

CONTROL DE CALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DEL HONGO

Gliocladium virens, PATÓGENO DE *Anopheles albimanus* (Wiedemann 1820), VECTOR DEL PALUDISMO EN MÉXICO

Irlanda Castillo Rivera, Olga Ruth Gálvez Coutiño, José Luis Torres-Estrada y María Guadalupe Vázquez-Martínez

RESUMEN

En el estado de Chiapas, México, se aislaron y caracterizaron cepas de hongos asociadas a criaderos de mosquitos *Anopheles albimanus*, vector del paludismo en México. La cepa nativa de *Gliocladium virens* demostró patogenicidad, en bioensayos de laboratorio, sobre *A. albimanus*, por lo que es un excelente candidato para el desarrollo de un producto bioinsecticida y, por lo tanto, se requiere la producción del hongo para continuar su estudio. El objetivo de este trabajo fue implementar un control de calidad en la producción artesanal del hongo *G. virens*, mediante la evaluación de indicadores de calidad. Se implementó el control de calidad durante los procesos de producción utilizando como indicadores: la detección de contaminantes, pureza del inóculo, reactivación de la cepa,

y concentración y viabilidad de las conidias. Además, se verificó la calidad del producto final utilizando como indicadores: el rendimiento, la viabilidad de las conidias, pureza microbiológica y patogenicidad. Se logró un buen control de calidad en las diferentes etapas del proceso de producción del hongo *G. virens* mediante el uso de arroz como sustrato en botellas y bolsas. El control de calidad permitió detectar la presencia de contaminación y evitar la diseminación del hongo contaminante *Aspergillus flavus* hacia productos limpios. Se obtuvieron productos libres de contaminantes y con viabilidad del 100%. La patogenicidad de las conidias producidas por el método artesanal fue excelente, ya que causó una mortalidad del 100% de las larvas de *A. albimanus* a las 120h.

Introducción

El uso excesivo de plaguicidas químicos para el control de mosquitos vectores del paludismo ha ocasionado efectos negativos en el ambiente, además de contribuir al desarrollo de resistencia de los vectores (Elósegui, 2006; Ordóñez-González *et al.*, 2008). En la actualidad se busca sustituir el uso de insecticidas químicos por alternativas biológicas, siendo el uso de hongos entomopatógenos una opción prometedora.

Debido a la factibilidad de producir bioinsecticidas basados en hongos para ser usados en salud pública para el control de insectos vectores de

enfermedades y a que las cepas nativas son más efectivas que aquellas introducidas (Castillo, 2006), en el Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) de Tapachula, Chiapas, México, se han llevado a cabo estudios para aislar y caracterizar cepas nativas de hongos entomopatógenos con capacidad infectiva sobre insectos vectores de enfermedades. La cepa nativa de *Gliocladium virens* demostró patogenicidad sobre las fases de larvas y adultos de *Anopheles albimanus*, por lo que representa un excelente candidato para el desarrollo de un producto bioinsecticida (Vázquez-Martínez *et al.*, 2007, 2008).

Con la finalidad de producir bioinsecticidas se ha propuesto el crecimiento y desarrollo de hongos entomopatógenos en sustratos naturales para su reproducción masiva a bajo costo. Desafortunadamente, aún no existen protocolos estandarizados para el control de calidad del producto, lo cual ha traído como consecuencia que productores y países desarrollen sus propios procedimientos de control de calidad. El objetivo del presente trabajo fue implementar un control de calidad en la producción artesanal del hongo *G. virens*, patógeno de *A. albimanus*, vector del paludismo en México, mediante la evaluación de indicadores de calidad.

Materiales y Métodos

Control de calidad durante el proceso de producción artesanal

Se utilizaron como indicadores de calidad: la pureza del inóculo, la concentración y viabilidad de las conidias, la reactivación de la cepa y la detección de contaminantes en cada paso del proceso de producción.

Material biológico

Se utilizó la cepa 297 de *G. virens* nativa de Tapachula, la cual forma parte del cepario del laboratorio de biología de patógenos y vec-

PALABRAS CLAVE / *Anopheles albimanus* / Control de Calidad / *Gliocladium virens* / Hongos Entomopatógenos / Malaria /

Recibido: 17/01/2012. Modificado: 15/05/2013. Aceptado: 05/06/2013.

Irlanda Castillo Rivera. Químico Farmacobióloga, Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH). Analista de Calidad, Cafés de Especialidad de Chiapas, S.A.P.I. de C.V (CAFESCA), Tapachula, Chiapas, México.

Olga Ruth Gálvez Coutiño. Químico Farmacobióloga, UNACH. Químico, Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública (CRISP/INSP), Tapachula, Chiapas, México.

José Luis Torres Estrada. Doctor en Ciencias, Colegio de Posgraduados. Profesor-Investigador, CRISP/INSP, Tapachula, Chiapas, México.

María Guadalupe Vázquez Martínez. Doctora en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Profesora-

Investigadora, CRISP/INSP, Tapachula, Chiapas, México. Dirección: Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, 4^o Norte y 19 Poniente s/n, Colonia Centro, C.P. 30700. Tapachula, Chiapas, México. e-mail: mguadalu@insp.mx.

QUALITY CONTROL IN THE PRODUCTION OF THE FUNGUS *Gliocladium virens* PATHOGEN OF *Anopheles albimanus* (Wiedemann 1820), VECTOR OF MALARIA IN MEXICO

Irlanda Castillo Rivera, Olga Ruth Gálvez Coutiño, José Luis Torres-Estrada and María Guadalupe Vázquez-Martínez

SUMMARY

In the State of Chiapas, Mexico, fungi strains associated with breeding sites for *Anopheles albimanus*, the vector mosquito of malaria in Mexico, were isolated and characterized. The native strain of *Gliocladium virens* demonstrated pathogenicity on *A. albimanus* in laboratory bioassays, being an excellent candidate for the development of a bioinsecticide product. Thus, production of the fungus is required in order to continue its study. The objective of this work was to implement a quality control in the artisan production of the fungus *G. virens*, through the evaluation of quality indicators. Quality control was implemented during the production processes using as indicators: the detection of pollutants, the purity of

the inoculum, the reactivation of the strain, concentration and viability of the conidia. Furthermore, the quality of the final product was verified using as indicators: performance, the viability of the conidia, microbiological purity and pathogenicity. A good quality control was achieved at different stages of the production process of the fungus *G. virens* by using rice as substrate in bottles and bags. Quality control allowed detecting the presence of pollution and prevention of the spread of the pollutant fungus *Aspergillus flavus* towards clean products. Free products of pollutants and 100% viability were obtained. The pathogenicity of the conidia produced was excellent, as it caused a 100% mortality rate of *A. albimanus* larvae at 120h.

CONTROLE DE QUALIDADE NA PRODUÇÃO DO FUNGO *Gliocladium virens*, PATOGÊNIO DE *Anopheles albimanus* (Wiedemann 1820), VECTOR DO PALUDISMO NO MÉXICO

Irlanda Castillo Rivera, Olga Ruth Gálvez Coutiño, José Luis Torres-Estrada e María Guadalupe Vázquez-Martínez

RESUMO

No estado de Chiapas, México, se isolaram e caracterizaram cepas de fungos associadas a criadouros de mosquitos *Anopheles albimanus*, vetor do paludismo no México. A cepa nativa de *Gliocladium virens* demonstrou patogenicidade, em bioensaios de laboratório, sobre *A. albimanus*, pelo qual é um excelente candidato para o desenvolvimento de um produto bioinseticida e, portanto, se requer a produção do fungo para continuar seu estudo. O objetivo deste trabalho foi implementar um controle de qualidade na produção artesanal do fungo *G. virens*, mediante a avaliação de indicadores de qualidade. Implementou-se o controle de qualidade durante os processos de produção utilizando como indicadores: a detecção de contaminantes, pureza do inóculo, reativação da cepa, e concen-

tração e viabilidade dos conídios. Além disso, foi verificada a qualidade do produto final utilizando como indicadores: o rendimento, a viabilidade dos conídios, pureza microbiológica e patogenicidade. Conseguiu-se um bom controle de qualidade nas diferentes etapas do processo de produção do fungo *G. virens* mediante o uso de arroz como substrato em garrafas e sacolas. O controle de qualidade permitiu detectar a presença de contaminação e evitar a disseminação do fungo contaminante *Aspergillus flavus* para matrizes limpas. Obtiveram-se produtos livres de contaminantes e com viabilidade de 100%. A patogenicidade dos conídios produzidas pelo método artesanal foi excelente, já que causou uma mortalidade de 100% das larvas de *A. albimanus* às 120h.

tores del Centro Regional de Investigación en Salud Pública/Instituto Nacional de Salud Pública (CRISP/INSP) de Tapachula, Chiapas, México, depositada en el cepario de REDBIO con número LBIH-116. En los bioensayos se usaron larvas de mosquitos *A. albimanus* de tercer estadio, proporcionadas por el insectario del CRISP/INSP.

Pureza del inóculo

El desarrollo del hongo se realizó en el medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) con la técnica del papel celofán (Dennis y Webster, 1971) y se incubó a 27°C hasta la esporulación, en ~21 días. Se

verificó la pureza del inóculo mediante la observación directa para identificar las características macroscópicas y microscópicas.

Concentración y viabilidad de las conidias

Se preparó una suspensión de conidias del hongo *G. virens* en Tween® 80 al 0,0001%, a partir del cultivo puro, y se determinó la concentración de la suspensión mediante conteos de muestras en la cámara de Neübauer. Además se determinó la viabilidad de las conidias (porcentaje de germinación) de acuerdo con la técnica de Cañedo y Ames (2004).

Reactivación del hongo sobre el insecto

Para reactivar las características de patogenicidad del hongo, se inoculó tópicamente una suspensión de conidias (1×10^7 conidias/ml) sobre chinches *Triatoma longipennis*. Los insectos inoculados se mantuvieron en cámaras húmedas hasta el desarrollo de infección. El hongo desarrollado sobre el insecto fue aislado, cultivado y usado para la producción por el método artesanal sobre un sustrato natural.

Producción artesanal del hongo

Se prepararon dos lotes de producción, siendo un lote un

conjunto de productos con características y fecha de producción iguales. De cada lote se tomó muestras en cada etapa del proceso de producción para decidir si los productos del lote cumplen con los criterios de calidad. El proceso se inició inoculando una infusión de papa y dextrosa con una suspensión de conidias (1×10^8 conidias/ml) y después se incubó a 28°C durante cuatro días para su posterior uso en sustrato arroz. Se prepararon bolsas y botellas con 100 y 200g de arroz precocido y se esterilizaron, para luego ser inoculadas con el medio líquido con conidias e incubadas en una cámara ambiental a 28°C con un foto-

periodo de 8h de luz y 16h de oscuridad durante 15 días.

El arroz, el cual había sido previamente inoculado con esporas del hongo *G. virens*, se transfirió a bandejas de unícel; éstas se sellaron y se dejaron en la cámara ambiental por seis días con 12h luz y 12h oscuridad. Los cultivos de hongos esporulados de las bandejas se transfirieron a recipientes refractarios rectangulares para ser secados en un horno a 60°C durante 24h. Posteriormente se realizó la cosecha de las conidias mediante macerado y tamizado. Una parte de la producción (cultivo de hongos esporulados sobre el sustrato arroz) fue guardada directamente en bolsas de polietileno.

Detección de contaminantes

Se llevó a cabo un monitoreo microbiológico en cada una de las etapas de producción, iniciando con la exposición de placas con agar nutritivo (AN) y ADS en diferentes puntos del área de trabajo y equipos. Las suspensiones de conidias stock y reactivadas fueron revisadas por observación directa en el microscopio. Además se realizaron diluciones seriadas y se sembró una alícuota de la última dilución en medio ADS y AN.

Las chinches, *T. longipennis*, usadas para la reactivación del hongo fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0,5% y lavadas con agua trisdestilada estéril, luego se colocaron sobre placas de ADS y se incubaron (sin inóculo). Se realizaron revisiones cada dos días para descartar el crecimiento de contaminantes.

En la etapa de esterilización de las bolsas y botellas con arroz se tomó una muestra del 5-10% de cada lote y se incubó a temperatura ambiente durante 48h para verificar que se encontraran libres de contaminantes. Durante la etapa de inoculación e incubación se dejaron bolsas y botellas con arroz sin inocular (10% del lote) y se incubaron en las mismas condiciones que las inoculadas. Todas las muestras

usadas para verificar la calidad del proceso fueron analizadas por observación directa y al microscopio.

Control de calidad del producto final

Se utilizaron como indicadores de calidad: el rendimiento, la viabilidad de las conidias, la pureza microbiológica y la patogenicidad.

Rendimiento. El producto final se pesó para estimar el rendimiento obtenido de conidias/g. El polvo de conidias cosechado se guardó en tubos Falcon de 100ml y las conidias sobre el sustrato arroz se empaquetaron en bolsas de polietileno, sellando las bolsas de forma hermética. Se tomaron muestras del producto y se realizaron suspensiones de conidias a las cuales se realizó el cálculo de la concentración de conidias por gramo, mediante conteos en cámara de Neübauer. Todo el material fue etiquetado con la información de las características del producto y la fecha.

Viabilidad de las conidias. Se tomaron muestras de la producción y se prepararon suspensiones de conidias a las cuales se determinó la viabilidad, de la forma descrita anteriormente.

Pureza microbiológica. Se tomaron muestras representativas de los lotes y se sembraron en los medios ADS y AN como se menciona anteriormente.

Patogenicidad. Los bioensayos de patogenicidad de las conidias se basaron en la guía de pruebas en larvas de mosquitos en campo y laboratorio utilizada por la World Health Organization (2005). Se evaluaron siete concentraciones de conidias con cuatro repeticiones cada una y su respectivo control (solución Tween sin conidias). El bioensayo se realizó colocando 100ml de las suspensiones de conidias en Tween 80 al 0,001% en vasos de plástico y luego se agregaron 25 larvas de *A. albimanus* de tercer estadio. Los bioensayos se realiza-

ron a temperatura ambiente y las larvas se alimentaron tres veces al día con alimento estéril para conejo. Se realizó el conteo de la mortalidad larvaria a cada 24h y con los datos obtenidos se calcularon los porcentajes de mortalidad causados por las diferentes concentraciones de conidias.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la cantidad de conidias (promedio de conidias/g) del producto en arroz contra el obtenido en polvo fueron analizados por medio de un modelo lineal generalizado (GLM) utilizando el paquete estadístico del SAS Institute versión 9.1 para Windows. Por su parte, los resultados obtenidos en los bioensayos de patogenicidad de mortalidad diaria (%) de larvas de *A. albimanus* expuestas a diferentes concentraciones de conidias de *G. virens* en polvo y arroz fueron sometidos a un análisis de varianza seguido de una prueba de Duncan como comparación múltiple de medias usando el mismo paquete estadístico.

Resultados y Discusión

Control de calidad durante el proceso de producción artesanal

En el monitoreo periódico de las áreas de trabajo se observó una buena limpieza de los equipos y materiales, ya que no se presentó crecimiento de contaminantes en ninguna de las pruebas realizadas después de cada limpieza. De igual manera, la cepa de *G. virens* utilizada en la producción se mantuvo libre de contaminantes.

La suspensión stock permaneció libre de contaminantes con viabilidad del 100% y con una concentración de $9,75 \times 10^7$ conidas/ml. De esta suspensión se tomaron alícuotas y se infectaron chinches (*T. longipennis*), de las cuales se tomaron muestras para aislar una cepa reactivada y de mejor calidad.

En estudios anteriores se ha demostrado que al realizar cultivos sucesivos en medios

de cultivo, los hongos modifican sus características morfológicas y tienden a perder su capacidad de germinación, lo cual repercute en su patogenicidad y virulencia (Lezama, 1994); sin embargo, al hacer pases sobre insectos hospederos, el hongo puede recuperar sus características morfológicas iniciales (Hall, 1976). En el presente trabajo se usaron chinches *T. longipennis* para reactivar la cepa del hongo, debido al tamaño del insecto y a la gran cantidad de nutrientes que aporta.

A partir de la cepa reactivada se prepararon nuevas suspensiones de conidias bajo el control de calidad expuesto. Todas las suspensiones estuvieron libres de contaminantes con viabilidad del 100%, con concentraciones de $1,68 \times 10^7$ y $1,68 \times 10^8$ conidias/ml, respectivamente para cada uno de los dos lotes producidos.

García *et al.* (2006) observaron que en subcultivos sucesivos de *Beauveria bassiana* se presentó un aumento en la producción de micelios, una disminución en la esporulación y la actividad entomopatógena, mientras que la viabilidad de las conidias no fue afectada (95% de viabilidad a las 20h de incubación). En el presente trabajo las suspensiones de *G. virens* mantuvieron el 100% de viabilidad a las 10h de incubación, tanto en el cultivo stock como el reactivado.

Se prepararon dos lotes de cultivo líquido, en el primero se usaron 1,35 litros de infusión de papa y dextrosa y 13,8 litros en el segundo. Los cultivos fueron analizados a los cuatro días de incubación, observando que el primer lote no presentó ningún tipo de contaminante y que su viabilidad fue del 100%. En el lote 2 se observó que el 4,34% de los cultivos líquidos presentaron una coloración café diferente al resto, por lo que se eliminó este material, aún cuando en la observación directa al microscopio no se encontró contaminación. El resto del lote tuvo una viabilidad del 100%.

En este trabajo se optó por la realización de cultivos bifá-

sicos, debido a que el hongo que se desarrolla en el cultivo líquido aprovecha la mayor cantidad de nutrientes que le aporta el medio para crecer. Además, al pasar al sustrato sólido se logra obtener estructuras infectivas de alta calidad y se acorta el tiempo de producción de conidias (Elósegui, 2006).

Antes de inocular el hongo en las bolsas y botellas se verificó la calidad de la etapa de esterilización, tomando una muestra del 5-10% del total de cada lote, observándose que el 100% de las muestras no presentaron crecimiento de tipo alguno de contaminantes.

Se inocularon 35 bolsas y 14 botellas con arroz en el primer lote y en el segundo se inocularon 261 bolsas. Las muestras que se tomaron como testigos no presentaron crecimiento de contaminantes.

Durante el periodo de incubación las bolsas y botellas se revisaron diariamente a partir del tercer día de inoculación. Se descartó el 3,14% de las bolsas con arroz ya que en ellas se detectó un exceso de humedad (90% humedad relativa).

En la transferencia a los contenedores refractarios, en el segundo lote, se observó la presencia de contaminación por el hongo *Aspergillus flavus*, por lo que todas las bandejas contaminadas fueron eliminadas para asegurar la calidad del producto final.

Según Mazariegos (2003), uno de los aspectos más críticos de controlar en la producción de bioplaguicidas es el aire que entra en las áreas de producción, por lo cual se debe utilizar un sistema de aire acondicionado que filtre el aire en varias etapas. En este trabajo, la producción artesanal fue realizada a escala de laboratorio y no se tuvo un control del flujo de aire que entra y sale de la incubadora, por lo que probablemente la contaminación en esta etapa del proceso de producción se deba a este aspecto.

Después del secado, en el segundo lote, se eliminó una bandeja por detectarse la pre-

sencia de contaminación por *A. flavus*. Este hongo es oportunista (Carrillo, 2003) y es uno de los principales contaminantes de laboratorio (Szwajkowska-Michalek *et al.*, 2010), siendo la detección durante el monitoreo de control de calidad efectiva para asegurar la pureza del producto final.

Control de calidad del producto final

En el primer lote se obtuvo 733,7g de conidias en polvo libre de contaminantes con una concentración de $2,69 \times 10^8$ conidias/g. En el segundo lote se aumentó la producción en un 200% y se obtuvieron 13620,5g del sustrato arroz seco colonizado con conidias, obteniéndose $3,85 \times 10^8$ conidias/g, con una viabilidad de 100%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F= 22,62$; $gl=1$; $P=0,0001$) entre el promedio de conidias/g obtenido en el arroz contra el obtenido en polvo (Tabla I).

Soto *et al.* (2005) obtuvieron concentraciones de *G. virens* de 10^8 conidias/ml en cuatro muestras realizadas a diferentes tiempos de incubación y viabilidades >90%. La diferencia entre este trabajo y el de Soto *et al.*, (2005) es que en este trabajo *G. virens* tuvo un 100% de viabilidad a las 24h, mientras que ellos obtuvieron arriba del 90% a los 15, 35, 50 y 90 días de incubación y se percataron que la viabilidad disminuía al transcurrir el tiempo de incubación.

En los bioensayos de patogenicidad, *G. virens* causó el 100% de mortalidad sobre larvas de *A. albimanus* a las 120h con concentraciones de $1,83 \times 10^7$ conidias/ml en el producto en polvo (Tabla II) y con $3,66 \times 10^7$ conidias/ml en el producto en arroz (Tabla III). En los bioensayos usando diferentes concentraciones de conidias de *G. virens* en polvo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de mortalidad ($P=0,01$) de cinco de las siete concentraciones probadas contra el control, siendo la concen-

TABLA I
CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO FINAL
DE *G. virens*

Control de calidad	Lote 1	Lote 2
	Polvo	Arroz
Conidias (g)	733,7	13620,5
Concentración (conidias/g)	$2,69 \times 10^8$ a	$3,85 \times 10^8$ b
Viabilidad (%)	100	100
Pureza microbiológica	S/C	S/C

Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ($F= 22,62$; $gl=1$; $P=0,0001$). S/C: sin contaminantes.

TABLA II
MORTALIDAD DIARIA (%) DE LARVAS DE *A. albimanus*
EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE *G. virens* (CONIDIAS EN POLVO)

Concentración (conidias/ml)	N	Mortalidad de larvas (%)				
		24h	48h	72h	96h	120h
$1,83 \times 10^7$	100	29	83	93	98	100 a
$1,043 \times 10^7$	100	1	18	82	97	98 ab
$2,56 \times 10^6$	100	2	2	10	83	96 abc
$1,45 \times 10^6$	100	0	0	18	72	95 bcd
$3,58 \times 10^5$	100	0	0	1	68	79 cd
$5,01 \times 10^4$	100	0	0	0	21	30 d
$7,00 \times 10^3$	100	0	0	0	16	29 d
Control	100	0	0	0	0	0 d

Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ($F= 3,25$; $gl=7$; $P=0,01$).

tración de $1,83 \times 10^7$ la que mayor mortalidad causó (ver Tabla II). Iguales resultados fueron observados en las mortalidades producidas por las conidias en arroz, donde la mayor mortalidad se encontró en la concentración de $3,66 \times 10^7$ (Tabla III).

Los resultados de patogenicidad confirmaron que la cepa nativa de *G. virens* tiene potencial entomopatógeno, tal como lo reportó Rodríguez (2008), quien, al exponer larvas de *A. albimanus*

en soluciones de conidias de *G. virens* obtuvo el 100% de mortalidad con $4,6 \times 10^7$ conidias/ml.

En conclusión, se realizó un buen control de calidad en las diferentes etapas del proceso de producción del hongo *G. virens*, lo cual permitió detectar la presencia de contaminación y realizar la eliminación a tiempo para evitar la diseminación del hongo contaminante *A. flavus* hacia otras bandejas. Se obtuvieron pro-

TABLA III
MORTALIDAD DIARIA DE LARVAS DE *A. albimanus*
EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES
DE *G. virens* (CONIDIAS EN ARROZ)

Concentración (conidias/ml)	N	Mortalidad de larvas (%)				
		24h	48h	72h	96h	120h
$3,66 \times 10^7$	100	22	65	88	99	100 a
$1,83 \times 10^7$	100	16	44	55	88	96 ab
$9,16 \times 10^6$	100	15	26	41	69	88 abc
$4,58 \times 10^6$	100	0	6	15	50	85 bcd
$2,28 \times 10^6$	100	0	4	12	37	62 cd
$1,14 \times 10^6$	100	0	3	8	17	26 d
$5,72 \times 10^5$	100	0	2	6	15	24 d
Control	100	0	0	0	0	0 d

Letras iguales indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas ($F= 5,37$; $gl=7$; $P=0,0004$).

ductos libres de contaminantes y con viabilidad del 100%. La patogenicidad de las conidias producidas por el método artesanal fue excelente, ya que causó una mortalidad del 100% de las larvas de *A. albimanus* a las 120h.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) el financiamiento de este estudio a través del Proyecto N° 87102 de los Fondos Sectoriales SSA.

REFERENCIAS

- Cañedo V, Ames T (2004) *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 62 pp.
- Carrillo L (2003) *Los Hongos de los Alimentos y Forrajes*. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 47 pp.
- Castillo Z (2006) *Uso de Metarhizium anisopliae para el Control Biológico del Salivazo* (Aeneolamia spp. y Prosapia spp.) en Pastizales de Bracharia decumbens en el Petén, Guatemala. Tesis. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 64 pp.
- Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic Properties of species-groups of *Trichoderma*. I: Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57: 25-39.
- Elósegui C (2006) *Métodos Artesanales de Producción de Bioplaguicidas a Partir de Hongos Entomopatógenos y Antagonistas*. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). La Habana, Cuba. 61 pp.
- García M, Villamizar L, Torres L, Cotes A (2006) *Efecto de Subcultivos Sucesivos de Beauveria bassiana sobre sus Características y Actividad contra Premnotypes vorax*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. Costa Rica. 77: 50-56.
- Hall R (1976) *Verticillium lecanii* on the aphid *Macrosiphoniella saborni*. *J. Invertebr. Pathol.* 28: 389-391.
- Lezama R (1994) Patogenicidad de hongos parásitos de insectos. *Primer Seminario de Patología*. FCBA. Universidad de Colima. Colombia. pp 47-82.
- Mazariegos L (2003) Producción de bioplaguicidas por la empresa colombiana Laverlam. En Rottger U, Muschler R (Eds.) *Simposio Internacional de Bioplaguicidas para Países en Desarrollo*. Turrialba, Costa Rica. p. 94.
- Ordóñez-González JG, Vázquez-Martínez MG, Valdez-Delgado KM, Penilla-Navarro RP, Torres-Estrada JL y Rodríguez-Ramírez AM (2008) Fundamentos y métodos de control químico e integrado. En Rodríguez MH, Ulloa GA, Ramsey WJM (Eds.) *Manual para la Vigilancia y el Control del Paludismo en Mesoamérica*. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, México. pp. 95-136.
- Rodríguez A (2008) *Patogenicidad de Diferentes Cepas de Hongos sobre Mosquitos Anopheles albimanus Wiedemann (Diptera: culicidae) Vectores del Paludismo*. Tesis. Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, México. 93 pp.
- Soto L, Pérez M, Perera E, Castañeda R, Rodríguez N, González J, González L, Viza R, Macías D, González N (2005) Desarrollo y utilización de *Trichoderma viride* y *Gliocladium virens* como antagonistas de hongos fitopatógenos. *Rev. Agrotec. Cuba*. 5: número especial. http://dict.isch.edu.cu/dict/revista/Agrotec_nia_de_Cuba/default.htm. ISSN 568 3114.
- Szwajkowska-Michalek L, Stuper K, Lakomy P, Matysiak A, Perkowski J (2010) Contents of microscopic fungi in dusts coming from cereal analysis laboratories. *Ann. Agric. Env. Med.* 17: 101-106.
- Vázquez-Martínez MG, Hernández E, Gálvez O (2007) Aislamiento de cepas nativas de hongos asociados a insectos vectores de enfermedades. *XII Congreso de Investigación en Salud Pública*. Cuernavaca Morelos, México. p. 209.
- Vázquez-Martínez MG, Rodríguez A, Rodríguez M (2008) Patogenicidad de diferentes cepas de hongos sobre el mosquito *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: culicidae), vector de paludismo. *Entomol. Mex.* 7: 760-763.
- World Health Organization (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.