SIBIUP
Biblioteca Int. Simón Bolívar
00256112

UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA EN ENTOMOLOGIA

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE *Mesocyclops leuckarti* (COPEPODA: CYCLOPOIDA) COMO AGENTE DE CONTROL BIOLOGICO DE MOSQUITOS

IMA APARECIDA BRAGA

REPUBLICA DE PANAMA

MAYO 1994

EVALUACION DE LA CAPACIDAD DE *Mesocyclops leuckarti* (COPEPODA: CYCLOPOIDA) COMO AGENTE DE CONTROL BIOLOGICO DE MOSQUITOS

TESIS

Sometida para optar al título de Maestro en Ciencias con especialización en Entomología Médica

VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

DIRECCION DE POSTGRADO

Permiso para su publicación y reproducción total o parcial, debe ser obtenido en la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado.

Aprobado

_____ **Asesor**

_____ **Jurado**

_____ **Jurado**

DEDICATORIA

A mis padres y hermanas, por su apoyo y comprensión, y al Dr. Jorge Arias, cuyo incentivo hizo posible emprender este estudio.

AGRADECIMIENTO

De manera muy especial quiero agradecer al Dr. Michael Nelson por su patrocinio y por permitirme llevar a cabo esta investigación que se originó de sus ideas; a los profesores Cheslavo Korytkowski, Evidelio Adames y Raul Amores por su constante asesoría atención y auxilio en los procedimientos de esta tesis.

Con el mismo enfásis, agradezco al Dr. Manuel Vasquez, Director de la División de Control de Vectores del Ministerio de Salud, por permitir la utilización las instalaciones y material biológico de esta instituición y quiero particularmente reconocer el valioso apoyo de los funcionários de la Sección de Insectário y Bioterio, Sr. Armando Blas T., Sra. Ruth Gallardo, Sra. Odilia Cruz y Sr. Jose F. A. Rodriguez en todo el período de investigación.

INDICE GENERAL

Página

RESUMEN 1

SUMMARY 1

INTRODUCCIÓN 2

REVISIÓN DE LITERATURA 4
1. Copepoda 4
2. *Mesocyclops leuckarti* Claus 1857 6
2.1 Biosistemática 6
2.2 Biología 7
3. Cultivo de *Mesocyclops leuckarti* y otras especies 8
3.1. Condiciones ambientales requeridas 9
3.1.1. Tolerancia al pH 9
3.1.2. Influencia de la temperatura 9
3.1.3 Otras condiciones 10
3.2. Crías 10
3.2.1 Cultivo de algas verdes 11
3.2.2 Cultivo de *Paramecium caudatum* 11
3.2.3 Cría de *Mesocyclops* 13
4. Evaluación de *Mesocyclops* como agente de control biológico 15
4.1. Laboratorio 15
4.2. Campo 19
5. Ventajas y desventajas en uso operacional 22

MATERIALES Y METODOS 27
1. Colecta y identificación de los Cyclopoida 27
2. Cultivo de algas verdes y *Paramecium* 27
3. Cría de *Mesocyclops* 29
4. Evaluación y Determinación de la Capacidad de Depredación 30
4. 1. Evaluación de la eficacia de depredación 30
4.2. Simulación de relación interespecífica 31

RESULTADOS Y DISCUSION 33

CONCLUSIONES 49

RECOMENDACIONES 50

LITERATURA CITADA 51

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE *Mesocyclops leuckati* (COPEPODA: CYCLOPOIDA) COMO AGENTE DE CONTROL BIOLOGICO DE MOSQUITOS

La especie *Mesocylops leuckarti* (Copepoda: Cyclopidae) colectada en Panamá fue estudiada con el fin de evaluar su potencial como agente de control biológico de larvas de Culicidae. En condiciones de laboratorio esta especie fue probada contra larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* mediante ensayos para determinar la capacidad individual de depredación, pruebas de depredación de una densidad constante de *M. leuckarti* contra densidades progresivas de incremento en 25 a 200 larvas de mosquitos y en simulaciones de relación depredador- presa. Una hembra de *Mesocylops leuckarti* puede depredar un promedio de 16 larvas en un período de 24 horas. Cuando 25 larvas son expuestas a una densidad de 25 adultos de esta especie, *Mesocylops leuckarti* puede eliminar 99.8% de las larvas de *Aedes aegypti* y 95 % de las larvas de *Anopheles albimanus* en 72 horas. En jaulas de simulación se observó que esta especie puede controlar la población de inmaduros de mosquitos en seis semanas.

SUMMARY

EVALUATION OF *Mesocyclops leuckarti* CAPACITY AS BIOLOGICAL CONTROL AGENT OF MOSQUITOES

Mesocyclops leuckarti (Copepoda: Cyclopidae) collected from Panama was studied in order to evaluate its potential as biological control agent of Culicidae larvae in laboratory conditions. This specie was tested against *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus* larvae through predation trials to determine the individual predation capacity; predation trials at constant density of *Mesocyclops leuckarti* against progressives larval densities ranging from 25-200 larvae and in a simulation test of relation predator-prey. A female can depredate an average of 16 larvae in 24 hours. When 25 larvae of mosquitoes were exposed to a density of 25 adults of *Mesocyclops leuckarti*, they eliminated 99.8% of *Aedes aegypti* and 95% of *Anopheles albimanus* larvae in 72 hours. In simulation cages was observed that this species can control the immature population of mosquitoes in six weeks.

CAPITULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El uso de agentes químicos en los programas de control de mosquitos, ha permitido disminuir las densidades de las poblaciones de estos vectores de enfermedades. Por otro lado, la utilización masiva y desmedida del control con químicos, ha conducido al desarrollo de la resistencia en las poblaciones de mosquitos, a la vez que han tenido un efecto negativo en el ambiente, por lo que durante los ultimos decenios se han fomentado el uso de agentes biológicos para el control de insectos, como alternativa ecológica y económica.

Entre las alternativas biológicas dirigidas al control de larvas de Culicidae, está la utilización de los Copepoda. En la determinación de la eficacia de ellos en el control biológico se ha evidenciado que especies pertenecientes al orden Cyclopoida son las adecuadas para controlar larvas de estos insectos, ya que sus partes bucales están adaptadas a capturar y masticar, además muchas de sus especies se encuentran en los mismos habitat de las formas inmaduras de mosquitos. Entre estas especies, las pertenecientes al genero *Mesocyclops* se ubican entre las más promisoras para el control de larvas de mosquitos debido a su tamaño y capacidad depredadora.

Estudios sobre la utilización de Cyclopoida en el control de larvas de especies de importancia médica como son *Aedes aegypti, Aedes polynesiensis, Anopheles farauti*, entre otras, se efectúan de manera sistemática en varios países, demostrándose su eficacia tanto en el laboratorio como en el campo (Brown y Kay, 1990; Brown, Kay y Hendrikz, 1991; Lardeux et al., 1990; Riviere y Thirel, 1981; Riviere et al., 1987).

En Panamá no se han realizado estudios que permitan evaluar el uso de especies locales de Cyclopoida en el control de larvas de especies de mosquitos transmisoras de

enfermedades; nuestros estudios sobre su evaluación como agentes de control biológico, marcan el inicio de esta línea de investigación en Panamá, la cual pretende aportar conocimientos en esta área.

El objetivo principal de esta investigación fue encontrar entre las especies de Cyclopoida de Panamá, una, cuyas características biológicas y ecológicas le permitiese ser utilizada en el control de poblaciones naturales de mosquitos transmisores de enfermedades . Luego de múltiples ensayos y observaciones en el laboratorio la especie seleccionada fue *Mesocyclops leuckarti* . Durante el curso de esta investigación se evaluó el potencial depredador de los adultos de esta especie sobre larvas de primer estadio de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, importantes vectores del dengue y malaria, respectivamente.

CAPITULO II

REVISION DE LITERATURA

REVISION DE LITERATURA

1. Copepoda

La subclase Copepoda (Artropoda: Crustacea) es la más amplia entre los Entomostraca ya que se han descrito más de 4500 especies de la misma. La mayor parte de los Copepoda son marinos, pero existen muchas especies de agua dulce. Los hay de vida libre y parásitos, son animales muy pequeños, cuyas dimensiones van desde 1 mm. a varios milímetros. Las formas parasitarias son más grandes que las formas de vida libre (Barnes, 1969).

Los Copepoda de agua dulce de América comprenden seis ordenes: Calanoida, Cyclopoida, Harpacticoida, Caligoida, Lernaeopodoida y Arguloida (Reid, 1985).

En lo que se refiere a los Cyclopoida, estos son de vida libre, su cuerpo es claramente segmentado, más o menos alargado, cilíndrico, dividido en cabeza, tórax y abdomen y poseen especies bénticas y del plancton. Las especies del plancton son principalmente filtradoras, pero algunos capturan organismos, además de filtrar el fitoplancton y otros son estrictamente rapaces, como son los miembros dulceacuícolas de los géneros *Cyclops* y *Mesocyclops* (Barnes, 1969).

El orden Cyclopoida posee las siguientes características morfológicas: metasoma mas largo que el urosoma, cuerpo marcadamente constreñido entre los segmentos del cuarto y quinto pares de patas, antenula con 6 a 18 segmentos, alcanzando o no el margen posterior del metasoma, ambas antenulas del macho geniculadas, hembra con dos ovisacos laterales, quinto par de patas vestigial, con basipodito uniarticulado o ausente, basipodito no ampliado en el margen interno liso (Reid, 1985).

Con unas pocas excepciones, el ciclo de vida de los Cyclopoida comprende 13 estadíos, incluyendo huevo, seis estadíos de nauplio y seis estadíos de copepodito, el último de los cuales es el adulto. Durante el desarrollo de huevo a adulto, la biomasa para cambios individuales aproximadamente se multiplica 50 veces (Epp, 1980). Su reproducción es sexuada y las hembras suelen depositar los huevos en un ovisaco, que es producido por secreciones del oviducto y permanece adherido al segmento genital femenino, en el cual actúa como cámara de incubación. Según el numero de oviductos se forman uno o dos sacos, cada uno de ellos conteniendo de unos pocos a 40 huevos, pudiendo producirse a intervalos frecuentes racimos de los mismos. Por ejemplo en la especie del género dulceacuícola *Cyclops*, los huevos maduran típicamente como larvas nauplio, entre 12 horas y cinco días, produciendose inmediatamente un nuevo racimo. Después de las etapas peculiares de crecimiento nauplio, llegan a la primera etapa de copepodito, siendo que el ciclo de desarrollo puede durar de una semana hasta un año, dependiendo de las condiciones ambientales (Barnes, 1969).

En cuanto a la distribución y presencia en Centro América, Fernando y Smith (1982), indican que hasta ahora la fauna de Copepoda de esta región es poco conocida, siendo el único estudio completo el de Smith y Fernando en pocos años antes referente a los Calanoida y Cyclopoida cubanos; no obstante, con respecto a la composición faunistica del orden Cyclopoida, se puede decir que las especies de este orden para lo que es México, Centro América y Indias Occidentales consisten de: 1) un elemento templado con afinidades septentrionales; 2) especies cosmopolitas; 3) formas tropicales y 4) formas endémicas para Sur, Centro América y Caribe. El mayor componente de la fauna es tropical y las especies más comunes son *Mesocyclops leuckarti* y *Thermocyclops crassus.*

2. *Mesocyclops leuckarti* Claus 1857

2.1 Biosistemática

El género *Mesocyclops* del orden Cyclopoida hasta el presente no es bien conocido taxonomicamente comprendiendo aproximadamente 40 especies (Van de Velde, 1984; Dussart y Fernando, 1988).

Las características principales para el género *Mesocyclops* Sars, 1914 son las siguientes: todas o algunas patas triarticuladas, segmento distal de la quinta pata con dos cerdas largas aproximadamente de la misma longitud, cerda interna del segmento insertada próxima a la mitad del margen interno del segmento, antenula con 17 segmentos, último segmento antenal 3 - 5 veces mas largo que ancho (Reid, 1985). Son relativamente pequeños, con hembras usualmente midiendo 1 mm. de longitud, encontrándose raramente algunas mas largas (hasta 1.8 mm.) (Rylov 1963).

En áreas tropicales y subtropicales, *Mesocyclops* esta difundido y frecuentemente abundante en lagos de agua dulce, depósitos, arroyos y charcos.

En cuanto a *M., leuckarti* las características morfológicas que los caracterizan son descritas en los trabajos de Rylov (1963), Van de Velde (1984) y Reid (1985).

En lo que concierne a Panamá, esta especie se encuentra ampliamente distribuida en la Zona del Canal, como era esperado, siendo ella una especie cosmopolita, y ocurriendo en todos los depósitos sanitarios y en muchas otras colecciones de agua dulce. Las especies panameñas concuerdan muy estrechamente con los tipos encontrados en otras localidades. En los especímenes de Panamá se observa que la

membrana hialina del 16° segmento es menudamente aserrada; lo que se observa también en especímenes colectados cerca de La Habana, Cuba (Marsh, 1913).

2.2 Biología

La biología de Cyclopoida ha sido revisada por Dussart (1969) y Wyngaard y Chinnapa (1982). *Mesocyclops* es una de las formas más comunes del zooplancton de agua dulce y es encontrado en habitat donde se crian muchos mosquitos. (Marten, 1990a).

Mesocyclops leuckarti es básicamente una especie tropical que se adaptó a áreas más frías. Los modelos de comportamiento de *M. leuckarti* varían considerablemente en los diferentes tipos de clima. En el trópico y subtrópico, *M. leuckarti* ocurre en poblaciones que son mezclas de diferentes generaciones. En zonas frías y templadas, en el verano la población muestra una sucesión de estadíos desarrollados, pero en el invierno toda la población está en los estadíos de copepodito IV y V; estos copepoditos se sumergen en las capas profundas si la temperatura es menor a 8°C, permanecen ahí mostrando metabolismo y movimiento muy reducidos. Si, la temperatura disminuye a 4-5°C, ellos se entierran en los sedimentos y entran en estado de diapausa (Macan, 1970 En: Gophen, 1976).

Durante la vida adulta que puede llegar a 45 días, una hembra de *Mesocyclops leuckarti* puede poner de 5 a 8 ovipposturas a intervalos de 4 a 5 días (Smyly, 1961). El tiempo de desarrollo de los estadíos está inversamente relacionado con la temperatura (Smyly, 1961; Smyly, 1974; Gophen, 1976; Jamieson, 1980; Maier, 1989).

Los estadíos de nauplio y copepodito I a III son herbívoros, mientras que los estadíos de copepodito IV a V y adultos son preferencialmente depredadores (Gophen, 1976).

Los adultos y copepoditos pueden alimentarse de una amplia variedad de sustancias, desde animales como rotiferos, todos los estadíos de desarrollo de Copepoda, Cladocera , Protozoa además de plantas y detritus. Esto depende de la disponibilidad de determinado tipo de alimento en el ambiente (abundancia, tamaño, concentración). Ellos pueden determinar el tamaño de partículas disponibles de alimento, por lo que pequeños sustratos (como detritus) pueden ser consumidos solo como suplemento, cuando especies de alga filamentosa, especies coloniales u otro largo contenido de alga son disponibles (Karabin, 1978 ; Williamson ,1983, 1986).

En lo concerniente a los mecanismos de depredación, *Mesocyclops* exhibe dos tipos distintos de comportamiento en respuesta a la presencia de presas. Durante un ataque, o seguido a la perdida de una presa única capturada, *Mesocyclops* puede frecuentemente nadar en una serie de vueltas verticales estrechas para mantener o incrementar la proximidad con la presa; en presencia de altas densidades de presa *Mesocyclops* nada en una serie de círculos y vueltas horizontales; la respuesta es aparentemente estimulada por la detección de uno o más organismos presas y puede no requerir contacto y/o ingestión de la presa elegida y perseguida (Williamson, 1981).

3. Cultivo de *Mesocyclops leuckarti* y otras especies

Para criar *Mesocyclops* de forma masiva en laboratorio se tienen que pasar por etapas distintas, a saber: a) hacer una cría pura de la especie seleccionada; b) proveer

los alimentos requeridos a los diferentes estadíos de *Mesocyclops* ; c) mantener el cultivo en condiciones adecuadas de laboratorio.

Muchos autores han trabajado con *Mesocyclops*, ya sea estudiando su biología o evaluando su capacidad de utilización en control de larvas de mosquitos. Estos estudios han aportado muchos conocimientos necesarios en la obtención de una cría pura y su mantenimiento.

3.1. Condiciones ambientales requeridas

3.1.1. Tolerancia al pH

En un estudio para determinar la tolerancia a agua con diferentes grados de pH, se ha determinado que un rango de pH entre 6.0 y 8.5, resulta ser adecuado para la supervivencia de *M. leuckarti* (Amaligam y Raghunathan, 1982).

3.1.2. Influencia de la temperatura

Como mencionado anteriormente el tiempo de desarrollo esta inversamente relacionado con la temperatura y el cultivo de copepodos tropicales es mejor a temperaturas entre 24 y 28°C (Suarez, Marten y Clark, 1992 ; Lardeux et al., 1990). Como ejemplo de la influencia de la temperatura podemos citar reportes que indican que a temperaturas por debajo de 5 °C el desarrollo de los huevos de *M. leuckarti* se detiene (Einsle, 1968; Taube y Nauwerck, 1967 En: Maier, 1989) y que a temperaturas de 15 °C

y 20 ^{0}C el tiempo promedio de desarrollo para los estadíos nauplio I a IV es de 26.4 y 13.4 días, respectivamente (Maier, 1989).

3.1.3 Otras condiciones

Una salinidad menor que 10% también es deseable (Lardeux et al., 1990). Si se utiliza agua tratada, el cloro debe ser removido antes de ser utilizada, el cloro se puede eliminar dejando que el agua repose por 24 h. o más si fuera necesario, o por la adición de químicos (líquidos o en tabletas), que también eliminan metales pesados, como los utilizados en acuarios de agua dulce Aunque esto no sea crítico para el cultivo, un laboratorio con fotoperíodo determinado de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad también es deseable (Suarez , Marten y Clark, 1992).

3.2. Crías

Un hecho que no se debe olvidar es que la cría en masa de *Mesocyclops* requiere tres cultivos distintos: 1) algas verdes como *Chlorella* (Orcoccal) , que constituyen la principal dieta de los cinco estadíos de nauplios y de estadíos jóvenes de copepoditos; 2) una mezcla de zooplancton local como *Rotifer* y protozoarios largos como *Paramecium caudatum*, siendo este cultivo utilizado para alimentar copepoditos de estadíos III y IV y adultos de *Mesocyclops* y 3) cultivo de *Mesocyclops* (Riviere et al., 1987).

3.2.1 Cultivo de algas verdes

Cuando se utilizó algas del género *Ankistrodesmus* se obtuvieron los mejores resultados para los en cultivos de laboratorio, en los cuales pequeños peces fueron mantenidos con hueveras de pez, o en cultivos de Cladocera mantenidos en luz solar brillante y alimentados con pequeñas cantidades de infusión de estiércol de carnero; se debe pasar la agua del acuario a través de papel de filtro, mantenerla en frascos cubiertos y en observación durante varias semanas para prevenir la presencia de animales; puede ser deseable provisión ocasional con estiércol de carnero o con líquidos fertilizantes en pequeñas cantidades. También se puede criar el alga filamentosa *Mougeotia* de la misma manera, y en este caso utilizar un pequeño y denso racimo del alga fragmentada como alimento alternativo. Las dos algas dan excelente resultados cuando son utilizadas como fuente de alimento en el desarrollo y fertilidad de Crustacea (Cocker, 1959). También se puede cultivar *Chlorella*, alimento para nauplios y estadíos iniciales de copepoditos en medio basal de Bold (Vonshak, 1986 En: Brown , Kay y Hendrikz, 1991).

3.2.2 Cultivo de *Paramecium caudatum*

Para efectuarse una cría eficaz de los Cyclopoida que tienen un hábito alimenticio depredador, es necesario proveer presas a los mismos; los Copepoda depredan usualmente formas zooplanctonicas. Una de las presas más fáciles de ofrecer son los protozoarios, específicamente *Paramecium* por su facilidad de cría en laboratorio.

Para cultivar *Paramecium caudatum*, se pueden utilizar diversos métodos de cultivo. Un rápido crecimiento poblacional es obtenido cuando se utiliza como medio una infusión de avena sin pilar (Smith, 1959).

Otro excelente medio de cultivo para *Paramecium* es utilizar 10 g. de heno cortado y añadido a un litro de agua que se hierve por 15 minutos, después de los cuales se filtra y esteriliza, para posteriormente ser inoculado con bacterias (Le Ray y Ford, 1959). La utilización de una mezcla de dos soluciones, una de heno (50%) y la otra de suero de caballo (25%) más agua de fuente (25%) también ha resultado ser un buen medio para cultivo (Trager, 1959). Se puede, además, cultivar *Paramecium* sp. en medio de Chalkey (Provasali, 1958 En: Brown, Hendrikz y Kay 1991).

La literatura sobre metodología de cultivo de *Paramecium* es amplia y existen varios métodos estándar, como son los sugeridos por Galtsoff et al. (1959).

Otra manera de iniciar un cultivo en gran escala, es obtener cultivos de *P. caudatum* disponibles comercialmente y con ellos iniciar una producción en masa, utilizando como alimento lechuga o semilla de trigo, siendo que el inconveniente de esta última es la dificultad de obtenerla de fuentes comerciales. En este caso los protozoarios deben ser mantenidos en frascos Mason de boca ancha (900 ml. de capacidad) lavados previamente con agua caliente (al menos a 60 °C) sin utilizar jabón y se inicia la producción en gran escala. Se coloca 50 ml. de cultivo de inoculación de *P. caudatum* en el frasco con una pieza de 10 cm^2 de lechuga fresca, llenando luego hasta cerca del borde con agua declorinada y finalmente cubriendo con papel aluminio para minimizar la evaporación y prevenir el polvo o contaminación con otros microorganismos. El exceso de lechuga debe ser evitado, pues pueden producir condiciones anaerobicas las cuales suprimen las cultivos de estos protozoarios (Suarez , Marten y Clark, 1992).

Para utilizar cultivos de *P. caudatum* para alimentar Cyclopoida, su densidad debe ser estimada. Tres o cuatro días después de iniciado un cultivo, una muestra de cada frasco debe ser examinada en un microscopio en aumento de 60 veces. El cultivo estará apropiado para ser utilizado si la densidad de protozoarios excede a 500 especímenes por campo focal (Suarez , Marten y Clark, 1992).

3.2.3 Cría de *Mesocyclops*

Los experimentos para determinar la metodología correcta en la cría de Copepoda en laboratorio, se iniciaron utilizando protozoarios como fuente de alimento. Se ha observado que en experimentos exitosos para criar *Macrocyclops fuscus* se utilizaron protozoarios como fuente de alimento, así como para criar *Acanthocyclops vernalis* (Klugh,1927; Lowndes,1928 En: Fryer 1957).

Una metodología más completa para la cría seria comenzar con una hembra grávida aislada en un pequeño vial con 3 cc. de agua filtrada de pozo o agua de acuario y 1 cc. de alimento mezclado (protozoarios con pequeñas algas). Siendo el agua del cultivo cambiada o suplementada cada dos días para crías a temperatura de 23 ^{0}C o cada dos semanas a 6 ^{0}C. La condición del agua del cultivo puede ser estimada así como la necesidad de adicionar más alimento , mirando el vial a través de la luz. El liquido no debe aparecer turbio ni debe aparecer excesiva claridad, indicativo de deficiencia de comida (Cocker, 1959).

Otra alternativa para manutención de cultivos puros es conservarlos en vasos de 2 litros y hacer la producción en masa utilizando una mezcla de algas verdes unicelulares (Chlorococcales), protozoarios y rotíferos (Riviere et al.,1987). Adicionar

una cantidad de larvas de primer estadío de *Ae. aegypti* como alimento suplementario puede ser una alternativa a este método (Brown y Kay, 1990).

También se han utilizado como fuente alimenticia para criar *Mesocyclops*, bacterias, flagelados, ciliados y rotíferos, utilizando semilla de trigo como substrato; este sistema llega a producir cerca de 50.000 copepoditos o 10.000 adultos por pie cuadrado de espacio de suelo por mes (Marten, 1990a).

En una evaluación de la posibilidad de utilización de *Mesocyclops* para el control de mosquitos realizada en Australia se utilizó el siguiente método: 50 o más especímenes de *Mesocyclops* fueron pipeteados en agua (con temperatura alrededor de 25 ^{0}C) que contenía algas unicelulares, protozoarios y otros organismos microscópicos para alimentación, conteniendo además de primeros estadíos de *Ae. aegypti* como una fuente suplementaria de alimento y comida de perro pulverizada adicionada al cultivo de *Mesocyclops* para incrementar el contenido orgánico del agua. Dentro de 14 días, este cultivo inicial habría desarrollado suficiente número de *Mesocyclops* ($\geq$ 25 por litro) para iniciar cultivos puros (Brown, Kay y Hendrikz, 1991).

Se puede mencionar como otra alternativa la utilización de un régimen de alimentación que consiste de *Chilomonas* sp. (un microflagelado), *P. caudatum* y semilla de trigo; *Chilomonas* sp. sirviendo como alimento para los primeros estadíos de desarrollo (nauplios y estadíos iniciales de copepoditos) y *P. caudatum* provisto para los estadíos tardíos. La semilla de trigo provee el substrato orgánico para completar el sistema de alimento para cultivos de *Mesocyclops*, la cual puede ser substituida por otro material vegetal, como la lechuga fresca, con la que se obtiene mejores resultados. Se puede utilizar *P. multimicronucleatum* en reemplazo de *P. caudatum* (Suarez , Marten y Clark, 1992).

Entre los cuidados importantes para tener en una cría masiva están, primero la disponibilidad de una cantidad adecuada de comida antes de que se inicie el cultivo de Cyclopoida y segundo de que el cultivo sea puro. Un cultivo se consigue iniciando con hembras grávidas aisladas individualmente en frascos con una pequeña cantidad de alimento para Copepoda. Una parte de los especímenes deben ser removidos de cada frasco para su identificación solo después que madure la primera generación de la progenie. Después de dos semanas, cada frasco tendrá aproximadamente de 20 a 50 adultos de Cyclopoida que serán utilizados para iniciar un cultivo a mayor escala (Suarez, Marten y Clark, 1992).

4. Evaluación de *Mesocyclops* como agente de control biológico

4.1. Laboratorio

Las primeras referencias sobre la posibilidad de utilizar Copepoda en el control biológico de larvas de mosquitos fueron hechas por Lindberg (1949) que da conocimiento de una nota hecha en 1938 por H.S. Hurlbut, quién observó un Cyclopoida de la especie *Microcyclops varicans* alimentarse de larvas de primer estadío de *Anopheles quadrimaculatus*. Lindberg (sup. cit.) también observó *Macrocyclops viridis* atacando larvas de *Anopheles superpictus*.

Al estudiarse el comportamiento de *Toxorhynchites brevipalpis* Theobald y su evaluación como agente de biocontrol para *Aedes albopictus* en Hawaii , se inició una colonia del mismo, suministrando diferentes tipos de alimento entre los cuales se encontraban Copepoda y larvas de *Aedes* sp. y *Culex* sp. Sin embargo, se observó que

la presencia de adultos de Copepoda en los frascos de cultivo resultaron en una alta mortalidad de larvas de estos mosquitos, donde los Copepoda observados atacaban larvas, depredandolas rápidamente. Se verificó también que la especie, identificada como *Mesocyclops obsoletus* (Koch) era bastante activa, principalmente para depredar larvas de *Aedes*; por ejemplo un adulto de *M. obsoletus* ingería de 15 a 20 larvas de segundo estadío en un período de 24 horas (Bonnet y Mukaida, 1957). Posteriormente se demostró que *Mesocyclops obsoletus* (Koch) es sinónimo de *Mesocyclops leuckarti* (Riviere y Thirel, 1981).

Los estudios dirigidos a determinar la viabilidad de utilizar especies de Cyclopoida como agentes de control biológico, se iniciaron con la evaluación de la capacidad de depredación de *Mesocyclops leuckarti pilosa* Kieffer 1930, común en Tahiti en charcas terrestres de agua dulce en asociación con larvas de *Culex quinquefasciatus* Say y *Culex annulirostris* Skuse. Esta especie había sido reconocida como eficaz depredadora de los primeros estadíos de los *Aedes* de Polinesia del subgénero *Stegomyia* (*Ae. aegypti* y *Ae. polynesiensis*). Experimentos sobre sus hábitos de depredación fueron conducidos en el laboratorio durante un período de 14 meses, en los cuales huevos de *Ae. aegypti* y *Ae. polynesiensis* fueron introducidos en números conocidos en ovitrampas conteniendo hembras de *M. leuckarti pilosa*. Cuando se comparó con el control, el 91.6% de las larvas eran depredadas por *M. leuckarti pilosa* (Riviere y Thirel, 1981).

En estudios posteriores, utilizando las especies *Mesocyclops darwini* (Townsville) y *Mesocyclops aspericonis* (Brisbane) como agentes de control biológico, se evaluó la eficacia de la depredación determinando el porcentaje de mortalidad en función de la densidad de larvas de mosquitos por litro. Se ensayó con tres géneros de mosquitos,

utilizando una densidad de 25 *Mesocyclops* y 25 larvas de mosquitos por litro, a una temperatura de 25ºC con observaciones por 72 horas. La eficacia de *M.darwini* y *M. aspericonis* también fue comparada con la cepa de *M. aspericonis* de la Polinesia Francesa (importada y mantenida como estándar en el estudio de eficacia de las especies de Queensland). Para simular condiciones de campo, se adicionó a cada vaso 400 ml. de solución de *Chlorella*, 200 ml. de solución de cultivo de protozoarios, y 50 µg. de comida larval. Según los resultados de este experimento todas las especies de *Mesocyclops* prefirieron larvas de *Ae. aegypti* (100% de mortalidad), más que *Anopheles farauti* y *Cx. quinquefasciatus* la cual fue la especie menos depredada. *M. aspericonis* (estándar) fue la especie depredadora más efectiva en comparación a *M. aspericonis* (Brisbane) y *M. darwini* (Townsville). La eficacia de la depredación no tuvo relación con el tamaño de los primeros estadíos larvales, por ejemplo la larva de *Ae. aegypti* era mayor que la de *An. farauti* (Brown y Kay, 1990)

En relación a los resultados de este estudio, una vez que la eficacia de las especies de *Mesocyclops* de Queensland fue bien establecida contra densidades de 25 individuos por litro, se condujeron ensayos considerando un rango mayor de densidad de *Ae. aegypti* (50 a 200 larvas por litro). Se evidenció una diferencia significativa en la capacidad de depredación únicamente cuando la densidad larval fue de 200 larvas por litro. En orden decreciente de eficacia tenemos que *M. aspericonis* (Polinesia Francesa) fue mejor que *M. aspericonis* (Brisbane) y esta más eficaz que *M. darwini* (Brown y Kay, 1990).

Otro experimento hecho en laboratorio fue la evaluación del comportamiento y capacidad de depredación en jaula de experimento para simular interacciones de campo entre *Mesocyclops darwini* y *Aedes aegypti*. En este ensayo dos grupos de 50 adultos

de *Ae. aegypti* se colocaron en dos jaulas las cuales contenían un frasco con agua (en el cual fue colocado algas y protozoarios) para la oviposición, uno de los frascos se inoculó con 50 adultos de *M. darwini* quedando el otro frasco como control. Se realizaron observaciones por un tiempo de ocho semanas obteniéndose los resultados siguientes: en la jaula tratada, la población de *M. darwini* se incrementó exponencialmente en respuesta al abundante suplemento de larvas como alimento. En tres semanas, los *Mesocyclops* controlaron completamente las larvas de mosquitos, en ausencia de nuevas emergencias; la población de adultos de *Aedes* decreció a cero en siete semanas, tiempo en que la población de *Mesocyclops* alcanzó su equilibrio. En la jaula de control, el número de inmaduros y adultos de mosquitos llegaron a un punto de equilibrio, donde los numeros poblacionales fueron determinados por niveles de comida y restricciones de espacio (Brown y Kay, 1990).

Posteriormente, utilizando la misma metodología que Brown y Kay (1990), se evaluó la capacidad de depredación y se hicieron experimentos en jaula de simulación con varias especies de *Mesocyclops* , sus resultados demostraron que *M. aspericonis* y *M. darwini*, tenían posibilidad de ser utilizados como agente de control biológico de *Ae. aegypti*, principalmente. En vista de los resultados preliminares obtenidos existe la alternativa de poder ser utilizados contra *An. farauti* (Brown, Kay y Hendrikz, 1991).

La misma metodología de evaluación de depredación y experimento en jaula de simulación de Brown y Kay (1990) fue utilizada en ensayos para evaluar poblaciones de *M. aspericonis* y *M. longisetus* en Brasil como agentes de biocontrol contra *Ae. aegypti*, *An. farauti* y *Cx. quinquefasciatus*. Las especies *M. aspericonsis* y *M. longisetus* demostraron ser exitosos depredadores de *Ae. aegypti* y *An. farauti*, aunque deficientes para *Cx. quinquefasciatus* (Kay et al , 1992).

4.2. Campo

En cuanto a los estudios en el campo, evaluaciones donde se introdujeron cinco hembras de *Mesocyclops* en ovitrampas expuestas a condiciones naturales se registró una reducción de 85% de *Aedes aegypti* y *Aedes polynesiensis*, siendo esta tasa mantenida durante 14 meses (Riviere y Thirel, 1981).

Para la subespecie *M. leuckarti pilosa* fue evaluada la supervivencia en afluentes secundarios (SSE) de aguas cloacales y su potencial depredación sobre larvas de mosquitos. Los resultados mostraron que la supervivencia de *M. leuckarti pilosa* no fue significativamente afectada en SSE o SSE diluida al 50%. En ensayos sobre depredación, los *Mesocyclops* consumieron de 50 a 90% de las larvas de primer estadío de *Cx. qüinquefasciatus* en un período de 24 a 72 horas (Mian, Mulla y Wilson, 1986).

En la Polinesia Francesa, *M. aspericonis* fue inoculado dentro de madrigueras del cangrejo de tierra *Cardisoma carnifex* y dentro de huecos de árbol, tanques, pozos y llantas; redujo con éxito poblaciones larvales de *Ae. polynesiensis* y *Ae. aegypti* en un 91 a 99%; *M. aspericonis* persistió por 29 meses en huecos de cangrejo y por 60 meses en algunos pozos, llantas y huecos de árbol (Riviere et al., 1987).

Charcas ubicadas en las costas del Pacifico y Atlántico de Colombia fueron muestreadas cuantitativamente utilizando una red de plancton con el objeto de determinar la abundancia relativa de la fauna existente en charcas con el objeto de determinar su abundancia relativa. Muchos de estos estanques contenían un número sustancial de larvas de *Anopheles albimanus*, pero las larvas estaban virtualmente ausentes en aquellas charcas con poblaciones significativas de *M. brasilianus* ó *M. longisetus*. La abundancia de larvas de *Anopheles albimanus* en un estanque tenía una relación inversa

mayor con la abundancia de *Mesocyclops*, que con cualquier otro animal en las muestras, incluyendo peces. La asociación fue particularmente pronunciada con respecto a las pupas y los estadíos larvales II, III y IV de *Anopheles albimanus* y la relación de densidad con larvas de *Culex* no era negativa; ya que aproximadamente la mitad de los estanques con ninguno o muy pocos *Mesocyclops* contenían sustanciales números de larvas de *Anopheles albimanus*. En contraste, todos los 11 estanques con un gran número de *Mesocyclops* no contenían o tenían muy pocas larvas de *Anopheles albimanus* (Marten et al., 1989).

En New Orleans, seis especies de Cyclopoida fueron probadas para el control biológico de larvas de *Ae. albopictus* en llantas desechadas; las especies *Dyacyclops navus, Acanthocyclops vernalis, M. ruttnen* y *M. edax* en un período de seis a ocho semanas después de la introducción, redujeron el número de larvas de *Ae. albopictus* en 83, 90, 95 y 96% respectivamente; en tanto que las especies *Macrocyclops albidus* y *M. longisetus* fueron las más eficaces. En seis a ocho semanas después de la introducción de *Macrocyclops albidus*, se registró una reducción de las larvas de *Ae. albopictus* en 99%; tres meses después, la reducción por *Macrocyclops albidus* alcanzó 100%, que en el caso de *M. longisetus* fue de 99 8% . La capacidad de depredación de *M. albidus* y *M. longisetus* fue igualmente eficiente sobre larvas de *Ae. aegypti* y *Ae. triseriatus* (Marten, 1990b).

Otros bioensayos con la especie *Macrocyclops albidus*, demostraron que cuando se introduce a llantas almacenadas, son eficaces en eliminar todas las larvas de *Ae. albopictus* dentro de dos meses y los adultos de *Ae. albopictus* de los alrededores de las llantas desaparecen en un mes más; la supresión completa de larvas de *Ae.*

albopictus continua aún efectiva en todas las llantas tratadas hasta un año mas tarde (Marten, 1990c).

Cuando se introdujo *M. aspericonis* en 30 madrigueras de cangrejo en la Polinesia Francesa se logró un control eficaz de larvas de *Ae. polynesiensis* por un período de más de dos años; además se condujo un experimento en larga escala en madrigueras de cangrejos de tierra, uno de los mas numerosos sitios de cría de esta especie en la Polinesia Francesa. En este ensayo se inocularon *M. aspericonis* y se obtuvieron los siguientes resultados: en las madrigueras de cangrejo, cuatro y ocho meses después del tratamiento, el porcentaje de huecos conteniendo *Ae. polynesiensis*, fue estadísticamente menor en la isla tratada con respecto al àrea control; la diferencia desapareció a lo 13 meses post-tratamiento. Durante el mismo tiempo, el porcentaje de huecos de cangrejo con *M. aspericonis* decreció un 10%, cuatro meses después del tratamiento, en un 40% a los 8 meses y 76% a los 13 meses después del tratamiento (Lardeux et al., 1990).

Cuando se utilizó *M. aspericonis* para tratar recipientes normalmente utilizados para almacenar agua, así como pozos y cisternas, se verificó que el impacto de *Mesocyclops* sobre larvas de *Aedes aegypti* en tanques de agua y pozos cubiertos no era consistente; aparentemente este resultado dependía de la disponibilidad de la dieta microfaunal para el crecimiento de los nauplios. Como la tasa de picadura de *Ae. aegypti* no fue afectada por el control biológico de larvas, *M. aspericonis* es considerado un fracaso bajo estas condiciones (Lardeux, 1992)

5. Ventajas y desventajas en uso operacional

Varias especies de Cyclopoida son eficientes en el control de larvas de mosquitos. Su introducción en recipientes de cría de *Aedes* puede proporcionar control de larvas por meses o años (Riviere et al. 1987; Marten et al., 1989); también pueden ser utilizados para controlar otras especies de mosquitos (Mian, Mula y Wilson, 1986; Marten et al., 1989, Kay et al., 1992).

Como lo han demostrado los estudios los Cyclopoida no ofrecen un control efectivo para especies de *Culex*. Se puede hacer un control integrado cuando hay dos especies blanco como *Aedes* sp. y *Culex* sp., utilizando *Bacillus thuringiensis* variedad *israelensis*, sin detrimento de los Cyclopoida (Riviere et al., 1987).

La utilización de especies de Cyclopoida puede ser particularmente útil, donde peces larvivoros no son efectivos; su pequeño tamaño permite libertad de movimientos a través de la vegetación acuática donde las larvas de mosquitos pueden ocultarse de los peces. Ellos pueden desarrollarse en ambientes acuáticos naturales o artificiales, donde no hay macroinvertebrados que los peces requieren como alimento. Muchas especies de Cyclopoida pueden sobrevivir cuando los cuerpos de agua se secan temporalmente. La producción en masa y transporte de estos pequeños crustáceos es considerada menos costosa que la de peces (Riviere et al. 1987 En: Marten 1990a).

Algunos criterios que deben ser considerados antes de utilizar especies de Cyclopoida en control de mosquitos son: 1) Selección de la especie mas efectiva para una aplicación en particular; 2) la metodología de producción, almacenaje y distribución a gran escala; 3) la posibilidad de su integración dentro de un control práctico de mosquitos (Marten, 1990a).

En cuanto a los criterios para la selección tenemos: 1) la efectividad como depredador de larvas que por regla general, es una simple proporción en tamaño, dado que no solo adultos sino copepoditos grandes depredan larvas y la depredación debe llegar cerca de 100%; 2) el éxito en establecer una población cuando son introducidos en habitat donde el tratamiento es requerido, conociendo que las introducciones son más efectivas cuando las especies ocurren naturalmente en un habitat; 3) larga supervivencia en habitat de crianza y un conveniente costo de producción, almacenaje y distribución (Marten, 1990a).

En lo que se refiere a los tipos de habitat donde pueden ser introducidos, poco se conoce sobre la introducción en habitat acuáticos temporales. Las probabilidades de éxito parecen mejores en charcas con una fauna limitada (Marten, 1990a). La mayor complicación en aguas permanentes es probablemente debido a que los peces planctívoros acondicionan la composición de especies del zooplancton en beneficio de sus preferencias alimentarias (Hulbert y Mulla,1981 En: Marten, 1990a).

En cuanto al cuestionamiento sobre si especies exóticas pueden ser utilizadas para control biológico, se indica que unas pocas especies de Cyclopoida, preferencialmente las más grandes, pueden ser más efectivas como depredadoras de larvas y ellas pueden ser utilizadas más allá de su rango geográfico; por otro lado, especies nativas serían las más adaptadas a las condiciones locales, siendo más capaces de establecer y mantener una población cuando son introducidas en los habitat de cría de mosquitos, evitando los riesgos de impactos ambientales indeseables que podrían ocurrir debido a la introducción de especies exóticas. Por lo tanto, parece ser prudente utilizar especies locales hasta que se tenga mas experiencia usando Cyclopoida para control biológico (Marten, 1990a).

Se pueden también utilizar en el control, una única especie o una mezcla de especies. La posibles ventajas de una mezcla son la posibilidad de que una población combinada tenga mas probabilidades de desarrollarse, debido a que los recursos de alimento para dos especies pueden diferir; de cubrir un habitat de cría más completamente que una, si los hábitos de cacería de dos especies difieren y que las diferencias en tolerancia a los cambios ambientales pueden permitir que una especie sobreviva cuando la otra es destruida (Marten, 1990a). Por otro lado, a veces una mezcla puede ser menos eficiente que una sola; *Macrocyclops* sp. y *Diacyclops* sp. en llantas redujeron en 95% las larvas de *Ae. albopictus*, mientras que *Macrocyclops* sp. sólo mataba 100% (Marten et al.,1989).

En cuanto a la asociación con otros agentes de control biológico, puede ser muy eficaz si la asociación es con peces y algas indigestibles (Marten, 1986, 1987 En: Marten, 1990a). También es eficaz la asociación con larvas de *Toxorhynchites* (Focks et al., 1986 En: Marten, 1990a). Larvas de *Toxorhynchites* pueden ser particularmente útiles cuando son combinadas con especies de Cyclopoida que no son fuertes depredadores para eliminar todas las larvas de mosquito. Debido a que los mosquitos *Toxorhynchites* son eficaces depredadores de tercer y cuarto estadíos larvales, ellos complementan la depredación por Copepoda que es preferencialmente sobre larvas de primer estadío (Marten, 1990a).

En lo referente a la posibilidad de asociación del control biológico a base de Cyclopoida con medidas de control químico, un estudio sobre el efecto de los insecticidas clorpirifos y temefos (normalmente utilizados para control de larvas de mosquitos) sobre otros organismos, verificó que hay una susceptibilidad de la parte de los Crustacea a estos insecticidas cuando son aplicados en sus habitat naturales (Frank et al. , 1978).

Estudios para evaluar la posibilidad de utilizarse insecticidas aplicados conjuntamente con una inoculación de Cyclopoida para controlar larvas, verificaron que es posible la utilización conjunta con permetrin, ya que este insecticida no impide la supervivencia y reproducción de los Copepoda (Marten, 1990a). Por otro lado, temefos es totalmente incompatible, y de hecho es utilizado contra Cyclopoida, en áreas donde ellos son hospederos de *Dracunculus* (Marten, Che y Bordes, 1993).

Como anteriormente se ha mencionado, se puede asociar con *Bti* H-14 y también con aceites larvicidas. Los Cyclopoida han demostrado una baja susceptibilidad al regulador de crecimiento metoprene (juvenoide) y la utilización de este agente conjuntamente con Cyclopoida parece ser posible (Marten, Che y Bordes, 1993).

Como se puede observar hay muchas ventajas en la utilización de especies de Cyclopoida como agentes de control, principalmente por el bajo impacto que causan en el ambiente, pero como cualquier otro medio de control de larvas, se debe evaluar el impacto que causa en las poblaciones adultas de mosquitos.

Los mosquitos generalmente tienen alta fecundidad, ciclo de vida corto, alto potencial de dispersión y son eficientes colonizadores; ellos también experimentan grandes mortalidades naturales, pero son muy resistentes y se pueden recobrar rápidamente de reducciones poblacionales, en consecuencia sus poblaciones frecuentemente ascienden y caen rápidamente; estas estrategias reprodutivas no son muy importantes en el control por insecticida, pero ellas si pueden crear dificultades a los métodos de control biológico (Service, 1983).

Se ha verificado en varios estudios que cuando la mortalidad natural de mosquitos inmaduros es de 95% o más, los números de adultos que emergen pueden constituir todavía un problema (Service, 1977, 1981 En: Service 1983).

Se admite entretanto, que en muchos casos donde ocurren reducciones menos drásticas pueden darse un control aceptable, sin embargo, para evaluar la eficacia de un programa de control biológico, es esencial monitorear poblaciones de adultos (Service,1983).

El control biológico raramente resulta en una muerte inmediata , entonces si hay un brote súbito de una enfermedad transmitida por vector, la única solución practica es la aplicación de insecticidas, porque reducen rápidamente una población vectora (Service, 1985).

Cuando se utilizan los Cyclopoida, entonces es necesario tener a disposición, insecticidas con los cuales ellos sean compatibles, lo que a veces puede tornarse difícil, principalmente en el control de *Aedes aegypti* en cuyo caso el principal insecticida utilizado para el control de larvas es temefos.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Colecta y identificación de los Cyclopoida

El área de colecta fue el lago Miraflores, situado en el área del canal, localizado en las afueras del municipio de Panamá, escogido como sitio de colecta porque varias especies de Cyclopoida fueron anteriormente reportadas en este lago y porque es una de las pocas áreas del canal, donde no hay aplicación de herbicidas regularmente (Fig.1).

La colecta con red de plancton (malla de 80 µ) se hizo mediante la técnica de arrastre y mediante la utilización de un "dipper" para colectar agua en las márgenes del lago. El material colectado con "dipper" es filtrado a través de una malla de 100 µ con el objeto de obtener una muestra más concentrada. El procesamiento de la muestra en el laboratorio indujo la separación de los Cyclopoida con dimensiones cercanas a 1 mm. La identificación fue realizada por el Profesor Raul Amores, PhD, zoólogo de la Universidad de Panamá, mediante las claves de Rylov (1963) y Reid (1985).

2. Cultivo de algas verdes y *Paramecium*

Las muestra de algas colectadas del lago Miraflores, previamente filtradas, fueron colocadas en un frasco de vidrio que contenía tres litros de agua reposada, para ser observada durante varias semanas con el fin de prevenir el aparecimiento de animales no deseados en el cultivo. Al verificar la ausencia de animales, el agua fue utilizada para complementar el medio de cultivo para la cría de los *Mesocyclops.* Este cultivo de algas

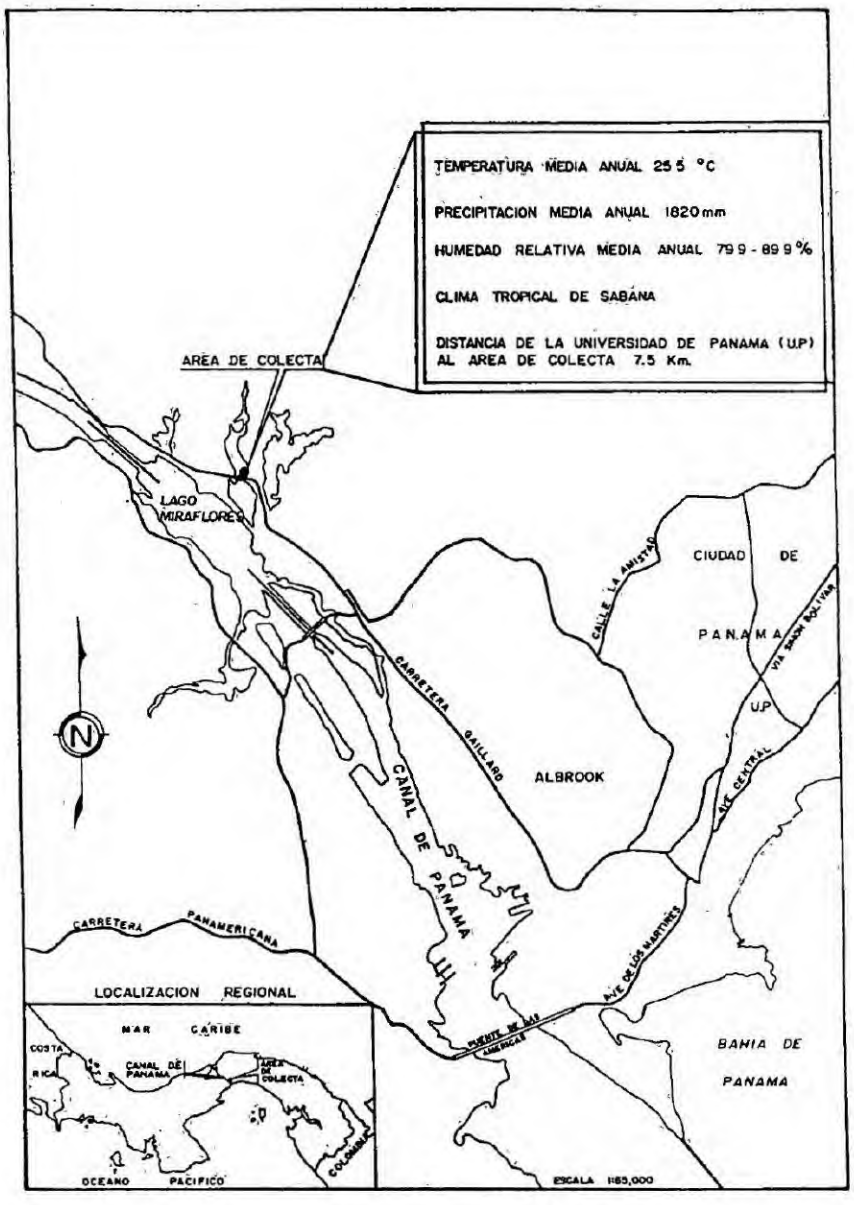

Figura 1. Ubicación del área de colecta de Copepoda - Panamá - Republica de Panamá

ubicado cerca de una ventana fue mantenido en condiciones de fotoperiodo de 12 horas utilizando una lámpara con regulador de tiempo y luz natural.

Se probaron los siguientes medios de cultivo para *Paramecium caudatum*: hierba hervida, hierba hervida más algunos granos de arroz, hierba fresca, hierba fresca más levadura, levadura y lechuga. La levadura sola tuvo mayor éxito en producir grandes poblaciones de *P. caudatum*. El material en descomposición de una zanja fue examinado para verificar la presencia de protozoarios y de este material se separaron especímenes de *P. caudatum*, los cuales fueron transferidos a frascos de 300 ml, en donde había una pequeña cantidad de levadura (5 g.) previamente macerada y diluida en agua reposada por 24 horas. Los frascos fueron cubiertos con tul y aproximadamente en una semana había un cantidad suficiente de *Paramecium* para alimentar los *Mesocyclops*. Se consideró como cantidad suficiente la muestra con más de 300 especímenes por campo focal (133mm^2) en un estereoscopio con aumento de 30 veces.

3. Cría de *Mesocyclops*

Los *Mesocyclops* fueron criados en frascos de vidrio de tres litros con boca ancha, manteniendo el agua a una temperatura promedio de 26 ^{0}C y un fotoperíodo de 12 horas. Se utilizó como alimento una mezcla de *Paramecium caudatum*, algas verdes y materia orgánica vegetal en descomposición, previamente hervida para evitar contaminación.

Para iniciar una cría pura, se aislaron hembras grávidas, que fueron colocadas individualmente en frascos de 50 ml. previamente codificados y que contenían el alimento. Estos frascos eran observados diariamente y si había nauplios, los mismos eran pasados a frascos aparte, con codificación correspondiente al frasco que contenía la hembra. Cuando la progenie de cada hembra había madurado, esta era sacrificada e identificada. La cría pura fue iniciada con las progenies de las hembras identificadas como *Mesocyclops leuckarti* .

4. Evaluación y Determinación de la Capacidad de Depredación

4. 1. Evaluación de la eficacia de depredación

Para se verificar la capacidad individual de depredación se condujeron ensayos con observaciones por un período de 24 horas en envases plásticos conteniendo aproximadamente 120 ml. de agua (procedente del lago Miraflores) previamente filtrada a través de una malla de 100 µ a los cuales se adicionó una hembra adulta de *Mesocyclops leuckarti* y 25 larvas de primer estadío de *Aedes aegypti*. A las 24 horas de observación, se contaron las larvas sobrevivientes. Se repitió este ensayo por 20 veces, en diferentes días y utilizando diferentes hembras.

En otro ensayo, basado en la metodología de Brown y Kay (1990), la capacidad de depredación fue medida como el porcentaje de mortalidad en función de las densidades de larvas de mosquito por litro. El ensayo fue conducido en frascos con un litro de agua a una temperatura promedio de 26°C durante 72 horas. Para simular

condiciones de campo fueron adicionados a cada frasco, 50 ml. de solución de *Paramecium caudatum*, 200 ml. de solución de algas y 750 ml. de agua reposada. En los ensayos una densidad de 25 adultos de copepodos por litro fueron probados contra densidades de larvas de mosquitos de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 200 por litro, por un período de 72 horas. Cada bioensayo tuvo tres replicas y frascos testigos para las larvas y para los *Mesocyclops*. Las especies de mosquitos utilizadas fueron *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.

4.2. Simulación de relación interespecífica

Para simular interacciones de campo entre *Mesocyclops leuckarti* y *Ae. aegypti* y *An. albimanus*, dos colonias de *Ae. aegypti* y dos colonias de *An. albimanus* fueron observadas durante ocho semanas, basando el diseño en la metodología de Brown y Kay (1990).

Para los experimentos con *Aedes aegypti* se utilizaron dos jaulas de 45 cm^3, siendo colocados en cada jaula 50 adultos de *Ae. aegypti*, un frasco de 1.5 litros con 300 ml. de solución de protozoario, 600 ml. de solución de algas y agua reposada hasta completar un volumen de 1.5 litros; en uno de los frascos fueron inoculados 50 adultos de *M. leuckarti* . La jaula que contenía el frasco sin inoculación de *Mesocyclops* fue utilizada como "control A" para registrar la mortalidad natural de mosquitos. Para controlar la mortalidad natural en los *Mesocyclops*, se utilizó un frasco que contenía 1.5 litros de agua con la misma mezcla de los frascos de las jaulas y en el cual fue inoculado 50 adultos de *M. leuckarti* , "control B".

Los mosquitos adultos fueron alimentados una vez por semana con cobayos por un período de dos horas, las larvas fueron alimentadas con levadura, siendo que cada vez que se echaba levadura en un frasco, se colocaba también en los otros para mantener la dieta constante.

Para *An. albimanus*, se utilizó la misma metodología, con excepción de que las jaulas tenían 60 cm^3 y los mosquitos adultos tuvieron que ser alimentados tres veces por semana, dado que la alimentación semanal mostró no ser suficiente para que las hembras ovipositen.

A fin de evaluar los resultados, se contaban semanalmente los adultos y copepoditos de *Mesocyclops* y las larvas y pupas de mosquitos existentes. Los adultos fueron contados mediante la separación diaria de pupas que se colocaban en trampas dentro de las jaulas, lo que permitía contar los emergidos y también los adultos que aparecían muertos diariamente.

Los mosquitos utilizados en todos los ensayos son provenientes de las colonias de *Ae. aegypti* (localidad: Amelia Denis de Icaza) y *An. albimanus* (localidad: Puente Bayano) del insectario de la División de Control de Vectores del Ministerio de Salud de Panamá.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

Se identificaron dos especies de Cyclopoida del tamaño apropiado (≥ 1 mm), *Eucyclops agilis* y *Mesocyclops leuckarti*. Se optó por trabajar con *Mesocyclops leuckarti* debido a que estudios anteriores demostraron que esta es una especie depredadora, mientras que *Eucyclops agilis* es una especie que se alimenta principalmente de algas y detritus (Bonnet y Mukaida, 1957; Fryer 1957; Gophen, 1977).

En los trabajos de crianza de la especie seleccionada, *Mesocyclops leuckarti*, la utilización de una mezcla de *Paramecium caudatum* y algas verdes como fuente de alimento, asociada a las condiciones de laboratorio anteriormente citadas, permitió el suministro de suficiente cantidad de *Mesocyclops* para nuestros estudios.

Cuando 25 larvas de primer estadío de *Aedes aegypti* son expuestas a una hembra de *Mesocyclops leuckarti*, por un período de 24 horas, en ausencia de otras presas, se observó que una hembra puede depredar un promedio de 16 larvas, variando entre 13 y 20. Este resultado es similar al obtenido por Bonnet y Mukaida (1957) para *Mesocyclops obsoletus* Koch, que en sus estudios verificaron que una hembra puede depredar de 15 a 20 larvas de segundo estadío de *Aedes* sp. en el mismo período de tiempo. La especie *Mesocyclops obsoletus* Koch es sinonimo de *Mesocyclops leuckarti* Claus, según Riviere y Thirel (1981).

En los Cuadros I y II, se puede observar los resultados de los ensayos en que se medió la capacidad de depredación de una densidad constante de 25 adultos de *Mesocyclops leuckarti* contra diferentes niveles de densidad de larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* por un período de 72 h. Se observó que cuando la densidad de

la presa es de 25 larvas el promedio de la mortalidad larvaria es 99.8% para *Ae. aegypti* y de 95% para *An. albimanus*, por lo que que hay una relación inversa entre porcentage de mortalidad y densidad larvaria para ambas especies.

Cuadro I. Porcentage de mortalidad de larvas I-II de mosquitos *Aedes aegypti* a una concentración de 25 adultos por litro de *Mesocyclops leuckarti*.

BIOENSAYC	DENSIDAD DE LARVAS / LITRO							
	25	50	75	100	125	150	175	200
1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	92.6	92.5
2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	96.0	94.3	93.0
3	100.0	98.0	97.3	97.0	97.6	96.0	94.3	93.0
4	100.0	100.0	100.0	97.0	97.6	96.0	94.3	99.0
5	100.0	100.0	96.0	100.0	96.8	96.0	92.6	99.5
6	100.0	98.0	100.0	100.0	96.8	95.3	95.4	92.5
7	100.0	100.0	100.0	100.0	97.6	100.0	94.9	94.0
8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.3	94.9	94.0
9	100.0	100.0	97.3	98.0	100.0	95.3	95.4	94.0
10	100.0	100.0	100.0	98.0	100.0	95.3	94.3	94.0
11	100.0	100.0	100.0	100.0	96.0	96.0	94.3	94.0
12	96.0	100.0	97.3	100.0	97.6	96.0	94.3	93.0
13	100.0	100.0	100.0	97.0	96.0	95.3	95.4	93.0
14	100.0	100.0	100.0	97.0	95.2	95.3	95.4	99.5
15	100.0	100.0	100.0	96.0	95.2	96.0	93.1	92.5
16	100.0	98.0	100.0	100.0	97.6	96.0	93.1	92.5
17	100.0	96.0	97.3	100.0	97.6	96.0	92.6	92.0
18	100.0	100.0	97.3	96.0	100.0	96.0	94.3	92.0
19	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.3	94.3	92.5
20	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	95.3	94.3	93.0
X	99.8	99.5	99.1	98.8	98.1	96.1	94.2	94.0
s	0.9	1.1	1.4	1.6	1.8	1.4	0.9	2.4

Cuadro II. Porcentage de mortalidad de larvas I-II de mosquitos *Anopheles albimanus* una concentración de 25 adultos por litro de *Mesocyclops leuckarti*.

BIOENSAYC	DENSIDAD DE LARVAS / LITRO							
	25	50	75	100	125	150	175	200
1	100.0	96.0	97.3	89.0	88.0	88.7	89.7	85.0
2	96.0	94.0	96.0	90.0	88.8	86.7	88.6	86.0
3	92.0	94.0	94.7	89.0	84.8	88.7	89.7	85.0
4	100.0	92.0	92.0	90.0	88.8	86.7	90.3	84.0
5	92.0	92.0	92.0	91.0	89.6	87.3	88.6	82.5
6	88.0	92.0	92.0	90.0	89.6	87.3	90.9	85.0
7	96.0	92.0	93.3	91.0	88.0	87.3	89.7	85.0
8	96.0	86.0	93.3	91.0	88.8	86.7	87.4	88.0
9	100.0	90.0	96.0	88.0	89.6	88.0	87.4	86.0
10	100.0	90.0	92.0	97.0	89.6	86.0	88.0	85.0
11	96.0	92.0	93.3	89.0	89.6	86.7	88.6	86.0
12	96.0	94.0	92.0	88.0	88.0	88.7	88 6	84.0
13	96.0	94.0	90.7	90.0	87.2	88.7	88.0	84.0
14	92.0	94.0	93.3	90.0	92.0	88.7	89.7	84.0
15	92.0	96.0	92.0	89.0	92.0	89.3	88.0	85.0
16	92.0	96.0	92.0	92.0	88.0	89.3	88.6	85.0
17	96.0	96.0	92.0	92.0	88.8	88.7	88.0	85.0
18	92.0	100.0	92.0	90.0	90.4	86.7	86.9	85.0
19	96.0	94.0	92.0	90.0	90.4	86.7	88.0	86.0
20	92.0	94.0	90.7	92.0	90.4	88.7	86.9	84.0
X	95.0	93.4	92.9	90.4	89.1	87.8	88.6	85.0
s	3.4	2.9	1.8	2.0	1.6	1.1	1.1	1.1

UNIVERSIDAD DE PANAMA
BIBLIOTECA

Los análisis estadísticos de regresión demuestran que la relación es significativa en aproximadamente 90% (r^2 = 0.900682) y por cada unidad de incremento en la densidad de larvas, la mortalidad decrece en 0.036% (b = 0.036) para *Aedes aegypti*. En el caso de *Anopheles albimanus* la relación es igualmente significativa en un 94% (r^2=0.943951), siendo que por cada unidad de incremento en la densidad de la presa, la mortalidad decrece en 0.053% (b = 0.053).

Aunque el porcentaje de mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* disminuyó cuando se aumentó su densidad por litro, manteniendo constante la densidad de *Mesocyclops leuckarti* , esta especie, en las condiciones de laboratório utilizadas, fue una depredadora eficaz, hasta cuando la cantidad de presa era ocho veces mayor que su propia densidad, situación en que pudo eliminar 94% de las larvas de *Ae. aegypti* y 85% de las larvas de *An. albimanus* (Cuadro I y II).

Cuando se compara la eficacia de depredación de *Mesocyclops leuckarti* sobre las especies utilizadas, ocurrió una mayor mortalidad en los diferentes rangos de densidad de larvas de *Aedes aegypti* expuestas a *Mesocyclops leuckarti*, en comparación a las mortalidades ocurridas en *Anopheles albimanus*, las diferencias oscilando entre 4.8 y 9.0% (Cuadro III). Sin embargo, los estudios de comparación de media (prueba de "F") no evidenciaron una diferencia significativa entre los promedios de mortalidades de ambas especies expuestas a una densidad constante de *M. leuckarti* (F=1.98, g.l. =7, P= 0.05)

Cuadro III. Promedio de mortalidad larvas por efecto de depredación por *Mesocyclops leuckarti*

Densidad de larvas/ l.	% de mortalidad promedio *Ae. aegypti*	*An. albimanus*	df[1]
25	99.8	95.0	4.8
50	99.5	93.4	6.1
75	99.1	92.9	6.2
100	98.8	90.4	8.4
125	98.1	89.1	9.0
150	96.1	87.8	8.3
175	94.2	88.6	5.6
200	94.0	85.0	9.0

[1]df = diferencia porcentual en el promedio de mortalidad

El porcentaje de mortalidad de 99.8%, obtenido en nuestros resultados, cuando una densidad de 25 larvas de *Aedes aegypti* por litro, son expuestos a una densidad constante de *Mesocyclops leuckarti* (n=25), son similares a los obtenidos por Brown y Kay (1990) para las especies *Mesocyclops aspericonis* y *Mesocyclops darwini*, por Brown et al.(1991) con *Mesocyclops aspericonis, Mesocyclops australiensis* y *Mesocyclops darwini* y por Kay et al.(1992) con *Mesocyclops longisetus*.

Por otro lado, si comparamos los resultados obtenidos en este estudio utilizando *An. albimanus*, con los resultados obtenidos por otros autores, utlizando diferentes esoecies de *Anopheles*, verificamos que obtuvimos 95% de mortalidad promedio de larvas de *Anopheles albimanus* (n=25) cuando expuestas a 25 adultos de *Mesocyclops leuckarti*, lo que es menor al promedio obtenido por *Mesocyclops aspericonis* (100%) y *Mesocyclops australiensis* (99%) como depredadores de *Anopheles farauti*, según estudios realizados por Brown y Kay (1990). Por otro lado, Kay et al. (1992), obtuvieron

100% y 96% de mortalidad de *Anopheles farauti* cuando utilizaron *Mesocyclops longisetus* y *Mesocyclops darwini*, respectivamente.

Los resultados obtenidos en los ensayos con densidades más altas de *Aedes aegypti* fue similar a los obtenidos por Brown y Kay(1990) y Brown et al. (1991), verificándose un decrecimiento en el porcentaje de mortalidad al aumentar el número de larvas expuestas a una densidad constante de *Mesocyclops* (n=25).

En los experimentos en jaulas simulando una condición de relación interespecifica (depredador-presa) de campo, se colocaron 50 adultos de *M. leuckarti* (depredador) y 50 adultos de mosquitos, los cuales constituyen la fuente de larvas(presa) al momento que ovipositarian en recipientes con agua donde estaban los *Mesocyclops*. Los resultados presentados en los cuadros IV y V corresponden a las dos especies de mosquitos utilizadas *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* respectivamente.

En el caso del ensayo con *Aedes aegypti* se observa que hubo un incremento en la densidad de *Mesocyclops* desde la primera semana, siendo que en la quinta semana la densidad llegó a ser ocho veces mayor que la densidad inicial y en la octava semana la densidad decreció en un 50% en relación a la semana anterior. Los mosquitos inmaduros (pupas y larvas) tuvieron su máxima densidad en la primera semana, siendo que en la sexta semana fueron eliminados hasta el final del ensayo. El incremento de los adultos empezó en la segunda semana, manteniendo esta densidad en forma sostenida hasta la sexta semana y luego alcanzando praticamente el estado inicial en la séptima semana (Cuadro IV, Fig. 2).

Cuadro IV. Densidad poblacional semanal en ensayo de relación interespecífica entre *Aedes aegypti y Mesocyclops leuckarti*

Semanas	Jaula tratada			Control A		Control B
	Copepodos	Mosq. adultos	Mosq. inm.	Mosq. adultos	Mosq. inm.	Copepodos
0	50	50	0	50	0	50
1	190	43	276	49	1065	149
2	243	120	35	106	774	207
3	163	142	8	161	176	160
4	190	137	26	201	568	197
5	407	120	14	204	1031	245
6	373	109	0	284	1089	268
7	340	64	0	354	885	215
8	156	7	0	421	581	185

Cuadro V. Densidad poblacional semanal en ensayo de relación interespecífica entre *An. albimanus y Mesocyclops leuckarti*

Semanas	Jaula tratada			Control A		Control B
	Copepodos	Mosq. adultos	Mosq. inm.	Mosq. adultos	Mosq. inm.	Copepodos
0	50	50	0	50	0	50
1	134	43	195	48	475	297
2	503	62	52	62	176	411
3	157	68	12	72	3	279
4	243	78	13	86	147	307
5	195	89	21	87	215	337
6	484	89	0	263	308	292
7	353	45	0	329	424	223
8	384	4	0	353	396	196

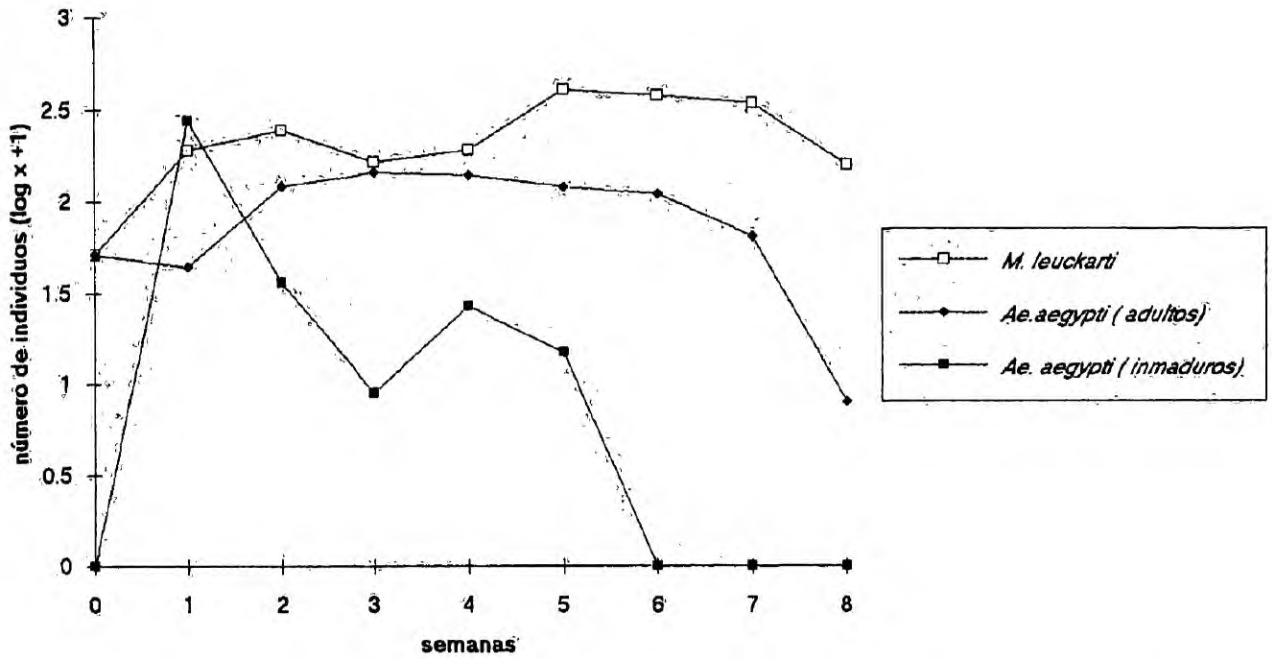

Figura 2. Cambios en la densidad poblacional de *M. leuckarti* y *Aedes aegypti* en jaula de simulación.

En lo que concierne a los controles en nuestro diseño de bioensayos, observamos en el control A (mosquitos) un aumento progresivo en la densidad de adultos, que en la octava semana correspondió a 421 individuos. En los estadíos inmaduros (larvas y pupas) se registraron altas densidades en la primera, quinta y sexta semanas correspondiendo a 1065, 1031 y 1089 individuos respectivamente. En el control B diseñado para el registro de mortalidad de *Mesocyclops* en condiciones experimentales, la densidad de *Mesocyclops leuckarti* (control B) se mantuvo sostenida de la primera a la octava semana, con un rango de 149 a 268 individuos (Cuadro IV, pg.: 39; Fig.3,4).

En el ensayo con *Anopheles albimanus* (Cuadro V, pg.: 39; Fig. 5) observamos que los *Mesocyclops* se incrementaron desde la primera semana alcanzando en la segunda semana la máxima densidad, 10 veces mayor que la inicial, en las siguientes tres semanas la densidad oscila en un rango 3 a 5 veces mayor que el inicial, en la sexta semana hay un nuevo incremento y la densidad de la octava semana es 7.5 veces mas alta que la inicial. Los mosquitos inmaduros alcanzaron su máxima densidad en la primera semana (195), decreciendo progresivamente hasta un nivel de cero individuos desde la sexta a la octava semana. Los adultos tuvieron un pequeño incremento a partir de la segunda semana, manteniendose en niveles escasamente alterados hasta que en la séptima semana se evidenció un decrecimiento que continuó hasta la octava cuando sobrevivieron cuatro individuos.

En lo que se refiere a los controles, se observa en el control A un aumento significativo de los adultos entre la sexta y la octava semana. Los inmaduros aunque aumentaron durante la segunda semana, mostraron un brusco decenso en la tercera para

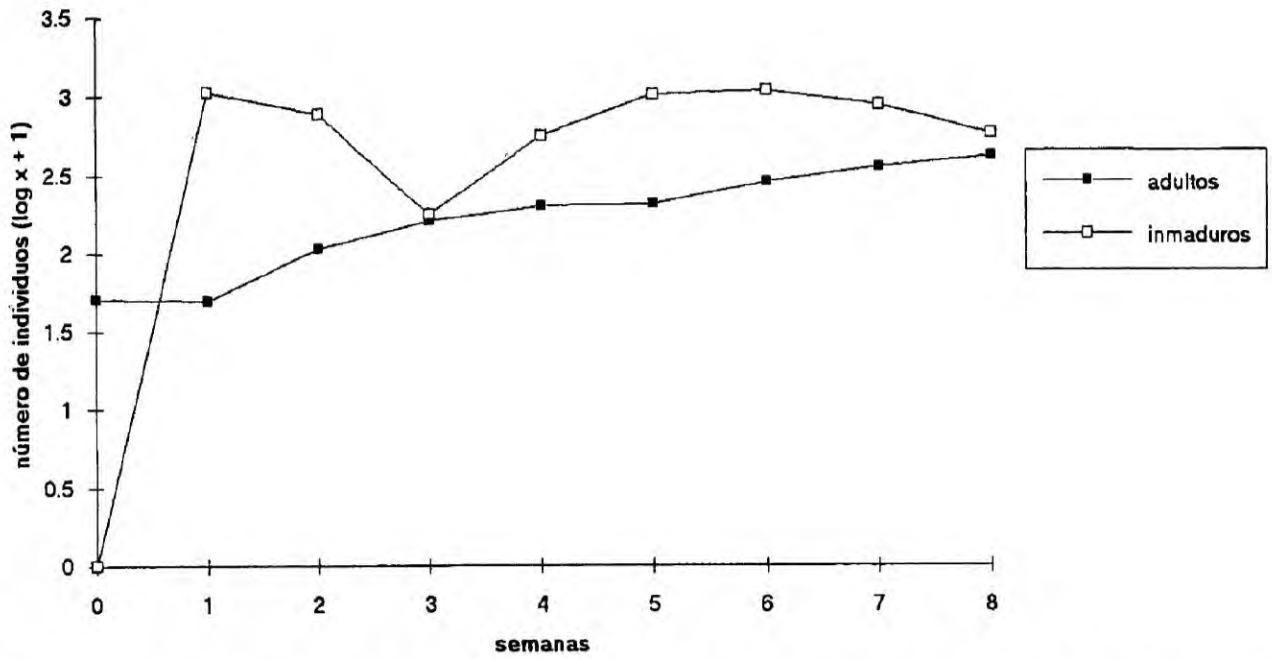

Figura 3. Densidad poblacional de inmaduros y adultos de *Aedes aegypti* en ausencia de *Mesocyclops leuckarti* (Control A).

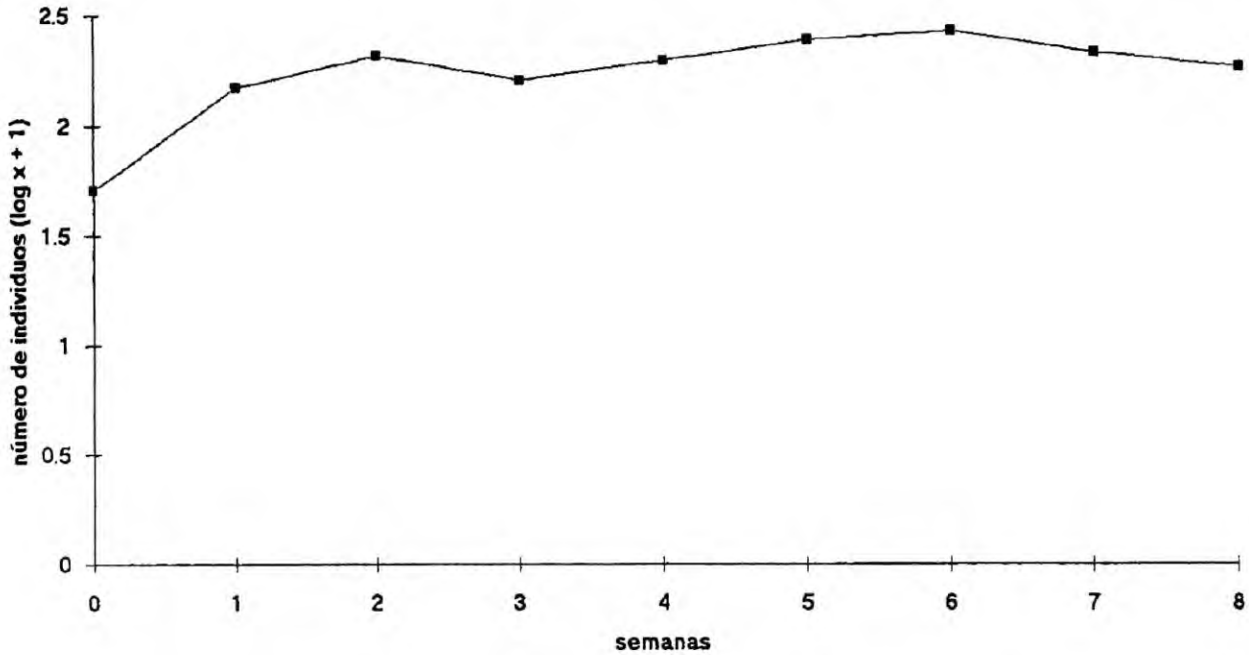

Figura 4. Densidad poblacional de *Mesocyclops leuckarti* en ausencia de larvas de mosquitos (Control B para *Aedes aegypti*).

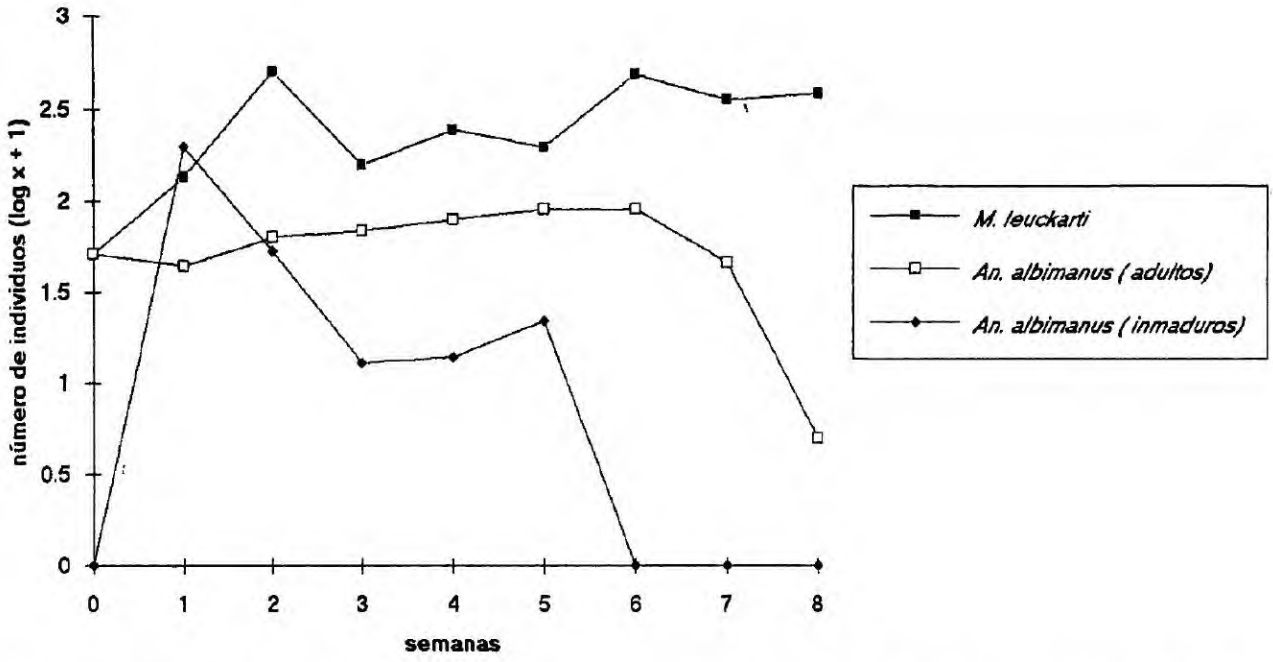

Figura 5. Cambios en la densidad poblacional de *Mesocyclops leuckarti* y *Anopheles albimanus* en jaula de simulación.

luego incrementarse a partir de la cuarta semana y hasta el final del ensayo. La densidad de los *Mesocyclops* (Control B) se mantuvo en niveles aproximadamente sostenidos, de la segunda a la sexta semana, resaltando un incremento en la tercera semana. En la séptima semana la densidad disminuyó llegando a 196 individuos en la octava semana (Cuadro V, pg.: 39; Fig.6,7).

Una observación relevante es la gran mortalidad de inmaduros de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* que ocurrió en la tercera semana en los controles y que afectó también a los inmaduros en las jaulas de simulación y que al parecer fue debido a factores externos desconocidos y ajenos al ensayo, visto que en esta semana los inmaduros de las colonias del insectário, donde se estaba realizando el ensayo también sufrieron gran mortalidad.

Estos resultados parecen indicar que la población de *M. leuckarti* se incrementó en respuesta al abundante suplimento inicial de larvas como alimento. Posteriomente como la cantidad de larvas disminuye, debido a que hay menos hembras oviponendo además de las restriciones de espacio, esta población disminuye y llega a un punto de equilibrio, como observado en el control B. En cuanto a los estadíos inmaduros, inicialmente la densidad de *M. leuckarti* parece no ser suficiente para depredar todas las larvas que eclosionan y una parte de estas consiguen pasar a fase adulta y aunque la densidad poblacional de inmaduros se vea afectada desde la primera semana, comparandose con el "control A", la población de adultos sólo empenza a disminuyer a partir de la séptima semana.

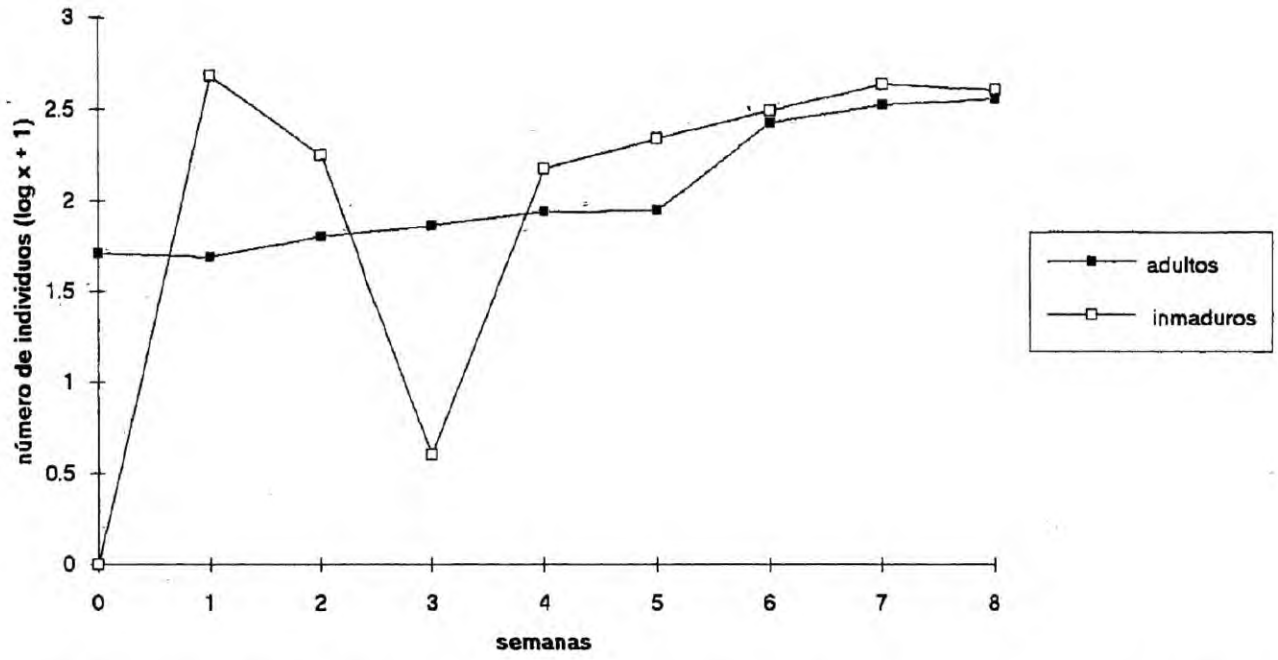

Figura 6. Densidad poblacional de inmaduros y adultos de *Anopheles albimanus* en ausencia de *Mesocyclops leuckarti* (Control A).

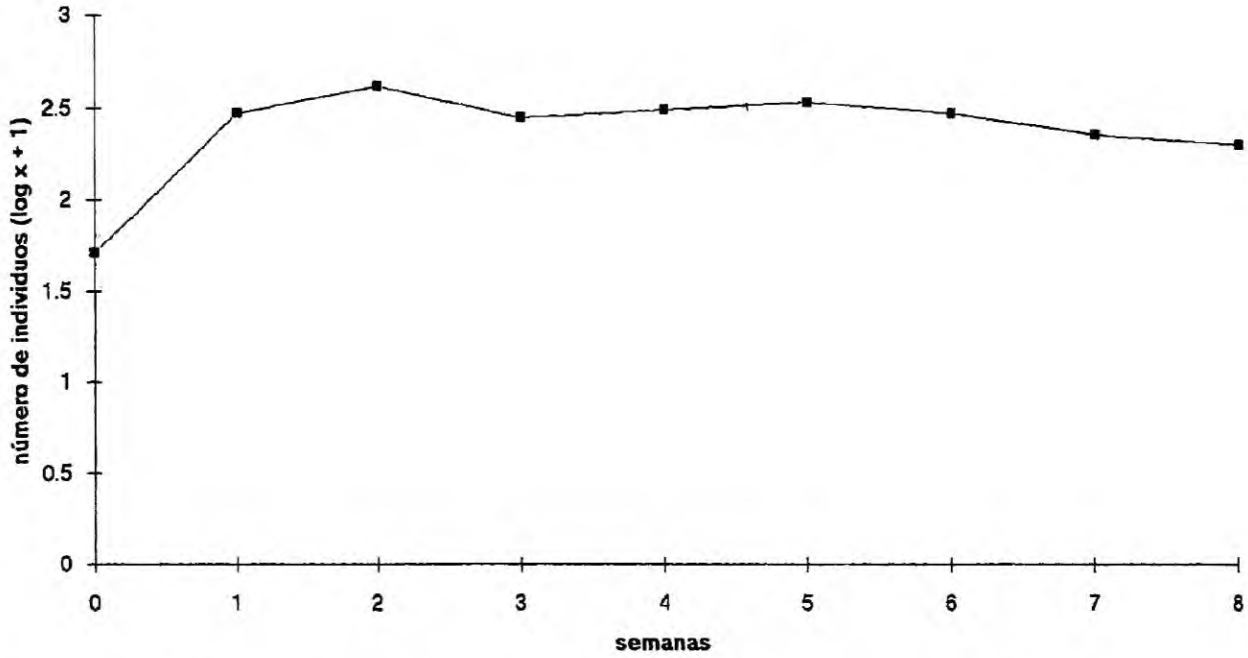

Figura 7. Densidad poblacional de ***Mesocyclops leuckarti*** **en ausencia de larvas de mosquitos (Control B para *Anopheles albimanus*).**

Si se compara nuestros resultados en la simulación de relación depredador-presa, con estudios similares a este con *Ae. aegypti* como presa, en nuestras jaulas, *Mesocyclops leuckarti* eliminó los inmaduros de *Aedes aegypti* en la sexta semana, mientras que *Mesocyclops darwini* en un experimento similar realizado por Brown y Kay (1990), eliminó las formas inmaduras en la tercera semana. Estos resultados también son similares a los obtenidos por Brown et al.(1991), con las especies *Mesocyclops aspericonis* y *Mesocyclops darwini* y por Kay et al. (1992) con *Mesocyclops longisetus*.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En base la metodología y limitaciones del presente trabajo se puede concluír que:

1) La cria masal de *Mesocyclops leuckarti* requiere que se hagan dos crías adicionales que son utilizadas como fuente de alimento, los procedimentos son sencillos y poco costosos cuando se emplea la metodología de esto estudio.

2) La cepa de *Mesocyclops leuckarti* utilizada tiene hábitos depredadores, su comportamiento es similar al observado en otros estudios, demostrando una gran capacidad de depredación, hasta en densidades larvarias ocho veces mayores que la suya.

3) Por los resultados obtenidos en laboratorio, probablemente es factible utilizar *Mesocyclops leuckarti* como agente de biocontrol de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, habiendo la necesidad de hacer ensayos preliminares en el campo para ver su comportamiento, evaluar métodos de aplicación, la eficácia de depredación y los impactos que tendrá la depredación en las poblaciones adultas de estos vectores.

4) Cuando se hizo ensayos en uno medio que contenía solamente agua potable reposada, los *Mesocyclops* morían dentro de las siguiente 24 horas, lo que acreditamos fue debido a la concentración de cloro en el agua, por tanto probablemente en el campo su eficacia en habitat naturales como charcas sea mayor en recipientes artificiales.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

Se recomiendan los siguientes pasos, antes de utilizar esta especie como agente de biocontrol:

1) Iniciar una cultura a mayor escala que la utilizada en este estudio;

2) Evaluar un método práctico de aplicación en el campo. Sugerimos que se podría probar con equipos portátiles de aplicación de agua en plantas o con los equipos de rociaminto grueso;

3) Evaluar su eficacia en los diferentes criaderos de *Aedes aegypti y Anopheles albimanus*, así como su impacto en la población adulta de estos mosquitos, bajo condiciones de campo.

CAPITULO VII

LITERATURA CITADA

LITERATURA CITADA

1 AMALIGAM, K. and RAGHUNATHAN, M. B. 1982. A study on the pH tolerance and survival of a Cyclopoid copepod *Mesocyclops leuckarti* (Claus). *Comp. Physiol. Ecol.*7(3): 188-190.

2 BARNES, R. D. 1969. Zoología de los invertebbrados. Nueva Editorial Interamericana , Mexico 761 pp.

3 BONNET, D.D. and MUKAIDA, T. 1957. A copepod predacious on mosquito larvae. *Mosquito News* 17(2): 99-100.

4 BROWN, M.D. and KAY, B.H. 1990. Evaluation of *Mesocyclops* copepodes for the biological control of mosquitoes in Northern Queensland.pp 150-153.En: M.F. Uren, J.Blok, L.H. Manderson(eds.), *Proc. Fifth Symp. Arbovirus Research in Australia*. CSIRO and Queensland Inst. Med. Res., Australia.

5 BROWN, M.D., KAY, B.H. and HENDRIKZ, J.K. 1991. Evaluation of Australian *Mesocyclops* (Cyclopoida: Cyclopidae) for mosquito control. *J. Med. Entomol.*, 28(5):618-623.

6 COCKER, R. E. 1959. Culture methods for Cyclopoid Copepods and their forage organisms 226-228. En. Culture Methods for Invertebrate Animals ed. Dover Publications, Inc., N.Y. 590 pp.

7 DUSSART, B. 1969. Les copépodes des eaux continentales d'Europe Ocidentale. Cyclopoides et biologie.Tomo II ed. N Boubée & Cie. 298 pp.

8 DUSSART, B.H. and FERNANDO, C.H. 1988. Sur quelques *Mesocyclops* (Crustacea. Copepoda). *Hydrobiologia* 157:241-264.

9 EPP, R. W. and LEWIS Jr.,W. M. 1980. The nature and ecological significance of metabolic changes during the life history of copepods. *Ecology* 61(2):259-264.

10 FERNANDO, C. H., K.E. SMITH.1982 Copepoda. En: Aquactic Biota of México, Central America and West Indies. Ed.S.H. Hurbert. San Diego 529pp

1 FRANK, A. M. AND SJOGREN, R. D.. 1978. Effect of temephos and chorpyrifos on crustacea. *Mosquito News* 38(1):138-139

2 FRYER, G. 1957. The food of some freshwater Cyclopoid copepods and its ecological significance. *The Journal of Animal Ecology* 26:263-286.

13 GALTSOFF,P.S., LUTZ, F.E., WELCH, P.S and NEEDHAN, J.G. 1959. Culture Methods for Invertebrate Animals Dover Publications Inc. New York, NY. 590pp.

4 GOPHEN, M. 1976. Temperature effect on lifespan, metabolism, and development time of *Mesocyclops leuckarti* (Claus). *Oecologia* 25:271-277.

5 GOPHEN, M. 1977. Food and feeding habits of *Mesocyclops leuckarti* (Claus) in Lake Kinneret (Israel). *Freshwater Biology* 7:513-518.

6 JAMIESON, C.D 1980. Observations on the effect of diet and temperature on rate of development of *Mesocyclops leuckarti* (Claus) (Copepoda,Cyclopoida). *Crustaceana* 38(2):145-154.

7 KARABIN, A. 1978. The pressure of pelagic predators of the genus *Mesocyclops* (Copepoda, crustacea) on small zooplankton. *Ekol. pol.* 26(2):241-257.

8 KAY, B.H., CABRAL, C. P., SLEIGH, A. C., BROWN, M. D., RIBEIRO, Z. M. and VASCONCELOS, A. W. 1992. Laboratory Evaluation of Brasilian *Mesocyclops* (Copepoda: Cyclopidae) for mosquito control. *J. Med. Entomol.* 29(4):599-602.

9 LARDEUX, F. J. R. 1992. Biological control of Culicidae with the copepod *Mesocyclops aspericonis* and larvivorous fish (Poeciliidae) in a village of French Polynesia. *Medical and Veterinary Entomology* 6:9-15.

20 LARDEUX, F. , LONCKE, S., SECHAN, Y., KAY, B.H. -and RIVIERE, F. 1990. Potentialities of *Mesocyclops aspericornis* (Copepoda) for Broadscale control of *Aedes polynesiensis* and *Aedes aegypti* in French Polynesia.pp 154-159 En: M.F. Uren, J.Blok, L.H. Manderson(eds.), *Proc. Fifth Symp. Arbovirus Research in Australia*. CSIRO and Queensland Inst. Med. Res., Australia.

1 LE RAY, W y FORD, N 1959. *Paramecium*.120-121 En: Culture Methods for Invertebrate Animals ed Dover Publications, Inc., N.Y. 590 pp.

2 LINDBERG, K. 1949. Crustacés Copepodes Comme ennemis naturels de larves d'Anophèles. *Bulletin de la société de pathologie exotique* 42: 178-179.

3 MAIER, G. 1989. The effect of temperature on the development times of eggs, naupliar and copepodite stages of five species of cyclopoid copepods. *Hydrobiologia* 184:79-88.

4 MARSH, C. D. 1913. Report on Fresh-water copepoda from Panama, with descriptions of new species. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 61(3): 1-30.

MARTEN, G.G.1990a. Issues in the development of Cyclops for mosquito control.pp 159-164.En· M.F. Uren, J.Blok, L.H. Manderson(eds.), *Proc. Fifth Symp. Arbovirus Research in Australia*. CSIRO and Queensland Inst. Med. Res., Australia.

MARTEN, G.G.1990b.Evaluation of Cyclopoid copepods for *Aedes albopictus* control in tires .*J. Am. Mosq. Assoc* 6(4):681-688.

MARTEN, G.G.1990c.Elimination of Aedes albopictus from the piles by introducing Macrocyclops albidus (Copepoda,Cyclopidae)J. Am. Mosq. Assoc 6(4):689-693.24b.

MARTEN, G. G., CHE, W. and BORDES,E. S. 1993. Compatibility of Cyclopoid copepods with mosquito insecticides. J. Am. Mosq. Assoc. 9(2):150-154.

MARTEN, G.G., ASTAIZA, R. , SUAREZ,M.F., MONJE,C. and REID, J.W. 1989. Natural control of larval *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) by the predator *Mesocyclops* (Copepoda: Cyclopoida). *J. Med. Entomol.* 26: 624-627.

MIAN, L. S., MULLA, M. S. and WILSON, B. A.. 1986. Studies on potential biological control agents of immature mosquitoes in sewage wastewater in Southern California. J. Am. Mosq. Assoc. 2(3):329-335. 27

PAPINSKA, K. 1985. Carnivorous and detritivorous feeding of *Mesocyclops leuckarti* Claus (Cyclopoida,Copepoda). *Hydrobiologia* 120:249:257.

REID, J. W. 1985. Chave de identificação e lista de referencias bibliograficas para as espécies continentais sulamericanas de vida livre da ordem Cyclopoida (Crustacea, Copepoda). *Bol. Zool., Univ. S. Paulo* 9:17-143.

RIVIERE, F. Y THIREL, R. 1981. La prédation du copépode *Mesocyclops leuckarti pilosa* (Crustacea) sur les larves de *Aedes (Stegomyia) aegypti* et de *Ae. (St.) polynesiensis* (Dip.: Culicidae). Essais préliminaires d'utilisation comme agent de lutte biologique. *Entomophaga* 26(4): 427-439.

RIVIERE, F., KAY, B.H., KLEIN, J.M. and SÉCHAN, Y. 1987 *Mesocyclops aspericornis* (Copepoda) and *Bacillus thuringiensis var Israelensis* for the biological control of *Aedes* and *Culex* vectors (Diptera: Culicidae) breeding in crab holes, tree holes and artificial containers. *J. Med. Entomol.*, 24:425-430.

RYLOV, V. M. 1963. Fauna of USSR Crustacea - Fresh-water Cyclopoida. Vol. III. ed. I.Prog. Scient. Transl. Ltd. 620 pp.

SERVICE, M. W. 1983. Biological Control of Mosquitoes - Has it a Future? *Mosq. News* 43:113-120.

SERVICE, M. W. 1985. Some ecological considerations basic to the biocontrol of Culicidae and other mediclly important insects.En: Integrated Mosquito Control Methodologies ed. Academic Press.

SMITH, G. A. 1959. Culturing *Paramecium caudatum* in oat straw infusion.127 En: Culture Methods for Invertebrate Animals ed. Dover Publications, Inc., N.Y. 590 pp.

SMYLY, W. P.1961. The life-cycle of the freshwater copepod *Cyclops leuckarti* Claus in esthwaite water. *The journal of Animal Ecology* 30:153-169.

SMYLY, W. P. 1974. The effect of temperature on the development time of the eggs of three freshwater Cyclopoid copepods from the English Lake District. *Crustaceana* 27(3):279-284.

SUAREZ, M.F., MARTEN, G.G. and CLARK, G.G.. 1992. A simple method for cultivating freshwater copepods used in biological control of *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Assoc.* 8(4):409-412.

TRAGER, W. 1959. Some methods for the pure culture of Protozoa. ed. Dover Publications, Inc., N.Y. 590 pp.

VAN DE VELDE, I. 1984: Revision of the African species of the genus *Mesocyclops* Sars, *1914* (Copepoda: Cyclopidae). *Hydrobiologia* 109:3-66.

WILLIAMSON, C.E. 1981. Foraging behavior of a freshwater copepod: frequency changes in looping behavior at high and low prey densities. *Oecologia* 50:332-336.

WILLIAMSON, C.E. 1983. Behavioral interactions between a cyclopoid copepod predator and its prey. *J. of Plankton Research* 5(5):701-711.

WILLIAMSON, C.E. 1986. The swiming and feeding behavior of *Mesocyclops*. *Hydrobiologia* 134:11-19.

WYNGAARD, G. A. and CHINAPPA, C.C.1982. General biology y Citology of cyclopoids. In:Developmental Biology of Freshwater Invertebrates, Allan Liss, New York, pp 485-533.