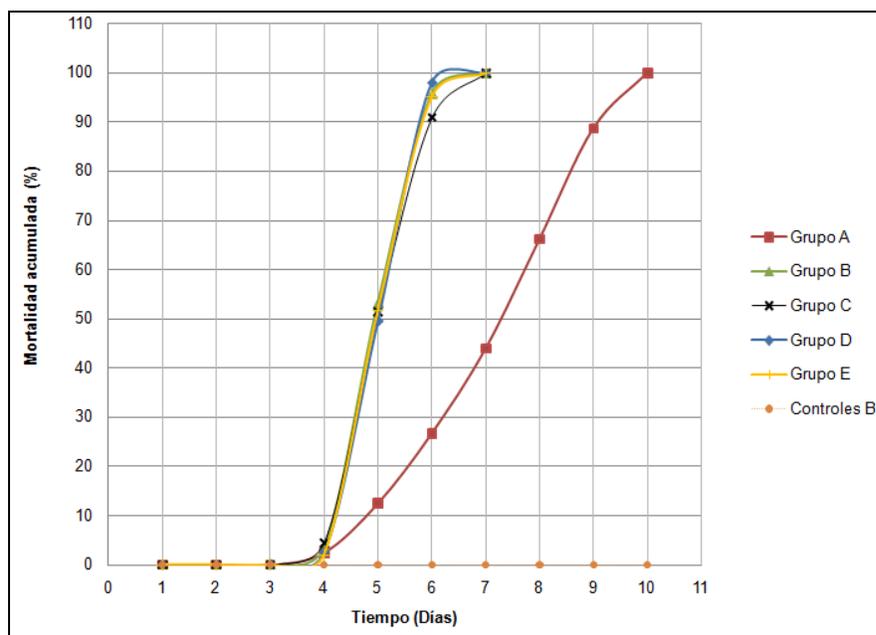
Grupo etario	Mortalidad acumulada por día (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Grupo A (0 días)</b>	0	0	0	2,5	12,5	26,75	44	66,25	88,75	100
<b>Grupo B (5 días)</b>	0	0	0	3,5	53,25	95,75	100	-	-	-
<b>Grupo C (10 días)</b>	0	0	0	4,5	51,5	91	100	-	-	-
<b>Grupo D (15 días)</b>	0	0	0	2,5	49,5	98	100	-	-	-
<b>Grupo E (20 días)</b>	0	0	0	2	51,75	95,25	100	-	-	-

**Tabla 12. Mortalidad acumulada por día (%) para los controles realizados.**

Control B (Tween 80® 0,01%)	Mortalidad acumulada por día (%)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Grupo A (0 días)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Grupo B (5 días)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Grupo C (10 días)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Grupo D (15 días)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Grupo E (20 días)</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

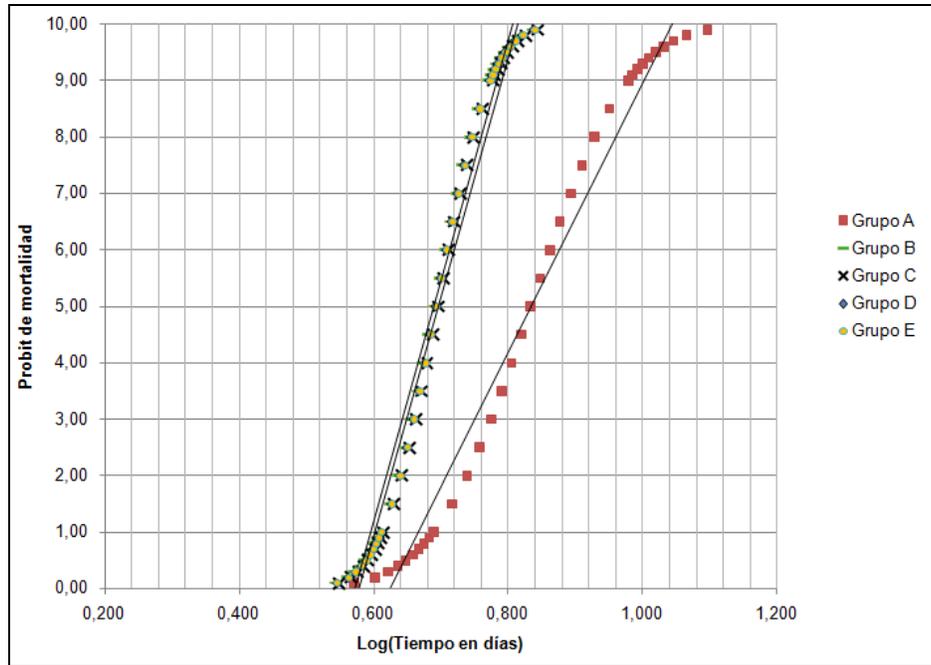
Con estos datos, se elaboró la **Figura 36**, en la cual se representa la mortalidad acumulada por día de los grupos y de los controles. Las moscas adultas de los **grupos B, C, D y E** comenzaron a morir a partir del cuarto día hasta el total

de mortalidad en el séptimo día, estos resultados son similares a los conseguidos con DMA3 en la **Tabla 3**. Por otro lado, si bien el **grupo A** registró descensos en el cuarto día claramente requirió un tiempo mayor para alcanzar el total de mortalidad.



**Figura 36. Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días).** Se observan los cinco grupos etarios estudiados y el Control B.

Con los datos de la **Tabla 11**, se procedió a realizar los análisis de Probit, que se muestran en la **Figura 37**.



		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>50</sub>	A	6,430	6,818	7,220
	B	4,769	4,899	5,026
	C	4,834	4,964	5,090
	D	4,641	4,913	5,174
	E	4,801	4,932	5,060

		Limite inferior	Valor estimado	Limite superior
TL <sub>95</sub>	A	9,518	10,456	12,049
	B	5,985	6,222	6,546
	C	6,074	6,311	6,633
	D	5,819	6,242	7,058
	E	6,028	6,267	6,595

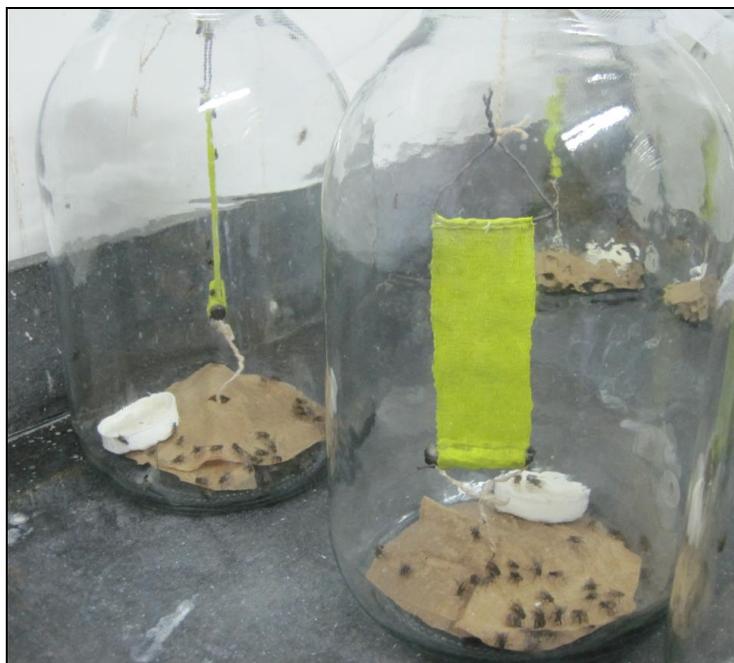
**Figura 37. Análisis de Probit de los grupos A, B, C, D, E.** Se muestran los TL<sub>50</sub> y TL<sub>95</sub> e intervalos de confianza.

Con los resultados aportados por los análisis de Probit, se pudo evidenciar como los **grupos B, C, D y E**, no presentaron diferencia estadísticamente significativa en cuanto a los tiempos letales, por ende, las edades de los individuos manejados no interfirieron con el proceso de infección de *M. anisopliae* sobre las moscas adultas, con esto se corrobora lo obtenido en la **Figura 36** donde se nota la clara superposición en los valores conseguidos de mortalidad en los grupos

mencionados. El grupo **A** presentó diferencia significativa en relación a los otros grupos, y arrojó valores de tiempos letales superiores.

El comportamiento que presentaron los bioensayos realizados con el grupo **A**, pudo deberse a lo inmaduro de los adultos recién nacidos. Keiding (1986), indica que los adultos recién eclosionados de *M. domestica* requieren entre 60 y 90 minutos, a altas temperatura y humedad relativa, para que se complete el proceso de bombeo de alas y endurecimiento de la cutícula del insecto, esta condición hace que sean incapaces de volar y solo puedan realizar pequeños saltos, luego de varias horas los adultos están en disposición de volar ampliamente.

Lo observado en los bioensayos con el grupo **A**, concuerda con lo descrito por Keiding, dado que la gran mayoría de los recién nacidos en el primer día de establecido el bioensayo, se ubicaron en el fondo del recipiente de post-tratamiento (**Figura 38**). Además, a partir de los tiempos letales obtenidos para este grupo, se podría inferir que el proceso de maduración de los recién nacidos tuvo un efecto considerable, más de lo esperado, lo que atrasó el proceso de infección sobre los adultos, si bien se produjo el total de mortalidad en la población.



**Figura 38. Bioensayos con grupo A. (Día 1).**

En cuanto a los grupos **F** y **G** y sus respectivos controles, fueron encontrados en las cámaras húmedas, cadáveres que no presentaron durante el tiempo de observación, evidencia de esporulación de *M. anisopliae*, por tanto fueron atribuidos a muerte por causa natural (**Figura 39**); se recuerda que en estos dos grupos las moscas se encuentran en edad avanzada, por lo que era esperado el apareamiento de estos descendos. Esto conlleva a descartar a los grupos **F** y **G** en los análisis de Probit, por no alcanzar la dosis diagnóstica.



**Figura 39. Cámara húmeda del grupo G con presencia de cadáveres debido a *M. anisopliae* y por causas naturales. Se indican algunos de los cadáveres por causas naturales.**

Debido a lo encontrado en los bioensayos con los **grupos F y G**, los resultados se muestran en las **Tablas 13 y 14** donde además de la mortalidad por *M. anisopliae*, se marcó en rojo la mortalidad acumulada por día debido a causas naturales.

**Tabla 13. Mortalidad acumulada por día (%) para cada los grupos F y G.**

Grupo etario	Mortalidad acumulada por día (%)													
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Grupo F (25 días)	0	0	0	0	0	0	4,5	0	45,5	0	65	2,25	87,25	12,75
Grupo G (30 días)	0	0	0	11,75	0	22	6	31,75	47	40	53	47	-	-

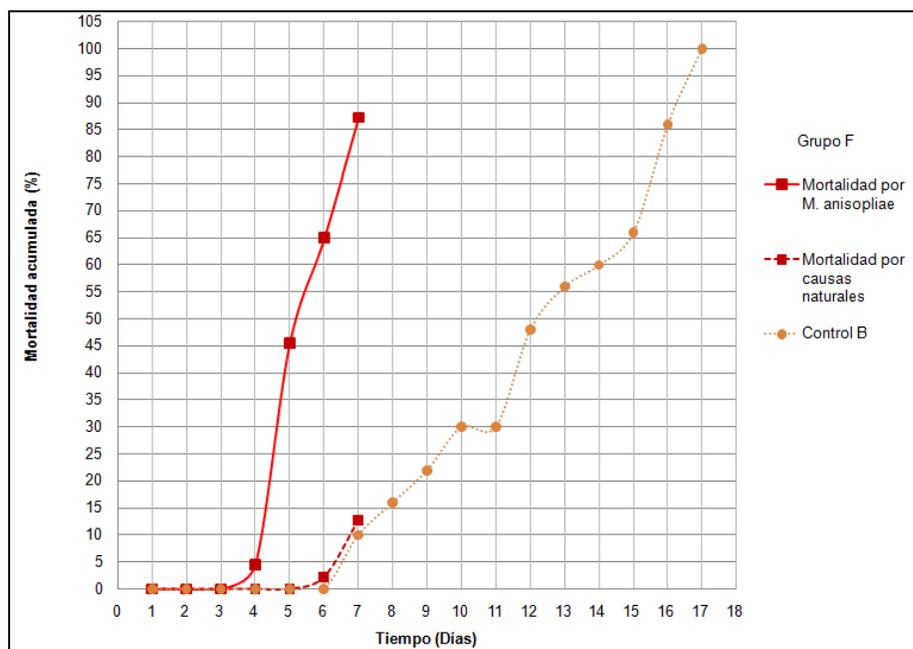
**Tabla 14. Mortalidad acumulada por día (%) para los controles realizados.**

Control B (Tween 80® 0,01%)	Mortalidad acumulada por día (%)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Control (25 días)	0	0	0	0	0	0	10	16	22	30	30	48	56	60	66	86	100
Control (30 días)	0	16	22	38	38	52	58	76	88	90	100	-	-	-	-	-	-

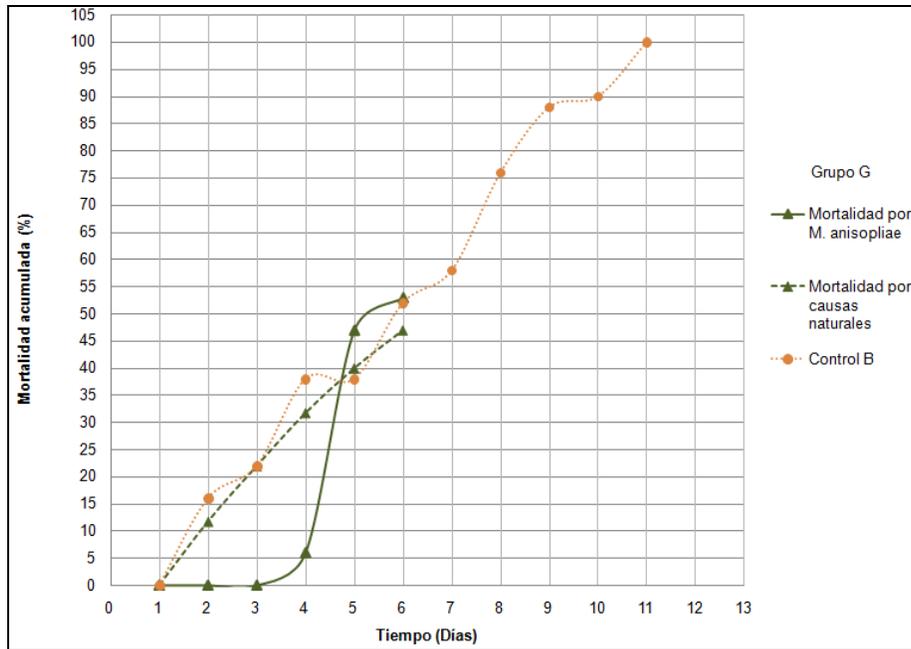
Según lo registrado, en los bioensayos realizados con el grupo **F** se alcanzó la mortalidad total en el séptimo día, siendo un 87,25% responsable por *M. anisopliae* y un 12,75% por causas naturales; En el grupo **G**, la mortalidad total se registró más temprano, al sexto día, siendo por causas naturales el 47% de los descensos y apenas el 53% por la infección del hongo (**Tabla 13**).

En cuanto a los controles, se nota como se registraron descensos en el grupo **G**, más temprano y de mayor magnitud que en el grupo **F**. En ambos se alcanzó el total de mortalidad de los adultos de *M. domestica* a los 41 y 42 días de edad respectivamente (**Tabla 14**).

Con los datos se elaboraron las **figuras 40 y 41** donde se muestra la mortalidad acumulada por día, pero distinguiendo entre la mortalidad obtenida por acción del hongo y aquellos descensos por causas naturales. Igualmente se observan los muertos conseguidos en los controles.



**Figura 40. Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) en el Grupo F y el Control B.** Nótese la mortalidad por infección de *M. anisopliae* (línea continua) y la mortalidad por causas naturales (línea segmentada). Se muestra además la mortalidad en el control (línea punteada).



**Figura 41. Mortalidad acumulada (%) a través del tiempo (Días) en el Grupo G y el Control B.** Se muestra la mortalidad por infección de *M. anisopliae* (línea continua) y la mortalidad por causas naturales (línea segmentada). Se representa además la mortalidad en el control (línea punteada).

Con las **figuras 40** y **41** se observa claramente como la edad avanzada de las moscas implicó una pérdida natural de la población de estudio lo que influyó en los porcentajes de mortalidad por acción de *M. anisopliae* y por ende, se disminuyó la patogenicidad en la población estudiada, debido a una reducción natural en la población.

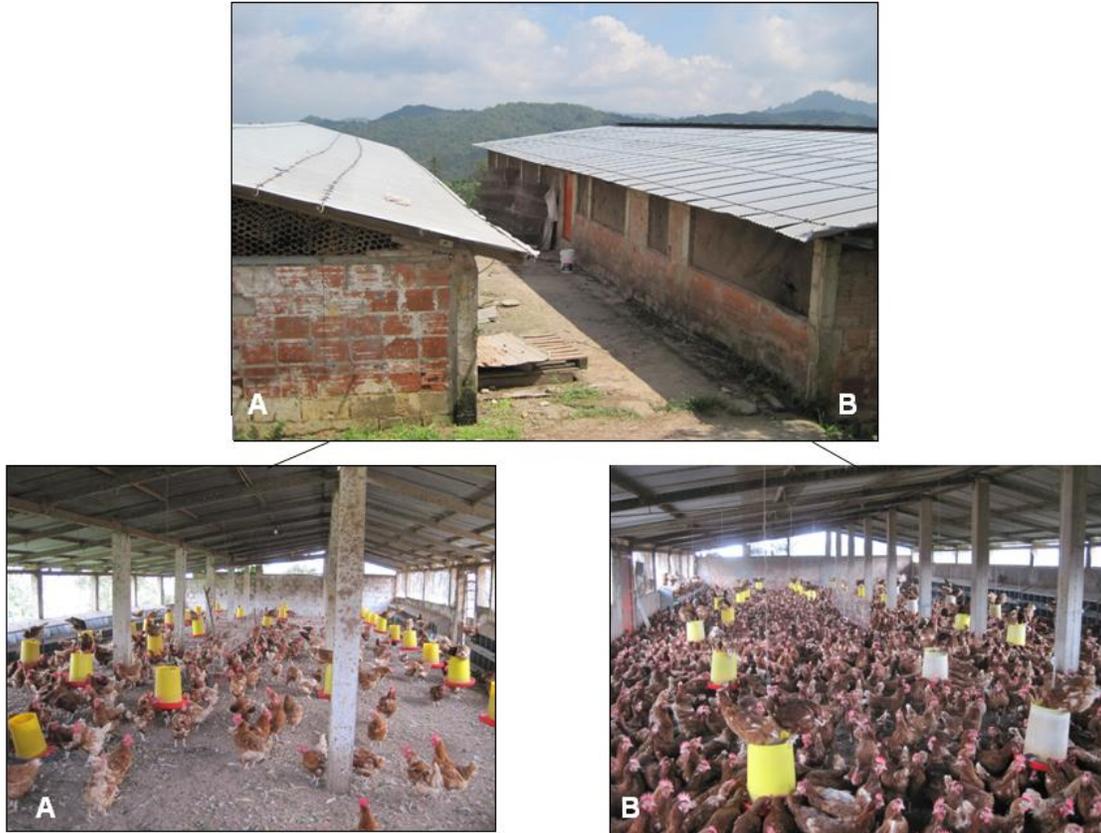
Los bioensayos realizados con los grupos **A, B, C, D, E, F** y **G** tenían como fin evaluar un posible efecto de la edad en la patogenicidad de *M. anisopliae* sobre adultos de *M. domestica*, los resultados obtenidos permitieron descartar este efecto en poblaciones comprendidas entre los 5-20 días; sin embargo en los grupos **F** y **G** la edad fue un factor restante de individuos y la patogenicidad se vio disminuida, por otra parte la edad prematura de los adultos de moscas domesticas en el grupo **A** implicó el retraso en la obtención del total de mortalidad, pero se obtuvo el 100% de

mortalidad, por tanto si bien los tiempos letales estimados fueron altos, la patogenicidad no se afectó.

Para los efectos de este trabajo, el efecto de la edad de adultos recién eclosionados (0 días) y de avanzada edad (25 y 30 días) de *M. domestica* en la patogenicidad de *M. anisopliae*, que pudiese generar un aporte inusual a la hora de evaluar la metodología a implementar, no es relevante. Esto debido a que ambos extremos de edades no se encuentran en cantidades representativas en el campo, Avancini y Silveira (2000) indicaron que la mayoría de la población de adultos de mosca domestica capturada en el interior del galpón avícola estudiado se trataba de adultos de edad madura, por su capacidad de copular y ovoposicionar, mientras que la cantidad de adultos recién eclosionados capturados (inmaduros sexualmente) fue muy baja. Por otro lado, Keiding (1986) indica que los adultos de *M. domestica* que son criados bajo condiciones de laboratorio sobrepasan enormemente la expectativa de vida de aquellos adultos encontrados en el campo.

### **6.3. Experimentos en campo.**

Para el desarrollo del trabajo en campo, el avicultor permitió la utilización de dos galpones vecinos, los cuales fueron identificados como galpón **A** y **B** (**Figura 42**).



**Figura 42. Galpones a utilizar en el trabajo de campo.** Se indica los galpones A y B.

A. Variables temperatura y humedad relativa (H.R.) en el galpón.

Con el uso de un termómetro de máx. y min. y un higrómetro, se monitorearon ambas variables tres veces al día (9:00 am, 1:00 pm y 5:00 pm), tres veces a la semana, durante la semana previa a la primera aplicación del hongo y luego al transcurrir cada semana hasta el fin de las aplicaciones.

Tanto el termómetro como el higrómetro fueron colocados dentro del galpón a una altura aproximada de 1,50 m. Cabe señalar que el periodo de estudio de las variables atmosféricas, transcurrieron en los meses de Agosto y Septiembre, dentro

de la temporada de lluvia característica de nuestro país, por lo que la cantidad de insectos presentes en la granja fue mayor con respecto a otras épocas del año.

Debe destacarse que los resultados registrados no representan los valores de las variables temperatura y humedad relativa durante todo el día dentro del galpón, por lo que su interpretación está limitada. Para obtener un registro adecuado se debió de haber utilizado un instrumento capaz de registrar continuamente dichas variable atmosféricas.

Los valores registrados durante la semana del pre-tratamiento se muestran en la **Tabla 15**.

**Tabla 15. Promedios de temperaturas máx. y min. (°C) y H.R. (%) registradas durante la semana de pre-tratamiento.**

	Semana	Hora	Promedios		
			Temp. Max. (°C)	Temp. Min. (°C)	H.R. (%)
Pre-tratamiento	I	09:00 am	29	13	50
		01:00 pm	29	13	47
		05:00 pm	26	12	44

Igualmente se obtuvieron los valores durante las aplicaciones I y II. (**Tablas 16 y 17**).

**Tabla 16. Promedios de temperaturas máx. y min. (°C) y H.R. (%) registradas durante las semanas de la aplicación I.**

	Semana	Hora	Promedios		
			Temp. Max. (°C)	Temp. Min. (°C)	H.R. (%)
Post- tratamiento (Aplicación I)	I	09:00 am	30	14	60
		01:00 pm	30	15	45
		05:00 pm	28	12	47
	II	09:00 am	29	13	45
		01:00 pm	30	14	40
		05:00 pm	28	12	42
	III	09:00 am	29	13	44
		01:00 pm	29	13	40
		05:00 pm	25	9	43

**Tabla 17. Promedios de temperaturas máx. y min. (°C) y H.R. (%) registradas durante las semanas de la aplicación II.**

	Semana	Hora	Promedios		
			Temp. Max. (°C)	Temp. Min. (°C)	H.R. (%)
Post- tratamiento (Aplicación II)	I	09:00 am	29	13	49
		01:00 pm	32	16	42
		05:00 pm	27	11	44
	II	09:00 am	29	13	55
		01:00 pm	31	15	47
		05:00 pm	28	12	45
	III	09:00 am	29	13	56
		01:00 pm	29	13	43
		05:00 pm	27	11	48

Los datos de las **tablas 15, 16 y 17**, son valores en los que según Hajek y Leger (1994) *M. anisopliae* es capaz de germinar, dado que se encuentran entre los límites de 20-35°C y H.R.  $\geq$  40. Según Alves (1986) para una óptima germinación, crecimiento y esporulación se requiere una temperatura comprendida entre 24 y 30°C y una humedad relativa mayor a 60%, sin embargo esto no es condición prescindible para que se dé el proceso infeccioso.

### B. Contaje de moscas adultas.

La rejilla de Scudder fue diseñada en 1947 con el fin de ser una herramienta práctica para el contaje y estimación de poblaciones de insectos voladores, especialmente de moscas.

Con la intención de estimar la población de moscas adultas dentro del galpón y además de determinar la localización idónea para el contaje (Sección **5.7.2**), inicialmente se realizaron varios contajes a diferentes alturas y posiciones en el galpón. Las posiciones estudiadas fueron: extremos y centro del galpón y luego a las

alturas de 0, 1 y 2 m. Se evitó contar cualquier insecto que a simple vista no presentase características morfológicas pertenecientes a los adultos de *M. domestica*.

### **Contajes en extremo y centro.**

Primeramente se evaluó la rejilla en la posición de extremo y centro del galpón a una altura de 1 m (**Figura 43**).



**Figura 43. Contaje de moscas con rejilla de Scudder en centro y extremo del galpón a 1m.**

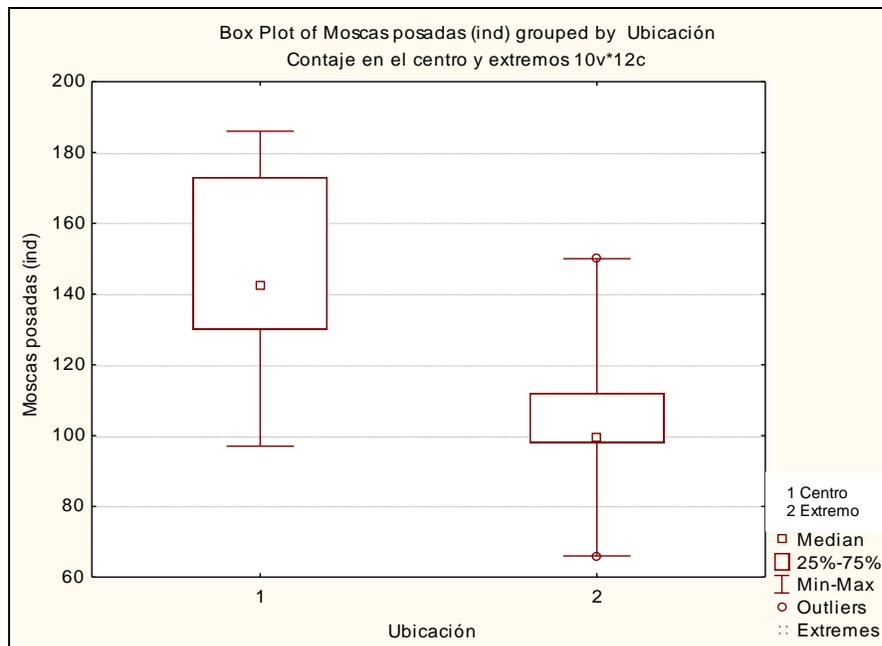
El promedio de moscas calculado en el centro fue mayor que en el extremo (**Tabla 18**), esta diferencia tal vez se atribuya al hecho de que el agua para las gallinas estuviese localizada en el centro del galpón, lo que resulta en mayor atracción de moscas hacia esa la zona.

**Tabla 18. Contaje de *M. domestica* en dos ubicaciones (centro y extremo) dentro del galpón.**

Ubicación	Minutos	Moscas posadas	Promedio moscas posadas
Centro	30	97	145
	60	130	
	90	186	
	120	148	
	150	173	
	180	137	
Extremos	30	99	104
	60	100	
	90	150	
	120	112	
	150	98	
	180	66	

Para determinar si las diferencias reportadas en el contaje "extremo" y "centro" del galpón son significativas ( $p < 0,05$ ), se procedió a efectuar un análisis de varianza (**Figura 44**).

Effect	Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	186501,3	1	186501,3	212,7149	0,000000
Ubicación	5043,0	1	5043,0	5,7518	0,037425
Error	8767,7	10	876,8		



**Figura 44. Análisis de varianza entre ubicaciones del galpón.**

El estudio estadístico arrojó un valor de p menor a 0,05 por tanto se rechaza la hipótesis nula, que sugiere la no existencia de un efecto en la cantidad de moscas contadas con respecto a la ubicación de la rejilla de Scudder. En cuanto a la grafica de comportamiento, la localización de las medianas hacia uno de los lados de la caja implica que existieron contajes cuyo valor registrado fue similar, si se observa la **Tabla 18** se nota como en el "extremo" encontramos valores registrados muy parejos. Adicionalmente se obtuvieron valores atípicos en el extremo, encontrándose un valor máximo y mínimo registrado.

A partir de estos resultados, se procedió a realizar contajes a diferentes alturas en el centro del galpón. Inicialmente, se encontró que debido a la prolongada acumulación del lecho y desechos como, estiércol, plumas, etc., la altura del galpón

fue reducida en más de 80 cm, por tanto el techo se localizaba a 3,20 m aprox. del suelo, sin embargo esto no afecta a las alturas seleccionadas.

### Contajes a diferentes alturas.

Los contajes realizados a las diferentes alturas se muestran en la **Tabla 19**. Se puede notar como la altura que menos atrajo a las moscas fue 0 m, esto debido a la continua perturbación por parte de las gallinas hacia la rejilla. En cuanto a las alturas de 1 y 2 m, se observó una ligera diferencia en el número de moscas contabilizadas a 1m.

**Tabla 19. Contaje de *M. domestica* a diferentes alturas (0 m, 1 m y 2 m) dentro del galpón.**

Altura	Minutos	Moscas posadas	Promedio de moscas posadas
0 m	30	30	57
	60	70	
	90	66	
	120	84	
	150	50	
	180	41	
1 m	30	156	160
	60	200	
	90	163	
	120	189	
	150	131	
	180	123	
2 m	30	99	152
	60	119	
	90	251	
	120	147	
	150	181	
	180	112	

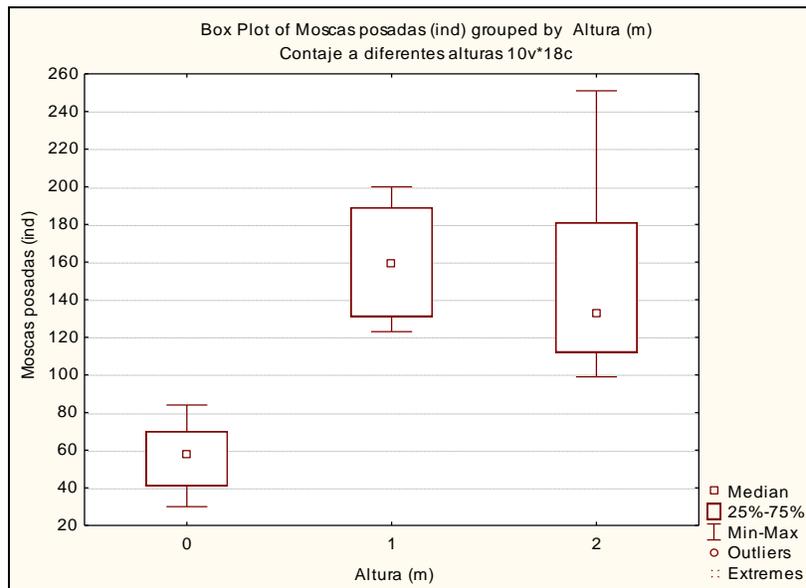
La **Figura 45** muestra la rejilla a 1m y 0 m respectivamente, ambas en el centro del galpón.



**Figura 45. Contaje de moscas con rejilla de Scudder a diferentes alturas. Izquierda: 1 m. Derecha: 0 m.**

El análisis de varianza realizado se muestra en la **Figura 46.**

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	271830,2	1	271830,2	178,4313	0,000000
Altura (m)	39504,1	2	19752,1	12,9654	0,000537
Error	22851,7	15	1523,4		



**Figura 46. Análisis de varianza entre alturas del galpón.**

El análisis estadístico estimó un valor de p menor a 0,05, lo que implica que la altura afectó la cantidad de moscas posadas sobre la rejilla de Scudder. En la gráfica de comportamiento se observa como a la altura de 0 m se obtuvieron los valores más bajos de moscas en la rejilla, en comparación con 1 y 2 m, los cuales presentan valores con comportamiento similar. Para 0 y 1 m, los bigotes fueron de menor magnitud con respecto a 2 m, lo que refleja una menor dispersión en los datos, a esta altura también la mediana se encuentra desviada hacia el cuartil del 25% de la caja.

Por último, se realizó una prueba de Tukey para comparar las medias de cada altura entre sí (**Figura 46**). La tabla muestra como la altura de 0 m presenta diferencias significativas con 1 y 2 m, mientras que estas dos últimas presentaron valores de p mayores a 0,05, por lo tanto no hay diferencia entre ambas.

Cell No.	Altura (m)	{1}	{2}	{3}
		56,833	160,33	151,50
1	0		0,001090	0,002219
2	1	0,001090		0,919316
3	2	0,002219	0,919316	

**Figura 46.1. Prueba de Tukey entre alturas del galpón.**

Siendo 0 m la altura en la que menos se registraron moscas sobre la rejilla y al no haber una diferencia en realizar los contajes a 1 y 2 m, se escogió 1 m, como la altura a utilizar en los contajes pre- y post- tratamiento.

### C. Contajes de moscas pre-tratamiento.

Tal como se mencionó en la **sección 5.7.1**, se realizaron contajes una semana antes de comenzar las aplicaciones de los montajes impregnados con *M. anisopliae*. Por tres veces a la semana y a una altura de un metro.

Las estimaciones obtenidas en ambos galpones se muestran en la **tabla 20**. Adicionalmente se calculó la desviación estándar para evaluar la dispersión de los promedios.

**Tabla 20. Contaje de *M. domestica* en galpones pre-tratamiento. Izquierda **A**, Derecha **B**.**

Contaje	Minutos	Moscas posadas	Promedio	Promedio	Desviación estándar	Contaje	Minutos	Moscas posadas	Promedio	Promedio	Desviación estándar
1	30	100	159	155	3,82	1	30	150	178	163	21,53
	60	130					60	172			
	90	216					90	133			
	120	151					120	257			
	150	180					150	160			
	180	178					180	197			
2	30	130	152	155	3,82	2	30	65	138	163	21,53
	60	167					60	96			
	90	79					90	102			
	120	150					120	174			
	150	199					150	213			
	180	188					180	178			
3	30	104	153	155	3,82	3	30	110	172	163	21,53
	60	180					60	200			
	90	208					90	188			
	120	126					120	161			
	150	120					150	214			
	180	180					180	156			

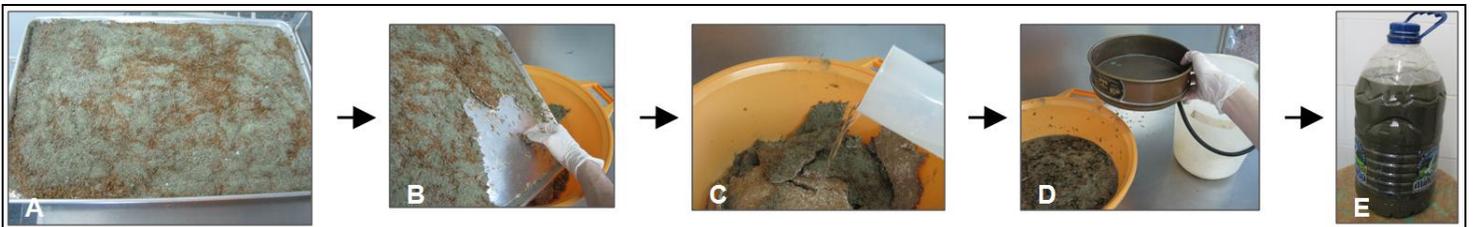
El número de moscas encontrado en ambos galpones se encuentran en valores cercanos, sin embargo el promedio del galpón **B** fue más alto y con una mayor desviación estándar.

Estos datos permitieron luego la comparación en el post-tratamiento y así evaluar si hubo efecto en la población de moscas domesticas.

## D. Elaboración, colocación y evaluación de los montajes en los galpones.

### **Aplicación I**

Con los resultados de los experimentos realizados se dio paso al desarrollo y evaluó de la metodología en el campo. Primeramente, como fue descrito en la **sección 5.7.3.1** y según Dorta (1990), se obtuvo en el laboratorio la suspensión de conidias a partir de cultivos esporulados en bandejas de *M. anisopliae* y fue colocada en recipientes para su traslado (**Figura 47**).



**Figura 47. Obtención de suspensión de conidias.** A: bandeja esporulada de *M. anisopliae*. B: se transfirió medio esporulado al recipiente. C: se añadió surfacton® al 0,1%. D: se tamizó la mezcla y E: se vertió en recipiente para su transporte.

Los montajes para el campo fueron elaborados según lo descrito en la **sección 5.7.3.1** y se muestran en la **Figura 48**. Los mismos fueron sumergidos en la suspensión de conidias preparada en el laboratorio, la cual fue vertida en una bandeja de metal (**Figura 49**).



**Figura 48. Montaje preparado para el campo. A:** Gancho de metal, **B:** Trozo de tela amarillo 60 x 145 cm, **C:** Trozo de metal.



**Figura 49. Inmersión de montajes en la suspensión de conidias.**

Luego, los montajes sumergidos se dejaron escurrir por 10 min aprox. y se colocaron en el interior de cada galpón, fueron colgados cuatro montajes a una altura de 3 m aprox. en el centro del mismo (**Figura 50**).



**Figura 50. Montajes colocados en el interior de los galpones A y B.**

Luego de apenas una hora de haber colgado los montajes se notó la presencia de moscas domesticas sobre las telas (**Figura 51**). También se observa como el contraste entre la tela y las otras superficies del galpón hacen resaltar aún más montaje.



**Figura 51. Montaje del galpón A con presencia de adultos de *M. domestica*.**

Posteriormente se realizaron pases con la malla entomológica dentro del galpón, los insectos colectados fueron colocados en recipientes post-tratamiento.

Una vez transportado al laboratorio los cadáveres encontrados fueron lavados y colocados dentro de cámaras húmedas a fin de conocer si la infección por *M. anisopliae* fue la causa de muerte (**Figura 52 y Tabla 21**).



**Figura 52. Colecta de insectos.**

**Tabla 21. Insectos colectados durante aplicación I.**

Aplicación I	Insectos colectados	% de individuos		% de mortalidad por <i>M. anisopliae</i>	
		<i>M. domestica</i>	Otros	<i>M. domestica</i>	Otros
<b>Total</b>	586	75	25	73	75

Durante la aplicación I fueron colectados 586 insectos, siendo 439 adultos de *M. domestica* de los cuales 320 murieron debido a *M. anisopliae*, también fueron encontrados moscas de otros géneros, coleópteros e himenópteros víctimas del hongo. Estos resultados indican que el 73% de las moscas domésticas colectadas murió debido a *M. anisopliae*; si bien este valor es considerable, es de menor magnitud que lo encontrado en el laboratorio, donde los valores alcanzados eran del 100%. Se debe recordar que debido al espacio disponible del galpón la probabilidad de que un insecto se pose es menor, por lo tanto era de esperarse valores en la

mortalidad de menor magnitud, aunado a esto se encuentra el hecho de que existen en el gallinero otros atrayentes más poderosos que el color para la mosca doméstica, como lo es, el estiércol de las gallinas (Axtell, 1986b).

En el transcurso de la aplicación, también se encontraron algunos cadáveres dentro de los galpones, que fueron colectados y llevados al laboratorio, donde fueron lavados y colocados dentro de cámaras húmedas, donde luego se hizo evidente la esporulación de *M. anisopliae*. La presencia de estos cadáveres, corrobora lo descrito por Alves (1986), donde se menciona que si bien el hongo fue la causa de muerte del insecto, la esporulación del mismo puede no darse sin altos porcentajes de humedad relativa.

En cuanto al conteo con la rejilla de Scudder, pasadas dos semanas se procedió a realizar las estimaciones en cada galpón (**Tabla 22**).

**Tabla 22. Contaje de *M. domestica* en galpones post-aplicación I. Izquierda A, Derecha B.**

Contaje	Minutos	Moscas posadas	Promedio	Promedio	Desviación estándar	Contaje	Minutos	Moscas posadas	Promedio	Promedio	Desviación estándar																																																																																																		
1	30	53	74	80	6,42	1	30	21	57	65	7,31																																																																																																		
	60	120					90	84				120	65	150	79	180	41	2	30	76	87	80	6,42	2	30	29	68	65	7,31	60	70	90	80	120	98	150	101	180	94	3	30	49	80	80	6,42	3	30	40	71	65	7,31	60	66	90	107	120	89	150	87	180	83																																																
	90	84					120	65				150	79	180	41	2	30		76	87					80	6,42				2	30	29	68	65	7,31	60	70	90	80		120	98					150	101				180	94	3	30	49	80	80	6,42	3	30	40	71	65	7,31	60	66	90	107	120	89	150	87	180	83																																		
	120	65					150	79				180	41	2	30		76		87												80	6,42				2	30	29	68		65	7,31					60	70				90	80		120	98					150	101				180	94	3	30	49	80	80	6,42	3	30	40	71	65	7,31	60	66	90	107	120	89	150	87	180	83																				
	150	79					180	41				2	30		76		87																				80	6,42									2	30				29	68		65	7,31					60	70				90	80		120	98					150	101				180	94	3	30	49	80	80	6,42	3	30	40	71	65	7,31	60	66	90	107	120	89	150	87	180	83						
	180	41					2	30					76		87																																	80				6,42									2	30				29	68		65	7,31					60	70				90	80		120	98					150	101				180	94	3	30	49	80	80	6,42	3	30	40	71	65	7,31	60	66
2	30	76	87	80	6,42	2		30	29	68	65		7,31																																																																																																
	60	70						90	80									120			98	150	101	180			94	3	30											49			80	80	6,42	3			30	40	71											65				7,31									60	66				90	107		120	89					150	87				180	83														
	90	80						120	98							150		101		180	94	3	30	49	80	80	6,42		3	30			40	71	65					7,31									60	66				90			107	120	89	150			87	180	83																																												
	120	98						150	101					180		94		3	30	49	80		80	6,42						3	30	40	71			65			7,31		60	66							90	107				120			89	150	87	180			83																																														
	150	101						180	94			3		30		49	80		80	6,42											3	30					40	71			65	7,31					60		66	90			107	120	89	150	87	180	83																																																		
	180	94					3	30	49					80	80	6,42																3					30										40	71	65	7,31		60	66	90	107	120	89	150	87	180	83																																																
3	30	49	80	80	6,42	3		30	40	71	65		7,31																																																																																																
	60	66						90	107																			120									89						150	87	180	83																																																															
	90	107						120	89													150			87	180	83																																																																																		
	120	89						150	87									180			83																																																																																								
	150	87						180	83																																																																																																				
	180	83																																																																																																											

Al comparar los promedios estimados post-tratamiento (**Tabla 22**) con los estimados en el pre-tratamiento (**Tabla 20**), se evidenció un descenso en la población de *M. domestica* de un 48% en el galpón **A** y un 61% en el galpón **B**.

## Aplicación II

Una vez pasadas las tres semanas, se restituyeron los viejos montajes por unos nuevos y fueron evaluados como se describió anteriormente.

En la **tabla 23** se muestran los resultados concierne a la colecta durante la aplicación II. Al observar lo obtenido es evidente la disminución en la cantidad de insectos colectados.

**Tabla 23. Insectos colectados durante aplicación II.**

Aplicación II	Insectos colectados	% de individuos		% de mortalidad por <i>M. anisopliae</i>	
		<i>M. domestica</i>	Otros	<i>M. domestica</i>	Otros
<b>Total</b>	238	63	37	73	72

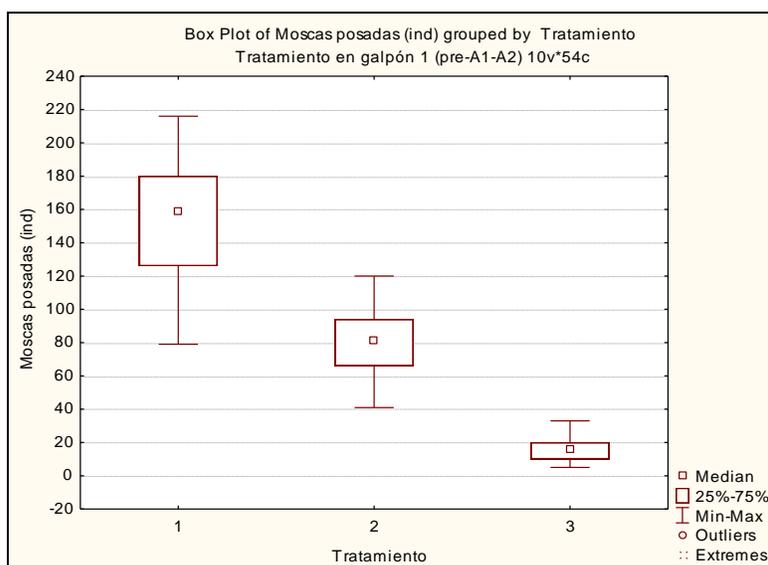
Luego de la aplicación II, se calculó una disminución en la abundancia de *M. domestica* del 80% en el galpón **A** y del 88% en **B** post-aplicación II (**Tabla 24**) en comparación con la aplicación I. Al comparar los contajes promedio realizados con la rejilla de Scudder en el pre-tratamiento se encontró una reducción del 90% en el galpón **A** y 95% en el galpón **B**.

**Tabla 24. Contaje de *M. domestica* en galpones post-aplicación II. Izquierda A, Derecha B.**

Contaje	Minutos	Moscas posadas	Promedio	Promedio	Desviación estándar	Contaje	Minutos	Moscas posadas	Promedio	Promedio	Desviación estándar
1	30	11	17	16	2,26	1	30	8	10	8	3,77
	60	18					60	15			
	90	19					90	12			
	120	22					120	7			
	150	21					150	7			
	180	10					180	10			
2	30	9	13	16	2,26	2	30	0	9	8	3,77
	60	15					60	14			
	90	21					90	7			
	120	9					120	12			
	150	15					150	12			
	180	9					180	10			
3	30	5	17	16	2,26	3	30	9	16	8	3,77
	60	20					60	18			
	90	17					90	15			
	120	10					120	18			
	150	33					150	22			
	180	17					180	14			

Se realizó para cada galpón una prueba de análisis de varianza, con el objetivo de evaluar estadísticamente los resultados obtenidos. La **figura 53**, muestra lo obtenido para el galpón **A**.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	376501,5	1	376501,5	551,3707	0,00
Tratamiento	174616,3	2	87308,2	127,8592	0,00
Error	34825,2	51	682,8		

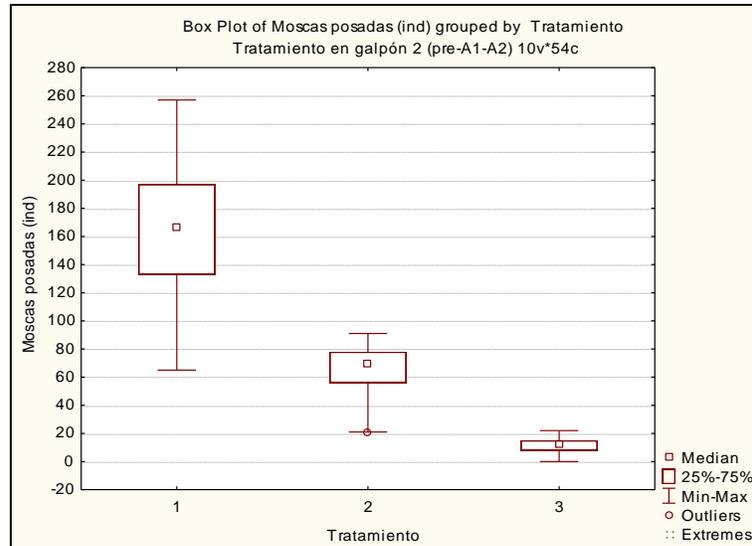


**Figura 53. Análisis de varianza entre galpón A en pre-tratamiento y luego de aplicación I y II.**

Como era de esperarse, el valor de p fue considerablemente menor a 0,05, por tanto se rechazó la hipótesis nula. En la grafica además se muestra como es en el pre-tratamiento donde se estimó la mayor cantidad de moscas domésticas y como luego de las aplicaciones el valor disminuyó significativamente.

De igual forma se procedió con el galpón **B**. Los resultados estadísticos se presentan en la figura **54**.

Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	344640,7	1	344640,7	375,2742	0,00
Tratamiento	210540,4	2	105270,2	114,6272	0,00
Error	46836,9	51	918,4		



**Figura 54. Análisis de varianza entre galpón B en pre-tratamiento y luego de aplicación I y II.**

El valor de p calculado es mucho menor que 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula. Claramente existió un efecto del tratamiento sobre la abundancia de *M. domestica*. Se destaca cómo el comportamiento de los datos es similar al encontrado en el galpón **A**, sin embargo la largura de los bigotes indican que los valores de los contajes se encontraban más dispersos en comparación con **A**.

Se hizo una última colecta de insectos, durante las tres semanas luego del fin de las aplicaciones en la granja, los resultados se muestran en la **tabla 25**. Si se compara el porcentaje de *M. domestica* colectado durante la primera aplicación (**Tabla 21**) con lo obtenido, se revela una reducción del 94% en la colecta de insectos y un 98% en la colecta de adultos de *M. domestica*.

**Tabla 25. Insectos colectados tres semanas luego de retirar la aplicación II.**

Post-tratamiento	Insectos colectados	% de individuos		% de mortalidad por <i>M. anisopliae</i>	
		<i>M. domestica</i>	Otros	<i>M. domestica</i>	Otros
<b>Total</b>	35	26	74	0	0

Por último, también se estimó con la rejilla de Scudder la población de *M. domestica* a la novena semana (**Tabla 26**). Al comparar los promedios calculados con los obtenidos en el pre-tratamiento (**Tabla 20**), se obtuvo una reducción del 99% en el galpón **A** y 99% en **B**.

**Tabla 26. Contaje de *M. domestica* en galpones post-aplicación II. Izquierda A. Derecha B.**

Contaje	Minutos	Moscas posadas	Promedio	Promedio	Desviación estándar
1	30	0	3	2	0,44
	60	3			
	90	5			
	120	0			
	150	7			
	180	3			
2	30	0	2	2	0,44
	60	3			
	90	0			
	120	4			
	150	4			
	180	2			
3	30	6	2	2	0,44
	60	0			
	90	0			
	120	5			
	150	1			
	180	2			

Contaje	Minutos	Moscas posadas	Promedio	Promedio	Desviación estándar
1	30	0	1	2	0,25
	60	1			
	90	2			
	120	0			
	150	4			
	180	0			
2	30	0	2	2	0,25
	60	1			
	90	2			
	120	1			
	150	1			
	180	4			
3	30	0	2	2	0,25
	60	3			
	90	3			
	120	2			
	150	2			
	180	0			

## 7. Conclusiones generales

-Se logró el establecimiento exitoso de una cría de *M. domestica* en el laboratorio que permitió obtener cantidades de individuos adultos para los experimentos en el laboratorio.

-De los colores estudiados fue el amarillo aquel que atrajo mayor número de individuos.

-Empleando las densidades entre  $3,89 \times 10^5$  y  $1,45 \times 10^7$  conidias/cm<sup>2</sup> de tela amarilla, en condiciones de laboratorio, se alcanzó el 100% de mortalidad de *M. domestica* en el lapso de 6 y 12 días.

-Los análisis de Probit estimaron que a densidades de  $6,33 \times 10^6$  (DMa3) conidias/ cm<sup>2</sup> de tela amarilla los TL<sub>50</sub> y TL<sub>95</sub> fueron de 8,056 y 12,522, mientras que a  $1,45 \times 10^7$  (DMa4) conidias/ cm<sup>2</sup> de tela amarilla los valores se redujeron en aprox. cuatro días (5,598 y 8,453, respectivamente).

-No se observaron diferencias significativas en los TL<sub>50</sub> en condiciones de laboratorio de *M. anisopliae* cuando se usaron los grupos etarios de 5, 10, 15, y 20, días post-eclosión. Tampoco se observaron diferencias entre los TL<sub>95</sub>. Sin embargo, cuando se evaluó *M. anisopliae* sobre recién eclosionados esos valores fueron ligeramente superiores, contrariamente cuando se usaron moscas adultas de 25 y 30 días post-eclosionados, el incremento de la mortalidad se debió a causas naturales.

-La aplicación de la metodología desarrollada en el campo (interior de los galpones avícolas) renovando los montajes impregnados entre cada tres semanas,

condujo a una reducción en la población de mosca doméstica de 48 y 61% a la tercera semana de aplicación en los galpones **A** y **B** respectivamente, una reducción hasta el 90 y 95% a la sexta semana y finalmente una reducción hasta el 99% en ambos galpones a la novena semana. Estos resultados indican que la metodología implementada constituye una alternativa viable para el control de *M. domestica*.

La colecta de *M. domestica* mediante pases de malla durante el tiempo en que duró el trabajo en campo permitió evidenciar el 75% de moscas infectadas por el hongo durante la aplicación I, el 63% en la aplicación II y el 26% post-aplicación II. También se vieron afectadas otras poblaciones de insectos como coleópteros, himenópteros y otros dípteros, lo que demostró la gran capacidad de infección de *M. anisopliae*.

## 8. Recomendaciones

El trabajo aquí desarrollado abre las puertas a un gran número de experimentos que contribuyen a aumentar la calidad y soporte de los resultados y conclusiones aquí obtenidas. Por ello, a continuación se describen algunas ideas y recomendaciones.

Aunque no se haya encontrado un efecto importante del color sobre los adultos de *M. domestica*, se deben realizar otros experimentos pero evaluando el contraste entre superficies y si es posible combinar el mismo con algún atrayente químico.

Si bien la rejilla de Scudder (Scudder, 1947) permitió la estimación de la abundancia de *M. domestica*, su empleo dentro del galpón fue dificultoso, esto debido a la inmovilidad absoluta que la rejilla requiere, puesto que la mínima perturbación espanta a los insectos posados, además el tamaño de la misma requiere cierta destreza a la hora de ubicarla dentro del galpón. Como solución a ello se recomienda la implementación de una trampa compuesta con algún atrayente específico para la mosca, que permita la retención de los insectos posados.

En cuanto a la temperatura y H.R., si bien lo registrado no refleja el comportamiento de estas dos variables en el tiempo, el implemento de un instrumento que registre de manera continua los valores de estas y otras variables atmosféricas es requerido para conocer el microclima presente en el galpón.

En cuanto a la evaluación de la metodología en campo, es necesario realizar otros estudios para reforzar la viabilidad de la misma, tales como, establecer

galpones controles en los que se coloquen telas únicamente sumergidas en surfactante, evaluar la cantidad de montajes requeridos para producir los más altos porcentajes de reducción en la población de la mosca doméstica y determinar un posible efecto residual del tratamiento.

Los hongos entomopatógenos tendrán un papel importante en las estrategias del manejo integral de plagas, por lo que se deben realizar estudios en los que se evalúen varias estrategias de control (culturales, químicas, biológicas) con el fin de enriquecer la carencia de trabajos existentes del tema.

## 9. Bibliografía

**Acevedo, G., Zapater, M., Toloza, A.** 2009. Insecticide resistance on house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. *Parasitol. Res.* **105**: 489-493.

**Alves, S.** 1986. Controle microbiano de insetos. Primera Edición. Editorial Manole LTDA. Sao Paulo, Brasil.

**Avancini, R., Silveira, G.** 2000. Age structure and abundance in populations of muscoid flies from a poultry facility in Southeast Brazil. *Mem. I. Oswaldo Cruz.* **95**: 259-264.

**Axtell, R.** 1986a. Fly management in poultry production: cultural, biological and chemical. *Poultry Sci.* **65**:657-667.

**Axtell, R.C.** 1986b. Status and potential of biological control agents in livestock and poultry pest management systems. Págs. 1-9. En: Patterson, R; Rutz, D. (eds), Biological control of muscoid flies. Publicación Número 61 de *Miscellaneous publications of the Entomological Society of America*.

**Axtell, R.C.** 1999. Poultry integrated pest management: Statuts and future. *Integrated Pest Management Reviews.* **4**: 53-73.

**Barson, G., Renn, N., Bywater, F.** 1994. Laboratory Evaluation of Six Species of Entomopathogenic Fungi for the Control of the House Fly (*Musca domestica* L.), a Pest of Intensive Animal Units. *J. Invertebrate Pathol.* **64**:107-113.

**Burg, J., Axtell, R.** 1984. Monitoring House Fly, *Musca domestica* (Diptera Muscidae), Populations in Caged-Layer Poultry Houses Using a Baited Jug-Trap. *Environ Entomol.* **13**: 1083-1090.

**Capinera, J.** 2008. Encyclopedia of Entomology. Segunda Edición. Editorial Springer Netherlands. Berlín, Alemania.

**Carvalho, C., Couri, M.** 2005. Key to the neotropical genera of Muscidae. Part I. Basal groups. Curso dictado en la Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela.

**Charnley, A., Collins, S.** 2007. Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. Págs. 159-181. En: Esser, K. (ed.), The Mycota. Environmental and Microbial Relationships IV. Segunda Edición. Editorial Springer. Heidelberg, Berlin.

**Conlon, D., Bell, W.** 1991. The use of visual information by house flies, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), foraging in resource patches. *J. Comp Physiol A.* **168**: 365-371

**Cova, L., Scorza-Dagert, J.** 2006. Control temporal de moscas caseras (*Musca domestica*) en galpones avícolas mediante nebulizaciones con conidias de *Beauveria bassiana*. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental.* **46**(22): 131-136.

**Deshpande, M.** 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Crit. Rev. Microbiol.* **25**: 229-243.

**Dorta, B., Bosch, A., Arcas, J., Ertola, R.** 1991. High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 712-715

**Dorta, B.** 2008. Producción de agentes microbianos de control de plagas y enfermedades agrícolas. Trabajo de ascenso a Profesor Titular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

**Eilenberg, J.** 2006. Concepts and Visions of Biological Control. Págs. 1-11. En: Eilenberg, J., Hokkanen, H. (eds), *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Primera Edición. Editorial Springer Netherlands. Dordrecht, Países Bajos.

**Hajek, A., Leger, E.** 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* **39**: 293-322.

**Hecht, O., Muñiz, R., Nava, A.** 1968. Contrary responses of *Musca domestica* concerning their selection of different shades and hues. *Entomol. Exp. et Appl.* **11**:1-14.

**Ignoffo, C.** 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann. NY. Acad. Sci.* **217**:141-164.

**Kaufman, P., Scott, J., Rutz, D.** 2001. Monitoring insecticide resistance in house flies (Diptera Muscidae) from New York dairies. *Pest Manag. Sci.* **57**: 514-521.

**Keiding, J.** 1986. The house-fly, Biology and control. WHO/VBC/86.937.

**Kobayashi, M., Sasaki, T., Saito, N., Tamura K., Suzuki, K., Watanabe, H., Agui, N.** 1999. Houseflies are not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **61**: 625-629.

**Lecuona, R., Papierok, B., Riba, G.** 1996. Hongos Entomopatógenos. Págs. 35-60. En: Lecuona, R. (eds), Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Primera Edición. Editorial Talleres Gráficos Mariano Mas. Buenos Aires, Argentina.

**Levine, O., Levine, M.** 1990. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of shigellosis. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 688– 696.

**Martiradonna, G., Soto Vivas, A., González, J.** 2006. Protocolo de cría de moscas en el laboratorio. Instituto de altos estudios Dr. Arnoldo Gabaldon.

**O.M.S. Organización Mundial de la Salud.** 1984. Información técnica sobre el agente de control biológico *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin 1.883. Serie ecología 16. Traducción de WHO/VBC/80.766, Geneva.

**O.P.S. Organización Panamericana de la Salud.** 1962. Guías de adiestramiento para el saneamiento del medio. Moscas de importancia para la salud pública y su control. Washington DC. Publicación científica. **61**: 4-12.

**Pinnock, D., Mullens, A.** 2008. Application and evaluation of entomopathogens for control of livestock and poultry pest. Págs. 713-734. En: Lacey, L., Kaya, H.

(eds.), Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Segunda edición. Editorial Springer Netherlands. Dordrecht, Países Bajos.

**Pospischil, R., Szomm, K., Londershausen, M., Schroder, I., Turberg, A., Fuchs, R.** 1996. Multiple Resistance in the Larger House Fly *Musca domestica* in Germany. *Pestic. Sci.* **48**: 333-341.

**Scott, J., Alefantis, T., Kaufman, P., Rutz, D.** 2000. Insecticide resistance in house flies from caged-layer poultry facilities. *Pest Manag Sci.* **56**: 147-153.

**Scudder, H.** 1947. A new technique for sampling the density of house fly populations. *Public Health Rep.* **62**(19): 681-686.

**Thomas, A.** 2009. *Musca domestica* (Diptera Muscidae) como vector mecánico de *Salmonella spp.* en la comunidad agrícola de La Colonia Tovar, Edo. Aragua. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

**Urban, J., Broce, A.** 2000. Killing of Flies in Electrocuting Insect Traps Releases Bacteria and Viruses. *Curr. Microbiol.* **13**: 267-270.

**W.H.O. World Health Organization.** 1991. The housefly. Training and information guide (Intermediate level). World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland. WHO/VBC/90.987.

#### **Consultas en línea:**

**A.T.T.R.A. National Sustainable Agriculture Information Service.** 2007. Poultry House Management for Alternative Production. Consultado: 11 Octubre, de

2009. Publicación disponible en:

<http://www.attra.ncat.org/attrapub/PDF/poultryhousemanage.pdf>

**SIGMIRANDA. Sistema de Información Geográfica del Estado Bolivariano de Miranda. Versión 1.0.** Mapas del Estado Miranda consultados: 14 de Octubre de 2009. Disponible en: <http://200.44.156.149:82/gmap/gmap75.phtml>.

<http://www.flycontrol.novartis.com/species/housefly/en/index.shtml>.  
Consultado: 14 de Octubre de 2009.