

FORMULADOS DE *Beauveria bassiana* (BALSAMO) VUILLEMIN SOBRE *Ctenocephalides canis* (CURTIS): RESULTADOS PRELIMINARES

✉ Lucía del Rocío Pacheco-Basulto¹, Martín Moreno-Ríos¹, Laura Alejandra Arriola-Mosqueda², Mauricio Valencia-Posadas³, Roberto Lezama-Gutiérrez⁴, Enrique Corona-Barrera³ y César Andrés Angel-Sahagún³.

✉ Correo: sahaun01@yahoo.com.mx

RESUMEN. Los insecticidas son utilizados para eliminar la pulga *Ctenocephalides canis* en perros y gatos, aunque afectan al medio ambiente y a la población, por lo cual, se buscan alternativas como el control biológico con hongos entomopatógenos. Los formulados con aceite mineral protegen al hongo y lo adhiere al insecto. En el presente estudio, se evaluó la patogenicidad de dos cepas de *B. bassiana* (Bb2 y Bb9) a concentraciones de 10, 15 y 20% de aceite mineral, con agua estéril y Tween 80, inoculado por inmersión sobre *C. canis*. El tratamiento formulado al 10% de Bb9 resultó con micosis de 86.3 % sobre las pulgas, siendo éste el más patógeno; el menos patógeno fue el Bb2 al 15 % de aceite mineral con un 6.7 % de micosis.

Palabras clave: Hongo, Entomopatógeno, pulga, ectoparásito.

FORMULATIONS OF *BEAUVERIA BASSIANA* (BALSAMO) VUILLEMIN ON *CTENOCEPHALIDES CANIS* (CURTIS): PRELIMINARY RESULTS

ABSTRACT. Insecticides are used to eliminate the flea *Ctenocephalides canis* in dogs and cats, although they affect the environment and the population, which is seeking alternatives such as biological control with entomopathogenic fungi. Formulated with mineral oil protect the fungus and adheres to the insect. In the present study, the pathogenicity of two strains of *B. bassiana* (Bb2 and Bb9) at concentrations of 10, 15 and 20% mineral oil with Tween 80 and sterile water, inoculated on *C. canis* immersion was evaluated. The treatment formulated 10% Bb9 with mycosis was 86.3% on fleas, being the most pathogen and less pathogenic Bb2 was 15% mineral oil with 6.7% of mycosis..

Key words: Fungi, Entomopathogenic, Flea, ectoparasite.

INTRODUCCIÓN

Las mascotas como el perro y el gato representan una parte importante de la vida actual del hombre (Dantas-Torres y Otranto, 2014). Se estima que en México, el 51 % de los hogares tienen perros y el 32% gatos (Pacheco-Ríos, 2003). Los animales de compañía, al igual que el hombre o que otros vertebrados, son susceptibles a parásitos que se transmiten por diferentes medios, y éstos provocan en el animal afecciones en la salud de diferente gravedad. Las pulgas, son hospedadores intermediarios de algunos parásitos y de organismos infecciosos (Shaw *et al.*, 2004), se comportan como transmisores de varios patógenos como *Mycoplasma* spp. y *Bartonella henselae* (Regnery) (Bouhsira *et al.*, 2012), además, las larvas de las pulgas tienen hábitos coprofágicos y pueden ingerir y a su vez transmitir huevos de *Dipylidium caninum* (Linneo)(Bolio-González *et al.*, 2012).

Las pulgas son insectos parásitos del orden Siphonaptera, los adultos son ectoparásitos hematófagos de mamíferos y aves (Bitam *et al.*, 2010). Entre las principales especies de pulgas que afectan a los animales se encuentran la pulga del gato, *Ctenocephalides felis* (Bouche), y la

pulga del perro, *Ctenocephalides canis* (Curtis) (Bolio-González *et al.*, 2012). Dentro de las afecciones que causan estos insectos se encuentran el prurito y algunas lesiones cutáneas en la piel de los hospederos y dermatitis alérgica por la picadura (Bouhsira *et al.*, 2012).

Para su control se utilizan diferentes métodos que integran el control directo sobre las infestaciones en animales domésticos, la mayoría de los productos ofrecen un insecticida con un regulador de crecimiento, que afectan al desarrollo del huevo (Bouhsira *et al.*, 2012). No obstante que los insecticidas son efectivos, los costos de producción son altos, los resultados no siempre son inmediatos ni con resultados sobresalientes, y al paso del tiempo se desarrolla resistencia hacia el producto (Mnyone *et al.*, 2012), sin mencionar que también afectan al medio ambiente y a la salud de la población, principalmente niños y mujeres embarazadas. Por lo antes mencionado, es conveniente utilizar otros métodos para el control, que afecten lo menos posible a otros organismos. El control biológico, con el uso de los entomopatógenos, se ha utilizado para controlar insectos de diversos ambientes (agrícolas, pecuarios y de importancia en la salud pública). Los microorganismos entomopatógenos utilizados incluyen los virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos (Albuquerque-Maranhão y Albuquerque-Maranhão, 2009).

Los hongos entomopatógenos (HE) son un grupo filogenéticamente diverso, heterotróficos, eucariontes, unicelulares o hifales (filamentosos), que presentan esporas sexuales, asexuales e incluso ambas (Albuquerque-Maranhão y Albuquerque-Maranhão, 2009). Los hongos son los únicos patógenos de insectos que, a través del tegumento, invaden a sus hospedantes (Inglis *et al.*, 2001), particularmente los que pertenecen a los géneros *Metarhizium* y *Beauveria*, han demostrado ser herramientas para el control de artrópodos vectores (Mnyone *et al.*, 2012).

A pesar de la virulencia que estos hongos han demostrado en el laboratorio, la eficacia puede decaer cuando se someten a condiciones de campo, ya que su acción se afecta por las condiciones ambientales, tales como la temperatura, humedad, radiación solar, lluvia, así como los elementos del microclima (Ment *et al.*, 2010; Camargo *et al.*, 2012). Bateman (1992) menciona que en condiciones de ambientes secos con altas temperaturas es recomendable utilizar formulaciones aceitosas por la efectividad que estas tienen, siendo incluso 40 veces más efectivas que las suspensiones acuosas. Cuando se le agrega a las suspensiones fúngicas aceites minerales y vegetales, aumenta la adhesión del conidio a la cutícula del hospedero, la cual protege al hongo de condiciones ambientales no favorables (Alves, 1998). La mezcla de los hongos con adherentes-dispersantes de tipo aceitoso o aquellos que facilitan que el ingrediente activo quede encapsulado, permite que las gotas finas de las formulaciones impacten y persistan sobre los insectos que se desean controlar (Alatorre-Rosas, 2006).

Un estudio previo (Rivera-Ramírez *et al.*, 2013) demostró que los HE de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin son patógenos para las pulgas *C. canis* bajo condiciones de laboratorio, los porcentajes de micosis de las tres cepas de hongos utilizadas resultaron ser entomopatógenas para las pulgas, específicamente la cepa Bb2 de *B. bassiana* tuvo un 20% de micosis. Otro estudio de Ortega-Palomares *et al.* (2013) confirmó que los HE son eficaces para eliminar la pulga *C. canis* bajo condiciones de laboratorio reportando micosis donde la especie más sobresaliente fue *B. bassiana* con la cepa Bb2 que mostró un 97.2 % de micosis, seguida de Bb9 con 96.4 sobre *C. canis*, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar formulados de dos cepas de *B. bassiana* sobre *Ctenocephalides canis* (Curtis).

MATERIALES Y MÉTODO

El presente estudio se realizó en el del Laboratorio de Parasitología y Control Biológico (LPCB) de la División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, de la Universidad de Guanajuato, ubicado en el km. 9 de la carretera Irapuato-Silao Ex - Hacienda el Copal, Irapuato, Guanajuato.

Las pulgas *C. canis* que se utilizaron, se obtuvieron de cánidos con infestaciones ectoparasitarias recolectadas por integrantes del LPCB en el Centro de Atención Canina del Municipio de Irapuato, Guanajuato. Las Pulgas se extrajeron manualmente con la metodología de Rivera-Ramírez *et al.* (2013), con peines con 1 mm entre cerdas y se colocaron en bolsas de polietileno y se transportaron al laboratorio para realizar las evaluaciones.

Las cepas de HE que se utilizaron en la presente investigación fueron Bb2 y Bb9 de *B. bassiana*, nativas del estado de Guanajuato, y que fueron seleccionadas por ejercer micosis en más del 95 % de las pulgas *C. canis* bajo condiciones de laboratorio con soluciones acuosas (Ortega-Palomares *et al.*, 2013). Inicialmente, los hongos fueron cultivados en Agar Dextrosa Sabourand con 1 % con extracto de levadura y 500 ppm de Cloranfenicol y se incubaron por 21 días a 25 ± 1 °C, para la producción de manera masiva, se realizó en granos de arroz dentro de bolsas de polipropileno, las cuales fueron inoculadas e identificadas (Camargo *et al.*, 2012). Después de 21 días los conidios fueron recolectados con ayuda de agua destilada con Tween 80 al 0.1 % y se extrajeron con ayuda de una centrífuga a 4500 rpm por 10 minutos, una vez terminado el sobrenadante se descartó y el sedimento se colocó en una campana de flujo laminar por 3 días para eliminar la mayor cantidad de humedad para facilitar la formulación. Posteriormente la masa centrifugada de HE se pulverizó con un pistilo sobre un mortero para obtener los HE en forma de polvo y se determinó la cantidad de conidios por gramo con ayuda de una Cámara de Neubauer, posteriormente se ajustó la concentración a 1×10^8 conidios/mL.

En el laboratorio se seleccionó adultos de *C. canis* para realizar los experimentos, la inoculación se realizó siguiendo la metodología de Camargo *et al.* (2012), con algunas modificaciones. Se formaron tres grupos que corresponden a las cepa Bb2, Bb9 y al grupo testigo, cada uno tuvo tres tratamientos con diferentes concentraciones de aceite mineral (10, 15 y 20 % de aceite mineral estéril, y 1 % de Tween80) de acuerdo con lo recomendado por Angelo *et al.* (2010) (Cuadro 1). Todos los formulados tenían una concentración final de 1×10^8 conidios/mL. Para realizar la inoculación se colocaron diez pulgas en cinta masking doble cara en cada una de las cajas Petri de 90x15 mm sobre una capa doble de papel filtro humedecido con agua destilada estéril para facilitar la proliferación del hongo entomopatógeno (Rivera-Ramírez *et al.*, 2013), para cada tratamiento se utilizaron cuatro repeticiones.

Los bioensayos consistieron inoculación por inmersión en la suspensión conidial e incubación a 25 ± 1 °C. La mortalidad se registró cada 48 horas por al menos 14 días para observar las micosis sobre el cuerpo de *C. canis*, con ayuda de un microscopio estereoscopio.

Cuadro 1. Contenido de formulados de *B. bassiana* para la evaluación sobre *C. canis*.

Grupos	Tratamiento (con tres repeticiones)	% aceite mineral	% suspensión Acuosa	% de Tween 80
Bb2	1	10	89	1
	2	15	84	1
	3	20	79	1
Bb9	4	10	89	1
	5	15	84	1
	6	20	79	1
Testigo	7	10	89	1
	8	15	84	1
	9	20	79	1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las condiciones en que se realizaron los experimentos se logró observar que *B. bassiana* formulado con aceite mineral es patógeno sobre *C. canis* bajo condiciones de laboratorio.

En el presente estudio se encontró una micosis de 42.3 % con 10 % de aceite mineral, 6.7 % para el formulado de 15% y de 23.3 % de micosis con 20 % de aceite mineral (Cuadro 2).

Rivera-Ramírez *et al.* (2013) demostraron en sus estudios preliminares la patogenicidad de *B. bassiana* en soluciones acuosas por inmersión sobre *C. canis* de la cepa Bb2 con un 20 % de micosis, resultados por debajo al presente estudio en formulaciones de 10 y 20 % de aceite mineral, en experimentos finos Ortega-Palomares *et al.* (2013) reportaron micosis de 97.2 % para la misma cepa, dichos resultados son significativamente superiores a los encontrados en todas las formulaciones evaluadas de la cepa Bb2, probablemente esta cepa es afectada por la presencia del aceite mineral.

Ortega-Palomares *et al.* (2013) reportaron micosis de la cepa Bb9 en soluciones acuosas de 96.4 % de sobre *C. canis* mientras que en este estudio, los formulados con aceite mineral tuvieron resultados máximos de 86.3 % de micosis con 10 % de aceite mineral, 76.7 % de micosis con 15 % de aceite mineral y 85.2 % con el formulado de 20 %, ninguna solución oleosa de Bb9 mejoró los porcentajes de micosis con soluciones acuosas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de micosis de los formulados de las cepas Bb2 y Bb9 de *B. bassiana* sobre *C. canis*.

Cepa	Formulados de aceite mineral		
	10 %	15 %	20 %
Bb2	42.3 %	6.7 %	23.3 %
Bb9	86.3 %	76.7 %	85.2 %
Testigo	0 %	0 %	0 %

En el presente estudio no se observó alguna cepa de *B. bassiana* que obtuviera el 100% de micosis sobre *C. canis* a diferencia de los estudios realizados por Mnyone (2012), que indicó que el hongo es capaz de infectar a la larva de la pulga de rata *Xenopsylla brasiliensis* (Baker), con el 100 % de mortalidad a los 11 días, probablemente la pulga *C. canis* sea menos susceptible a los

hongos entomopatógenos o tenga mecanismos para inactivarlos antes de que le causen daños o por la poca efectividad de las cepas de *B. bassiana* nativas del estado de Guanajuato.

Wang *et al.* (2002) indica que aunque una cepa haya tenido buenos resultados *in vivo* e *in vitro*, las formulaciones no siempre resultan en una interacción sinérgica, incluso pueden retardar el tiempo de micosis de una cepa muy virulenta o anular el efecto en una cepa débil, tal efecto probablemente se observó, no obstante son necesarios más estudios que permitan dilucidar el fenómeno observado en el presente estudio.

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

- Alatorre-Rosas, R. 2006. Hongos entomopatógenos como insecticidas microbianos. Memoria del XVII Curso Nacional de Control Biológico, Manzanillo, Colima: Sociedad Mexicana de Control Biológico, Angel-Sahagún, C. A. (Edit). Pp. 250.
- Albuquerque-Maranhão, E. A. de A. y Albuquerque-Maranhão, E. H. de A. 2009. Hongos entomopatógenos importante herramienta para el control de Moscas Blancas (Homoptera: Aleurodidae). Anais da Academia Pernambucana de Ciencia Agronómica, 5-6:209-242.
- Alves, S. B. 1998. Fungos entomopatógenos. Alves, S. B. (Edit.) Controle Microbiano de Insetos, Piracicaba: FEALQ. Pp. 289-382.
- Angelo, I. C., Fernandes, E. K. K., Bahisense, T. C., Peronotto, W. M. S., Moraes, A. P. R., Terra, A. L. M., Bittencourt, V. R. E. P. 2010. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Parasitology, 172:317-322.
- Bateman, R. P. 1992. Controlled droplet application of mycoinsecticides: and environmentally friendly way to control locust. Antenna, 16(1):6-13.
- Bitam, I., Dittmar, K., Parola P., Whiting, M. F., Raoult, D., 2010. Fleas and flea-borne diseases. International Journal of Infectious Diseases, 14:e667-e676.
- Bolio-González, M. E., Rodríguez-Vivas R. I., Sauri-Arceo, C. H., Gutiérrez-Blanco, E., Morales-Puerto, E. J., Aranda-Cirerol, F. J., Montes de Oca-Jiménez R., Manrique-Saide, P. C., Rosado-Aguilar, J. A., Puerto-Nájera J. L. 2012. Prevalencia y lesiones cutáneas de *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis* en perros del estado de Yucatán. Bioagrobiencias, 5(1):15-19.
- Bouhsira, E., Lienard E., Jacquet P., Warin S., Kaltsatos V., Baduel L., Franc M. 2012. Efficacy of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen on adult fleas, flea eggs collection, and flea egg development following transplantation of mature female fleas (*Ctenocephalides felis felis*) from cats to dogs. Veterinary Parasitology, 190:541-546.
- Camargo, M. G., Golo, P. S., Angelo, I. C., Perinotto, W. M. S., Sá, F. A., Quinelato, S., Bittencourt, V. R. E. P., 2012. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. Veterinary Parasitology, 188:140-147.

- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2014. Dogs, cats, parasites and humans in Brazil: opening the black box. *Parasites & Vectors*, 22(7):1-25.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., Strasser, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. Butt, T. M., Jackson, C. W. y Magan, N. (Edit.) *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potencial*, Wallingford, U. K. CAB International. Pp. 23-69.
- Klein, M. G., Y Lacey, L. A. 2010. An attractant trap for autodissemination of entomopathogenic fungi into populations of Japanese beetle, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biocontrol Science and Technology*, (9):151-158.
- Ment, D., Gindin, G., Glazer, I., Perl, S., Elad, D., Samish, M. 2010. The effect of temperature and relative humidity on the formulation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fungal Biology*, 114(1):49-56.
- Mnyone, L.L., Ng'habi, K.R., Mazigo, H.D., Katakweba, A.A., Lyimo, I.N. 2012. Entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* reduce the survival of *Xenopsylla brasiliensis* larvae (Siphonaptera: Pulicidae). *Parasites & Vectors*, 204(5)1-3.
- Ortega-Palomares, J. E., Hernández-Rangel, A. A., Angel-Sahagún, C. A., Cruz-Ávalos, A. M., Jiménez-Lara, Y., Arriola-Mosqueda, L. A., Valencia-Posadas, M., Lezama-Gutiérrez, R. 2013. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Cordyceps bassiana* sobre pulgas adultas de *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico*, Oaxaca: Sociedad Mexicana de Control Biológico, A. C. Pp. 718.
- Pacheco-Rios, A. 2003. Mascotas en los hogares: enfermedades de los niños adquiridas por convivencia con animales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 24(4):137-148.
- Rivera-Ramírez, L.V., Angel-Sahagún, C. A., Valencia-Posadas, M., Ortega-Palomares, J. E., Canchola-Ramírez, M. 2013. Evaluación de hongos entomopatógenos sobre pulgas *Ctenocephalides canis*: Resultados preliminares” en VIII Congreso Latinoamericano de Entomología, Zihuatanejo: Sociedad Mexicana de Entomología. Pp. 356-359.
- Shaw, S. E., Kenny, M. J., Tasker, S., Birtles, R. J. 2004. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouche) in the United Kingdom. *Veterinary Microbiology*, 102(3-4):183-188.
- Wang, C. S., Li, Z. Z., Butt, T. M. 2002. Molecular studies of co-formulated strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 80(1):29-34.