

## Nota Técnica

### EFICACIA DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Metharrizium anisopliae* EN EL CONTROL DE *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE)

Miguel Arguedas\*, Víctor Álvarez<sup>1/\*\*</sup>, Roberto Bonilla<sup>\*\*</sup>

**Palabras clave:** Hongos entomopatógenos, *Metharrizium anisopliae*, *Boophilus microplus*, garrapatas, Control Integrado de Parásitos, Costa Rica.

**Keywords:** Entomopathogenic fungi, *Metharrizium anisopliae*, *Boophilus microplus*, ticks, Integrated Parasite Control, Costa Rica.

Recibido: 10/04/08

Aceptado: 04/07/08

#### RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la eficacia del hongo entomopatógeno *Metharrizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus*, se realizó el presente ensayo, que comprendió tanto una fase in vivo como una in vitro. El trabajo se realizó entre marzo de 2003 y junio de 2004, en 2 fincas ubicadas en Sarapiquí, Heredia y en los laboratorios de Garrapatas del Ministerio de Agricultura y Ganadería y de Parasitología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. La fase in vitro consistió en la aplicación de  $10^8$ ,  $10^9$  y  $10^{10}$  conidios.ml<sup>-1</sup> del hongo *M. anisopliae* a diferentes estadios de la garrapata *B. microplus* (huevo, larva y hembra repleta). La fase in vivo consistió en la aplicación de  $10^{10}$  conidios.ml<sup>-1</sup> del hongo a los animales de la finca seleccionada. En la finca testigo el productor continuó aplicando el tratamiento químico a base de Amitraz. Los resultados mostraron un efecto sobre los diferentes estadios de la garrapata con diferencias altamente significativas entre  $10^8$  y las 2 restantes. Asimismo, los porcentajes de inhibición de la oviposición y de control, resultaron directamente proporcionales a la concentración. El efecto letal sobre las teleóginas con la concentración de  $10^9$  fue a partir del día 5, aunque la concentración  $10^{10}$  presentó una mortalidad >7% desde el día 3. La comparación de las fincas en los meses en que no se aplicó el hongo y cuando fue aplicado, presentó una

#### ABSTRACT

**Efficiency of the entomopathogenic fungus *Metharrizium anisopliae* on the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae).** To evaluate the efficacy of *Metharrizium anisopliae* controlling *Boophilus microplus*, in vivo and in vitro, experiments were carried out between March 2003 and June 2004. For the in vivo phase, 2 farms located in Sarapiquí, Heredia were selected. The in vitro phase was carried out in the laboratories for ticks of the Ministry of Agriculture and Livestock and that for Parasites of the School of Veterinary Medicine of the National University of Costa Rica. The in vitro phase consisted on the application of *M. anisopliae* at  $10^8$ ,  $10^9$ , and  $10^{10}$  conidia.ml<sup>-1</sup> to different stages of *B. microplus* (egg, larva and full females). For the in vivo phase, an application of  $10^{10}$  conidia.ml<sup>-1</sup> of the fungus to the animals of the selected farm was performed. The control farm continued applying the chemical treatment base on Amitraz. The results showed an effect on the different stages of the tick with highly significant differences between  $10^8$  and the other 2 concentrations. Results on oviposition inhibition and control percentages were directly proportional to the concentration. A lethal effect on adult females with the  $10^9$  concentration was observed from day 5, although the  $10^{10}$  conidia.ml<sup>-1</sup> concentration presented a mortality >7% from day 3. A comparison of the farms during

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: viacal@racsa.co.cr

\* Práctica privada.

\*\* Ministerio de Agricultura y Ganadería. Servicio Nacional de Salud Animal. 11965-1000, San José, Costa Rica.

disminución de 79% en el número de garrapatas en la finca tratada contra 59% en la no tratada.

the months the fungus was not applied and when it was applied showed a 79% decrease in the number of ticks in the farm treated against 59% in the non-treated.

## INTRODUCCIÓN

La amplia distribución de *Boophilus microplus*, la garrapata común del ganado bovino, en Costa Rica, la convierte en la más importante para la ganadería vacuna del país, debido a los daños directos e indirectos que causa al huésped, y que tienen una implicación económica, (Anónimo 1980, Álvarez et al. 1999).

El control de las garrapatas en Costa Rica es principalmente químico, siendo los organofosforados, los piretroides sintéticos, las amidinas y las lactonas macrocíclicas las moléculas registradas y de mayor uso (Pérez y Álvarez 1995, Álvarez et al. 1999, Álvarez et al. 2000), aunque a menor escala también se utilizan los inhibidores de desarrollo (Álvarez V. Datos sin publicar). A pesar de las facilidades que han ofrecido estas moléculas en el control de las garrapatas, inconvenientes como la resistencia, los residuos en los productos cárnicos y lácteos, la contaminación del ambiente, y los costos, exigen la búsqueda de nuevas alternativas (Leal et al. 2003).

El control biológico en diferentes plagas no es un concepto nuevo y ha sido una medida efectiva, que ha permitido mantener estas dentro de parámetros económicos y zoonosarios aceptables (Hogsette 1999, Waller et al. 2004). Una de las posibilidades reales en este campo, para controlar garrapatas de importancia pecuaria, es el uso de hongos entomopatógenos como el *Metharizium anisopliae* (Frazzon et al. 2000).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la eficacia del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* en el control de *B. microplus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio consistió de una fase in vitro y una in vivo.

### Fase in vitro

**Ubicación.** El trabajo de laboratorio se realizó entre marzo de 2003 y mayo de 2004, en las instalaciones del MAG, Dirección de Salud Animal, Programa de la Garrapata, en el Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica del Instituto Nacional Aprendizaje y en el Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

**Cultivo del hongo.** El cultivo del hongo se realizó de la siguiente forma:

- a. **Reproducción en platos Petri:** se utilizó agar papa dextrosa con 13% de extracto de levadura (39 g de papa dextrosa + 5 g de extracto de levadura). Los platos Petri con el hongo se incubaron durante 10 días a 25°C y 80% de humedad relativa.
- b. **Reproducción en matrices:** se procedió a preparar una matriz que consiste en una botella transparente autoclavable, con 100 g de arroz calidad 80/20 al que se le agregaron 30 ml de agua destilada, y se autoclava por 15 min.
- c. **Inoculación de matrices:** a partir de las cepas crecidas en los platos Petri, se inocularon las matrices con ¼ del plato Petri con el hongo crecido, se agita para que las esporas se mezclen con el arroz y se incuban

por 10 días a 28°C y 80% de humedad relativa.

- d. Reproducción masiva en bolsas de polipropileno:** las bolsas se esterilizan con 300 g de arroz y 90 ml de agua destilada y son mantenidas a una temperatura de 28°C y 80% de humedad relativa.
- e. Inoculación en bolsas:** las bolsas se inoculan con 15 ml de la solución de conidios obtenidos del hongo crecido en la matriz. La solución tiene una concentración de  $1 \times 10^{10}$  conidios. $\text{ml}^{-1}$ . Las bolsas inoculadas se incuban por 10 días a 28°C y 80% de humedad relativa, hasta obtener el crecimiento del hongo con sus características morfológicas de color verde oliváceo y aspecto polvoriento.

Transcurrido todo este proceso, se preparó una solución del hongo crecido en las bolsas de polipropileno, junto con agua destilada esterilizada y 0,05% de Tween 80, a partir de la cual se formuló los tratamientos, los cuales consistieron en:  $1 \times 10^8$ ,  $1,25 \times 10^9$  y  $2,25 \times 10^{10}$  conidios. $\text{ml}^{-1}$  del hongo.

**Infestación de terneros.** Se utilizaron 2 terneros *Bos taurus* mantenidos en confinamiento. La alimentación consistió de concentrado, pasto, heno y agua la cual se suministró ad libitum.

En cada una de las infestaciones, al ternero se le colocó aproximadamente 20.000 larvas de una cepa de *B. microplus*, proporcionada por el CENAPA de México y cultivada en laboratorio, susceptible a organofosforados y piretroides sintéticos. Para evitar que los terneros utilizaran sus mecanismos de defensa (acicalamiento), fueron

encepados y se les sujetó la cola por un período de 8 h.

**Manejo de las garrapatas en el laboratorio.** Pasados 21 días desde el momento de la infestación, se procedió a recolectar las teleóginas caídas naturalmente, se lavaron con agua corriente y se eliminaron las deformes o dañadas. Las hembras repletas fueron seleccionadas y pesadas en una balanza analítica; el peso total se dividió entre el número de garrapatas para obtener un promedio de peso, con el fin de que a la hora de agruparlas no existieran diferencias superiores a los 20 mg entre los pesos superior e inferior y el promedio. Las garrapatas se colocaron en grupos de 10 en platos Petri.

**Aspersión de teleóginas.** Las teleóginas fueron divididas en 4 grupos, cada uno se colocó en cámaras húmedas (platos Petri plásticos con algodón humedecido en el fondo y papel toalla). El grupo control se asperjó con agua y los 3 grupos restantes fueron asperjados por 30 s con  $1 \times 10^8$ ,  $1,25 \times 10^9$  y  $2,25 \times 10^{10}$  conidios. $\text{ml}^{-1}$  del hongo. En cada tratamiento se utilizó un mínimo de 10 repeticiones y cada repetición contó con 10 individuos. Una vez concluido el tratamiento, las garrapatas fueron colocadas en una incubadora a  $27,5 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $85 \pm \%$  de humedad relativa por 13 días.

**Efecto de *M. anisopliae* sobre la mortalidad y los factores reproductivos de las teleóginas de *B. microplus*.** Los platos Petri se revisaron diariamente para anotar la mortalidad. En el control, sólo se aceptó una mortalidad  $\leq 15\%$ . La mortalidad se midió por medio de la siguiente fórmula:

$$M = \frac{\% \text{ mortalidad del tratamiento} \times \% \text{ mortalidad del testigo} \times 100}{\% \text{ mortalidad del testigo} \times 100}$$

Para la eficacia del hongo sobre la mortalidad se utilizó:

$$\% \text{ eficacia} = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Donde:

C es el número de garrapatas del grupo control  
T es el número de garrapatas del grupo tratado

A los 11 días de iniciada la oviposición, se retiraron los huevos del control y de los otros tratamientos, los huevos se pesaron y se colocaron en viales de vidrio de boca ancha y se taparon con algodón. Los huevos fueron mantenidos durante 25-30 días en las mismas condiciones de humedad y temperatura. Transcurrido ese tiempo, se sacrificaron las larvas que eclosionaron por medio de calor. El contenido se mezcló, luego se extrajeron 5 alícuotas y se realizaron los conteos de cascarones y huevos en cada uno de los viales. Se calculó el porcentaje de eclosión alcanzado en cada grupo por medio de la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{C}{H+C} \times 100$$

Donde: C = cascarones  
H = Huevos

Con los datos del peso de las garrapatas y los huevos de cada lote, se determinó el porcentaje de inhibición de la oviposición aplicando:

$$\%I.O. = (PQLt/PQLT - PHLt/PHLT) \times 100$$

Donde:

PQLt= Peso de hembras del lote tratado

PQLT= Peso de hembras del lote testigo

PHLt= Peso de huevos del lote tratado

PHLT= Peso de huevos del lote testigo

Para determinar el porcentaje del control, se calculó la reproducción estimada (R. E.) por grupo, mediante la siguiente fórmula.

$$R. E = \frac{\text{Peso de huevos}}{\text{Peso de hembras}} \times \% \text{ Eclosión}$$

Una vez calculada la R. E. de los lotes tratados y testigo, se procedió a calcular los porcentajes de control como sigue;

$$\% C = \frac{RET - REt}{RET} \times 100$$

Donde:

RET= reproducción estimada de los lotes testigo

REt= reproducción estimada de los lotes tratados

**Efecto de *M. anisopliae* sobre los huevos de *B. microplus*.** Los huevos fueron obtenidos de oviposiciones de teleóginas no tratadas, y mantenidas en las condiciones de laboratorio anteriormente descritas. Al momento de la oviposición, los huevos se recolectaron y pesaron en una balanza analítica, se colocó 1 g de huevos en cada tubo de boca ancha. Los tubos fueron agrupados en testigo y tratados, con las concentraciones y métodos antes descritos en la prueba de aspersión de teleóginas. En cada tratamiento se utilizó un mínimo de 10 repeticiones. Los tubos fueron tapados con algodón y colocados en incubadoras a  $27,5 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $85 \pm 5\%$  de humedad relativa, por 30 días.

**Efecto de *M. anisopliae* sobre la eclosión los huevos de *B. microplus*.** Durante el período de incubación y con la ayuda de un estereoscopio se revisó el pulso vital de los huevos, tomando en cuenta secado, cambio de coloración, pérdida de volumen y crecimiento del hongo dentro de los tubos. A los grupos tratados se les brindó 5 días más, desde el momento en que las larvas de los grupos testigo eclosionaron, para determinar si hubo una inhibición o un retraso en la aparición de las larvas. Luego se sacrificó por medio de calor las larvas que eclosionaron; se contó el número de cascarones y huevos de acuerdo a la fórmula antes descrita.

**Efecto de *M. anisopliae* sobre las larvas de *B. microplus*.** Las larvas se obtuvieron de eclosiones de huevos no tratados, previamente seleccionados. Se pesó 0,025 g (~500 larvas) de huevos, se colocaron en tubos, los cuales fueron puestos en las condiciones de laboratorio descritas anteriormente.

Las larvas fueron divididas en 4 grupos, un grupo testigo que se trató sólo con agua y los 3 grupos restantes fueron tratados, con las mismas concentraciones del hongo utilizadas en

la prueba de aspersión de teleóginas. Para realizar las aspersiones se utilizaron tubos de ensayo grandes de boca ancha, dentro de los cuales se colocó un papel toalla humedecido con la solución respectiva, correspondiente a cada una de las concentraciones ya citadas. Las larvas de *B. microplus* se recolectaron con un pincel y se colocaron en el fondo del tubo, en donde se asperjaron durante 30 s con el tratamiento respectivo. Los tubos fueron tapados con algodón y colocados en incubadoras a  $27,5 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $85 \pm 5\%$  de humedad relativa. A los 10 días después de la aspersión se determinó el porcentaje de mortalidad. En los testigos sólo se aceptó una mortalidad  $\leq 15\%$ .

### Fase in vivo

**Selección del área geográfica.** El estudio se realizó entre abril de 2003 y junio de 2004. Se seleccionaron 2 fincas dentro de un área geográfica con temperatura, precipitación y humedad relativa similares y donde la *B. microplus* sea la población de garrapatas predominante. Las 2 fincas se ubicaron en La Victoria de Río Frío, Sarapiquí, a una distancia aproximada, entre ambas fincas, de 1 km.

La finca 1, donde se realizaron las aspersiones con el hongo, es de doble propósito (1 solo ordeño al día), consta de 1 un hato de ganado *Bos taurus* con cruces de *B. indicus*, en donde la mayoría eran vacas lactantes. La finca 2 es de leche (2 ordeños al día), y al igual que en la finca 1, cuenta con un hato de ganado *B. taurus*, donde la mayoría también eran vacas lactantes, esta finca servirá como testigo del aumento o disminución de las poblaciones de garrapatas debido a condiciones ambientales.

En cada finca los animales se ubicaron, al azar, en grupos de 10. El conteo de garrapatas se realizó 1 vez al mes y consistió en enumerar y anotar todas las garrapatas  $>4$  mm que se encontraban del lado derecho del animal, comenzando en la cabeza y finalizando en la cola, la cantidad final del conteo fue multiplicada por 2. Cualquier procedimiento adicional de manejo o tratamientos necesarios, diferentes al señalado, fueron tomados en cuenta. Previo a la aplicación

del tratamiento con el hongo, existió una fase de 4 meses, en la cuál se realizaron los conteos en ambas fincas y se permitió el control de garrapatas por el método regular del productor.

**Aplicación de *M. anisopliae* a los animales.** El tratamiento de los animales en la finca 1, se realizó en forma de baños de espalda con la dosis que mostró mejores resultados en laboratorio ( $10^{10}$  conidios. $\text{ml}^{-1}$ ). En promedio se utilizaron 2,5 l de solución por animal. Los baños fueron realizados cada 15 días y la aplicación de productos químicos en esta finca no fue permitida. En la finca 2, se continuaron los baños mensuales utilizando básicamente Amitraz, siempre que la realización de los baños fuera después de las visitas mensuales de conteo.

## RESULTADOS

En el cuadro 1 se presenta los resultados de mortalidad y de eficacia del hongo sobre larvas de *B. microplus* de estos ensayos. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y el testigo fueron altamente significativas tanto para la mortalidad como para la eficacia.

En la figura 1 se presenta la eficacia en la reducción de la eclosión de huevos de *B. microplus* tratados con  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  conidios. $\text{ml}^{-1}$  del hongo. Con relación a la variable eficacia de la reducción de la eclosión, no se detectaron diferencias estadísticas entre ninguna de las 3 concentraciones del hongo utilizadas.

Cuadro 1. Efecto de *M. anisopliae* sobre la mortalidad de larvas de *B. microplus*.

Tratamiento	Mortalidad (%)	Eficacia (%)
Testigo (agua)	2,27a	
Concentrac. $10^8$	70,70b	67,75a
Concentrac. $10^9$	96,03c	93,67b
Concentrac. $10^{10}$	98,64d	96,34c

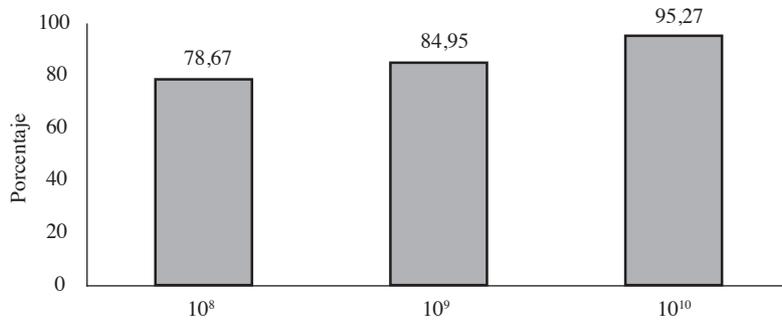


Fig. 1. Eficacia de *M. anisopliae* en la reducción de la eclosión de los huevos de *B. microplus*.

En el cuadro 2 se presenta los resultados de los indicadores de mortalidad, reproductivos, y de control obtenidos con el hongo *M. anisopliae*.

La mortalidad diaria de teleóginas tratadas con *M. anisopliae* se observa en el cuadro 3.

En la figura 2 se puede observar la eficacia del hongo *M. anisopliae* sobre la mortalidad de teleóginas de *B. microplus*, pero agrupada en

tractos: el primer tracto, del día 1 al 3, el segundo del día 4 al 7 y el tercero del día 8 al 11.

En la figura 3 se presenta el promedio de lluvia semanal en Río Frío, de 1996 a 2004. Como se puede apreciar no existe una estación seca propiamente dicha, sino un período de menor precipitación durante las primeras 16 semanas del año. La línea punteada representa la mediana anual de precipitación.

Cuadro 2. Mortalidad, inhibición de la oviposición y la eclosión de huevos, in vitro, de *B. microplus* por efecto del hongo *M. anisopliae*.

Concentración	Mortalidad (%)	Inhibición Oviposición (%)	Eclosión (%)	Control (%)
Testigo (agua)	9,07a		84,60a	
10 <sup>8</sup>	52,33b	56,26a	82,73a	53,95a
10 <sup>9</sup>	81,60c	72,70b	79,50a	76,11b
10 <sup>10</sup>	87,71c	77,29b	78,62a	78,79b

Cuadro 3. Mortalidad diaria de teleóginas de *B. microplus* por causa del hongo *M. anisopliae*.

Tratamiento	Días										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Testigo	0,68	2,27	1,48	0,45	0,57	0,23	1,25	0,91	0,34	0,91	0,45
10 <sup>8</sup>	0,73	3,17	5,37	4,39	2,93	8,05	4,88	2,68	10,24	8,54	10,24
10 <sup>9</sup>	1,25	5,13	4,74	4,41	10,2	11,45	8,49	7,57	10,07	10,13	7,24
10 <sup>10</sup>	1,13	4,05	7,75	7,39	10,63	11,04	10,36	6,94	11,22	11,31	5,23

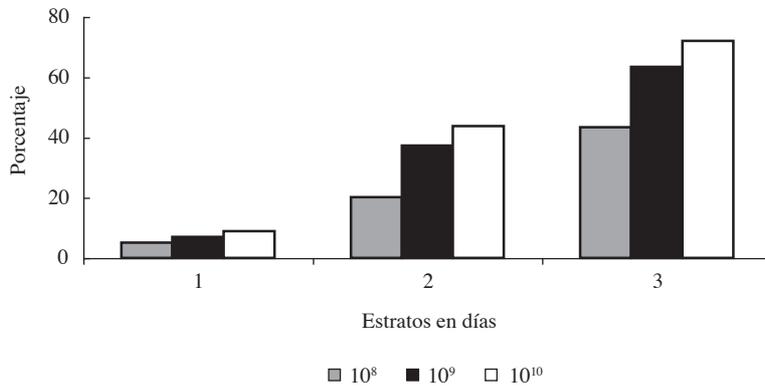


Fig. 2. Eficacia in vitro del hongo *M. anisopliae* en la mortalidad de *B. microplus*.

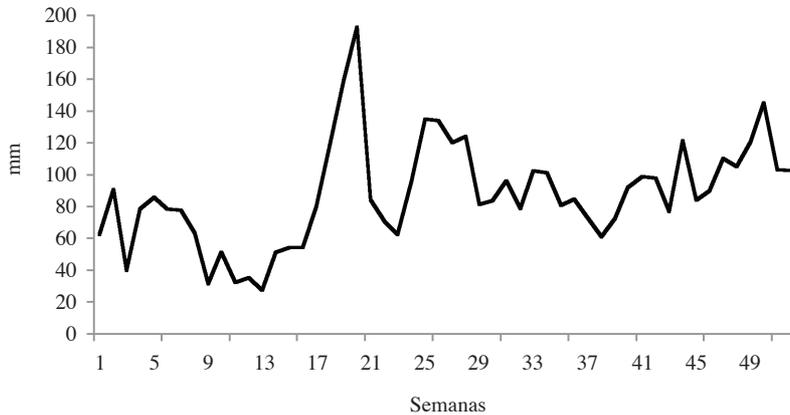


Fig. 3. Precipitación pluvial de 1996 a 2004. Río Frío.

En la figura 4 se presenta el promedio semanal de temperatura máxima y mínima en Río Frío, de 1996 a 2004. Durante este período la temperatura máxima registrada fue de 35,3°C y la mínima de 18°C. La diferencia promedio entre la temperatura máxima y mínima fue de 9,8°C.

En la figura 5 se presenta la precipitación pluvial en Río Frío de abril de 2003 a junio 2004.

En la figura 6, se presenta el promedio de garrapatas por animal en el hato tratado y en el hato testigo, según conteo mensual realizado en ambos hatos.

Una comparación entre abril, mayo y junio de los años 2003 (previo al tratamiento) y 2004 (con tratamiento), en las fincas 1 y 2, muestra una

disminución del promedio de garrapatas por animal (cuadro 4). En el caso de la finca 1 presentó una reducción de 79% y la finca 2 de 59%.

Cuadro 4. Promedio de garrapatas por animal en las fincas en estudio. 2003-2004.

	Finca 1		Finca 2	
	2003	2004	2003	2004
Abril	86	20	138	40
Mayo	93	26	157	100
Junio	19	2	161	47
Promedio	66	16	152	62

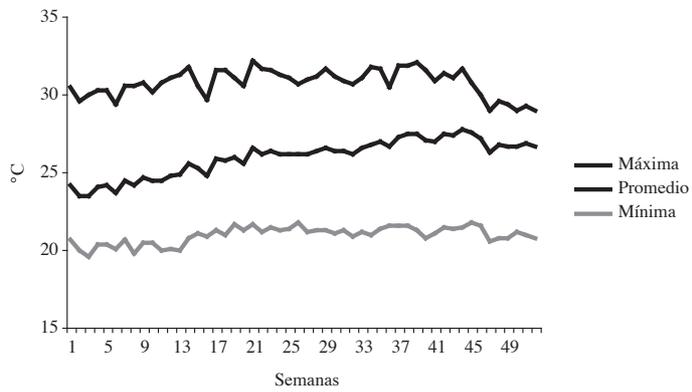


Fig. 4. Temperaturas máximas y mínimas promedio de 1996 a 2004. Río Frío.

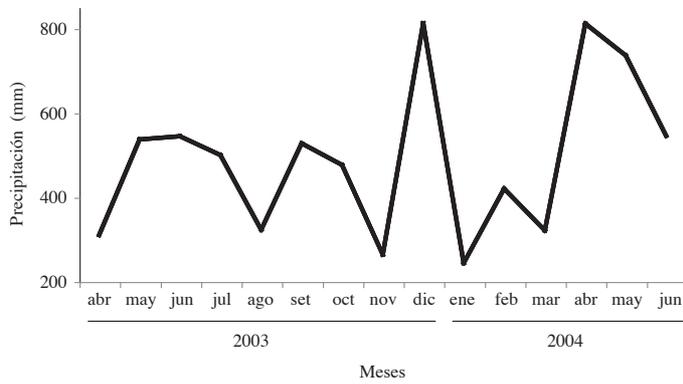


Fig. 5. Precipitación pluvial de abril 2003 a junio 2004. Río Frío.

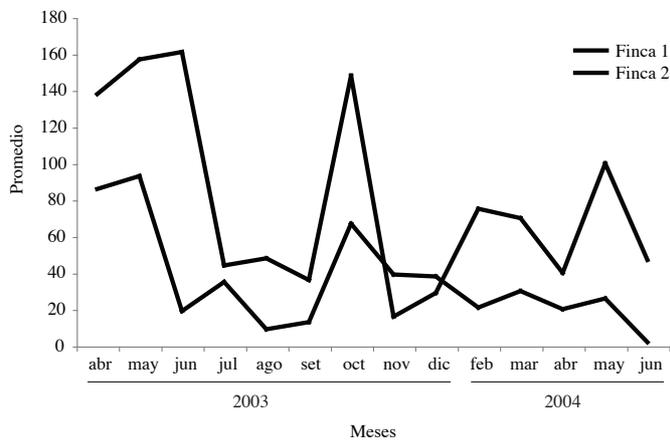


Fig. 6. Conteo de garrapatas en los hatos en estudio, 2003 a 2004. Río Frío.

## DISCUSIÓN

### Fase in vitro

La acción deletérea de un agente controlador, sobre diferentes estadios de desarrollo de la garrapata (huevos, larvas, adultos), y no solo sobre alguno o algunos de ellos, lo vuelve más eficiente en la disminución de la población del agente blanco. En resultados preliminares (no publicados), obtenidos en el Laboratorio con el hongo *M. anisopliae*, sobre larvas de *B. microplus*, este mostró una eficacia que osciló entre 83 y 96,4%. En el presente estudio se observa, igualmente, un efecto negativo sobre la viabilidad de las larvas; efecto que es directamente proporcional a la concentración utilizada y que oscila de 70,7-98,6%, con una eficacia de 68-96,3%. Gindin et al. (2002), señalan que entre los 4-7 días después de la inoculación con *M. anisopliae*, se obtuvo una mortalidad de 90-100% de las larvas de *B. annulatus*, no alimentadas.

Los huevos de las garrapatas expuestos a la acción de *M. anisopliae*, mostraron una reducción significativa en la eclosión, con relación al control. Aunque entre las diferentes concentraciones aplicadas no se observó diferencias a  $p \leq 0,05$ , si fue manifiesta una tendencia hacia una mayor eficacia, conforme la concentración era más alta. Estos resultados demostraron la capacidad del hongo para afectar los huevos de las garrapatas e impedir el desarrollo o la sobrevivencia de la larva. Bittencourt et al. (1994), describieron la acción *M. anisopliae* sobre huevos de *B. microplus* y en correspondencia con nuestro estudio, ellos también encontraron una relación directa de la eclosión con respecto a la concentración del hongo, obteniendo una eclosión de 9,33% con  $10^8$  conidios.ml<sup>-1</sup>.

La disminución in vitro, en la eclosión de los huevos tratados con las diferentes concentraciones del hongo es evidente, lo que hace pensar en la posibilidad de asperjar los pastizales con el hongo, dado que la mayor cantidad de garrapatas se encuentra en el suelo, de hecho pasan mucho más tiempo en el suelo que sobre el animal. Esta idea toma fuerza ya que es sabido que el hongo

viene originalmente de infestaciones naturales, observadas en campo; por lo que pareciera factible que el hongo se reproduzca en condiciones ambientales favorables.

Bittencourt et al. (2003), llevaron a cabo ensayos aplicando el hongo *M. anisopliae* pulverizado sobre apartos de *Brachiaria decumbens* previamente infestados con larvas de *B. microplus*. Los ensayos mostraron resultados promisorios luego de varias aplicaciones, lo que demuestra el potencial de esta forma de combate de la garrapata dentro de un Control Integrado de Plagas.

De nuevo, el efecto sobre otros indicadores como la mortalidad, el porcentaje de inhibición de la oviposición y el porcentaje de control, fueron directamente proporcionales a la concentración del hongo empleada, donde a mayor concentración mayor efecto, proporcionando una señal importante del efecto del hongo *M. anisopliae* sobre *B. microplus* y del potencial que podría jugar en el combate de la garrapata. Bittencourt et al. (1994), Frazzon et al. (2000), y Gindin et al. (2002), encontraron resultados similares a los obtenidos en este estudio, en relación con la mortalidad de teleóginas, indicando tasas de mortalidad elevadas en comparación con los testigos.

La mortalidad diaria de teleóginas, refleja la relación directa que existe entre la concentración y el tiempo de exposición al hongo. Asimismo, las garrapatas tratadas con las concentraciones mayores, alcanzan una mortalidad mayor más rápidamente, la cual se mantiene de forma consistente en el tiempo. Por otra parte, aunque la mayor mortalidad se produzca luego del día 5 en la concentración de  $10^9$  conidios.ml<sup>-1</sup>, en el caso de la concentración de  $10^{10}$  conidios.ml<sup>-1</sup>, un nivel de mortalidad alto (>7) se inicia desde el tercer día. Es probable que se logre una potencialización de la patogenicidad del hongo, a través de exposiciones prolongadas del hongo con las garrapatas o sus estructuras en medios de cultivo, obteniéndose así una acción letal más rápidamente y con mayores porcentajes de eficacia.

El efecto obtenido sobre los diversos indicadores medidos en la fase in vitro demuestran un

enorme potencial para el hongo *M. anisopliae* en el control de *B. microplus*.

### Fase in vivo

Debido a limitaciones institucionales, el estudio tuvo que desarrollarse en 2 fincas privadas, que presentaban una diferencia importante en cuanto a la composición racial de sus animales, este es un factor limitante a la hora de hacer comparaciones, por la mayor susceptibilidad del grupo de animales europeos a las garrapatas, en relación con el grupo de bovinos con sangre cebuína.

Los resultados de la fluctuación de la población de adultos, muestra que durante el año de estudio, en ambas fincas se observó una tendencia hacia la disminución del número de garrapatas por animal, lo cual se pudo producir por aspectos propios de la dinámica de esas poblaciones, situaciones ambientales o prácticas de manejo previas que condicionaron la tendencia a disminuir la cantidad de garrapatas en el tiempo, en las 2 unidades de producción. Lo que si fue claro es que la finca en la cual únicamente se utilizó el baño con la solución de *M. anisopliae*, se controló la población de garrapatas a un nivel que no permitió el aumento, y por el contrario se produjo la disminución arriba mencionada. En un estudio previo, realizado en la misma finca, se determinó un promedio de 27 garrapatas por animal, usando combate químico (Álvarez et al. 2003), lo cual no difiere con el control logrado en la presente investigación, que fue de 25 garrapatas.

La comparación de los meses previos al inicio del tratamiento con el hongo y cuando el tratamiento ya se había llevado a cabo, muestra una disminución importante de la población de garrapatas, pese a que en ambas fincas, por causas no determinadas se presentó una disminución significativa. En resumen la disminución en la finca tratada con el hongo fue de 20% superior a la finca en la cual no se llevó a cabo la aplicación del hongo.

De Castro et al. (1997), en pruebas de estable, con concentraciones de  $10^7$  y  $10^8$  conidios.  $\text{ml}^{-1}$ , obtuvieron una eficacia significativa de *M.*

*anisopliae* sobre diferentes estadios de desarrollo de *B. microplus*, en especial sobre estadios inmaduros o inmediatamente después de la muda, lo que constata el potencial que este hongo tiene para la aplicación directa sobre animales.

Finalmente, es preciso continuar con los estudios, con el fin de responder una serie de preguntas que permitan mejorar algunos de los indicadores obtenidos y proporcionar una mayor información de campo y laboratorio.

### AGRADECIMIENTOS

A Miguel Obregón, Ana Jiménez y Jorge Hernández por su desinteresada colaboración. A Fernando Córdoba y Orlando Artavia por brindar las fincas. A Edwin Cruz y Vladimir Hernández por su ayuda en los trabajos de campo y laboratorio. A Armando Nari por la revisión crítica del artículo. A Dagoberto Méndez por su ayuda.

### LITERATURA CITADA

- ÁLVAREZ V., BONILLA R., CHACÓN I. 1999. Determinación de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) a organofosforados y piretroides en Costa Rica. Rev. Cien. Vet. 22:41-60.
- ÁLVAREZ V., BONILLA R., CHACÓN I. 2000. Comportamiento de la resistencia a los acaricidas organofosforados y piretroides sintéticos por la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en diez fincas de Costa Rica. Rev. Cien. Vet. 23:15-24.
- ÁLVAREZ V., BONILLA R., CHACÓN I. 2003. Frecuencia relativa de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en bovinos (*Bos taurus* y *B. indicus*) en ocho zonas ecológicas de Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 51: 427-434.
- ANÓNIMO. 1980. Informe final proyecto estudio de factibilidad para el control de la garrapata. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección de Salud Animal, San José, Costa Rica. 118 p.
- BITTENCOURT V.R.E.P., MASSARD C.I., LIMA A.F. 1994. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. Rev. Univ. Rural, Sér. Ciênc. da Vida 16:49-55.

- BITTENCOURT V.R.E.P., BAHIENSE T.C., FERNANDES E.K.K., DE SOUZA E.J. 2003. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1833 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae). Rev. Brasileira de Parasitologia Veterinária 12: 38-42.
- DE CASTRO A.B.A., BITTENCOURT V.R.E.P., DAEMON E., VIEGAS E.C. 1997. Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. Rev. Univ. Rural, Sér. Ciênc. da Vida 19:73-82.
- FRAZZON A.P.G., VAZ JR.I., MASUDA A., SCHRANK A., VAINSTEIN M.H. 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol. 94:117-225.
- GINDIN G. SAMISH M., ZANGI G., MISHOUTCHENKO A., GLAZER I. 2002. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. Experimental and Applied Acarology 28: 283-288.
- HOGSETTE J.A. 1999. Management of ectoparasites with biological control organisms. International Journal for Parasitol. 29:147-151.
- LEAL A.T., DE FREITAS D.R., VAZ JR. I. 2003. Perspectivas para o controlo do carrapato bovino. Acta Scientiae Veterinariae 31:1-11.
- PÉREZ E., ALVAREZ V. 1995. Analysis of potencial causes of acaricide resistance in *Boophilus microplus* ticks in Costa Rica. In: III Seminario Internacional de Parasitología Animal. S. Rodríguez y H. Frago (eds.). Acapulco, p. 9-21.
- WALLER P.J., SCHWAN O., LJUNGSTRÖM B.L., RYDZIK A., YEATES G.W. 2004. Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden. Vet. Parasitol. 126:299-315.

