

EVALUACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE PULGAS *Ctenocephalides felis* Bouché (SIPHONAPTERA: PULICIDAE)

✉ Martín Moreno-Ríos¹, Eugenia del Carmen Prieto-Avella¹, Rosa Itzel Palacios-Pacheco¹, Laura Alejandra Arriola-Mosqueda², Roberto Lezama-Gutiérrez³, Enrique Corona-Barrera⁴, Abner Josué Gutiérrez-Chávez⁴, César Andrés Angel-Sahagún⁴

¹Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex Hacienda el Copal Km. 9 Carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Gto. CP 36824, México.

²Maestría Interinstitucional en Producción Pecuaria, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex Hacienda el Copal Km. 9 Carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Gto. CP 36824, México.

³Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima.

⁴Departamento de Agronomía, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex Hacienda el Copal Km. 9 Carretera Irapuato-Silao, Irapuato, Gto. CP 36824, México.

✉ Correo: sahasun01@yahoo.com.mx

RESUMEN. Las pulgas *Ctenocephalides felis* son de importancia veterinaria y de salud pública ya que pueden ser vectores y reservorios de diferentes patógenos que pueden llegar a ser zoonóticos. El estudio evaluó la patogenicidad de hongos entomopatógenos de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre pulgas adultas de *C. felis* en condiciones de laboratorio. Las pulgas fueron obtenidas de perros del Centro de atención Canina del municipio de Irapuato, Guanajuato. Los tratamientos con los hongos entomopatógenos consistieron de cuatro repeticiones con 10 pulgas por repetición y bañadas por inmersión a la concentración de 1×10^7 conidios/ml. Los resultados mostraron micosis que variaron de 90 a 100% y se encontraron cepas de las especies de *M. anisopliae* y *B. bassiana* que micosaron el 100% a una concentración de 1×10^7 conidios/ml. Se recomienda continuar evaluado cepas y realizar ensayos de virulencia para seleccionar la cepa más sobresaliente por sus concentraciones letales.

Palabras clave: Ectoparásito, Control biológico, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*.

Evaluation of entomopathogenic fungi against fleas of *Ctenocephalides felis* (Bouché)

ABSTRACT. *Ctenocephalides felis* fleas are of veterinary and public health importance because they can be vectors and reservoirs of different pathogens that can become zoonotic. The study evaluated the pathogenicity of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against adult fleas *C. felis* in laboratory conditions. Fleas were obtained from dogs of the Canine Care Center of Irapuato, Guanajuato. Treatments with entomopathogenic fungi consisted of four replications with 10 fleas repetition and washed by dipping the 1×10^7 conidia / ml. The results showed mortality ranging from 90 to 100% with strains of *M. anisopliae* and *B. bassiana* and found 100% micosaron with 1×10^7 conidia / ml. We recommend further evaluation of strains and virulence tests to select the most outstanding strain for their lethal concentrations.

Key words: Ectoparasite, Biological Control, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*.

INTRODUCCIÓN

El gato (*Felis silvestris catus*) (Schreber, 1775) brinda compañía al ser humano y su relación ofrece cambios positivos, mejora la calidad de vida y fascina a la sociedad por sus cualidades (Sanz-Aguirre, 2004). Es un buen depredador y exterminador de plagas y regula las especies nocivas (Santos-Ramos *et al.*, 2005).

Según Wall *et al.* (1997) el gato también puede ser portador de diferentes ectoparásitos, que pueden ocasionar lesiones dérmicas y afectar su calidad de salud, además de poder ser vectores de diferentes microorganismos patógenos, tanto para otros animales domésticos como para el humano. Cruz-Vazquez *et al.* (2001) mencionan que la infestación de la pulga *Ctenocephalides felis* (Bouché) es un problema común también en perros, es ectoparásito hematófago con distribución mundial, hospedero intermediario de endoparásitos y actúa como vector de microorganismos que causan zoonosis de gran importancia y que se presenta mayormente durante las temporadas de otoño y verano.

El uso de insecticidas químicos para controlar insectos plaga tiene como consecuencia el desarrollo de resistencia por los insectos, daños ambientales, de costo elevado y un comprobado daño al tener contacto con los animales y humanos. La comunidad científica ha explorado métodos alternativos que no presenten las desventajas de los productos químicos y ha encontrado en los hongos entomopatógenos una alternativa, por su gran eficacia para controlar insectos, además de que no son dañinos para los mamíferos incluyendo el hombre, entre otras ventajas (Narayan *et al.*, 2009).

El uso y aplicación de bioinsecticidas, como los hongos entomopatógenos, para controlar insectos de importancia agrícola, pecuaria, de animales de compañía y de importancia en la salud pública está cada vez más estudiado, por ejemplo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin; se utiliza para el control de larvas de mosquitos sobre las especies *Anopheles quadrimaculatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.), *Ochlerotatus atropalpus* (Lynch-Arribalzaga) y *Culex pipiens* (L.); donde encontraron en más de la mitad de 52 cepas causaron más de 50% de mortalidad de larvas, en la cual las cepas más virulentas de *Culex pipiens* fueron de patógenos sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi* (Liston) (Scholte *et al.*, 2004). En pulgas también existen estudios donde se utilizan hongos entomopatógenos de las especies de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin sobre huevos y adultos de *C. felis*, los entomopatógenos demostraron que son capaces de inhibir la eclosión de huevos y causar mortalidad de adultos.

Se cuenta con evidencias de estudios de hongos entomopatógenos sobre diferentes plagas agrícolas, pecuarias y de importancia en salud pública no obstante la información de cepas nativas de México es limitada, por lo que en el presente estudio se reporta la primera evaluación de hongos entomopatógenos sobre pulgas *C. felis* en condiciones de laboratorio que permite seleccionar cepas con potencial a utilizarse en condiciones de campo controladas y no controladas.

MATERIALES Y MÉTODO

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Parasitología y Control Biológico (LPCB) de la Universidad de Guanajuato del Campus Irapuato Salamanca División Ciencias de la Vida ubicado en la carretera Irapuato-Silao Km 7, Ex hacienda el copal Irapuato Guanajuato.

Las pulgas fueron colectadas de perros del Centro de Control Canino de Irapuato (CANI) con ayuda de un peine de cerdas separadas por 0.5mm entre cada una, se colocaron en una bolsa de polietileno (Rivera-Ramírez *et al.*, 2013) para su transporte al laboratorio. En el laboratorio se colocaron dos tiras de cinta adhesiva doble cara en cajas de Petri 90x10 mm, en cada cinta se apostaron cinco pulgas con ayuda de pinzas de disección, para facilitar su manipulación se introdujeron en un refrigerador por cuatro minutos a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para el presente estudio se utilizaron cinco aislados de hongos entomopatógenos, cuatro de *M. anisopliae* (Ma1, Ma3, Ma5 y Ma7) y uno de *B. bassiana* (Bb2), pertenecientes a la colección de hongos entomopatógenos del LPCB, inicialmente todos fueron multiplicados en Agar Dextrosa Sabouraud, enriquecido con 1% de extracto de levadura (Moorhouse *et al.*, 1993; Watson *et al.*, 1995) y con 500 ppm de Cloranfenicol (Sneh, 1991); se incubaron a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Barson *et al.*, 1994) y 12 horas luz/oscuridad, durante 21 días (Arthurs y Thomas., 2001). Después de 21 días de cultivo, los conidios se colectaron en agua destilada estéril con 0.1% de Tween 80® (Samuels *et al.*, 2002), se cuantificaron en una cámara de hematimétrica de Neubauer previa agitación durante 3 minutos y por dilución, se ajustó a la concentración de 1×10^7 conidios/mL (Watson *et al.*, 1995; Arthurs y Thomas, 2001), misma que se utilizó para realizar las evaluaciones sobre adultos de *C. felis*.

Cada tratamiento constó de cuatro repeticiones; la inoculación se realizó mediante baños de inmersión con ayuda de una pipeta sobre cada grupo de pulgas; para un grupo se utilizó agua destilada estéril con 0.1% de Tween 80® y se le consideró como Testigo. La mortalidad y micosis fueron registradas cada 48 horas en cada tratamiento con ayuda de un microscopio estereoscópico.

Los resultados de micosis fueron analizados con un análisis de varianza con arreglo completamente al azar de los porcentajes de micosis, previa transformación angular al ArcSen¹ (Arc Sen $\sqrt{\%}$) y una de separación de medias por Tukey al 95 % de confianza, lo anterior con ayuda del programa estadístico SAS (SAS, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las condiciones en que se desarrolló el presente estudio los resultados mostraron que los hongos entomopatógenos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* son eficaces para matar la pulga *C. felis* en condiciones de laboratorio a la concentración de 1×10^7 conidios/ml.

La micosis por hongos entomopatógenos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* variaron de 90 a 100% (Tabla 1). Las cepas sobresalientes Bb2 y Ma3, presentaron una micosis de 100% sobre *C. felis*; con un 96.67% la Ma7; y los menos sobresalientes con un 90% de micosis fueron Ma1 y Ma5. Resultados que son similares a los encontrados por De Melo *et al.* (2008) con cepas de hongos entomopatógenos de las misma especies evaluadas en el presente estudio, no obstante en

el presente estudio se encontraron cepas sobresalientes de las dos especies, a diferencia del estudio antes mencionado, los autores indican que las cepas de la especie de *B. bassiana* utilizadas fueron más eficientes en micosar pulgas.

En pulgas *C. canis* se han reportado resultados similares, la cepa Bb2 utilizada en el presente estudio que micosó hasta un 97.2% de pulgas adultas a la concentración de 1×10^8 conidios/ml (Ortega-Palomares *et al.*, 2013), probablemente la cepa tiene toxinas que son más eficientes para la pulga *C. felis* ya que en el presente estudio se utilizó la concentración de 1×10^7 conidios/ml.

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($p < 0.0001$). La prueba de separación de medias de Tukey formó tres grupos donde las cepas Bb2, Ma3 y Ma7 integraron las más sobresalientes, el segundo grupo lo formaron las cepas Ma1 y Ma5, y no compartieron igualdad estadística con el tercer grupo que correspondió al tratamiento testigo.

Tabla 1. Porcentaje de micosis de *C. felis* inoculados con cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* a la concentración de 1×10^7 conidios/mL y prueba de separación de medias de Tukey al 95% de confianza.

Cepa	Porcentaje de micosis y prueba de Tukey
Ma3	100.00a
Bb2	100.00a
Ma7	96.67a
Ma5	90.00b
Ma1	90.00b
Testigo	0c

*Medias con diferente letra son estadísticamente diferentes al (0.05).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal técnico y médico del Centro de Atención Canina del H. Ayuntamiento de la ciudad de Irapuato, Guanajuato por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización del presente estudio.

LITERATURA CITADA

- Arthurs, S. y Thomas, M. B. 2001. Effect of dose, pre-mortem host incubation temperature and thermal behavior on host mortality, mycosis and sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in *Schistocerca gregaria*. *Biocontrol Science Technology*. 11: 411-420.
- Barson, G., Renn, N. y Bywater, A. F. 1994. Laboratory evaluation of six species of entomopathogenic fungi for the control of the house fly (*Musca domestica* L.), a pest of intensive animals units. *Journal of Invertebrate Pathology*. 64: 107-113.
- Cruz-Vazquez, C., Castro-Gamez, E., Parada-Fernandez M. y Ramos-Parra, M., 2001. Seasonal occurrence of *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) infesting dogs and cats in an urban area in Cuernavaca, México. *Journal of Medical Entomology*. 38: 111-113.

- De Melo, D. R., Fernandes-Everton. K. K., G. L. da Costa, Fabio B, Scott y Vânia R. E. P. Bittencourt 2008, Virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to *Ctenocephalides felis felis*, Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. New York Academy of Sciences.1149: 388–390.
- Moorhouse, E. R., Gillespie, A. T. y Charnley, A. K. 1993. Selection of virulent and persistent *Metarhizium anisopliae* isolates to control black vine Weevil (*Otiorhynchus sulcatus*) larvae on Glasshouse begonia. Journal Invertebrate Pathology. 62: 47-52.
- Narayan, S. C., Maurya, P., Sharma, P. y Mohan, L. 2009. Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. Journal compilation, Entomological Research. 39: 341–355.
- Ortega-Palomares, J. E., Hernández-Rangel, A. A., Ángel-Sahagún, C. A., Cruz-Avalos, A. M., Jiménez-Lara, Y., Arriola-Mosqueda, L. A., Valencia-Posadas, M. y Lezama-Gutiérrez, R. 2013. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* sobre pulgas adultas de *Ctenocephalides canis*. (Siphonaptera: Pulicidae). Memoria del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico presentado en Oaxaca, México: Sociedad Mexicana de Control Biológico, A. C., el 7 y 8 de noviembre del 2013. pp: 518-522.
- Rivera-Ramírez, L.V., Angel-Sahagún C.A., Lezama-Gutiérrez R., Valencia-Posadas M., Ortega-Palomares J.E., Canchola-Ramírez M., 2013. Evaluación de hongos entomopatógenos sobre pulgas *Ctenocephalides canis*: resultados preliminares. Memorias del VIII Congreso Latinoamericano de Entomología, Ixtapa, Zihuatanejo, 356-359.
- Samuels, R. I., Pereira, R. C., y Gava, C. A. T. 2002. Infection of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) by Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Biocontrol Science and Technology.12:631-635.
- SAS Institute, 1997. SAS/STAT software: changes and hancements through relase 6.12. SAS Institute, Cary, NC.
- Sanz-Aguirre, L. 2004. Zootecnia general, felino doméstico. Recuperado de: <http://www.patitasvets.cl/scripts/pvt/arti.mvc?nid=27&ids=> (3/11/14).
- Santos-Ramos, A. J., Santos-Ramos. R., Vela-Villalobos, M. C. y Delia-Camarillo, A. 2005. Los gatos: origen, historia, importancia ecológica, económica y mitos y realidades. División académica de ciencias agropecuarias. 61-68. Recuperado de: http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&ved=0CCgQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.publicaciones.ujat.mx%2Fpublicaciones%2Fkuxulkab%2Fediciones%2F25%2F10_LosGatos.pdf&ei=JUVU43mKsOVqAbSpoLoBg&usg=AFQjCNHWqLNU6yxa_L-vzITQcCQ3aNJcyg (3/11/14).
- Scholte, E. J., Knols, B. G. J., Samson, R. A. y Takken, W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. The Journal of Insect Science, 4(19):1-24.
- Sneh, B., 1991. Isolation of *Metarhizium anisopliae* from insects on an improved selective medium based on wheat germ. Journal Invertebrate Pathology. 58:269-273.

- Wall, R., Shaw, S. E. y Penaliggon, J. 1997. The prevalence of flea on cats and dogs in Ireland. *Medical and Veterinary Entomology*. 11:404-406.
- Watson, D. W., Geden, C. J., Long, S. J. y Rutz, D. A, 1995. Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). *Biological Control* 5: 405-411.