



INFORME BREVE

Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrafa común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia

Adriana P. Tofiño Rivera^{a,c,*}, Mailen Ortega Cuadros^{b,d}, Bertilda Pedraza Claros^c, Sandra C. Perdomo Ayola^a y Diana Carolina Moya Romero^a

^a Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), C.I. Motilonia, Codazzi, Cesar, Colombia

^b Universidad de Antioquia (UdeA), Medellín, Colombia

^c Grupo de Investigación CIENCIAUDES, Facultad de Salud, Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Santander (UDES), Valledupar, Cesar, Colombia

^d Grupo de investigación Parasitología, Agroecología Milenio, Programa de Microbiología, Universidad Popular del Cesar (UPC), Valledupar, Cesar, Colombia

Recibido el 20 de mayo de 2017; aceptado el 4 de octubre de 2017

Disponible en Internet el 7 de mayo de 2018

PALABRAS CLAVE

Control biológico;
Ectoparásitos;
Ganadería

Resumen Se evaluó la efectividad de Baubassil® (*Beauveria bassiana*) sobre la garrafa *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. En la fase *in vitro*, se determinaron la temperatura óptima de germinación del hongo mediante microcultivos a 25, 30 y 35°C, y la mortalidad de las garrapatas. En campo, en un diseño aleatorio, se utilizaron 30 vacas cebuinas; 15 vacas se trataron con Baubassil® una vez por semana con 1×10^6 conidias/ml y un grupo control se dejó sin tratamiento. Se observó que a temperaturas de 25, 30 y 35°C, la germinación del entomopatógeno fue del 97,5, el 94,7 y el 6,3%, respectivamente. En los animales tratados con Baubassil® se obtuvo una efectividad corregida del 96,8%. En el Caribe Seco, Baubassil® constituiría una alternativa de control del ectoparásito, pues no existen registros anteriores en La Guajira del control sostenible de esta garrapata.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: atofino@corpoica.org.co, ad.tofino@mail.udes.edu.co (A.P. Tofiño Rivera).

KEYWORDS

Biological control;
Ectoparasites;
Cattle

Effectiveness of *Beauveria bassiana* (Baubassil®) on the common cattle tick *Rhipicephalus microplus* in the Department of Guajira, Colombia

Abstract The effectiveness of Baubassil® (*Beauveria bassiana*) on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* was evaluated. In the *in vitro* phase, the optimal germination temperature of the fungus was determined by microcultures at 25, 30 and 35°C and the mortality of ticks. In the field, in a randomized design, 30 cebuine cows; 15 cows were treated with Baubassil® once a week at a 1×10^6 conidia/ml, and a control group was left untreated. It was observed that at temperatures of 25, 30 and 35°C, germination of the entomopathogen was 97.5, 94.7 and 6.3%, respectively. In animals treated with Baubassil® obtained a corrected effectiveness of 96.8% on ticks in the fifth week of application. The use of Baubassil® would be a valid alternative for controlling the cattle tick under the agroecological conditions of the Dry Caribbean.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La ganadería bovina ocupa el primer renglón de cobertura en Colombia, con el 78% de las fincas, de las cuales el 32% se encuentra en la región Caribe bajo el sistema producción de leche y carne en un mismo esquema o doble propósito¹⁴. En el caso específico de La Guajira, dicha actividad es baja respecto al contexto de la región, con una participación del 5,87%, asociado entre otros factores a parásitos como la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae)¹⁰.

Las garrapatas afectan al 80% del ganado bovino mundial¹², con pérdidas en US\$ 7 billones y de esos un billón corresponde a Latinoamérica⁶; en Colombia, las pérdidas anuales ascienden a US\$ 25,3 millones aproximadamente⁵. En el país, los métodos para el control de garrapatas se fundamentan en la utilización intensiva de ixodicidas químicos, como organofosforados y piretroides sintéticos¹, que causan resistencia a los ixódidos, efectos ambientales negativos y alteran la calidad e inocuidad de los subproductos^{7,11}. Por tal motivo, deben evaluarse alternativas sostenibles de control que reduzcan la aplicación de químicos, que garantice eficacia contra garrapatas en bovinos y que estén inmersas en el control integrado de parásitos (CIP), donde se combinan estrategias físicas, químicas y biológicas con efecto sinérgico¹¹. De este último se destaca el uso de hongos entomopatógenos, dada su amplia distribución natural, bajo riesgo para la salud de humanos y animales¹⁴, compatibilidad ambiental, alta virulencia sobre garrapatas y bajo costo^{2,14}. Entre los hongos que tienen reportes de patogenicidad *in vitro* frente a garrapatas, las especies más investigadas son *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, con mortalidad sobre larvas, alteración en la eclosión de huevos^{7,15} y cambios en el metabolismo lípidico³.

El objetivo de esta investigación, fue evaluar la efectividad de una cepa comercial Baubassil® (Fungicol, Hongos de Colombia S.A.S., Palmira, Valle, Colombia) (*B. bassiana*) sobre la garrapata *R. (B.) microplus* en ganado bovino, mediante bioensayos en laboratorio y aplicación en campo bajo condiciones agroecológicas del sur de La Guajira, donde la temperatura promedio es superior a la recomendada para

la acción eficiente del producto y no se registran estudios previos de *B. bassiana* en el control de *R. (B.) microplus*.

Se realizó un estudio tipo experimental, en 2 fases. Una fase *in vitro* en el laboratorio de Micología de la Universidad de Santander (UDES) de Valledupar, Cesar, Colombia, ubicada a 10°27'0" N, 73°15'0" O, a 169 msnm y con temperatura promedio de 28°C. La fase *in vivo* o en campo se realizó durante la época húmeda del año 2013 en el hato «La sombra», municipio de la Jagua del Pilar, Guajira, Colombia, ubicado a 9°33'40" N y 73°20'11" O, a 170 msnm; la temperatura osciló entre 35 y 40°C; la precipitación anual promedio de 500 mm de septiembre a diciembre, con 6,3 h/sol/día y humedad relativa entre el 47 y el 60%⁹.

Se realizaron bioensayos *in vitro* con la cepa comercial de *B. bassiana* Baubassil® (marca de la empresa Fungicol, hongos de Colombia S.A.S), concentración mínima de 1000 millones (1×10^9) de conidias por gramo de formulación. Para evaluar el efecto de temperaturas superiores a las recomendadas por el fabricante, se realizó un ensayo según las metodologías de Ren et al.¹³, Sun et al.¹⁵ y Godoy et al.⁸ con modificaciones en la temperatura empleada. Se evidenció el crecimiento de *B. bassiana* en agar papa dextrosa (PDA) a 25, 30 y 35°C, respectivamente, mediante 3 microcultivos en caja de Petri, con un portaobjeto más 4 cm² de PDA y se aplicó 139 µl de la suspensión de esporas. Luego de 6 y 12 h de incubación se observó al microscopio el número de esporas germinadas.

Para medir la mortalidad *in vitro* se utilizaron 90 garrapatas hembras de 0,1-0,3 g ingurgitadas de sangre colectadas de 8 vacas infestadas, desinfectadas por inmersión durante 1 min en hipoclorito de sodio al 1%, seguido de 2 lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, se dividieron en grupos de 10 individuos por caja de Petri como unidad experimental para 3 tratamientos y 3 réplicas. El tratamiento 1 correspondió a una solución de 1×10^8 conidias/ml de *B. bassiana* a partir de 1 g de Baubassil® en 9 ml de agua destilada; el tratamiento 2, correspondió a una dilución seriada en base 10 para obtener 1×10^6 conidias/ml, y el tratamiento 3 fue un testigo de agua destilada. En cada tratamiento se sumergieron las teologinas durante 10 min; luego se

Tabla 1 Reducción de infestación de garrapatas en relación con un nivel inicial en bovinos del grupo tratado y control

Semana	Tratamiento con Baubassil® (<i>B. bassiana</i>)		Control		Comparación de medias (p) ^b	Efectividad corregida (%)
	Número GE/animal (media ± DE), n	Reducción infestación (%)	Número GE/animal (media ± DE) ^a , n	Reducción infestación (%)		
1	24,6 ± 4,7	18,1	29,4 ± 6,9 a	-66	0,096	50,7
2	21,0 ± 4,1	30	38,4 ± 8,5 b	-116,4	0,000	67,7
3	13,8 ± 3,1	50,2	55,2 ± 10,3 b	-219,7	0,000	84,4
4	8,6 ± 2,3	71,5	76,6 ± 11,7 b	-351,1	0,000	93,7
5	4,6 ± 1,3	84,8	98,1 ± 12,2 b	-381,2	0,000	96,8

DE: desviación estándar; GE: garrapatas estándar.

^a Valores seguidos de una misma letra no difieren significativamente.

^b Prueba t de Student para comparación de medias en dos muestras independientes ($p < 0,05$).

pasaron a papel toalla para eliminar el exceso y se incubaron en cámara húmeda de algodón con agua destilada estéril y papel filtro a 25 °C y HR 60%. Cada 24 h, durante 11 días, se registró la mortalidad confirmada por observación de inmovilidad al estereoscopio e infección con *B. bassiana*.

El grado de mortalidad producido por Baubassil® se determinó de acuerdo con las metodologías planteadas por Fernández et al.⁷ y López et al.¹⁰ con modificaciones en dosis y número de individuos. El diseño experimental fue aleatorio con 3 repeticiones. La experimentación con animales se realizó bajo el cumplimiento ético de la Ley N.º 1774 de 2016, «estatuto nacional de protección de los animales».

En la prueba se utilizaron 30 vacas de 3 años de edad, de raza mestiza, de 420-450 kg pesadas en báscula ganadera, las cuales debían presentar una infestación natural mínima de 20 garrapatas adultas/animal con tamaño ≥ 4 mm (Garrapatas estándar [GE]). Los animales se distribuyeron en 2 grupos de 15 bovinos cada uno; en el primero cada animal se bañó con 2 l de una suspensión acuosa con 1.000 ppm (1 g/l) de Baubassil® equivalente a 1×10^6 conidias/ml (o 1×10^{18} conidias/baño) y el otro grupo (control) se bañó con 2 l de agua. Ambos grupos se alimentaron por pastoreo en praderas con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), sal y agua a voluntad.

Las aplicaciones se hicieron una vez a la semana, por 5 semanas, con una bomba de aspersión de espalda de 20 l de capacidad (Royal Condor®, Progen Producciones generales S.A., Soacha, Cundinamarca, Colombia); el grupo sometido a tratamiento se bañó en las horas de la tarde (4:00 pm). La efectividad en reducción de infestación se determinó mediante monitorización visual de la población de GE, en todo el cuerpo del animal, principalmente vientre, inserción de la cola y región perineal en cada uno de los animales¹⁰, antes de iniciar las aplicaciones y en la monitorización semanal posterior al tratamiento. También se colectaron garrapatas en viales con etanol al 70%, rotuladas para su identificación mediante claves taxonómicas¹. El porcentaje de efectividad del tratamiento (%E) se calculó con la fórmula de Abbott (1925)¹.

%E = $\frac{[\text{garrapatas en el control} - \text{garrapatas en tratados}]}{\text{garrapatas en control}} \times 100$

Adicionalmente, se tomaron datos meteorológicos con influencia sobre el crecimiento y la esporulación del bioconsumo, como temperatura (máxima, media y mínima) y humedad relativa de la zona de estudio durante el año 2013, mediante revisión en la base de datos del Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM)⁹.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa IBM SPSS® versión 22 (International Business Machines. IBM, Armonk, Nueva York, EE. UU.). Se aplicó ANOVA de los porcentajes de germinación *in vitro* y prueba Tukey al 0,05 entre los tratamiento y el testigo. En la fase *in vivo*, para comparar el grado de disminución de la infestación en el grupo tratado con Baubassil® y el grupo control, se utilizó la prueba t de Student. Los datos de temperatura y humedad relativa se analizaron mediante correlación de Pearson.

En la fase *in vitro*, el mayor porcentaje de germinación *B. bassiana* fue a 25 °C (95,7% ± 2,0), a 30 °C germinó en el 94,7% ± 2,1. El menor porcentaje de germinación ocurrió cuando el hongo se incubó a 35 °C (6,3% ± 1,7). No hubo diferencia significativa ($p=0,88$) en el porcentaje de germinación del hongo incubado a 25 y a 30 °C, respectivamente. En todo caso, se tomó 25 °C como temperatura para prueba de mortalidad *in vitro*. En laboratorio se observó que *B. bassiana* fue efectiva contra *R. (B.) microplus* en estadio adulto a concentración de 1×10^8 conidias/ml, occasionando una mortalidad del 100% en garrapatas en el día 7 postratamiento, mientras que en el tratamiento 2 (1×10^6 conidias/ml) la mortalidad de *R. (B.) microplus* fue del 90% en el día 10. Los resultados son similares al estudio realizado por Broglia et al.⁴, con una efectividad del 100% en el control de teologinas, con 10^8 y 10^9 conidias /ml de *B. bassiana* en 14 días. Además, Fernández et al.⁷ señalan que el potencial reproductivo de la garrapata disminuye en el 90% al infestarse con $2,5 \times 10^7$ conidia/ml del hongo. En otros estudios también se registró que *B. bassiana*, a concentraciones de 10^7 , 10^8 y 10^9 conidias/ml, presentó patogenicidad sobre teologinas de *R. (B.) microplus* en comparación con el grupo control^{1,13}. En fase *in vivo*, el grupo tratado con *B. bassiana* presentó un control ascendente de la infestación por *R. (B.) microplus*, siendo mayor en la semana 5, con el 84,8% de reducción (tabla 1), mientras que el grupo control no

evidenció control de la infestación, el número de garrapatas aumentó gradualmente durante el período de estudio, con diferencias significativas entre grupos a partir de la segunda semana.

Además, se evidenció que el %E de *B. bassiana* sobre la garrapata se incrementó con la aplicación durante varias semanas con suspensiones de 10^6 conidias/ml, alcanzando niveles del 96,8%; resultados similares a los obtenidos *in vitro* por Ren et al.¹³ con inhibición del 100%. Así mismo, Angelo et al.³ determinaron que dicha concentración altera el metabolismo lipídico y afecta al período de supervivencia de garrapatas hembras adultas, la oviposición y el peso de los huevos¹.

Dicho %E registrado podría explicarse debido a que, en campo, la infestación se mantuvo activa en relación con la población controlada de laboratorio y se favoreció por la alta humedad registrada en la época de estudio, con temperatura constante de 33 °C durante las 12 h del período nocturno, favoreciendo la actividad infectiva de *B. bassiana*, cuya esporulación se incrementa con humedad relativa del 80 al 100%, según estudios realizados por Godoy et al.⁸.

En ensayos realizados en campo se ha reportado efectividad de *B. bassiana* en garrapatas, menores que la obtenida en el presente estudio. Pérez (2015)¹¹ señala la reducción del 67% de garrapatas de *R. (B.) microplus* con aplicación cada 21 días de una suspensión de *B. bassiana* en bovinos de 14 a 18 meses de edad. También Angel et al.² encontraron una reducción de infestación de *R. (B.) microplus* del 67,8 y el 94,2% en la aplicación de *M. anisopliae*, lo que demuestra el potencial de entomopatógenos en el control biológico de la garrapata común del ganado.

En cuanto a las condiciones climáticas registradas en la zona de estudio, se observó temperatura baja de 24 °C, media de 30 °C y máxima entre 32,3 y 35,8 °C, siendo esta última inversamente proporcional con coeficiente de Pearson de -0,75 a la humedad relativa registrada entre el 61,4 y el 82,0% durante el año 2013, alcanzando valores máximos en los meses de mayor precipitación según IDEAM (2015)⁹.

Los resultados obtenidos corroboran lo referido en los registros de diferentes estudios sobre la efectividad del entomopatógeno *B. bassiana* sobre garrapatas adultas de *R. (B.) microplus* como control biológico^{2,11}. En el bioensayo, las temperaturas de 25 y 30 °C indujeron el 94,7 y el 95,7% de germinación de conidias para *B. bassiana*, respectivamente; otros autores señalan una respuesta similar. Angelo et al.³ identificaron una viabilidad del 98% en la germinación del hongo a 25 °C. Por otro lado, Godoy et al.⁸ refieren germinación de 5 aislamientos de *B. bassiana* a 25 °C del 59-100%, mientras que a 30 °C descendió a valores entre el 28 y el 37%. La diferencia en la germinación de esporas responde a la interacción de múltiples componentes genéticos, ambientales, entre otros⁸. La sensibilidad a altas temperaturas es propia de este género⁸, por lo que es indispensable verificar su efectividad en campo en zonas agroecológicas como La Guajira, donde se presentan factores condicionantes a su inclusión en el CIP, como temperatura superior a 35 °C⁸ y alto brillo solar⁹. La aplicación exclusiva en horas de la tarde podría minimizar efectos desfavorables de dichos factores sobre la patogenicidad de la cepa⁸.

En este sentido, es relevante mantener las condiciones ambientales propicias para la germinación de las esporas y el período crítico de infección del entomopatógeno pues

se ha referido que durante la infección de *B. bassiana* se degrada la cutícula del hospedador mediante la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares como proteasas y quitinasas¹⁵, que penetran los insectos de 12 a 18 h. Por lo cual, la aplicación de *B. bassiana* a las 4:00 pm, como se realizó en el presente estudio, es adecuada para evitar el efecto de la alta radiación registrada en la zona durante el tiempo crítico de infección de la cepa.

De forma general, *B. bassiana*, por sus características patogénicas sobre *R. (B.) microplus* a temperaturas de 25-30 °C en laboratorio y campo, validadas a partir de aplicaciones semanales de 10^8 conidias/ml sobre el ganado durante 5 semanas, puede constituir una alternativa de control de la garrapata, lo cual podría potenciarse según las características climáticas de la zona, como se precisó en este estudio. En consecuencia, se recomienda la evaluación de otras labores de manejo (además de la hora de aplicación) articulables al CIP en el Caribe Seco colombiano.

Financiación

El trabajo fue financiado por la Universidad de Santander (UDES) Sede Valledupar.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a las bacteriólogas Grace Vargas, Laury Amaya, Marieth Brito y Liliana Escobar, por su participación en la investigación; al profesor Jorge Humberto Botero, docente de la Universidad de Antioquia, por su colaboración y acompañamiento durante el proceso de análisis estadístico. A los investigadores Jesús Antonio Betancourt y Elizabeth Cassalett, por la generosa revisión y acompañamiento en la construcción del documento.

Bibliografía

1. Araque A, Ujueta S, Bonilla R, Gómez D, Rivera J. Resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de algunas explotaciones ganaderas de Colombia. Rev U.D.C.A. Act Div Cient. 2014;17:161-70.
2. Angel CA, Lezama R, Molina J, Pescado A, Skoda SR, Cruz C. Virulence of Mexican isolates of entomopathogenic fungi (Hypocreales: Clavicipitaceae) upon *Rhipicephalus* = *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) larvae and the efficacy of conidia formulations to reduce larval tick density under field conditions. Vet Parasitol. 2010;170:278-86.
3. Angelo IC, Gôlo PS, Camargo MG, Kluck GEG, Folly E, Bittencourt VREP. Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. Transbound Emerg Dis. 2010;57:79-83.
4. Broglia S, Souza L, Valente E, Araujo M, Silva N, Gómez M. Evaluación de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Idesia. 2012;30:93-9.
5. Castelblanco L, Sanabria O, Cruz A, Rodríguez C. Reporte preliminar del efecto ixodicida de extractos de algunas plantas

- sobre garrapatas *Boophilus microplus*. Rev Cub Plant Med. 2013;18:118–30.
6. Castro E, Rifran L, González P, Piaggio J, Gil A, Schumaker TTS. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by *in vitro* bioassays. Vet Parasitol. 2010;169:172–7.
 7. Fernández M, Berlanga AM, Cruz C, Hernández VM. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la inhibición de oviposición, eclosión y potencial reproductivo en una cepa triple resistente de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). Entomotrop. 2010;25:109–15.
 8. Godoy J, Valera R, Guédez C, Cañizalez L, Castillo C. Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. Rev Fac Agron. 2000. Universidad del Zulia. 2007;24: 415–25.
 9. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM). Seguimiento clima. 2016 [consultado 20 Jul 2016]. Disponible en: <http://www.ideam.gov.co/inicio>
 10. López E, López G, Orduz S. Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. Rev Colomb Entomol. 2009;35:42–6.
 11. Pérez M. Validación del efecto de los hongos entomopatógenos *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium Anisopliae* (Metsch) Sorokin, reguladores biológicos de estados parasitarios de la garrapata *Rhipicephalus Microplus* (Arachnida: Ixodidae). Congreso Colombiano de Entomología. Medellín, Colombia: Sociedad Colombiana de Entomología-SOCOLEN; 2015.
 12. Polanco D, Ríos L. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera (Colombia). 2016;17:81–95.
 13. Ren Q, Liu Z, Guan G, Sun M, Ma M, Niu Q, et al. Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. Biol Control. 2012;63:98–101.
 14. Silva J, Pulido J, Ballesteros H, Abuabara Y, Benavides E, Rodríguez G, Roncallo B, Abadía B, Molina J. Modelos tecnológicos y calidad de la leche en sistemas bovinos de doble propósito de la región Caribe. Colombia, Bogotá: Corpoica; 2011.
 15. Sun M, Ren Q, Guan G, Li Y, Han X, Ma C, et al. Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. Parasitol Int. 2013;62:412–5.