

**EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO, PARA EL CONTROL DE
GARRAPATAS DE LA SÚPER FAMILIA *Ixodoidea*, EN CANINOS**

DIEGO MARTÍN NARANJO ACOSTA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2017**

**EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO, PARA EL CONTROL DE
GARRAPATAS DE LA SÚPER FAMILIA *Ixodoidea*, EN CANINOS**

DIEGO MARTÍN NARANJO ACOSTA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:
Magister en Microbiología Agroindustrial**

Director:

HECTOR JAIME ARICAPA GIRALDO

Codirector:

PATRICIA EUGENIA VÉLEZ ARANGO

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA
AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2017**

Nota de aceptación

**Firma de Director del Trabajo de
Grado**

**Firma del presidente del Comité de
Programa**

**Firma de integrante del Comité de
Programa**

Manizales, 2017

DEDICATORIA

A todos los amantes del conocimiento y la investigación.

No nos atrevemos a muchas cosas porque son difíciles, pero son difíciles porque no nos atrevemos a hacerlas. (Seneca).

La verdadera ciencia enseña sobre todo a dudar y a ser ignorante. (Miguel de Unamuno).

AGRADECIMIENTOS

A toda la comunidad academica que dio el pilar de participación en la investigación, a mis directores de tesis un profundo agradecimiento y una gran admiración por la paciencia las enseñanzas y la transmisión de sus conocimientos.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	12
1. OBJETIVOS.....	14
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1. GARRAPATAS: GENERALIDADES.....	15
2.1.1. Familia <i>Argasidae</i> : Garrapatas del género <i>Ornithodoros</i>	15
2.1.2. Garrapatas del género <i>Amblyomma</i>	16
2.1.3. Garrapatas del género <i>Dermacentor</i>	17
2.1.4. Garrapatas del género <i>Haemaphysalis</i>	17
2.1.5. Ciclo biológico de las garrapatas.....	17
2.1.5.1. Ciclo biológico de las garrapatas en pequeños animales.....	18
2.1.6. Enfermedades transmitidas por garrapatas	19
2.2. MÉTODOS PARA EL CONTROL DE GARRAPATAS.....	21
2.3. CONTROLADORES QUÍMICOS (GARRAPATICIDAS).....	22
2.3.1. Garrapaticidas a base de Imidacloprid y cifenotrina (Attack)	24
2.4. USO DE QUÍMICOS NATURALES DE PLANTAS	25
2.5. BIOPLAGUICIDAS	26
2.5.1. Formulación de bioplaguicidas.....	27
2.6. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	28
2.6.1. <i>Beauveria bassiana</i>	28
2.6.2. <i>Metarhizium anisopliae</i>	29
2.6.3. <i>Purpureocillium lilacinus</i> (antes <i>Paecilomyces lilacinus</i>)	31
2.7. CONTROL DE GARRAPATAS POR LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> Y <i>Purpureocillium lilacinus</i>	33
2.8. CONSORCIO MICROBIANO	34
2.9. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.....	35
2.9.1. Medición del crecimiento de microorganismos.....	35
2.9.1.1. Procedimientos para conocer la concentración	35
2.9.1.1.1. Recuento celular.....	35
2.9.1.1.2. Recuento celular en cámara.....	35
2.9.1.1.3. Unidades formadoras de colonia.....	37
2.9.1.2. PROCEDIMIENTOS PARA CONOCER LA VIABILIDAD Y	

PUREZA	37
2.9.1.2.1. Unidades formadoras de colonia (conteo de viables).....	37
2.9.1.2.2. Coloración de azul de metileno	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1. UBICACIÓN.....	38
3.1.1. Fuente de garrapatas y hongos biocontroladores	38
3.1.2. Población de estudio.....	38
3.2. METODOLOGÍA.....	38
3.2.1. Objetivo específico 1	38
3.2.1.1. Aplicación de los tratamientos seleccionados.....	39
3.2.1.2. Comprobación de la presencia de los hongos del consorcio evaluado	42
3.2.1.3. Capacidad ovicida del consorcio microbiano	43
3.2.2. Objetivo específico 2.....	44
3.2.2.1. Comprobación de la presencia de los hongos del consorcio evaluado	45
3.2.2.2. Comprobación final y causalidad	45
3.2.2.3. Capacidad ovicida del consorcio microbiano	45
3.2.3. Análisis estadístico.....	46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1	47
4.1.1. Acción de diferentes tratamientos en el control de garrapatas.....	47
4.1.1.1. Efecto de diferentes concentraciones de la mezcla de aislamientos individuales que conforman el consorcio microbiano sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros vivos.	48
4.1.1.2. Efecto de diferentes concentraciones de la mezcla de aislamientos individuales que conforman consorcio microbiano sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros muertos.....	49
4.1.1.3. Efecto de diferentes concentraciones de la mezcla de aislamientos individuales que conforman consorcio microbiano sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros infestados.	49
4.1.2. Registro de crecimiento de los hongos del consorcio microbiano, sobre las garrapatas	49
4.1.3. Comprobación de la actividad ovicida del consorcio microbiano ..	50
4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2	52
4.2.1. Evaluación del producto comercial Agromix sobre distintas fases de garrapatas.....	52

4.2.1.1. Efecto de diferentes concentraciones del consorcio formulado sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros vivos por tratamiento.....	53
4.2.1.2. Efecto de diferentes concentraciones del consorcio formulado sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros muertos por tratamiento.....	54
4.2.1.3. Efecto de diferentes concentraciones del consorcio formulado sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros afectados por tratamiento.....	54
4.2.2. Registro del crecimiento de los hongos del consorcio microbiano presentes en el producto comercial Agromix®	55
4.2.3. Evaluación de la actividad ovicida del consorcio microbiano	56
5. CONCLUSIONES	58
6. RECOMENDACIONES.....	59
7. BIBLIOGRAFÍA.....	60
ANEXOS.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de las garrapatas en uno, dos y tres hospederos.....	18
Figura 2. Morfología macroscópica y microscópica del hongo <i>Beauveria bassiana</i>	29
Figura 3. Morfología macroscópica (A) y microscópica (B) del hongo <i>Metarhizium anisopliae</i>	30
Figura 4. Morfología macroscópica (a),(b) y (c) y microscópica (d), (e), (f), (g) (h) (i), del hongo <i>Purpureocillium lilacinus</i>	32
Figura 5. Colonias aisladas de los hongos utilizados.....	40
Figura 6. Conteo de colonias del consorcio microbiano en agar PDA	40
Figura 7. Conteo de colonias del consorcio microbiano en agar PDA.	41
Figura 8. Escala de crecimiento del consorcio microbiano sobre el integumento de los ácaros.....	42
Figura 9. Garrapatas muertas en agar agua.....	42
Figura 10. Ubicación de los ácaros infectados en la caja de petri.	43
Figura 11. Aspecto estereoscópico de larvas de garrapata eclosionadas.	44
Figura 12. Garrapatas del género <i>Boophilus</i> con crecimiento del consorcio al momento de la oviposición.	51
Figura 13. Crecimiento del consorcio microbiano sobre la región intersegmentaria ventral de una garrapata del género <i>Dermacentor</i> spp.	53
Figura 14. Larvas de garrapata eclosionadas.	57
Figura 15. Huevo de garrapata.	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de crecimiento de los hongos del consorcio sobre las garrapatas.....	41
Tabla 2. Acción de diferentes tratamientos en el control de garrapatas.	47
Tabla 3. Registro del porcentaje de crecimiento de los hongos del consorcio, en las concentraciones de $(7 \times 10^5$ y 4×10^9) esporas por mL, sobre la garrapata.	50
Tabla 4. Porcentaje de incidencia de los hongos del consorcio y eclosión de huevos, en concentración 4×10^9 esporas por mL, sobre los huevos de garrapata.	51
Tabla 5. Resultados de la evaluación del producto comercial sobre distintas fases de garrapatas	52
Tabla 6. Determinación del porcentaje de crecimiento de los hongos presentes en el producto comercial Agromix®, a las concentraciones de 2 gramos, 4 gramos y 8 gramos por litro de agua, sobre la garrapata.	55
Tabla 7. Relación de variables.....	56

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para la variable ácaros vivos por tratamiento....	68
Anexo 2. Prueba de rango múltiple para la variable ácaros vivos por tratamiento	68
Anexo 3. Análisis de varianza para la variable ácaros muertos por tratamiento	68
Anexo 4. Prueba de rango múltiple para la variable ácaros muertos por tratamiento.....	68
Anexo 5. Análisis de varianza, para la variable de ácaros infestados por tratamiento.....	68
Anexo 6. Prueba de rango múltiple, para la variable de ácaros infestados por tratamiento.....	69
Anexo 7. Análisis de varianza, para la variable de ácaros vivos por tratamiento.	69
Anexo 8. Prueba de rango múltiple, para la variable ácaros vivos por tratamiento.....	69
Anexo 9. Análisis de varianza, para la variable ácaros muertos por tratamiento.	69
Anexo 10. Prueba de rango múltiple para la variable ácaros muertos por tratamiento.....	69
Anexo 11. Análisis de varianza, para la variable ácaros afectados por tratamiento.....	70
Anexo 12. Prueba de rango múltiple, para la variable ácaros afectados por tratamiento.....	70
Anexo 13. Tabla de datos Objetivo 1.	71
Anexo 14. Tabla de datos Objetivo 1.	75
Anexo 15. Tabla de datos, evaluación capacidad ovicida del consorcio microbiano.	77
Anexo 16. Tabla de datos Objetivo 2.	80
Anexo 17. Tabla de datos Objetivo 2.	83
Anexo 18. Tabla de datos, evaluación capacidad ovicida del consorcio microbiano.	86

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos de características hematófagas de vertebrados terrestres, semi acuáticos y animales domésticos. Actualmente presentan distribución mundial con la amplia posibilidad de transmitir gran cantidad de patógenos a los humanos y a los animales (Guglielmone *et al.*, 2014).

Los cambios socioeconómicos y climáticos de la actualidad han influenciado el impacto de la transmisión de enfermedades por garrapatas en el mundo, hasta considerarse patologías emergentes y reemergentes (Cota, 2015). Entre los patógenos transmitidos por este tipo de ácaros se encuentran: bacteriosis, rickettsias, borreliosis, virus, hongos y nematodos (Anderson & Magnarelli, 2008).

En Colombia se presentó un brote de rickettsiosis en los habitantes de los municipios de Necoclí y Turbo, departamento de Antioquia, en los años 2006 y 2008 y un tercero en el municipio de Los Córdoba, del departamento de Córdoba en el 2007, con una tasa de letalidad entre el 26 y el 54% (Vélez, Hidalgo, & González, 2012).

En el sector agropecuario y en las clínicas de pequeños animales, las infestaciones por garrapatas representan un grave problema económico y sanitario, con elevados gastos para su control y/o tratamiento, de modo que tanto caninos como bovinos, equinos, felinos, ovinos, caprinos y el hombre, son susceptibles al influjo de estos artrópodos. En este control de garrapatas se han utilizado compuestos químicos (fluralaner, isoxazolina, Imidacloprid, moxidectina, deltametrina, methoprene, meflumizona, amitraz y selamectina), que incluyen un elevado costo económico y daño medioambiental, además de la generación, a largo plazo, de resistencias y efectos adversos de su uso.

Actualmente existe una tendencia en el desarrollo de métodos de controles alternativos e integrados. Una de las opciones son los controladores biológicos, mediante el uso de hongos entomopatógenos en forma individual o en consorcio, como el formado por los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces lilacinus*, los cuales poseen efectos acaricidas, con tasas de mortalidad que van hasta el 92% (Maranga *et al.*, 2005).

La presente investigación fue realizada con el fin de evaluar el efecto de un consorcio microbiano, a base de hongos entomopatógenos de los géneros *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* & *Paecilomyces lilacinus*, en el control de garrapatas de la súperfamilia *Ixodoidea*, en caninos, a partir de bioensayos en condiciones de laboratorio, para determinar el efecto de diferentes concentraciones de la mezcla de aislamientos individuales de estos géneros de hongos entomopatógenos mencionados y de un producto comercial formulado, conformado por *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* & *Paecilomyces lilacinus*. En consecuencia, se registrará la actividad acaricida a

través de su acción sobre el integumento de los diferentes ácaros de la súperfamilia *Ixodoidea* y su capacidad ovicida.

El estudio provee una metodología para el transporte y soporte nutricional de los ácaros recolectados, con una elevada tasa de viabilidad, así como para la obtención de huevos y larvas de garrapatas bajo condiciones de laboratorio.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un consorcio bioplaguicida, para el control de garrapatas de la súper familia *Ixodoidea*, en caninos.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar bioensayos en condiciones de laboratorio, para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de la mezcla de aislamientos individuales que conforman el consorcio microbiano, sobre las diversas fases del ciclo de la garrapata de la súper familia *Ixodoidea*.
- Determinar en condiciones de laboratorio, el efecto de 3 concentraciones de un producto comercial a base del consorcio microbiano, sobre las diferentes fases del ciclo de la garrapata de la súper familia *Ixodoidea*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GARRAPATAS: GENERALIDADES

Las garrapatas son parásitos hematófagos obligados de un gran número de vertebrados terrestres, que incluyen reptiles, aves, perros e incluso el hombre, con gran importancia desde el punto de vista veterinario y de salud pública, ya que son vectores patógenos de enfermedades de origen bacteriano, viral, protozoario y rickettsial (Aktas, 2014; Paternina, Díaz-Olmos, Paternina-Gomez, & Berjaranao, 2009).

Se clasifican en el suborden *Ixodida* del orden *Parasitiformes*, que corresponde a uno de los dos órdenes de los ácaros conocido como *Acari* (Echeverry & Osorio, 2016). Son los ácaros de mayor tamaño que existen y pueden llegar a medir entre 2 y 30 mm, además poseen partes bucales especializadas debido a su condición de ectoparásitos obligados (Black & Piesman, 1994).

El suborden *Ixodida* está formado por 850 especies, agrupadas en la súper familia *Ixodoidea*, que reúne a tres familias: *Argasidae*, *Ixodidae* y *Nuttalliellidae*. La familia *Argasidae* (garrapatas blandas) incluye a 166 especies, agrupadas en cinco géneros: *Antricola*, *Argas*, *Nothopsis*, *Ornithodoros* y *Otobius*; la familia *Ixodidae* (garrapatas duras) reúne cerca de 700 especies reunidas en 13 géneros: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Aponomma*, *Boophilus*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* y *Rhipicephalus*; la familia *Nuttalliellidae*, posee un solo género *Nuttalliella* como una única especie (Black & Piesman, 1994).

Las garrapatas provocan un gran impacto económico debido a los daños que causan por la transmisión de enfermedades por lo que deben aplicarse muchas medidas preventivas, de control y tratamiento en regiones donde están presentes. Se han asociado con zonas tropicales y subtropicales, con una amplia distribución en el planeta y gran adaptabilidad así como resistencia a diferentes condiciones climáticas, encontrándose algunas especies en países con climas muy fríos como Islandia o Rusia y también en condiciones más calurosas como Estados Unidos o Europa (Muñoz & Casanueva, 2001).

Con la globalización de las economías se han abierto los mercados a países del mundo, en el área agrícola y pecuaria, capaces de producir un fuerte comercio legal e ilegal de animales exóticos, mamíferos, aves y reptiles, los cuales pueden ser hospedadores de estados adultos o inmaduros de los distintos tipos de garrapatas (Muñoz & Casanueva, 2001).

2.1.1. Familia *Argasidae*: Garrapatas del género *Ornithodoros*

Las garrapatas de ésta familia están distribuidas al sur del Sahara, Kenya, Mozambique Ruanda y Madagascar; parasitan jabalíes, porcinos, osos hormigueros, puerco espines, perros, humanos y gallinas (Walton, 1964). Las

del género *Ornithodoros* talaje se distribuyen por Estados Unidos, México, Guatemala, Argentina y norte de Chile, parasitan roedores, humanos, perros, gatos, caballos y llamas (Muñoz & Casanueva, 2001).

Por otro lado, el género *Otobius* tiene dos especies, de las cuales la especie *Otobius megnini* puede parasitar al perro. Las larvas y ninfas se fijan en lo profundo de la orejas, en zonas desprovistas de pelos, también bajo la cola en bovinos y en la conjuntiva en humanos (Baker, 1999).

2.1.2. Garrapatas del género *Amblyomma*

Éste género reúne a 102 especies, de las cuales 11 pueden parasitar al perro, y se encuentran distribuidas alrededor del mundo viviendo como parásitas de múltiples animales e incluso el ser humano. La especie *Amblyomma americanum* comúnmente llamada estrella o estrella solitaria, está distribuida en México, Guatemala, Guyana, Guayana Francesa y Estados Unidos. El adulto de esta especie parásita bovinos, perros, caprinos, equinos, ciervos, ovinos, gatos, aves, zorros, mapaches, ardillas, gallinas y al hombre. Prefiere fijarse en áreas de piel delgada tales como orejas, papada, prepucio, axila, cabeza, vientre, ijar, sin embargo en infestaciones masivas pueden fijarse en cualquier parte del cuerpo (Muñoz & Casanueva, 2001).

Por su parte la especie *Amblyomma aureolatum*, comúnmente llamada garrapata amarilla del perro, está ampliamente distribuida en Brasil. Parasitan a perros, caprinos, ciervos y cánidos silvestres. Es vector de tifus exantémico de Sao Paulo y posiblemente de piroplasmosis canina (Flechtmann, 1973).

Amblyomma cajennense comúnmente llamada garrapata del pimentón, estrella, mostacilla o Cayena, está distribuida en Estados Unidos, México, Jamaica, Panamá, Brasil, Colombia, Guayana Francesa, Argentina, Paraguay y Venezuela. El adulto usualmente parásita animales salvajes pero también ovinos, caprinos, porcinos, conejos, gallinas, ciervos, bovinos, mulas, asnos y perros (Muñoz & Casanueva, 2001).

Los tres estados de *A. cajennense* pueden parasitar al hombre. Los adultos prefieren fijarse entre las piernas o sobre el abdomen. Sin embargo, en porcinos y equinos, todos los estados son encontrados frecuentemente dentro de las orejas. En bovinos pueden fijarse en cualquier parte del cuerpo, incluso han sido encontradas en la lengua de terneros jóvenes (Muñoz & Casanueva, 2001; Strickland, Gerrish, Hourigan, & Schubert, 1965).

Otra de las especies, *Amblyomma imitator*, se ubican en Estados Unidos, México, América Central y Venezuela. Parasitan al ganado doméstico, perros, ciervos y humanos (Barriga, 1994), así como *Amblyomma inornatum*, se encuentra distribuida en Venezuela, Estados Unidos y México. Parasita bovinos, coyotes, ciervos, perros, conejos, armadillos, gatos, mapaches, roedores, ardillas y lobos (Muñoz & Casanueva, 2001; Oliver Jr. & Osburn, 1985).

La especie *Amblyomma maculatum*, comúnmente llamada garrapata de la costa del Golfo aparece en países como Estados Unidos, México, Jamaica, Paraguay, Perú, Uruguay, Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador y Venezuela. Puede parasitar aves, palomas, ardillas, conejos y roedores. El adulto parasita bovinos, equinos, ovinos, perros, coyotes, lobos, osos, zorros, ciervos, porcinos, conejos y humanos (Muñoz & Casanueva, 2001; Strickland et al., 1965).

Por su parte, *Amblyomma ovale*, llamada comúnmente garrapata café brillante del perro. Está distribuida en Brasil, México, Argentina y Venezuela. Con el tiempo se ha adaptado a perros, gatos y aves en zonas rurales (Flechtmann, 1973), y *Amblyomma tigrinum*, llamada también garrapata blanca del perro, está distribuida en Argentina, Brasil, Venezuela y Chile. Puede parasitar zorros, gatos, ovejas, ciervos, bovinos, cuyes y aves (Flechtmann, 1973), además la especie *Amblyomma triguttatum*, distribuida sólo en Australia, parásita canguros, dingos, bovinos, ovinos, equinos, perros y humanos. Se fija a la oreja de su hospedador.

Finalmente, la *Amblyomma variegatum*, llamada comúnmente garrapata africana tropical. Se distribuye en Nigeria, Madagascar, Islas Mauricio, Etiopía, Senegal, República Centroafricana, Arabia, Jamaica Puerto Rico (Muñoz & Casanueva, 2001; Strickland et al., 1965).

2.1.3. Garrapatas del género *Dermacentor*

Las garrapatas del género *Dermacentor* reúnen más de 30 especies de las cuales 6 pueden parasitar al perro; *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor marginatus* causante de la enfermedad de Lyme, *Dermacentor nitens*, *Dermacentor occidentalis*, *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor variabilis* (Muñoz & Casanueva, 2001).

2.1.4. Garrapatas del género *Haemaphysalis*

El género *Haemaphysalis* reúne a cerca de 155 especies, cinco de las cuales pueden parasitar al perro, *H. concinna*, *H. indica*, *H. leachi*, *H. leporispalustris*, *H. longicornis*. Las garrapatas de los géneros *Hyalomma*, *Ixodes*, *Rhipicentor*, *Rhipicephalus*; también parasitan animales domésticos y grandes animales (Muñoz & Casanueva, 2001).

2.1.5. Ciclo biológico de las garrapatas

El ciclo de vida de las garrapatas incluye cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto. Las garrapatas *Ixóidas* solamente presentan un estadio de ninfa, el ciclo de vida de esta familia puede darse de uno hasta tres huéspedes, mientras que las garrapatas *Argasidae* tienen dos o más estadios de ninfa (Dantas-Torres & Otranto, 2013) (Figura 1).

Las garrapatas son consideradas actualmente como el segundo grupo de vectores después de los mosquitos en importancia para la transmisión de enfermedades infecciosas a humanos y animales en el ámbito mundial (Anderson & Magnarelli, 2008). La capacidad vectorial de las garrapatas de la familia *Ixodidae* se ve favorecida por períodos largos en los cuales permanecen firmemente adheridas al huésped y no se sueltan fácilmente. La picadura generalmente indolora, pasa desapercibida hasta que la garrapata se llena de sangre y vuelve al suelo (Anderson & Magnarelli, 2008).

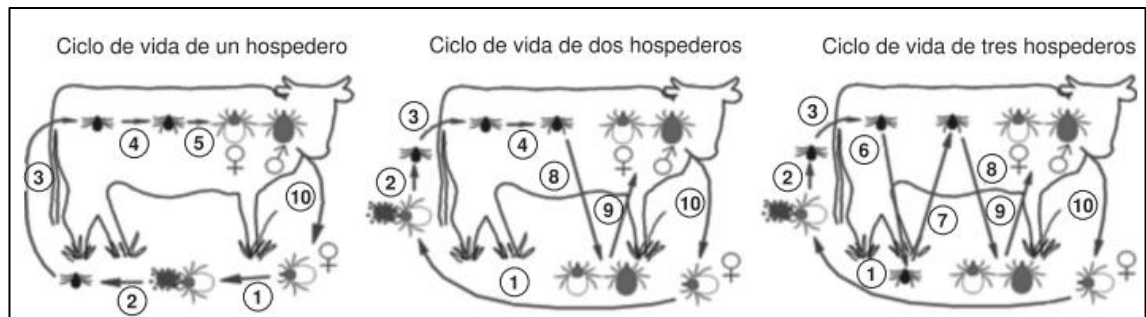


Figura 1. Ciclo de vida de las garrapatas en uno, dos y tres hospederos

Elaborada por Forero-Becerra, 2011. Ciclo de vida de las garrapatas en uno, dos y tres hospederos. (1) Oviposición. (2) Eclosionan los huevos. (3) Las larvas encuentran un hospedero y se adhieren a él. (4) Cambio de larva a ninfa sobre el hospedero. (5) Cambio de ninfa a adulto sobre el hospedero. (6) Cambio de larva a ninfa fuera del hospedero. (7) Ninfas encuentran y se adhieren a un hospedero. (8) Cambio de ninfa a adulto fuera del hospedero. (9) Adulto encuentra un hospedero y se adhiere a él. (10) Hembra apareada e ingurgitada se desprende del hospedero. Recuperado de: Simposio Parasitología veterinaria, Garrapatas estado actual y perspectiva. (Cortés-Vecino, 2011).

2.1.5.1. Ciclo biológico de las garrapatas en pequeños animales

Las garrapatas en pequeños animales poseen un ciclo evolutivo que incluye además de los huevos que ponen las hembras en el terreno, tres estadios móviles: larvas, ninfas y adultos (machos y hembras). Siendo un ácaro de tres hospederos, lo que significa que cada estadio puede alimentarse de sangre por algunos días y abandonan su hospedero para evolucionar en el ambiente (Alcaíno, Gorman, & Jiménez, 1990).

Existen cuatro tipos de ciclos vitales de las garrapatas en los que pueden parasitar a uno, dos, tres o a múltiples vertebrados, en los que se desarrollan desde larvas hasta su adultez. Cuando es un ciclo vital de un hospedero, las garrapatas permanecen en el mismo durante toda su vida, excepto para depositar los huevos en el ambiente al haber llegado al estadio adulto. En el ciclo de vida de dos hospederos, la garrapata pasa del estado de larva a ninfa en uno de los hospederos para luego dejarlo y trasladarse a otro de la misma especie o incluso de otra completamente diferente y convertirse en adulta. En el ciclo de vida de tres hospederos la garrapata pasa cada etapa de su desarrollo en un hospedero diferente, que puede ser de la misma o de diferentes especies. La mayoría de garrapatas que provocan problemas de salud pública y zoonosis son aquellas que atraviesan ciclos vitales de tres o

más hospederos (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Yu *et al.*, 2010) (Figura 1).

Las garrapatas de la familia *Argasidae* tienen ciclos vitales de varios hospederos por lo que han desarrollado la capacidad de alimentarse rápido y dejar al hospedero para trasladarse a otro, lo anterior debido a que tienen varios estadios ninfales que requieren de una rápida alimentación. Las de la familia *Ixodidae* se mantienen en el hospedero hasta varios días, por lo que el máximo de hospederos que parasitan es de tres, y tienen períodos más largos de alimentación (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Yu *et al.*, 2010).

2.1.6. Enfermedades transmitidas por garrapatas

Entre las enfermedades que se transmiten por estos ácaros se encuentran las bacteriosis, enfermedades por rickettsias (anaplasmosis y ehrlichiosis), las borreliosis (enfermedad de Lyme), enfermedades hemoparasitas como (babesiosis, hepatozoonosis y theileriosis) y virus (encefalitis, encefalomiелitis infecciosa y peste porcina). Se reporta transmisión de hongos como ocurre con *Dermatophilus congolensis* por la garrapata *Amblyomma variegatum*, así como la transmisión de nematodos (Anderson & Magnarelli, 2008).

Es importante mencionar que la Babesiosis, Anaplasmosis y Ehrlichiosis son transmitidas principalmente por las garrapatas pertenecientes a los géneros de *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus* (Rodríguez *et al.*, 2013).

Existe una neurotoxina en la saliva de las garrapatas hembras causante de una enfermedad que produce parálisis. La toxina interrumpe la transmisión sináptica de los nervios motores de la columna vertebral y bloquea las uniones neuromusculares al impedir la liberación de acetilcolina y así causa daño a los sitios receptores. Entre los síntomas producidos está la disfunción nerviosa periférica, dificultad respiratoria, efectos cardiovasculares, vómito y cambios en la temperatura corporal (Mans, Gothe, & Neitz, 2008).

La *Ehrlichia spp.* Pertenece al grupo de las *rickettsias*, bacterias gram negativas, pleomórficas (Martínez, Arraga-Alvarado, Triana-Alonso, Johanny Alejandra Ruiz, & Clara Nancy Gutiérrez, 2015) e intracelulares con una alta afinidad por células sanguíneas como leucocitos y plaquetas, que pueden ocasionar trombocitopenia y neutropenia en el hospedero definitivo (Silva *et al.*, 2014).

Un estudio desarrollado por Martínez *et al.*, 2015, en el Instituto de investigaciones biomédicas en la universidad de Carabobo, Venezuela, encontró una asociación significativa en la presencia de *E. canis* y la presencia de garrapatas del género *Rhipicephalus sanguineus* con un 69%. *Dermacentor variabilis* & *Haemaphysalis leporis-palustris* se asoció también en la transmisión de esta misma patogenicidad en caninos (Sosa *et al.*, 2016).

Clínicamente, las *Erlchias* spp. pueden cursar 3 fases: aguda, subclínica y crónica. La primera fase ocurre posterior al período de incubación (8-20 días) y aquí los signos remiten, usualmente, en 15 días, pudiendo existir una recuperación total o inducir a una fase subclínica, en la cual no es posible observar signos evidentes, a pesar de que el agente persiste dentro del hospedero. Una tercera fase, la crónica, puede seguir a la fase subclínica, y en esta, es muy difícil la recuperación del paciente. Las causas que conllevan al desarrollo de la fase crónica de la erlichiosis son desconocidas; sin embargo, se ha determinado que el agente puede mantenerse en un animal durante años sin desarrollar enfermedad (Romero Pérez *et al.*, 2010). Esta bacteria ingresa al torrente sanguíneo y linfático, por la mordida de una garrapata infectada, se multiplica en los leucocitos y macrófagos del bazo, hígado y ganglios linfáticos replicándose para diseminarse hacia otros órganos del cuerpo (Dolz *et al.*, 2013; Romero Pérez *et al.*, 2010).

Los síntomas de la ehrlichiosis varían, dependiendo de la fase en que se encuentre, los más frecuentes son: fiebre, anorexia, letargia, vómito o diarrea con o sin sangre, polimiositis, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, alteraciones respiratorias, cardíacas, nerviosas y oculares (uveítis), así como alteraciones hematológicas que incluyen anemia, leucopenia, trombocitopenia y enzimas hepáticas elevadas (Astigarraga *et al.*, 2016).

Otra de las enfermedades a tener en cuenta transmitida por las garrapatas de importancia clínica en caninos es la Babesiosis, una enfermedad de amplia distribución mundial causada por un protozoo intracelular hemolítico del género *Babesia*. Hay 73 especies de *Babesia* identificadas, 2 de las cuales parasitan al canino (*B. canis* & *B. gipsoni*). Entre las vías de transmisión puede estar la mordedura de garrapatas infestadas a través de la placenta y transfusiones sanguíneas (Loayza, 2014).

Los caninos infestados pueden presentar cuadros agudos de anorexia, apatía, diarrea, neumonía, fiebre, hemoglobinuria, anemia e ictericia (siempre presente), en un curso de evolución de 3 a 10 días. Esta evolución de la enfermedad puede tener una recuperación superior a un mes o alcanzar la muerte. En algunos casos se pueden presentar síntomas neurológicos con extrema apatía, como agresividad, parálisis, desequilibrio y ataxia (Nelson & Couto, 2015).

La anaplasmosis es otra enfermedad infecciosa causada y transmitida por garrapatas, pero ocasionada por *Anaplasma platys*, una bacteria intracelular obligada, gram negativa, con una amplia afinidad por las plaquetas. Los caninos infestados pueden presentar cuadros de trombocitopenia entre 7 y 14 días, con signos leves de pirexia y anorexia, acompañados con petequias y equimosis. Otros de los signos clínicos presentes en la enfermedad son linfo, espleno y hepatomegalia, mucosas pálidas, epistaxis, disnea, vómitos y diarreas (Tateishi *et al.*, 2015).

Algunos autores plantean la posibilidad de que las hemorragias no se presentan, por la poca duración de las trombocitopenias en esta enfermedad, por lo que el agente no genera daños vasculares o vasculitis significativa en comparación con otras infecciones hemoparasitas (Tateishi *et al.*, 2015).

Otra patología transmisible por las garrapatas del género *Rhipicephalus sanguineus* es la hepatozoonosis, poco conocida en Colombia, causada por un protozoo llamado *Hepatozoon canis*. Se encarga de parasitar macrófagos y células endoteliales, al ingresar después de la ingesta de una garrapata contaminada con ooquistes de *Hepatozoon*. Los signos clínicos más comunes son fiebre, ansiedad, inquietud, inapetencia, mucosas pálidas, esplenomegalia y anemia. Así mismo se puede presentar disminución del porcentaje de glóbulos rojos, hemoglobina y del hematocrito (Mejía & Acevedo, 2016).

Los signos clínicos como fiebre persistente, adelgazamiento, diarrea, anorexia, depresión, dolor generalizado, supuración ocular-nasal, paresia, parálisis del tren posterior e inmunosupresión, pueden presentarse en compañía de otros microorganismos, transmitidos por garrapatas, como *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Babesia* o *Ehrlichia* (Morgado *et al.*, 2016).

2. 2. MÉTODOS PARA EL CONTROL DE GARRAPATAS

Las enfermedades por garrapatas pueden ser muy perjudiciales para la economía, las pérdidas económicas por garrapatas para el año 2010 fueron estimadas en US\$ 7 billones en todo el mundo, de esos, un billón de dólares corresponde a Latinoamérica. Las pérdidas y los perjuicios que ocasionan en los diferentes sistemas de producción pecuaria y en salud pública, hacen necesaria la búsqueda de alternativas y medidas eficientes de tratamiento y control (Castro-Janer *et al.*, 2010).

En Colombia una de las principales actividades económicas es la agropecuaria y una de las mayores amenazas para la misma es la infestación por garrapatas como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, transmisora de hemoparásitos como *Babesia spp.* y *Anaplasma spp.* que afectan la producción de carne, leche y disminuyen la calidad de las pieles, llegando a ocasionar pérdidas anuales de unos \$150.417 millones de pesos (para el año 2001) del que el 51% corresponde a garrapatas y moscas y el 8% a hemoparásitos transmitidos por éstas (Cortés-Vecino, 2011).

El impacto económico negativo ocasionado a la industria se debe principalmente a las pérdidas en la producción causadas por daños en piel con heridas que suelen infectarse, alteraciones en la producción de leche, disminución de la fertilidad, anorexia de los animales y dificultades para la adaptación a los ambientes tropicales (Cortés-Vecino, 2011).

Los programas de control integrado de garrapatas están encaminados a lograr un uso óptimo de los productos existentes en el mercado, mediante la integración de estrategias químicas y no químicas para la eliminación de estos ácaros (De Oliveira Monteiro, Daemon, Silva, Maturano, & Amaral, 2010).

Entre las corrientes actuales y futuras de investigación para el control de las garrapatas se encuentran los análisis taxonómicos, filogenéticos, uso de biología molecular, genética de poblaciones, distribución, hábitat, interacciones con patógenos, epidemiología, estudios de caracterización, resistencia a garrapaticidas, programas y alternativas de manejo integrado en el que se combine por lo menos dos herramientas para romper el equilibrio de poblaciones con alta proporción de individuos genéticamente resistentes, así como vacunas y mejoramiento genético de los huéspedes (Dantas-Torres & Otranto, 2013).

Los métodos de control tienen como función romper los ciclos de vida de las garrapatas a través de la aplicación de acaricidas a intervalos determinados, según las especies que se van a combatir, la eficacia residual o persistencia del antiparasitario. Se incluyen varios grupos químicos en el control de los ácaros con diferencias en sus mecanismos de acción (organofosforados, piretroides sintéticos, fenilpirazolonas, amidinas y lactonas macrocíclicas) (Rodríguez *et al.*, 2010).

Se debe rescatar la posibilidad de encontrar un enfoque unificador de los criterios de la medicina humana y veterinaria para el tratamiento y prevención de algunas enfermedades zoonóticas transmitidas por las garrapatas con la protección del medio ambiente (Dantas-Torres & Otranto, 2013).

2. 3. CONTROLADORES QUÍMICOS (GARRAPATICIDAS)

Una garrapata adulta puede provocar la pérdida aprox. de 1 g diario de peso vivo en el animal y puede ingerir de 2 a 3 mL de sangre, durante toda su vida parasitaria, favoreciendo la presentación de alteraciones en la productividad y en la salud de los animales infestados (Araque *et al.*, 2014).

Durante las últimas cuatro décadas, el desarrollo de productos garrapaticidas de gran eficacia y poder residual permitió disponer de una herramienta de control práctica y adaptable, con la disminución de la toxicidad en humanos, pero ha creado un falso sentido de seguridad que ha sustituido el diagnóstico y asesoramiento profesional por la casi exclusiva utilización de fármacos indiscriminadamente (Rivera, Gómez-Lim, Fernández, & Loske, 2014).

Los agentes acaricidas presentaron una evolución, tanto en el principio activo como en la vía de aplicación. Al comienzo, se aplicaban exclusivamente por inmersión del animal, actuando por contacto directo y las formulaciones presentadas eran a base de organofosforados; luego, para menor toxicidad y mayor eficacia, aparecen alternativas de tratamiento con piretroides sintéticos y

diformamidinas. En la actualidad, el control se realiza con agentes de administración parenteral o de aplicación tópica dorsal con fipronilo, fluazuron, lactonas macrocíclicas (Araque *et al.*, 2014).

En pequeños animales las aplicaciones se pueden hacer con baños por inmersión o productos cuyo principio activo es a base de fluralaner, isoxazolina, Imidacloprid, moxidectina, deltametrina, methoprene, meflumizona, amitraz y selamectina, con buenos resultados para su control pero con costos elevados. Muchos propietarios, frente al problema de disminución de eficiencia, cambian el producto sin criterio profesional aumentando las dosis y disminuyen el intervalo entre baños, recurriendo a un profesional veterinario cuando la resistencia está presente y su manejo tiene mayor dificultad (Cuore, Altuna, & Cicero, 2012).

El futuro de nuevos ectoparasitarios, no sólo se encuentra comprometido por el aumento progresivo de los casos de resistencia (Villar *et al.*, 2017) y los crecientes costos de investigación y desarrollo, sino también por cierta falta de conocimiento de nuevas moléculas farmacológicas (Araque *et al.*, 2014),

En Colombia aun cuando no se han realizado estudios nacionales para determinar la extensión de la situación de resistencia, existen trabajos de carácter local que visualizan el problema encontrando en varias regiones resistencia a organofosforados y piretroides sintéticos en departamentos como Antioquia, Meta, Córdoba, Huila y Valle (Díaz, Macías, Navarro, & Torre, 2006).

Al comparar los efectos de varios acaricidas en distintas zonas del país, concluyeron que la deltametrina y la cipermetrina combinada con piperonil-butóxido, presenta la eficacia más baja de todos los acaricidas, superados ligeramente por los valores del amitraz. Su principal efecto fue a nivel reproductivo, interfiriendo en la oviposición de las hembras objeto de estudio con huevos deformes, coincidiendo con otra investigación realizada por Raynal *et al.*, 2013, en Brasil que mostró valores de eficacia muy bajas para la deltametrina ligeramente superados por el amitraz.

Los productos que obtuvieron mayor porcentaje de letalidad fueron los que contenían algún compuesto de organofosforados (etión, clorpirifos o triclorfón). El etión fue el único acaricida que mostró una eficacia del 99 a 100% en las garrapatas que se empleó. Después del etión, el triclorfón fue el acaricida que tuvo más impacto sobre el parámetro de fertilidad de huevos con una disminución de hasta el 50% de la eclosión respecto al grupo testigo (Villar *et al.*, 2017).

En general, la eficacia de los acaricidas piretroides (deltametrina y

cipermetrina) fue la más baja de todos los acaricidas empleados y coincide con aquellos productos comerciales mencionados como ineficientes por los consumidores (Villar *et al.*, 2017).

Así mismo, se pueden encontrar mezclas de varios ixodicidas que sinergizan la acción de otros compuestos contra las garrapatas, tal es el caso de la toxicidad de la cipermetrina + clorfenvinfos y deltametrina + etion para el control de *R. microplus*, en Australia, utilizados con éxito. Una de las ventajas de estas mezclas es que se pueden combatir garrapatas y moscas al mismo tiempo, sin embargo, el riesgo de generar poblaciones de garrapatas resistentes es mayor, por lo que su uso debe ser mediante esquemas establecidos.

Por otro lado, se ha reportado que las lactonas macrocíclicas presentan un impacto ambiental negativo disminuyendo la diversidad y el número de las poblaciones de escarabajos estercoleros. El uso indiscriminado de estos productos ha provocado la selección de poblaciones de garrapatas resistentes, debido a la fuerte presión que elimina a los individuos susceptibles, disminuyendo progresivamente el efecto y elevando los costos de desarrollo de nuevos ixodicidas (Rodríguez *et al.*, 2014).

2.3.1. Garrapaticidas a base de Imidacloprid y cifenotrina (Attack)

El control de las garrapatas actualmente se hace con acaricidas químicos a pesar de que existe una resistencia cada vez mayor a estos, lo que implica el desarrollo de nuevos tratamientos. La mayoría de estos productos actúan sobre el sistema nervioso de la garrapata, siendo este sistema, blanco acaricida desde que se utilizaron extractos de tabaco que contienen nicotina como ectoparasiticida, lo que evidencia la presencia de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) en los ácaros (Lees *et al.*, 2014).

Recientemente, se ha demostrado que los insecticidas de espinosina que se dirigen a nAChRs (Geng, Watson, & Sparks, 2013) son acaricidas eficaces contra garrapatas que son resistentes a piretroides y organofosforados (Miller *et al.*, 2013).

Respecto a los insecticidas nicotinoides el Imidacloprid es el de mayor reconocimiento y uso, representando aproximadamente el 17% del mercado global de insecticidas. Aunque el Imidacloprid exhibe una fuerte eficacia contra los insectos, las garrapatas han mostrado ser insensibles al imidacloprid (Erdmanis *et al.*, 2012). Esto es de particular interés comercial ya que la combinación de los tratamientos de garrapatas disponibles para gatos y perros está en aumento (Lees *et al.*, 2014).

Así mismo se están administrando diferentes formulaciones, incluyendo piretroides y otros combinados con Cifenotrina, para permitir una mejor actividad pulguicida y acaricida, un producto comercial manejado en Colombia a partir de este combinado de Imidacloprid + Cifenotrina es Attack ®; un

antiparasitario externo con efecto pulguicida y garrapaticida spot-on para perros y gatos.

2. 4. USO DE QUÍMICOS NATURALES DE PLANTAS

Actualmente existe un interés global por investigar la presencia de principios farmacológicos en plantas, que son reconocidas como ixodicidas para disminuir costos de producción y no causar daño al ecosistema.

De forma empírica, se ha utilizado en Cuba los residuos del tabaco (*Nicotiana tabacum*), para el control del ácaro de las aves *Dermanyssus gallinae* y en el control de garrapatas en bovinos (Nápoles *et al.*, 2016).

En Colombia, ha sido evaluado el efecto de la tintura del tabaco para el control de la garrapata en caninos frente al tratamiento clásico con amitraz y los resultados de efectividad obtenidos fueron de un 70 % para mortalidad en larvas, 61.79 % en ninfas y 64.9 % para adultos, comparados con un 92 % de efectividad promedio del amitraz en los tres estadios de vida del ácaro (Neira *et al.*, 2009).

Varios estudios se han realizado para determinar la eficacia frente al control de *Rhipicephalus sp.* por parte de extractos de plantas con *Calea serrata*, en el control de *R. microplus* y *R. sanguineus*, obteniendo una reducción del 11 al 14 % en la oviposición y 100 % de mortalidad en larvas (Martínez *et al.*, 2011).

También se ha empleado el uso de aceites esenciales extraídos de *Cuminum cyminum* y *Pimenta dioica*, así como el efecto acaricida de aceites esenciales de hojas de orégano (*Lippia graveolens*), hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*) y bulbos de ajo (*Allium sativum*) con efectos larvicidas del 85 al 100 % contra *R. microplus* (Martínez *et al.*, 2011).

Otros reportes han determinado que los extractos metanólicos de hojas y corteza de Neem (*Azadirachta indica*) son eficaces para el control de garrapatas, así como los aceites de *Azadirachta indica* y *Ocimum* han mostrado eficacia y efectos repelentes contra larvas de *Amblyomma variegatum* y todos los estadios de *Hyalomma anatolicum excavatum* y *R. appendicular* (Ndumu *et al.*, 1999).

En el manejo fitoterapéutico, también se destaca la planta de *Morinda citrifolia* L. (Noni) por sus múltiples propiedades medicinales atribuidas a sus hojas, que poseen actividad antiinflamatoria, analgésica, antiséptica y antihelmíntica para el control de garrapatas en bovinos (Martínez *et al.*, 2012).

Es importante ampliar los proyectos de investigación en algunos aspectos relacionados con la presencia y variabilidad de los metabolitos secundarios en las plantas, conseguir reconocer, aislar y evaluar los metabolitos activos, así como realizar estudios *in vivo* que fortalezcan la comunidad académica y la

posibilidad de desarrollar productos industriales (Rodríguez *et al.*, 2014).

2.5. BIOPLAGUICIDAS

Los bioplaguicidas o biopesticidas provienen de materiales naturales como animales, plantas, microorganismos y minerales (Nava-Pérez, García-Gutiérrez, Camacho-Báez, & Vázquez-Montoya, 2012). Son controladores biológicos naturales de plagas y enfermedades, con una alta especificidad contra las mismas y representan poco o ningún riesgo para el ambiente y el ser humano (Nava-Pérez *et al.*, 2012).

Un primer intento de control biológico de garrapatas con bioplaguicidas se hizo con la introducción de avispas parasitarias de garrapatas de origen francés a los EE.UU. y Rusia. Durante la última década, se han desarrollado otros modelos de control biológico como aves Buphagus (Brasil, Kenia y Zimbabwe) con resultados exitosos, parasitoides (Kenia y Estados Unidos), nematodos entomopatógenos (Egipto, Israel, Guadalupe, y los Estados Unidos), hongos entomopatógenos (Brasil, Cuba, Israel, Kenia y EE.UU.) y bacterias (Brasil) que han ganado impulso (Samish, 2000).

Los bioplaguicidas están divididos en dos grupos principales: el primero se compone de bioplaguicidas microbianos que están formulados utilizando bacterias, hongos, virus y protozoos e insectos; el segundo grupo es el de los biocontroladores bioquímicos en el que se incluyen hormonas, reguladores del crecimiento y enzimas, entre otros (Alfonso, 2002; Nava-Pérez *et al.*, 2012).

El éxito de un bioplaguicida de origen microbiano radica en la buena formulación, dependiente de las características del microorganismo, su relación con los componentes, el ambiente de almacenamiento, los ensayos de laboratorio o de campo que confirmen la efectividad del producto formulado, su inocuidad y sus características físicas que permitan la mezcla con otros componentes, que sea de fácil aplicación y económicamente rentable (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

En los últimos años, unos de los principales microorganismos utilizados para la formulación de bioplaguicidas agrícolas han sido los hongos, debido a su capacidad para antagonizar con otros hongos, bacterias e insectos causantes de enfermedades. La utilización de hongos entomopatógenos como bioplaguicidas requiere de la producción masiva del hongo, el cual debe mantener su capacidad infectiva por un periodo de tiempo considerable. Se han desarrollado polvos humedecibles con formulación seca, debido a su larga conservación, buena miscibilidad en agua para formar una suspensión homogénea de fácil aplicación; sin embargo es necesario realizar pruebas de suspensibilidad, contenido de humedad y tamaño de la partícula siempre antes de sacar el producto al mercado (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

La temperatura y la humedad son las principales limitantes para la eficacia de

los hongos que se han contrarrestado con la adición de coadyuvantes que mejoran la germinación de esporas, tales como el aceite de maíz sin refinar que reduce los requerimientos de humedad, así como los surfactantes que mejoran la dispersión de las esporas en gotas, la germinación, infección y desarrollo de los hongos (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

2.5.1. Formulación de bioplaguicidas

La formulación y evaluación de los bioplaguicidas compuestos por hongos solos o en consorcios, requieren de ciertas técnicas de microbiología básica y aplicada para obtener productos estandarizados, con alta calidad y eficiencia al momento de su uso. La manipulación de (los) microorganismo (s) en condiciones adecuadas de laboratorio así como el asegurar las concentraciones iniciales y finales del mismo, tanto en la fase de formulación como de evaluación de acción, son vitales para lograr resultados eficientes de los bioplaguicidas compuestos por hongos entomopatógenos.

Casi la totalidad de los bioplaguicidas a base de hongos se formulan utilizando en primer lugar la fermentación sumergida para el crecimiento de los hongos, la cual es más manejable y automatizable, sin embargo, los métodos de fermentación en estado sólido también se utilizan ampliamente para la producción de oosporas o micelio del hongo que luego es fragmentado para su posterior formulación (Burges, 1998). A pesar de que ya se han estandarizado muchas metodologías para la producción de hongos y posterior formulación de bioplaguicidas, cada hongo es diferente en cuanto a las condiciones requeridas de crecimiento y reproducción por lo que las tecnologías deben adaptarse a cada especie (Burges, 1998).

La mayoría de formulaciones son polvos humedecibles, algunas que contienen blastosporas y otras que contienen conidias e hifas. Otros productos se formulan en forma de gránulos humedecibles pero generalmente requieren refrigeración lo cual es un problema (Burges, 1998).

Formulaciones más recientes están basadas en polvos suspendidos en biopolímeros que les otorgan más durabilidad o también suspensiones en diluyentes no evaporables que facilitan la conservación y posterior dispersión de las esporas de los hongos (Glare *et al.*, 2012).

La mayoría de bioplaguicidas a base de hongos están pensados para que se realice una aplicación de los mismos por medio de sprays, pero algunos productos pueden formularse en forma de gránulos que lentamente liberan el producto para adaptarse a las condiciones del ácaro (Glare *et al.*, 2012).

Finalmente, es indispensable que las formulaciones provean las condiciones necesarias para la estabilidad, conservación y viabilidad de los hongos. Esto se logra utilizando por ejemplo, estabilizantes que protejan el producto de las condiciones ambientales pero que permitan su liberación en el ambiente

cuando sea necesario, ingredientes activos que permanezcan “dormidos” hasta momento adecuado y nutrientes que mantengan al hongo vivo hasta el momento de la aplicación (Hynes & Boyetchko, 2006).

2. 6. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los primeros microorganismos identificados como causantes de enfermedades en insectos fueron los hongos, ya que se observó su crecimiento en el cuerpo de estos. Los hongos entomopatógenos penetran, invaden y se multiplican dentro del insecto, sin necesidad de ser ingeridos; su crecimiento y desarrollo está limitado por condiciones medioambientales como la radiación solar, la humedad y las altas temperaturas. Las unidades de reproducción de los hongos (esporas o conidias) son las que infectan generalmente a los insectos (Góngora, Marín, & Benavides, 2009).

Este tipo de hongos inicia su proceso infectivo cuando las esporas son retenidas en la superficie del tegumento, iniciando la formación hacia el tubo germinativo, donde comienzan a excretar enzimas como proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas, encargadas de degradar la cutícula del insecto y favorecer la penetración por presión mecánica. Una vez dentro del insecto, el hongo desarrolla cuerpos hifales que se diseminan a través del hemocele e invade diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de malpighi, mitocondrias y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto después de 3 a 14 días de iniciada la infección (Díaz *et al.*, 2006; Wraight *et al.*, 2000).

2.6.1. *Beauveria bassiana*

Es un hongo ascomiceto que crece de forma natural en los suelos de todo el mundo, pero además es cosmopolita y se ha aislado de insectos, filoplano y en algunas ocasiones, de tejido vivo de plantas (Rehner *et al.*, 2011). Su poder entomopatógeno le hace capaz de parasitar a insectos de diferentes especies, causando la conocida enfermedad blanca (Xiao *et al.*, 2012). *Beauveria bassiana* debe parte de su capacidad entomopatógena a que produce ácidos cítrico y oxálico los cuales pueden solubilizar péptidos y proteínas presentes en la cutícula de los insectos (Talaiei-Hassanloui, Kharazi-Pakdel, Goettel, & Mozaffari, 2006).

Actualmente es utilizado como insecticida biológico o biopesticida controlando un gran número de parásitos de las plantas como son orugas, termitas, moscas blancas, áfidos o escarabajos. La capacidad de defensa de este hongo también ha permitido numerosos estudios con aplicación en inmunología humana (Xiao *et al.*, 2012).

Como ya se ha mencionado, *Beauveria bassiana* es usado para controlar una gran variedad de insectos plaga, siendo la especie comercialmente más utilizada en el mundo para este fin. Las formulaciones con este hongo consisten en la combinación de ingredientes de tal forma que las esporas se

mantiene estables, efectivas y fáciles de aplicar. Desde la llegada de la broca del café (*Hypothenemus hampei*), a Colombia este hongo ha sido asociado como el mayor controlador natural de esta plaga con buenos índices de mortalidad (Góngora et al., 2009).

En cuanto a sus características morfológicas puede decirse que las colonias de este hongo se caracterizan por su color blanquecino amarillento con una textura algodonosa o velutinosa que se convierte en farinácea o polvosa a medida que se acumulan las conidias en la superficie de las colonias que van envejeciendo. Las conidias de este hongo se caracterizan por su forma globosa o elipsoide y poseen hifas aéreas ramificadas, hialinas, que son septadas con paredes delgadas. Los conidióforos se observan en grupos densos o solitarios de hifas aéreas y pueden estar agrupados o solos y poseen una base típicamente subsférica o en forma de ampolla que alberga las conidias agrupadas y juntas (Rehner et al., 2011) (Figura 2).

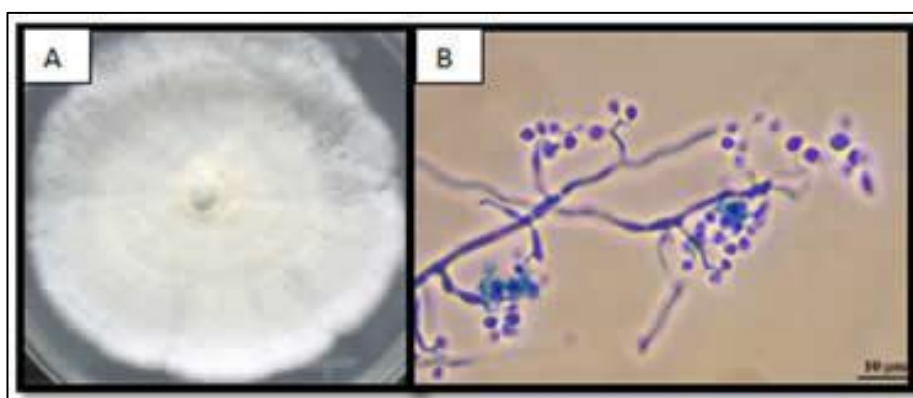


Figura 2. Morfología macroscópica y microscópica del hongo *Beauveria bassiana*

Recuperado de: Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. Gonzales, M. Aguilar, C. Rodríguez, R (2012).

2.6.2. *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium spp. pertenece a la clase *Hyphomycetes*, familia *Moniliaceae*. Este hongo entomopatógeno anamorfo y facultativo, fue aislado por primera vez en 1879 del escarabajo *Anisoplia*. Actualmente, se ha aislado de insectos, suelo, sedimentos del río y material orgánico en descomposición.

La clasificación taxonómica del género *Metarhizium spp.*, ha sufrido cambios de acuerdo a varios autores. Tulloch (1976) citado por Ojeda-Chi et al, 2012 lo clasifica con base en sus características morfológicas y reconoce dos especies: *M. anisopliae* y *M. flavovoride* (Ojeda-Chi, Rodríguez-Vivas, Galindo-Velasco, Lezama-Gutiérrez, & Cruz-Vázquez, 2011; Tulloch, 1976). Los estudios filogenéticos han permitido reubicar a las especies de *Metarhizium* al grupo de los *Ascomycetes*, al considerar además de su origen e implicaciones evolutivas como reproducción, hábitat, tipo de hospedero y otros invertebrados como fuente de alimento (Ojeda-Chi et al., 2011).

Morfológicamente, las colonias de este hongo se caracterizan por tener una textura aterciopelada con bordes definidos y colores que van desde el verde oscuro al verde claro, a veces presentando un color blanco parduzco y algunas colonias tienen una combinación de estos colores. La mayoría de las colonias de este hongo presentan un borde blanco de grosor variable y al reverso de la caja de Petri presentan un color parduzco o anaranjado (Fernandes *et al.*, 2010). (Figura 3).

Las conidias se caracterizan por ser de forma cilíndrica u ovalada, usualmente con los extremos truncados con un tamaño de entre 3,5 – 9,0 μm , y se organizan en grandes masas de conidias, soportadas por conidióforos erectos con dos o tres ramificaciones de forma clavar, que pueden ser de color amarillo oscuro o verde oscuro (Bischoff, Rehner, & Humber, 2009; Fernandes *et al.*, 2010) (Figura 3).

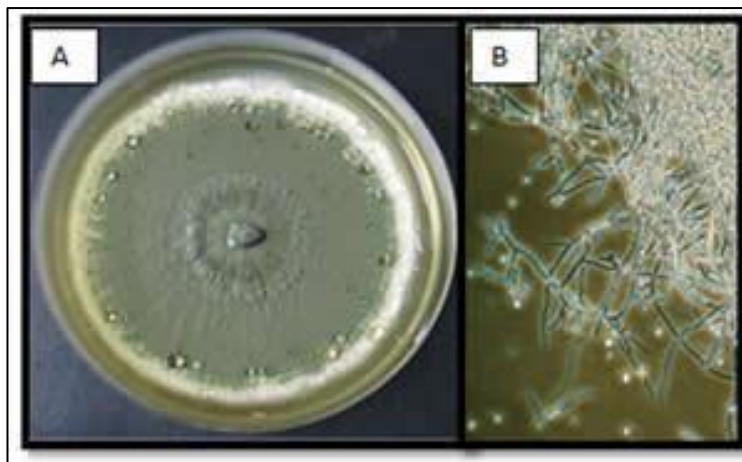


Figura 3. Morfología macroscópica (A) y microscópica (B) del hongo *Metarhizium anisopliae*

Recuperado de: Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. Gonzales, M. Aguilar, C. Rodríguez, R (2012).

M. anisopliae ataca más de 200 especies de insectos y ácaros de diversos géneros, en los órdenes *Orthoptera*, *Hemiptera*, *Lepidoptera*, *Dermaptera*, *Hymenoptera* y *Coleoptera*, entre otros. Además, se sabe que tiene efecto sobre las siguientes especies de garrapatas: *Amblyomma americanum*, *A. maculatum*, *A. cajennense*, *A. variegatum*, *Rhipicephalus annulatus*, *R. microplus*, *Hyalomma excavatum*, *Ixodes scapularis*, *R. appendiculatus* y *R. sanguineus* (Polar, Moore, Kairo, & Ramsubhag, 2008).

Este hongo es capaz de producir enzimas como aminopeptidasas y proteínas como hidrofobinas que facilitan la acción de otras enzimas producidas de forma extracelular para atacar la cutícula del insecto. También se han encontrado esterases y proteasas en conidias no germinadas, lo que sugiere que puede existir una preparación previa de la superficie cuticular del insecto antes de la infección por el hongo (Díaz *et al.*, 2006). Igualmente se ha detectado la producción de la toxina ácido oxálico, el cual se ha descrito como factor de virulencia que puede ayudar a los hongos entomopatógenos a solubilizar la

cutícula de los insectos (Díaz *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que *M. anisopliae* no causa efectos colaterales en los animales de sangre caliente ni al medio ambiente; en estudios realizados se demuestra sólo toxicidad en células de insectos y no en células humanas, bacterias o protozoarios. Otros autores manifiestan que no causa efecto de patogenicidad, toxicidad o alergia y no se observan pérdidas del apetito, diarrea, ni muerte en ratas *Wistar*. En condiciones de campo afecta específicamente sus huéspedes blanco, reduciendo la posibilidad de afectar a otros organismos presentes en el mismo (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

2.6.3. *Purpureocillium lilacinus* (antes *Paecilomyces lilacinus*)

El hongo *Paecilomyces lilacinus* es un saprófito oportunista, que habita los suelos diferentes ambientes; es utilizado como controlador biológico de los nematodos *Meloidogyne* & *Nacobbus sp.* Así mismo, ha mostrado ser un controlador eficaz del nematodo de la papa *Globodera rostochiensis* y de otras especies de nematodos fitoparásitos como *Pratylenchus spp.*, *Helicotylenchus spp.*, *Trichodorus spp.* & *Rotylenchulus spp.* (Kiewnick & Sikora, 2006).

Recientemente, esta especie ha sufrido una revisión en su taxonomía siendo reacomodado en el nuevo género *Purpureocillium*, como lo describe el estudio realizado por Luangsa-ard *et al.* 2011, en el que se especifican las diferencias taxonómicas de esta especie con respecto de las demás especies de *Paecilomyces*, obtenidas luego de analizar secuencias del gen 18S RNA e ITS (Espaciador Transcrito Interno) en aislamientos clínicos y del suelo (Luangsa-Ard *et al.*, 2011). Debido a lo anterior, este hongo ahora se clasifica como un Ascomiceto, de la clase *Sordariomycete*, en el orden de los *Hipocreales* y en la familia *Ophiocordycipitaceae*.

En cuanto a las características morfológicas las colonias de este hongo tienden a ser aplanadas y pueden presentar crecimiento micelial aéreo. Poseen un color blanco al inicio del cultivo que se torna rosa o púrpura vino a medida que la colonia envejece, presentando además al reverso de la caja de Petri un color vináceo o blanco (Luangsa-Ard *et al.*, 2011) (Figura 4).

Presenta conidióforos levantados de las hifas que tienen entre 2 y 4 fiálides y que poseen un característico cuello hinchado en la parte inferior que luego se hace más delgado, sosteniendo cadenas divergentes de conidias elipsoides o fusiformes y a veces cilíndricas cuando se cultiva este hongo en agar. Las hifas de este hongo son ligeramente rugosas y no septadas (Luangsa-Ard *et al.*, 2011) (Figura 4).

Se han descrito diferentes mecanismos de acción para el hongo *P. lilacinus* sobre nematodos que infectan plantas, el principal de estos es la infección directa sobre los estadíos sedentarios del parásito, especialmente cuando se encuentran en la etapa de huevo (Kiewnick & Sikora, 2006). Varias proteínas y

toxinas como leucitoxinas, quitinasas, proteasas y ácido acético se han relacionado con el proceso de infección de *P. lilacinus* (Kiewnick & Sikora, 2006). Es reconocido que el hongo forma estructuras con sus hifas que envuelven al parásito y finalmente lo penetran para completar el proceso de infección (Kiewnick & Sikora, 2006).



Figura 4. Morfología macroscópica (a),(b) y (c) y microscópica (d), (e), (f), (g) (h) (i), del hongo *Purpureocillium lilacinus*.

Recuperado de: *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. Luangsa-Ard, J et al (2011).

Purpureocillium sp. es un hongo parásito que ataca formas sedentarias de los nematodos, como se ha descrito anteriormente, es oportunista con muy poca especificidad hacia el hospedero, aunque las diferentes cepas difieren en su habilidad para atacar huevos de diferentes especies de nematodos (Mancebo et al., 2005). A pesar del auge que han tenido sus aplicaciones en condiciones de campo, aún no es claro el efecto que estas aplicaciones masivas tendrían en el ecosistema del suelo y su interacción con organismos benéficos del ambiente (Aranzazu-hernández, Leguizamón-caycedo, & Dávila-arias, 1999).

2.7. CONTROL DE GARRAPATAS POR LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* Y *Purpureocillium lilacinus*

Los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* & *Metarhizium anisopliae* han sido ampliamente utilizados en todo el mundo para el control de diversas plagas que afectan cultivos agrícolas, como se ha descrito anteriormente, sin embargo, su potencial como controladores biológicos de plagas que afectan a los animales ha sido poco abordado (Maranga, Kaaya, Mueke, & Hassanali, 2005).

En el estudio realizado por Maranga *et al.*, (2005) se describió por primera vez el efecto de la combinación de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en condiciones de laboratorio sobre la mortalidad de garrapatas del género *Amblyomma variegatum*. En este estudio se utilizaron dos formulaciones, una en agua y otra en aceite, además de varias concentraciones de esporas / mL de los hongos (desde 10^4 hasta 10^{10}), obteniéndose resultados de hasta el 92% de muerte de las garrapatas para la formulación en aceite y del 44% para la formulación en agua (Maranga *et al.*, 2005).

Otro estudio realizado por Pirali-Kheirabadi *et al.*, (2007) comprobó la virulencia de once cepas de *Metarhizium anisopliae* y seis cepas de *Beauveria bassiana* sobre diferentes estadios de las garrapatas pertenecientes al *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, demostrando que el hongo *M. anisopliae* afectó la eclosión de los huevos en un 89,1%, y *B. bassiana* en un 35,5%, ambos a una concentración de 10^7 esporas / mL. Además, se demostró una reducción en la eficiencia de la reproducción de las garrapatas del 88,69% con *M. anisopliae* y de 78,15% con *B. bassiana*. (Pirali-Kheirabadi *et al.*, 2007).

En el año 2004, Kirkland *et al.*, demostraron el efecto, por separado, de los hongos *B. bassiana* y *M. anisopliae* sobre ninfas y adultos de dos géneros de garrapatas: *Amblyomma americanum* & *Amblyomma maculatum*. En este estudio se obtuvo con el hongo *M. anisopliae* a una concentración de 10^8 esporas / mL, una mortalidad de más del 90% para adultos de *A. maculatum* y del 10% para adultos de *A. americanum*. Con el hongo *B. bassiana*, en las mismas condiciones se obtuvo una mortalidad del 60% para *A. maculatum* y del 15% para *A. americanum*. Ambos hongos demostraron tener una efectividad del 100% sobre las ninfas de *A. maculatum* y del 35% sobre las de *A. americanum*. También se demostró que los pentanos extraídos de la cutícula de *A. americanum* inhibieron la germinación de los hongos sobre la misma, reduciendo la mortalidad de esta especie de garrapatas (Kirkland, Cho, & Keyhani, 2004).

Un estudio in vitro realizado en la ciudad de Lanzhou en el laboratorio de parasitología en China, demostró que más de la mitad de las garrapatas hembras de género *Hyalomma anatolicum*; estaban infestadas con hongos biocontroladores como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, causando

una mortalidad del 90%, revelando que son altamente patógenos para este tipo de ácaros (Sun *et al.*, 2011).

Otra investigación llevada a cabo en Río de Janeiro Brasil en la universidad Federal Rural, demostró que de 200 hembras recolectadas de garrapatas, el 71% fueron infectadas con *Beauveria bassiana* y el 29% con *Metarhizium anisopliae* (Da Costa, Sarquis, De Moraes, & Bittencourt, 2002). Así mismo, en el año 2006 en la Universidad de Michigan en el departamento de entomología demostraron la susceptibilidad de *Agilus planipennis* un insecto Coleoptera por *Beauveria bassiana* & *Metarhizium anisopliae*, mediante bioensayos con mortalidad de los ácaros entre 4 y 6 días después de iniciado el tratamiento (Liu & Bauer, 2006).

Aunque el hongo *Purpureocillium lilacinus* se ha utilizado más ampliamente para el control de nematodos (Kiewnick & Sikora, 2006), se ha demostrado también su acción acaricida, como lo indica por ejemplo, el estudio realizado por Alessandro *et al.*, en el 2012, en el cual se infectaron garrapatas hembra engordadas, de las especies *Amblyomma cajennense* & *Rhipicephalus sanguineus* con el hongo *P. lilacinus* aislado de la cutícula de garrapatas *A. cajennense* que se encontraban en la región del centro de Brasil. El hongo produjo una mortalidad del 66,6% para garrapatas de *A. cajennense* y del 100% para garrapatas de la especie *R. sanguineus* luego de 20 días de crecimiento, demostrándose la capacidad infectiva de dicho microorganismo sobre los ácaros (D'Alessandro, Humber, & Luz, 2012).

2. 8. CONSORCIO MICROBIANO

El consorcio microbiano es la asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad para obtener un efecto benéfico de los demás. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos en el que el crecimiento y el flujo de nutrientes se conducen más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales. Funcionalmente, un consorcio microbiano supera la suma de sus partes; sus miembros mantienen la compatibilidad metabólica y ecológica, dependiendo de transformaciones ambientales generadas, que permitan que ellos coexistan cercanamente (Ochoa & Montoya, 2010).

Un consorcio desempeña funciones que poblaciones individuales no harían eficientemente; además, en asociación pueden generar mayor resistencia a cambios ambientales y mayor estabilidad en el tiempo. Estas características dependen de la comunicación de sus miembros, mediante el intercambio de sustancias o por señales moleculares, donde cada población detecta y responde a la presencia de otras, ejerciendo sobre ellas un control positivo o negativo para su crecimiento y metabolismo. Esta comunicación permite la combinación de tareas desempeñadas por las poblaciones microbianas involucradas (Ochoa & Montoya, 2010).

2.9. TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

2.9.1. Medición del crecimiento de microorganismos

Entre las metodologías que existen para cuantificar el crecimiento de una población de microorganismos, se diferencian dos grupos que incluyen las pruebas que permiten determinar la concentración y aquellos procedimientos que permiten conocer la viabilidad y pureza de éstos. Los métodos más comúnmente utilizados se describen a continuación.

2.9.1.1. Procedimientos para conocer la concentración

2.9.1.1.1. Recuento celular

Se aplica para el recuento de esporas de hongos filamentosos, células de levaduras y algunas bacterias, empleando la cámara de Neubauer. Este es un procedimiento que permite conocer la concentración del microorganismo valorado. Entre las limitaciones del procedimiento está que no se puede distinguir células muertas de las vivas, las células pequeñas son difíciles de ver al microscopio y algunas posiblemente no se cuentan por lo que es un método que requiere tiempo y habilidad para conseguir precisión (Martinko JM, Madigan MT, 2003).

Este método no es adecuado para suspensiones donde la concentración de células es poco densa. En el caso de suspensiones que tienen menos de 10⁶ células/mL se verán pocas células por campo en el microscopio. Estas muestras diluidas pueden sin embargo, contarse si previamente se concentraron por centrifugación en un pequeño volumen.

2.9.1.1.2. Recuento celular en cámara

El objetivo del uso de la cámara de Neubauer es realizar diluciones a partir de la muestra a evaluar, para facilitar el recuento de microorganismos. Su elaboración dependerá de la consistencia y procedencia de la muestra. Si la muestra a evaluar es líquida se debe tomar 10 mL de la muestra y se adicionaran 90 mL de diluyente (agua peptonada 0.1%), de esta manera quedará realizada la dilución 10⁻¹, a partir de esta dilución se toma 1 mL y adicionan 9 mL de diluyente, así quedará preparada la dilución 10⁻². De esta forma se realizan diluciones hasta alcanzar la concentración que permita realizar el recuento.

Si las muestras son sólidas (cultivos deshidratados, microorganismos propagados en cereal): se toman 10 g de la muestra y se adicionan 90 mL de diluyente (agua peptonada 0.1%), quedando una dilución 10⁻¹, a partir de esta dilución se toma 1 mL y se adicionan 9 mL de diluyente, así queda preparada la dilución 10⁻². De esta forma se van realizando diluciones, hasta alcanzar una concentración que permita realizar el recuento.

Si los microorganismos están presentes en un medio de cultivo sólido o agar se puede realizar inicialmente una suspensión madre con 100 mL de diluyente, al

adicionar el contenido del agar presente en la superficie donde está el crecimiento del microorganismo. A partir de esta suspensión se puede realizar las diluciones necesarias descritas anteriormente en el procedimiento para muestras líquidas.

El número de diluciones a elaborar depende en gran medida del conocimiento previo que se tenga de la muestra a evaluar, si esta información es desconocida se puede realizar mínimo 7 diluciones y a partir de su montaje considerar si es necesario realizar más o menos diluciones.

Para el manejo de la cámara se debe lavar y secar previamente al momento del recuento y seleccionar la dilución, se recomienda observar las últimas 2 diluciones; montar cada una de las diluciones en cada lado de la cámara de recuento. La dilución a elegir será aquella que tenga entre 10 y 50 células en el cuadrante central.

Una vez elegida la dilución, se debe tomar de la muestra 0.01 mL con micropipeta o con un capilar, depositando con cuidado, de tal manera que el líquido entre por capilaridad sin formar burbujas. Si esto ocurre, se debe retirar el cubre objeto, lavar, secar la cámara y repetir el proceso. Se recomienda dejar reposar 3 minutos y enfocar la cámara empleando un aumento de 10 x. Buscar el cuadrante central para observar nítidamente las esporas o células microbianas y luego pasar al objetivo de 40 x, para la realización del conteo.

Es importante tener en cuenta que la cámara está dividida en 2 retículos que se divide en 9 cuadrados de 1 mm² cada uno, o sea que cada retículo tiene una superficie total de 9 mm². El cuadrado central, está de nuevo subdividido en 25 cuadrantes y éstos en 16 cuadrantes más pequeños. El recuento se realiza en los 25 cuadrantes centrales para obtener directamente el N.

Realización de cálculos para el reporte (Vélez *et al.*, 1997):

El volumen (V) en mililitros de uno de los cuadrantes de 1mm² es el siguiente:

$$V = 1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm} \text{ (profundidad)} = 0,1\text{mm}^3 \times \left(\frac{1\text{cm}^3}{10^3}\right) \times \frac{1\text{ml}}{\text{cm}^3} = 10^{-4}\text{ml}.$$

Si N es el número promedio de esporas por cuadrante, entonces E el número de células por mL: Células/mL (E) = N x dilución de la suspensión / V

$$\frac{1\text{ml} - 10^3\text{mm}^3}{x - 0,1\text{mm}^3} \times \frac{1\text{ml} \times 0,1\text{mm}^3}{10^3\text{mm}^3} = \frac{0,1\text{ml}}{10^3} = 0,1 \times 10^3$$

$$X = 10^{-1} \times 10^{-3} = 10^{-4}\text{ml} \text{ (Factor de la cámara)}$$

Fórmula para el recuento de esporas y células microbianas, informado en ml. Explicación de la conversión de mm³ a mL. Tomado de Vélez et al., 1997.

De acuerdo a lo anterior, para el reporte final se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ml} = N \times \text{dilución} \times 10^4$$

2.9.1.1.3. Unidades formadoras de colonia

Se debe iniciar el procedimiento con la realización de diluciones de la muestra utilizando como diluyente agua peptonada al 0.1%, de acuerdo con el siguiente flujo de trabajo:

La siembra se realiza en profundidad, al adicionar 1 mL de la dilución correspondiente en una caja de Petri estéril y vacía, donde posteriormente se adicionan 15 mL de agar previamente seleccionado según los requerimientos, se debe realizar una buena homogenización para que el microorganismo quede distribuido por todo el agar.

Se recomienda realizar este procedimiento por duplicado para cada dilución. Las cajas se llevan a incubar a la temperatura requerida para el microorganismo que se esté trabajando. Luego del período de incubación, se selecciona la dilución en la cual se llevará a cabo el recuento de acuerdo al rango para mohos y levaduras entre 10 y 100 colonias. Una vez realizado el recuento se saca el promedio de colonias obtenidas en cada caja y a partir de éste se informan 2 dígitos significativos, teniendo en cuenta el inverso de la dilución donde fue realizado el recuento. El resultado se expresa en UFC/ mL.

2.9.1.2. PROCEDIMIENTOS PARA CONOCER LA VIABILIDAD Y PUREZA

2.9.1.2.1. Unidades formadoras de colonia (conteo de viables)

Una célula es viable cuando es capaz de dividirse para dar lugar a descendencia. La forma habitual para su determinación es de acuerdo al número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido. Permite valorar concentración, viabilidad y pureza del inóculo evaluado. Entre sus limitantes está que el número de colonias depende del tamaño del inóculo, del medio de cultivo, las condiciones y el tiempo de incubación. El tamaño de las colonias varía ampliamente de modo que colonias muy pequeñas pueden no ser contadas (Martinko JM, Madigan MT, 2003).

2.9.1.2.2. Coloración de azul de metileno

Permite determinar la actividad y viabilidad de las células, ya que las células que son no viables absorben el colorante tornándose azules mientras que aquellas que son aún viables rechazan el mismo, manteniéndose de color blanco o transparente. Tiene gran aplicabilidad para la valoración de cultivos de levadura (Martinko JM, Madigan MT, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

La investigación se realizó entre los meses de Marzo a Noviembre del año 2016, en las instalaciones del laboratorio de diseño y desarrollo de la empresa Soluciones Microbianas del Trópico (SMT). Las muestras de garrapata fueron recolectadas del albergue municipal canino de Manizales, Departamento de Caldas.

TIPO DE ESTUDIO: Descriptivo en el análisis e interpretación de las variables cualitativas. Para la evaluación de las variables cuantitativas se empleó un diseño de bloques, completamente aleatorizado.

3.1.1. Fuente de garrapatas y hongos biocontroladores

La investigación se realizó con una recolección directa de garrapatas de la súper familia *Ixodoidea* presentes en caninos de la ciudad de Manizales, departamento de Caldas.

Los hongos biocontroladores utilizados en la investigación fueron suministrados por la empresa Soluciones Microbianas del Trópico (SMT), CENICAFÉ, Kilómetro 2 Vía antigua a Manizales Chinchiná - Caldas.

3.1.2. Población de estudio

La colecta total de garrapatas durante el tiempo del estudio fue de 400 individuos, para una población de 190 garrapatas de caninos empleada para el presente estudio, con su registro respectivo de hospedero y procedencia. Todas las garrapatas eran de cuerpo duro (*Ixodidae*), tanto adultos (machos y hembras), como ninfas. Las garrapatas recolectadas se transportaron en recipientes plásticos, en grupos de 50 ácaros, con suministro continuo de pelo estéril canino como fuente de alimento, y se llevaron al laboratorio de investigación el mismo día de la recolección. Es importante mencionar, que con base en ensayos previos se logró determinar que a partir de una fuente de alimentación con pelo, buena aireación y humedad continua se conservaron los ácaros vivos por un mayor período, en grupos de cerca de 50 individuos.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Objetivo específico 1

Realizar bioensayos en condiciones de laboratorio, para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de la mezcla de aislamientos individuales que

conforman el consorcio microbiano, sobre las diversas fases del ciclo de la garrapata de la súper familia *Ixodoidea*.

La unidad experimental estuvo conformada por la caja de Petri con 5 individuos de garrapatas, 5 repeticiones por cada tratamiento y 7 mediciones realizadas cada 5 días, por un período de 35 días. Es importante aclarar que el número de repeticiones contempladas respondió a la disponibilidad de individuos de garrapatas, al momento de la aplicación homogénea de los tratamientos, teniendo en cuenta la dificultad de colecta y agrupamiento, que garantizara su viabilidad durante el estudio.

Para favorecer las condiciones de oxigenación se realizaron varias aberturas en la tapa de la caja de Petri, de aprox. 0,2 mL de diámetro, para un total de 30 a 40 aberturas. Se suministró pelo estéril canino como fuente de alimento, cortado en pedazos de 1 cm de longitud. Para garantizar la cámara húmeda al interior de las cajas, se adicionó 1 mL de agua destilada estéril, directamente sobre el papel toalla, cada dos días.

Se seleccionaron 4 tratamientos distribuidos así:

- Testigo: Sin aplicación de tratamiento químico o biológico.
- Tratamiento control biológico 1: Se utilizó una concentración baja del consorcio microbiano correspondiente a 1×10^5 esporas por mL.
- Tratamiento control biológico 2: Se utilizó una concentración intermedia del consorcio microbiano correspondiente a 1×10^9 esporas por mL.
- Tratamiento químico convencional con Imidacloprid y cifenotrina (Attack®), en concentración sugerida por el fabricante (Imidacloprid 10 mg / kg; Cifenotrina 1 mg / kg, equivalente a 1 ml cada 10 Kg de peso).

3.2.1.1. Aplicación de los tratamientos seleccionados

Los tratamientos seleccionados para las pruebas se aplicaron de la siguiente manera:

1. Testigo: El modelo de control consistió en la aspersion de las garrapatas con agua destilada estéril, dosis única, bajo un suministro de alimentación continuo a base de pelo canino estéril.
2. Tratamientos a base de control biológico 1 y 2: Se realizó la aspersion de las garrapatas vivas, con una concentración conocida del consorcio microbiano a base de los hongos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* (1×10^5 y 1×10^9 esporas por mL, respectivamente).

Para la preparación de la suspensión microbiana de concentración 1×10^5 esporas por mL, se tomó $\frac{1}{4}$ de una colonia de 10 cm de diámetro de cada uno de los hongos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus*, crecidos por 8 días en medio nutritivo (Figura 5), se suspendió en 50 mL de agua destilada estéril, se agregó Tween 80 al 0.1% y se realizaron

diluciones sucesivas para conteo final de esporas por mL (Figuras 6 y 7).

De la misma forma, para la formulación del consorcio de 1×10^9 esporas por mL, se tomó $\frac{1}{2}$ de una colonia de 10 cm de diámetro, de cada uno de los hongos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. lilacinus*, crecidos por 8 días en medio nutritivo, se suspendió en 50 mL de agua destilada estéril, se agregó Tween 80 al 0.1% y se realizaron diluciones sucesivas para conteo final de esporas por mL.

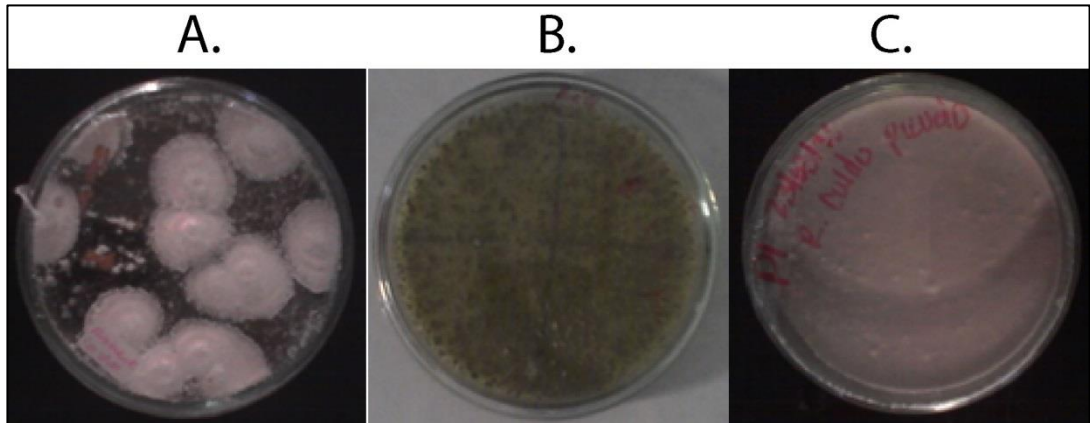


Figura 5. Colonias aisladas de los hongos utilizados

(A) Colonias de *Beauveria bassiana*. (B) Colonias de *Metarhizium anisopliae*. (C) Colonia de *Paecilomyces lilacinus*. Elaboración propia. Naranjo, D. (2016).

Para determinar el número de UFC de ambas concentraciones, se realizó una siembra en profundidad de 8 diluciones seriadas de la suspensión inicial, en agar PDA y 2 diluciones seriadas en agar nutritivo, realizando conteo de las colonias a los 7 días después de la siembra (Figuras 6 y 7).

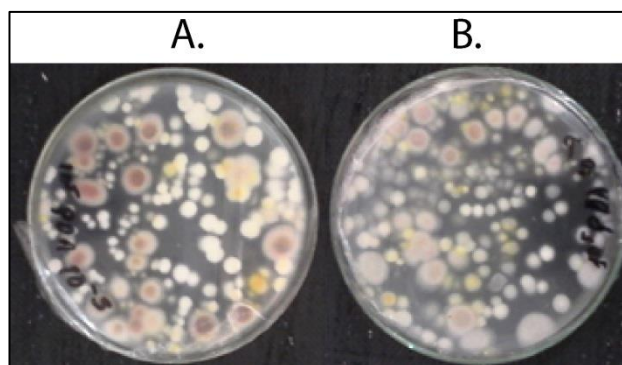


Figura 6. Conteo de colonias del consorcio microbiano en agar PDA

Concentración de 10^5 esporas por mL, dilución foto (a) 10^{-3} y foto (b) 10^{-7} . Colonias en color rosado se identificaron como *P. lilacinus*, en color amarillo - verde *M. anisopliae*, y blanco *B. bassiana*. Elaboración propia. Naranjo, D. (2016).



Figura 7. Conteo de colonias del consorcio microbiano en agar PDA.

Concentración de 10^9 esporas por mL, dilución 10^{-2} . Elaboración propia. Naranjo, D. (2016).

3. Tratamiento químico: Se realizó el contacto directo de las garrapatas con un producto químico convencional a base de Imidacloprid y cifenotrina (Attack®), aplicando 0,5 mL del producto, sobre el papel toalla contenido en cada caja de Petri. La dosis recomendada por el fabricante es: Imidacloprid 10 mg / kg; Cifenotrina 1 mg / kg, equivalente a 1 ml cada 10 Kg de peso.

VARIABLES EVALUADAS

Las variables cuantitativas evaluadas fueron:

- Número de individuos vivos.
- Número de individuos muertos.
- Número de ácaros afectados.

Las variables cualitativas evaluadas fueron:

- Porcentaje de crecimiento de los hongos entomopatógenos sobre la superficie corporal de los ácaros.

Para este propósito y con base en estudios en los cuales se ha evaluado la patogenicidad de hongos entomopatógenos sobre la broca del café, mediante el empleo de una escala que define las diferentes etapas del proceso infectivo (Vélez *et al.*, 1997), se estableció un criterio técnico basado en una escala de cubrimiento (observación microscópica) que registra en forma porcentual la acción del consorcio sobre el ácaro (Tabla 1) (Figura 8).

Tabla 1. Porcentaje de crecimiento de los hongos del consorcio sobre las garrapatas

CRECIMIENTO	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DEL CONSORCIO SOBRE EL INTEGUMENTO DEL ÁCARO
INCIPIENTE	0 – 33%
MODERADO	34 – 66%
PROFUSO	67 – 100%



Figura 8. Escala de crecimiento del consorcio microbiano sobre el integumento de los ácaros
Elaboración propia. Naranjo, D. (2016).

3.2.1.2. Comprobación de la presencia de los hongos del consorcio evaluado

Una vez registrada la muerte de las garrapatas por la acción de los hongos, se observó la expresión de crecimiento de éstos sobre el integumento de las mismas. Para este propósito, se colocaron las garrapatas en agar agua 1%, con el fin de medir el inicio de crecimiento de cada hongo y su color característico sobre el agar (Verde (V) *M. anisopliae*, Blanco (B) *B. bassiana* y Rosado (R) *P. lilacinus*), para realizar una identificación visual de los mismos, tanto macroscópica como microscópicamente (Figuras 9 y 10).



Figura 9. Garrapatas muertas en agar agua

Garrapatas en Agar agua, para comprobar la presencia de los hongos del consorcio microbiano. Concentración de 10^9 esporas por mL, repetición V. Elaboración propia. Naranjo D. (2016).

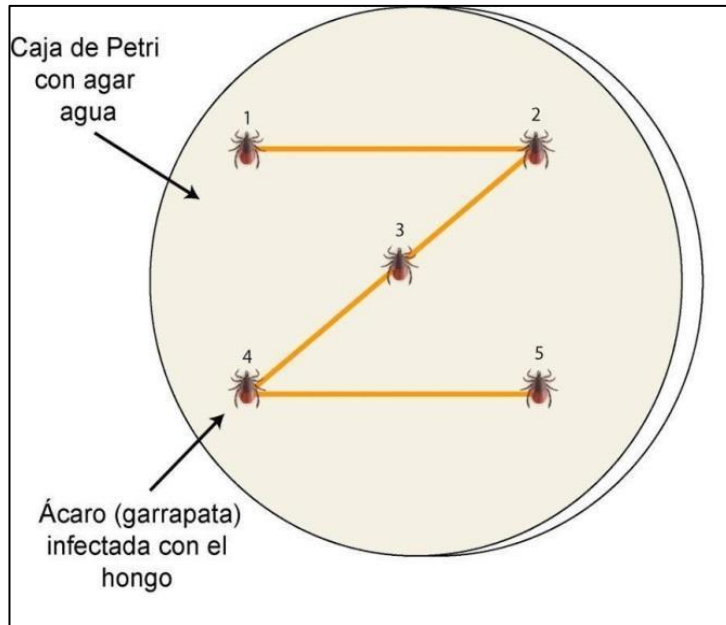


Figura 10. Ubicación de los ácaros infectados en la caja de petri.

Esquema empleado para la ubicación de los ácaros infectados en el agar agua. Los números indican la posición y la numeración que se le dio respectivamente a cada ácaro en la caja de Petri. Elaboración propia. Naranjo, D. (2016).

Al cabo de 12 días de crecimiento de los hongos, se tomó una muestra directa de crecimiento de la caja de Petri, con cinta adhesiva, y se realizó su identificación microscópica mediante coloración de azul de lactofenol.

Esta evaluación e identificación en agar agua fue realizada al cabo de 12 días de la inoculación, con el apoyo de un profesional con amplio conocimiento de la morfología y aspecto de las colonias de cada uno de los hongos evaluados.

3.2.1.3. Capacidad ovidica del consorcio microbiano

A partir de la obtención de los huevos de los ácaros en el laboratorio, se evaluó la capacidad ovidica del consorcio y su efecto.

Esta evaluación se realizó de la siguiente manera:

Se evaluó el efecto del consorcio microbiano sobre los huevos, a una dosis de 1×10^9 esporas por mL. Se asperjaron con dosis única, luego de ser obtenidos en el laboratorio, a partir de las garrapatas del grupo de control no afectadas por los hongos entomopatógenos. La oviposición fue registrada en la mayoría de las garrapatas hembras alrededor del día 17, post - cautiverio.

Se conformaron grupos de 80 huevos por cada repetición, después de conteo al estereoscopio, para un total de 10 repeticiones, con igual número de unidades y repeticiones para el control negativo, que se asperjó únicamente con agua destilada estéril. Los huevos fueron depositados en frascos antibióticos de vidrio, sellados con algodón y en cuyo interior tenían rodetes de

papel toalla humedecido con 0,5 mL de agua destilada estéril cada 2 días (Aricapa, ensayos previos 2015-2016).

Las variables para evaluar la capacidad ovicida del consorcio fueron:

- Crecimiento sobre la superficie de los huevos.
- Eclosión (Figura 11).

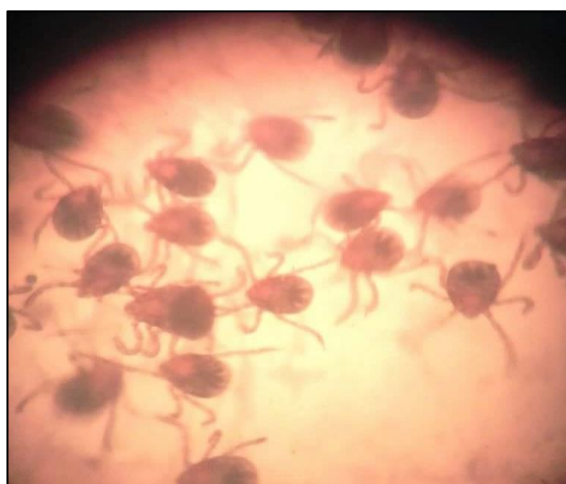


Figura 11. Aspecto estereoscópico de larvas de garrapata eclosionadas.

Larvas eclosionadas después de 21 días de oviposición. Elaboración propia. Naranjo, D. (2016).

3.2.2. Objetivo específico 2

Determinar en condiciones de laboratorio, el efecto de 3 concentraciones del producto comercial a base del consorcio microbiano, sobre las diferentes fases del ciclo de la garrapata de la superfamilia *Ixodoidea*.

La unidad experimental estuvo conformada por la caja de Petri con 5 individuos de garrapatas y 7 repeticiones por tratamiento, de cualquier género de la superfamilia *Ixodoidea*, según la metodología descrita en el objetivo anterior. Se seleccionaron 3 tratamientos (concentraciones) con 7 repeticiones y 5 garrapatas vivas por repetición, incluido un tratamiento control. Cada tratamiento consistió en una dosis diferente del producto comercial Agromix® de la empresa SMT, a base del consorcio microbiano *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *P. lilacinus*.

A continuación se relaciona la distribución de tratamientos:

1. Testigo: Sin aplicación de método químico o biológico. Según procedimiento descrito previamente.
2. Tratamiento de control biológico con Agromix®, concentración 1: Se realizó la aspersion de las garrapatas con una dosis conocida del producto comercial Agromix®, correspondiente a 2 gramos por litro de agua.

3. Tratamiento de control biológico con Agromix®, dosis 2: Se realizó la aspersión de las garrapatas con una concentración conocida del producto comercial Agromix®, correspondiente a 4 gramos por litro de agua.

4. Tratamiento de control biológico con Agromix®, dosis 3: Se realizó la aspersión de las garrapatas con una concentración conocida del producto comercial Agromix®, correspondiente a 8 gramos por litro de agua.

3.2.2.1. Comprobación de la presencia de los hongos del consorcio evaluado

Se utilizó la misma metodología previamente descrita para la identificación y reconocimiento de los tres hongos evaluados sobre las garrapatas.

3.2.2.2. Comprobación final y causalidad

Se realizó un registro fotográfico para comprobar la causalidad del agente microbiano sobre la mortalidad de la garrapata, es decir, la relación causal entre el agente infeccioso (consorcio de hongos entomopatógenos) y la enfermedad que éste produce (mortalidad del ácaro), evidenciando presencia y crecimiento activo de los hongos sobre el integumento del artrópodo, mediante registro estereoscópico (Castillo, 2007). Esta evaluación se realizó en promedio cada 5 días, para obtener imágenes comparativas, durante las etapas de estudio realizadas en el laboratorio.

3.2.2.3. Capacidad ovicida del consorcio microbiano

Esta evaluación fue realizada mediante el uso del producto comercial Agromix® a una concentración de 8 g por litro de agua, sobre los huevos obtenidos. La unidad experimental fue conformada por 5 repeticiones más un control con igual número de repeticiones y 80 huevos, bajo los mismos parámetros de conservación y aspersión mencionados anteriormente.

VARIABLES

Las variables evaluadas sobre los ácaros fueron:

- El número de individuos vivos.
- Número de individuos muertos.
- Número de ácaros afectados.
- Porcentaje de crecimiento de los hongos entomopatógenos sobre la superficie corporal de los ácaros.

Las variables consideradas para determinar la capacidad ovicida del consorcio fueron:

- Crecimiento sobre la superficie del huevo.
- Eclosión.
- Crecimiento del consorcio microbiano sobre la larva.
- Mortalidad de larvas.

3.2.3. Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de Tukey, para determinar diferencias significativas entre tratamientos y controles. Para este fin se empleó el programa The StatAdvisor.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es importante mencionar que se registró una velocidad de respuesta distinta al evaluar la actividad acaricida en el tiempo con el producto químico y el biológico. Durante las pruebas realizadas con el producto químico Attack®, se logró obtener una mortalidad del 100% en todas las garrapatas después de un minuto de su aplicación sobre el papel toalla, evidenciando la acción del fármaco que actúa de manera inmediata al bloquear los canales de los receptores nicotínicos de acetilcolina del ácaro produciendo parálisis y posterior muerte del ácaro. Una respuesta acaricida de mayor tiempo sucede con el controlador biológico al requerir un periodo superior mientras completa sus etapas de adhesión, penetración, colonización y diseminación por el sistema linfático del ácaro y finalmente su muerte. Reflejando así una velocidad de respuesta distinta según el tratamiento empleado.

4.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1

Evaluación del efecto acaricida del consorcio microbiano, en diferentes concentraciones, sobre las diversas fases del ciclo de la garrapata de la superfamilia *Ixodoidea*

4.1.1. Acción de diferentes tratamientos en el control de garrapatas

La Tabla No. 2 a continuación, registra la acción de diferentes tratamientos en el control de garrapata de la superfamilia *Ixodoidea*.

Tabla 2. Acción de diferentes tratamientos en el control de garrapatas.

Tratamiento / Concentración	*Medición	% de Mortalidad	% de Ácaros afectados	Tipo de crecimiento
Testigo	1	0	-	-
	2	12	-	-
	3	12	-	-
	4	12	-	-
	5	12	-	-
	6	12	-	-
	7	24	-	-
Concentración 7 x 10 ⁵ esporas x mL	1	0	0	Incipiente
	2	0	4	Incipiente
	3	16	20	Incipiente
	4	28	28	Incipiente
	5	60	48	Incipiente
	6	88	48	Incipiente a Moderado
	7	88	100	Moderado a Profuso
Concentración 4 x 10 ⁹ esporas x mL	1	0	0	Incipiente
	2	8	12	Incipiente
	3	32	44	Incipiente
	4	44	60	Incipiente

	5	88	76	Incipiente
	6	100	84	Incipiente a moderado
	7	100	100	Profuso

*Cada medición corresponde a 5 días.

Con base en los resultados registrados se pudo establecer que el tratamiento testigo presentó una tasa de mortalidad total del 24%. Esta respuesta se atribuye a factores abióticos tales como temperatura y humedad del ambiente en el cual se realizó la evaluación y factores bióticos, en términos de la mortalidad causada por hongos saprófitos.

La concentración de 7×10^5 esporas por mL en las mediciones iniciales no muestra resultados sobre la mortalidad o la infestación de los ácaros, pero después de 15 días se alcanzó una mortalidad del 16% y un crecimiento incipiente (< 33% según tabla de manejo) sobre los ácaros. En la medición final después de 35 días la mortalidad ascendió al 88%, con un 100% de ácaros afectados y un tipo de crecimiento moderado sobre la superficie de los mismos (33% - 65%).

Estos resultados demuestran que los hongos entomopatógenos en consorcio provocan altas tasas de mortalidad, un resultado similar fue reportado por Adbel, en el año 2015, sobre garrapatas en diversas fases, con registro de tasas de mortalidad del 95% a 100%.

La concentración de 4×10^9 esporas por mL, alcanzó una mortalidad del 8% a partir de la medición 2, con un crecimiento incipiente sobre la superficie de los ácaros. La mortalidad llegó a un 88%, con un 76% de ácaros afectados a los 25 días de la medición, registrando un 100% de mortalidad al día 30.

Resultados similares fueron obtenidos por Benjamin, Zhiou & Ostfeld, 2002, con una concentración de 4×10^9 esporas por mL del hongo *Metarhizium anisopliae* en garrapatas *in vitro*, al obtener una tasa de mortalidad del 100%, después de 4 semanas.

4.1.1.1. Efecto de diferentes concentraciones de la mezcla de aislamientos individuales que conforman el consorcio microbiano sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros vivos.

Para la variable ácaros vivos se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Anexo 1):

- Testigo y biológico, concentración 7×10^5 esporas por mL, a favor del tratamiento biológico.
- Testigo y biológico, concentración 4×10^9 esporas por mL, a favor del tratamiento biológico.
- Biológico concentración 7×10^5 esporas por mL y biológico concentración $4 \times$

10⁹ esporas por mL, a favor de la mayor concentración del tratamiento biológico (Anexo 2).

4.1.1.2. Efecto de diferentes concentraciones de la mezcla de aislamientos individuales que conforman consorcio microbiano sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros muertos.

Para la variable ácaros muertos se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos:

- Testigo y biológico, concentración 7×10^5 esporas por mL, a favor del tratamiento biológico.
- Testigo y biológico, concentración 4×10^9 esporas por mL, a favor del tratamiento biológico (Anexo 3).

Por otra parte, los tratamientos:

Biológico, concentración 7×10^5 esporas por mL y biológico, concentración 4×10^9 esporas por mL, no mostraron diferencias estadísticas significativas (Anexo 4).

4.1.1.3. Efecto de diferentes concentraciones de la mezcla de aislamientos individuales que conforman consorcio microbiano sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros infestados.

Para la variable ácaros infestados se encontraron diferencias estadísticas significativas entre todos los tratamientos, según prueba de rango múltiple (Anexos 5 y 6).

4.1.2. Registro de crecimiento de los hongos del consorcio microbiano, sobre las garrapatas

La tabla No. 3 a continuación, muestra el crecimiento de los hongos del consorcio microbiano, en diferentes concentraciones, sobre la garrapata de la superfamilia *Ixodoidea*.

Tabla 3. Registro del porcentaje de crecimiento de los hongos del consorcio, en las concentraciones de (7×10^5 y 4×10^9) esporas por mL, sobre la garrapata.

*Observación	Hongo	% de Crecimiento Concentración 7×10^5 esporas por mL	% de Crecimiento Concentración 4×10^9 esporas por mL
1	<i>B. bassiana</i>	40	40
	<i>M. anisopliae</i>	60	60
	<i>P. lilacinus</i>	0	0
2	<i>B. bassiana</i>	60	100
	<i>M. anisopliae</i>	40	0
	<i>P. lilacinus</i>	0	0
3	<i>B. bassiana</i>	60	80
	<i>M. anisopliae</i>	20	20
	<i>P. lilacinus</i>	20	0
4	<i>B. bassiana</i>	60	100
	<i>M. anisopliae</i>	20	0
	<i>P. lilacinus</i>	20	0
5	<i>B. bassiana</i>	80	100
	<i>M. anisopliae</i>	20	0
	<i>P. lilacinus</i>	0	0

*Cada observación corresponde a una caja de petri con 5 ácaros.

Al comprobar el crecimiento de los hongos y evaluar el efecto acaricida del consorcio, en la concentración de 7×10^5 esporas por mL, se puede apreciar que el hongo *Beauveria bassiana* está presente en todas las repeticiones, con un mayor porcentaje de crecimiento, respecto a los demás hongos, seguido de *Metarhizium anisopliae*. Por su parte, *Paecilomyces lilacinus* solo se presentó en un ácaro. En la concentración de 4×10^9 esporas por mL, los porcentajes de incidencia se conservan similares a la concentración menor; el hongo *Paecilomyces lilacinus* no estuvo presente en ninguna repetición.

Para esta evaluación se puede evidenciar que existe un predominio de acción acaricida por parte del hongo *Beauveria bassiana*, independientemente de la concentración: Un resultado similar fue descrito por Sun, *et al.*, 2013, en China, en el que tratamientos con el hongo *Beauveria bassiana*, sobre hembras pertenecientes a la Superfamilia *Ixodoidea* del género *Boophilus microplus*, redujeron significativamente la tasa de oviposición y un mayor porcentaje de garrapatas murió por efecto de la elevada acción de quitinasas y proteasas producidas por estos hongos.

4.1.3. Comprobación de la actividad ovicida del consorcio microbiano

La tabla 4 a continuación registra el porcentaje de incidencia de los hongos del consorcio sobre los huevos de garrapata de la súper familia *Ixodoidea*.

Tabla 4. Porcentaje de incidencia de los hongos del consorcio y eclosión de huevos, en concentración 4×10^9 esporas por mL, sobre los huevos de garrapata.

Tratamiento	*Medición	% de Crecimiento	% de Eclosión
Consortio	1	0	0
	2	0	0
	3	40	0
	4	80	20
	5	100	20
Testigo	1	0	0
	2	0	0
	3	0	30
	4	0	60
	5	0	80

*Cada medición corresponde a 12 días.

El porcentaje de eclosión para el grupo asperjado con los hongos correspondió al 20%, con el hallazgo incidental de la presencia del consorcio microbiano sobre el área genital de las larvas. El grupo control comenzó a eclosionar a partir del día 36, llegando a un 80% de eclosión para el día 60. Este resultado evidencia el efecto directo del consorcio microbiano sobre la eclosión de los huevos de garrapatas de la súper familia *Ixodoidea*.

La toxicidad mostrada por los hongos hacia los artrópodos, puede interferir en aspectos del metabolismo celular de éstos, o actuar específicamente sobre el sistema inmune (Korosteleva, *et al.*, 2007). Estas toxinas favorecen la invasión de los hongos a partir enzimas lipolíticas, proteolíticas y quitinolíticas extracelulares, que son producidas al momento de la penetración a los ácaros o los huevos, según el caso. Ensayos previos en el laboratorio también determinaron la presencia del consorcio microbiano sobre la boca de hembras del género *Boophilus microplus* al momento de realizar oviposición, demostrando así la afinidad de los hongos entomopatógenos principalmente por los tejidos blandos del ácaro (Figura 12).



Figura 12. Garrapatas del género *Boophilus* con crecimiento del consorcio al momento de la oviposición. Elaboración propia. Naranjo, D. (2016).

4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2

Determinar en condiciones de laboratorio, el efecto de 3 concentraciones del producto comercial a base del consorcio microbiano, sobre las diferentes fases del ciclo de la garrapata de la superfamilia *Ixodoidea*.

4.2.1. Evaluación del producto comercial Agromix sobre distintas fases de garrapatas.

La Tabla 5 relaciona los resultados de la evaluación del producto comercial, sobre las distintas fases de las garrapatas de la súper familia *Ixodoidea*.

Tabla 5. Resultados de la evaluación del producto comercial sobre distintas fases de garrapatas

Tratamiento / Concentración	*Medición	% de Mortalidad	% de Ácaros afectados	Tipo de crecimiento
Testigo	1	0	-	-
	2	0	-	-
	3	6	-	-
	4	14	-	-
Concentración 2 g/L agua	1	0	0	Incipiente
	2	54	14	Incipiente
	3	63	29	Incipiente
	4	100	60	Incipiente a moderado
Concentración 4 g/L agua	1	3	14	Incipiente
	2	80	60	Incipiente
	3	80	80	Incipiente a moderado
	4	100	91	Profuso
Concentración 8 g/L agua	1	14	9	Incipiente
	2	71	23	Profuso
	3	89	46	Profuso
	4	100	94	Profuso

*Cada medición corresponde a 5 días.

Para el grupo testigo, al final de las 4 mediciones (20 días), se registró un porcentaje de mortalidad del 14% de los ácaros.

Los resultados para las concentraciones de 4 gramos y 8 gramos por litro de agua, presentan un comportamiento similar, no se presentaron diferencias estadísticas significativas, sin embargo, en la mayor concentración, el porcentaje de crecimiento de los hongos sobre la superficie de las garrapatas es mayor.

Podría concluirse que para una tasa de letalidad del 100% de garrapata, no es necesario aplicar una concentración superior a 2 gramos por litro de agua, pero sí es importante aumentar esta concentración, en cuanto se está buscando una mayor efectividad de estos hongos a través de un mayor tiempo de contacto. En consecuencia, se recomiendan concentraciones más altas que puedan promover una rápida colonización de estos hongos sobre el integumento de los

ácaros y por ende, una mayor probabilidad de infestación de otras garrapatas, al contacto con las infestadas.

La respuesta obtenida en el presente estudio (Figura 13) está soportada por Argueta, 2011, quien afirma que la muerte del artrópodo ocurre a los 4 o 5 días después de la colonización interna del hongo; 48 a 60 horas después de la muerte, las hifas comienzan a emerger por los espiráculos, (cercano a la tráquea y a la región genital), a través de las áreas más delgadas, regiones intersegmentarias; cada uno de estos pasos es importante, no sólo para provocar la muerte del hospedante, sino también para la posterior diseminación en el hábitat.

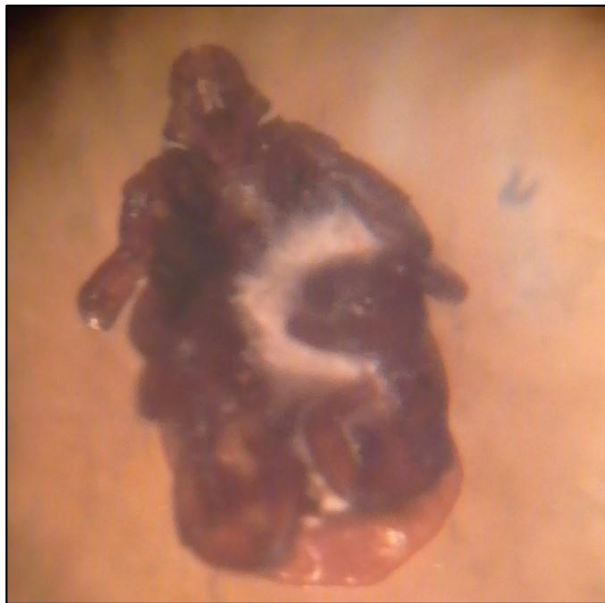


Figura 13. Crecimiento del consorcio microbiano sobre la región intersegmentaria ventral de una garrapata del género *Dermacentor* spp.

Elaboración propia. Naranjo D. (2016)

Un estudio realizado por Sun, *et al.*, 2011, con los hongos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, demostró resultados similares a los obtenidos en la presente investigación, en garrapatas de la superfamilia Ixodoidea del género *Hyalomma anatolicum*, con una mortalidad superior al 90%.

4.2.1.1. Efecto de diferentes concentraciones del consorcio formulado sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros vivos por tratamiento.

El análisis estadístico de la información mostró diferencias estadísticas significativas, para la variable de ácaros vivos, entre los tratamientos:

- Testigo y concentración 2 gramos por litro de agua.
- Testigo y concentración 4 gramos por litro de agua.

- Testigo y concentración 8 gramos por litro de agua.

Concentración de 2 gramos por litro de agua y concentración de 8 gramos por litro de agua (Anexo 7).

Para la misma variable mostraron ser grupos homogéneos sin diferencias estadísticas significativas los tratamientos de 2 gramos por litro de agua y 4 gramos por litro de agua (Anexo 8)

4.2.1.2. Efecto de diferentes concentraciones del consorcio formulado sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros muertos por tratamiento.

Para la variable ácaros muertos, los tratamientos:

- 4 gramos por litro de agua y 8 gramos por litro de agua.
- 2 gramos por litro de agua y 4 gramos por litro de agua.

No mostraron diferencias estadísticas significativas.

Sin embargo, los tratamientos:

- Testigo y concentración de 2 gramos por litro de agua.
- Testigo y concentración de 4 gramos por litro de agua.
- Testigo y concentración de 8 gramos por litro de agua.

Concentración de 2 gramos por litro de agua y 8 gramos por litro de agua, mostraron diferencias estadísticas significativa (Anexos 9 y 10).

4.2.1.3. Efecto de diferentes concentraciones del consorcio formulado sobre la mortalidad de garrapatas en la variable ácaros afectados por tratamiento.

Para la variable de ácaros afectados por tratamiento, todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto de los demás (Anexos 11 y 12).

4.2.2. Registro del crecimiento de los hongos del consorcio microbiano presentes en el producto comercial Agromix®

Tabla 6. Determinación del porcentaje de crecimiento de los hongos presentes en el producto comercial Agromix®, a las concentraciones de 2 gramos, 4 gramos y 8 gramos por litro de agua, sobre la garrapata.

*Observación	Hongo	% de Crecimiento Concentración de 2g / litro de agua	% de Crecimiento Concentración de 4g / litro de agua	% de Crecimiento Concentración de 8g / litro de agua
1	<i>B. bassiana</i>	100	20	0
	<i>M. anisopliae</i>	0	80	20
	<i>P. lilacinus</i>	0	0	80
2	<i>B. bassiana</i>	100	60	40
	<i>M. anisopliae</i>	0	0	40
	<i>P. lilacinus</i>	0	40	20
3	<i>B. bassiana</i>	100	60	40
	<i>M. anisopliae</i>	0	20	20
	<i>P. lilacinus</i>	0	20	40
4	<i>B. bassiana</i>	80	20	40
	<i>M. anisopliae</i>	20	0	0
	<i>P. lilacinus</i>	0	80	60
5	<i>B. bassiana</i>	40	100	40
	<i>M. anisopliae</i>	60	0	0
	<i>P. lilacinus</i>	0	0	60
6	<i>B. bassiana</i>	40	80	60
	<i>M. anisopliae</i>	40	0	0
	<i>P. lilacinus</i>	20	20	40
7	<i>B. bassiana</i>	80	40	40
	<i>M. anisopliae</i>	0	20	0
	<i>P. lilacinus</i>	20	40	60

*Cada observación corresponde a 1 caja de Petri con 5 ácaros.

Con base en los resultados registrados (Tabla 6), se puede concluir que en concentraciones más bajas existe un predominio en la presencia del hongo *Beauveria bassiana*; *Metarhizium anisopliae* muestra un porcentaje similar en las 3 concentraciones empleadas, sin embargo, en concentraciones mayores, *Paecilomyces lilacinus* presenta una mayor presencia.

4.2.3. Evaluación de la actividad ovicida del consorcio microbiano

La Tabla 7 a continuación, relaciona las variables de porcentaje de crecimiento, porcentaje de eclosión, porcentaje de larvas infestadas y porcentaje de mortalidad sobre larvas de garrapata de la familia *Ixodidae*.

Tabla 7. Relación de variables.

Tratamiento	*Medición	% Crecimiento	% Eclosión	% Larvas infestadas	% Mortalidad de larvas
Concentración 8g / L agua	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	20	0	0
	4	40	60	40	0
	5	100	100	80	80
Testigo	1	0	0	0	0
	2	0	20	0	0
	3	0	40	0	0
	4	0	80	0	0
	5	0	80	0	0

*Cada medición corresponde a 12 días calendario.

Un huevo de garrapata con micelios y conidias en la superficie se considera muerto (García *et al.*, 2005, Ment *et al.*, 2010 citado por Luz *et al.*, 2016). La aplicación directa de los hongos sobre los huevos proporciona una distribución más homogénea, desarrollándose en simultáneo los micelios y conidias y permitiendo la disminución en la tasa de oviposición o letalidad de la larva al momento de eclosionar.

Al comparar los resultados la eclosión de los huevos de garrapata para los grupos de control en ambas evaluaciones para los objetivos 1 y 2 de la presente investigación, se observó que ésta se presentó alrededor de los días 24 y 36; en ensayos previos con huevos de garrapatas de *Boophilus microplus* la eclosión se dio a partir del día 27 (Apanaskevich & Oliver, 2014), bajo condiciones de manejo similares (Figuras 14 y 15).

El porcentaje de eclosión para los huevos fue del 100% en el día 60, pero se registró el 80% de las larvas infestadas, con una mortalidad del 80% de éstas. Luz *et al.*, 2016, en un experimento realizado con *Metarhizium anisopliae*, en el cual se asperjó el hongo sobre huevos de *Rhipicephalus sanguineus*, obtuvieron eclosión de todas las larvas, pero éstas se presentaron contaminadas por los conidios del hongo producidos en los huevos (Figura 14).

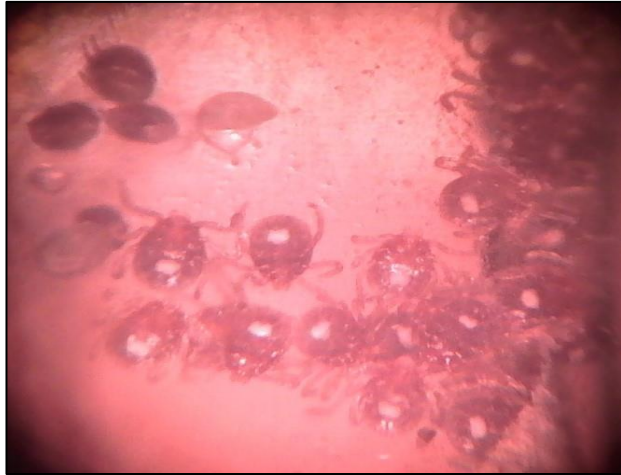


Figura 14. Larvas de garrapata eclosionadas.

Larvas de garrapata eclosionadas después de 27 días de oviposición, con presencia del consorcio microbiano sobre sus genitales. Elaboración propia. Naranjo D. (2006).



Figura 15. Huevo de garrapata.

Huevo de garrapata, obtenido en el laboratorio. Elaboración propia. Naranjo, D. (2016).

5. CONCLUSIONES

La presente investigación permite concluir que el consorcio conformado por los hongos de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus*, registra efecto acaricida sobre las diversas fases del ciclo de la garrapata de la superfamilia *Ixodoidea*, con índices de mortalidad total, entre 20 y 30 días, después de aplicado.

Se puede evidenciar después de ocurridas las fases de adhesión, penetración, colonización y diseminación, que el crecimiento sobre el integumento de los ácaros manifiesta una amplia afinidad sobre los tejidos blandos del ácaro, sobretodo en la región genital y el área de las piezas bucales. El tipo de crecimiento registrado en los 15 días de medición iniciales fue incipiente, pero posteriormente aumentó a los estados de moderado y profuso, con una cobertura total sobre el dorso de los ácaros.

A su vez, el consorcio microbiano formulado a base de estos 3 hongos, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus* (producto comercial), tiene un efecto ovicida, evidenciado por el crecimiento de micelio de estos hongos sobre la superficie de los huevos y por la reducción de sus porcentajes de eclosión. Así mismo, las larvas eclosionadas registraron crecimiento del consorcio sobre los genitales, corroborando la afinidad de los hongos por los tejidos blandos del ácaro.

Con base en los resultados obtenidos en la variable porcentaje de presencia de los hongos, en el producto comercial Agromix®, se puede concluir que el hongo *Paecilomyces lilacinus* mostró un efecto directo sobre la eclosión y el porcentaje de infestación de las larvas de garrapatas, con altas tasas de mortalidad.

Las concentraciones de 4 gramos y 8 gramos por litro de agua del producto comercial Agromix® mostraron índices de mortalidad sobre los ácaros, a partir de los 15 días y posteriormente evidenciaron un crecimiento profuso que favorece el contacto del consorcio y control sanitario con otros ácaros durante el tiempo, extendiendo la acción de biocontrol del producto.

6. RECOMENDACIONES

1. Es apropiado llevar esta investigación bajo los mismos parámetros de estudio en condiciones de campo.
2. Realizar una identificación microscópica y macroscópica de él o los hongos presentes en el área genital de las larvas y sobre la superficie de las mismas.
3. Realizar una identificación microscópica y macroscópica de él o los hongos presentes sobre la superficie de las mismas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel Basit, E. (2015). *Biocontrol of Ticks (Acari Ixodidae) by Scopulariopsis brevicaulis and Metarhizium anisopliae* (Doctoral dissertation, UOFK).
- Aktas, M. (2014). A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. *Veterinary Parasitology*, 200(3–4), 276–283.
- Alcaíno, H., Gorman, T., & Jiménez, F. (1990). Ecología del *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae) en la región Metropolitana de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 22(2).
- Alfonso, M. (2002). Los plaguicidas botánicos y su importancia en la agricultura orgánica. *Agricultura Orgánica* 2, 26–30.
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 195–215.
- Apanaskevich, D. A., & Oliver Jr, J. H. (2014). Life cycles and natural history of ticks. *Biology of ticks*, 1, 59-73.
- Aranzazu-hernández, P. J., Leguizamón-caycedo, J. E., & Dávila-arias, M. T. (1999). EFECTO DE *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma koningii* SOBRE ESTADOS BIOLÓGICOS DE *Eisenia foetida*, 50(1), 39–48.
- Araque, A., Ujueta, S., Bonilla, R., Gómez, D., & Rivera, J. (2014). Resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en algunas explotaciones ganaderas de Colombia. *Rev.udcaactual.divulg.cient*, 17(1), 161–170.
- Argueta Ayala, I. N. (2011). *Evaluación del hongo entomopatógeno Verticillium lecanii (Zimmerman) Viegas como bio-controlador de garrapatas en perros (Canis domesticus L)* (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).
- Astigarraga, M. J. T., Amarilla, S. P., & Nara, E. M. (2016). Ehrlichiosis, enfermedad transmitida por garrapatas y potencial zoonosis en Paraguay. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 17(9), 1-9.
- Baker, A. S. (1999). *Mites and ticks of domestic animals. An identification guide and information source. Veterinary dermatology*. Londres: The Natural History Museum.
- Benjamin, M. A., Zhioua, E., & Ostfeld, R. S. (2002). Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 39(5), 723-728.
- Bischoff, J. F., Rehner, S. a, & Humber, R. a. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4), 512–530. <http://doi.org/10.3852/07-202>
- Black, W. C., & Piesman, J. (1994). Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (21), 10034–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.91.21.10034>
- Burges, H. D. (1998). Formulation of mycoinsecticides. *Formulation of Microbial Biopesticides*, 131–186. http://doi.org/10.1007/978-94-011-4926-6_4
- Castillo, C. F. (2007). Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 262-267.

- Castro-Janer, E., Rifran, L., González, P., Piaggio, J., Gil, A., & Schumaker, T. S. (2010). Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. *Veterinary Parasitology*, 169(1–2), 172–177. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.017>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Ticks [Amblyomma spp.] [Dermacentor spp.] [Ixodes spp.] [Ornithodoros spp.] [Rhipicephalus spp.]. Retrieved November 27, 2016, from <http://www.cdc.gov/dpdx/ticks/>
- Cortés-Vecino, J. A. (2011). Garrapatas: estado actual y perspectivas. *Biomédica*, 31(sup.3), 268–283.
- Cota Guajardo, S. D. C. (2015). *Control biológico e integrado de la garrapata "Hyalomma lusitanicum" en explotaciones silvo-agro-cinegéticas de ecosistema mesomediterráneo* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Cuore, U., Altuna, M., & Cicero, L. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de Rhipicephalus (Boophilus) microplus en Uruguay. *Veterinaria*, 48(187), 5–13. Retrieved from <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4190069>
- D'Alessandro, W. B., Humber, R. A., & Luz, C. (2012). Occurrence of pathogenic fungi to Amblyomma cajennense in a rural area of Central Brazil and their activities against vectors of Rocky Mountain spotted fever. *Veterinary Parasitology*, 188(1–2), 156–159.
- Da Costa, G. L., Sarquis, M. I. M., De Moraes, A. M. L., & Bittencourt, V. R. E. P. (2002). Isolation of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae var. anisopliae from Boophilus microplus tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia*, 154(4), 207–209.
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2013). Species diversity and abundance of ticks in three habitats in southern Italy. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(3), 251–255. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.11.004>
- De Oliveira Monteiro, C. M., Daemon, E., Silva, A. M. R., Maturano, R., & Amaral, C. (2010). Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 106(3), 615–619. <http://doi.org/10.1007/s00436-009-1709-1>
- Díaz, P., Macías, F., Navarro, R., & Torre, D. (2006). Mecanismo de acción de Los Hongos Entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856–860.
- Dolz, G., Ábrego, L., Romero, L., Campos, L., Bouza, L., & Jiménez, A. (2013). Ehrlichiosis y anaplasmosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 55(Supplement 1), 34–40.
- Echeverry, D. N. P., & Osorio, L. A. R. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81-95.
- Erdmanis, L., O'Reilly, A. O., Williamson, M. S., Field, L. M., Turberg, A., & Wallace, B. A. (2012). Association of neonicotinoid insensitivity with a conserved residue in the loop D binding region of the tick nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry*, 51(23), 4627–4629.

<http://doi.org/10.1021/bi300522s>

- Fernandes, É. K. K., Keyser, C. A., Chong, J. P., Rangel, D. E. N., Miller, M. P., & Roberts, D. W. (2010). Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(1), 115–128. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04422.x>
- Flechtmann, C. H. W. (1973). *Ácaros de importancia médico veterinaria*. (NBL Editora, Ed.). São Paulo.
- Garcia MV, Monteiro AC, Szabo MJP, Prette N, Bechara GH (2005) Mechanism of infection and colonization of *Rhipicephalus sanguineus* eggs by *Metarhizium anisopliae* as revealed by scanning electron microscopy and histopathology. *Braz J Microbiol* *36*:368–372
- Geng, C., Watson, G. B., & Sparks, T. C. (2013). *Nicotinic acetylcholine receptors as spinosyn targets for insect pest management*. (Academic Press, Ed.). Nueva York.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., ... Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, *30*(5), 250–258. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003>
- Góngora, C., Marín, P., & Benavides, P. (2009). Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. *Avances Técnicos Cenicafé*, (16), 3–8. Retrieved from <http://biblioteca.cenicafe.org/handle/10778/346>
- González-Castillo, M., Noé, C., & Rodríguez-Herrera, R. (2012). Control de Insectos-Plaga en la Agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, *4*(8), 14.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., & Horak, I. (2014). The hard ticks of the world. *Springer, Dordrecht. doi*, *10* (1007), 978-94.
- Hynes, R. K., & Boyetchko, S. M. (2006). Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(4), 845–849. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.07.003>
- Kiewnick, S., & Sikora, R. A. (2006). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control*, *38*(2), 179–187. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.12.006>
- Kirkland, B. H., Cho, E. M., & Keyhani, N. O. (2004). Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, *31*(3), 414–421. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.07.007>
- Korosteleva, S.N., Smith, T.K. and Boermans, H.J. (2007). Effect of feed borne *Fusarium* mycotoxins on performance, metabolism and immunity of Dairy Cows. *Dairy Science*. *90*: 3867-3873.
- Lees, K., Jones, A. K., Matsuda, K., Akamatsu, M., Sattelle, D. B., Woods, D. J., & Bowman, A. S. (2014). Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor α subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus*

- sanguineus. *International Journal for Parasitology*, 44(1), 75–81. <http://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.11.002>
- Liu, H., & Bauer, L. S. (2006). Susceptibility of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, 99, 1096–1103.
- Loayza Romero, M. D. L. Á. (2014). *Determinación de Babesia canis en caninos de la ciudad de Machala Provincia de El Oro* (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).
- Luangsa-Ard, J., Houbaken, J., van Doorn, T., Hong, S. B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L., & Samson, R. A. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, 321(2), 141–149. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x>
- Luz, C., D'Alessandro, W. B., Rodrigues, J., & Fernandes, É. K. K. (2016). Efficacy of water-and oil-in-water-formulated *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus sanguineus* eggs and eclosing larvae. *Parasitology research*, 115(1), 143-149.
- Mancebo, A., F, G. M., B, G. N., Riera, L., Lugo, S., Am, B., ... Lpl-, P. (2005). Evaluación de la patogenicidad en ratas del *Paecilomyces lilacinus* LPL-01 utilizando vías diferentes de exposición, 185–190.
- Mans, B. J., Gothe, R., & Neitz, W. H. (2008). Tick toxins: perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. *Ticks Biology, Diseases and Control*, 108–126.
- Maranga, R. O., Kaaya, G. P., Mueke, J. M., & Hassanali, A. (2005). Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (ixodidae) in relation to seasonal changes. *Mycopathologia*, 159(4), 527–532. <http://doi.org/10.1007/s11046-005-3374-y>
- Martínez, M. del C., Arraga-Alvarado, C. M., Triana-Alonso, F. J., Johanny Alejandra Ruiz, C. M., & Clara Nancy Gutiérrez, G. (2015). Estudio Serológico y Molecular de *Ehrlichia canis* en Perros de una Comunidad del Estado Aragua, Venezuela. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(4), 648–656. <http://doi.org/10.15381/rivep.v26i4.11220>
- Martínez SM, Jiménez MC, Del Río S, Pérez JL, Maceira MA, Morales Z, Curi MA. 2012. Evaluación diurética del producto natural Noni-C (*Morinda citrifolia* L.) en un modelo experimental en ratas. *Rev Cubana Plant Med* 17: 431-438.
- Martinez-Velazquez M, Castillo-Herrera GA, Rosario-Cruz R, Flores-Fernández JM, Lopez-Ramirez J, Hernandez-Gutierrez R, Lugo-Cervantes EC (2011a) Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 108(2): 481-487.
- Martinko JM, Madigan MT, P. J. (2003). *Brock: Biología de los Microorganismos*.
- Mejía Valencia, C., & Acevedo, C. M. (2016). Diagnóstico histopatológico de esplenitis no supurativa en un canino producida por hepatozoon spp. Un reporte de caso.

- Ment D, Gindin G, Glazer I, Perl S, Elad D, Samish M (2010) The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. *Fung Biol* 114:49–56
- Miller, R. J., Almazán, C., Ortíz-Estrada, M., Davey, R. B., George, J. E., & De León, A. P. (2013). First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. *Veterinary Parasitology*, 191(1–2), 97–101. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.011>
- Morgado, F. N., Cavalcanti, A. D. S., Miranda, L. H. D., O'Dwyer, L. H., Silva, M. R. L. D., Menezes, R. C., ... & Porrozzi, R. (2016). Hepatozoon canis and Leishmania spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(4), 450–458.
- Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente E Água*, 6(2), 77–90. <http://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Muñoz, L. E., & Casanueva, M. E. (2001). Estado actual del Conocimiento de las garrapatas (Acari:Ixodida) asociadas a Canis Familiaris L. *Gayana (Concepc.)*, 65(2).
- Nápoles, D., Sebasco, K. M., Colas, M., López, W., & Meireles, T. (2016). Eficacia in vitro de *Morinda citrifolia* L para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(4), 833-839.
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., & Vázquez-Montoya, L. (2012). Bioplaguicidas: Una Opción Para El Control Biológico De Plagas Biopesticidas: an Option for the Biological Pest Control. *Ra Ximhai*, 8(3), 17–29.
- Ndumu PA, George JPD, Choudhury MK (1999) Toxicity of neem seed oil (*Azadirachta indica*) against the larvae of *Amblyomma variegatum*, a three-host tick in cattle. *Phytotherapy Research* 13: 532-534.
- Nelson, RW., Couto, CG. (2015) *Medicina interna de pequenos animais*. 5ª ed. Rio de Janeiro.
- Neira J, Carvajal L, Cala F, Gómez J (2009) Evaluación del efecto de la tintura de tabaco (*Nicotiana tabacum*) en el control biológico de La garrapata. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 3(22): 551-552.
- Ochoa, D. C., & Montoya, A. (2010). Consorcios Microbianos : Una Metáfora Biológica Aplicada a La Asociatividad Empresarial En Cadenas Productivas Agropecuarias. *Revista de La Facultad de Ciencias Económicas*, XVIII(2), 55–74.
- Ojeda-Chi, M., Rodríguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., & Cruz-Vázquez, C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 2(2), 177–192.
- Oliver Jr., J. H., & Osburn, R. L. (1985). Cytogenetics of ticks (Acari: Ixodoidea): chromosomes and timing of spermatogenesis in *Amblyomma inornatum*. *The Journal of Parasitology*, 71(1), 124–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3981339>

- Paternina, L. E., Díaz-Olmos, Y., Paternina-Gómez, M., & Berjaranao, E. E. (2009). *Canis familiaris*, un nuevo hospedero de *Ornithodoros* (*A.*) *puertoricensis* Fox, 1947 (Acari: Ixodida) en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 153–160.
- Pirali-Kheirabadi, K., Haddadzadeh, H., Razzaghi-Abyaneh, M., Bokaie, S., Zare, R., Ghazavi, M., & Shams-Ghahfarokhi, M. (2007). Biological control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium psalliotae* fungi. *Parasitology Research*, 100(6), 1297–1302. <http://doi.org/10.1007/s00436-006-0410-x>
- Polar, P., Moore, D., Kairo, M. T. K., & Ramsuhag, A. (2008). Topically applied myco-acaricides for the control of cattle ticks: overcoming the challenges. *Diseases of Mites and Ticks*, 46(1–4), 119–148. <http://doi.org/10.1007/978-1-4020-9695-2>.
- Raynal JT, Borges da Silva AA, Sousa TJ, Bahiense TC, Meyer B, Portela RW. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* from Bahia state North-Central región. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal 2013; 22(1):71-77.
- Rehner, S. a, Minnis, A. M., Sung, G.-H., Luangsa-Ard, J. J., Devotto, L., & Humber, R. a. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*, 103(5), 1055–1073. <http://doi.org/10.3852/10-302>
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., & Loske, A. (2014). Genetic Transformation of Cells using Physical Methods. *Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy*, 5(4). <http://doi.org/10.4172/2157-7412.1000237>
- Rodríguez Diego, J. G., Olivares, J. L., Sánchez Castilleja, Y., Alemán, Y., & Arece, J. (2013). Cambios climáticos y su efecto sobre algunos grupos de parásitos. *Revista de Salud Animal*, 35(3), 145-150.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Rosado-Aguilar, J. A., Ojeda-Chi, M., Pérez-Cogollo, L. C., Trinidad-Martínez, I., & Bolio-González, M. E. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 295-308.
- Romero Pérez, L. E., Dolz Wiedner, G., Romero Zúñiga, J. J., Meneses Guevara, A., Jiménez Soto, M., & Salazar Sánchez, L. (2010). Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa Rica. *Revista de Ciencias Veterinarias*, 28(1), 23–36.
- Samish, M. (2000). Biocontrol of ticks. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1), 172–178. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05287.x>
- Silva, A. B., Canseco, S. P., de la Torre, M. del P. G., Silva, A. M., Mayoral, M. Angel, Mayoral, L. P. C., Pérez-Campos, E. (2014). Infección humana asintomática por contacto con perros. Un caso de ehrlichiosis humana. *Gaceta Médica de México*, 150(2), 171–174.
- Sosa-Gutiérrez, C. G., Quintero-Martínez, T., Vargas-Sandoval, M., & Gordillo-Pérez, G. (2016). Primer análisis filogenético de *Ehrlichia canis* en perros y

- garrapatas de México. Estudio preliminar. *Revista MVZ Córdoba*, 21(3), 5569-5576.
- Strickland, R. K., Gerrish, R. R., Hourrigan, J. L., & Schubert, G. O. (1965). *Ticks of Veterinary Importance. Agriculture Handbook N° 485*. Washington D.C: United States Department of agriculture.
- Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Liu, Z., Ma, M., Gou, H., ... Luo, J. (2011). Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 180(3–4), 389–393. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.027>
- Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Li, Y., Han, X., Ma, C., ... & Luo, J. (2013). Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitology international*, 62(5), 412-415.
- Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M., & Mozaffari, J. (2006). Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*, 16(5), 525–534. <http://doi.org/10.1080/09583150500532758>
- Tateishi, V., Lí, O., Hoyos, L., Rivera, H., Manchego, A., Barrios, L., & More, J. (2015). Identificación hematológica y molecular de *Anaplasma platys* en caninos domésticos de Lima Metropolitana con signos clínicos compatibles con anaplasmosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1), 111-118.
- Tulloch, M. (1976). The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66(3), 407–411. [http://doi.org/10.1016/S0007-1536\(76\)80209-4](http://doi.org/10.1016/S0007-1536(76)80209-4)
- Vélez, J. C. Q., Hidalgo, M., & González, J. D. R. (2012). Rickettsiosis, una enfermedad letal emergente y re-emergente en Colombia. *Universitas Scientiarum*, 17(1), 82-99.
- Vélez, P. E., Posada, F. J., Marín, P., González, M. T., Osorio, E., & Bustillo, A. (1997). *Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos*. Chinchiná.
- Villar, D., Gutiérrez, J., Piedrahita, D., Durán, A. R., Martínez, N., Cortés-Vecino, J. A., ... & Gutiérrez, J. J. C. (2017). Resistencia in vitro a acaricidas tópicos de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de cuatro departamentos de Colombia. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 11(3), 58-70.
- Walton, G. A. (1964). the *Ornithodoros Moubata* Group of Ticks in Africa. Control Problems and Implications. *Journal of Medical Entomology*, 1(1), 53–64. Retrieved from <http://www.ingentaconnect.com/content/esa/jme/1964/00000001/00000001/art00010>
- Wright, S. ., Carruthers, R. ., Jaronski, S. ., Bradley, C. ., Garza, C. ., & Galaini-Wright, S. (2000). Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, 17(3), 203–217. <http://doi.org/10.1006/bcon.1999.0799>

- Xiao, G., Ying, S.-H., Zheng, P., Wang, Z.-L., Zhang, S., Xie, X.-Q., ... Feng, M.-G. (2012). Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*, 2, 483. <http://doi.org/10.1038/srep00483>
- Yu, Z., Zheng, H., Chen, Z., Zheng, B., Ma, H., & Liu, J. (2010). The life cycle and biological characteristics of *Dermacentor silvarum* Olenov (Acari: Ixodidae) under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 168(3–4), 323–328. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.010>

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para la variable ácaros vivos por tratamiento

Fuentes	Grados Libres	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Prob P
Tratamientos	2	6.28114	3.14057	28.68	0.00000
Repeticiones	4	0.71525	0.1788125	1.63	0.1726
Error	6	14.4342	2.4057	21.97	0.00000
Residual	92	10.0739	0.109498913		
Total (Corregido)	104	31.50449			

Anexo 2. Prueba de rango múltiple para la variable ácaros vivos por tratamiento

TRATAMIENTOS	CONTEOS	MEDIA	GRUPOS
Concentración 4×10^9 esporas por mL.	35	1.72359	A
Concentración 7×10^5 esporas por mL.	35	1.94252	B
Testigo	35	2.31601	C

Anexo 3. Análisis de varianza para la variable ácaros muertos por tratamiento

Fuentes	Grados Libres	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Prob P
Tratamientos	2	5.90451	2.952255	26.40	0.00000
Repeticiones	4	1.24425	0.3110625	2.78	0.0312
Error	6	16.0003	2.666716667	23.85	0.00000
Residual	92	10.2872	0.1118173913		
Total (Corregido)	104	33.4363			

Anexo 4. Prueba de rango múltiple para la variable ácaros muertos por tratamiento

TRATAMIENTOS	CONTEOS	MEDIA	GRUPOS
Testigo	35	1.22783	A
Concentración 7×10^5 esporas por mL.	35	1.63469	B
Concentración 4×10^9 esporas por mL.	35	1.79029	B

Anexo 5. Análisis de varianza, para la variable de ácaros infestados por tratamiento.

Fuentes	Grados Libres	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Prob P
Tratamientos	2	12.6793	6.33967	64.97408722	0.00000
Repeticiones	4	0.390777	0.09769425	1.001250021	0.4111
Error	6	10.4295	1.73825	17.8149978	0.00000
Residual	92	8.97665	0.09757228261		
Total (Corregido)	104	32.4763			

Anexo 6. Prueba de rango múltiple, para la variable de ácaros infestados por tratamiento.

TRATAMIENTOS	CONTEOS	MEDIA	GRUPOS
Testigo	35	1	A
Concentración 7×10^5 esporas por mL.	35	1.5897	B
Concentración 4×10^9 esporas por mL.	35	1.8264 4	C

Anexo 7. Análisis de varianza, para la variable de ácaros vivos por tratamiento.

Fuentes	Grados Libres	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Prob P
Tratamientos	3	14.2925	4.764166667	40.99329892	0.00000
Repeticiones	6	0.964716	0.160786	1.383484043	0.2287
Error	3	17.0915	5.697166667	49.02130267	0.00000
Residual	99	11.5056	0.1162181818		
Total (Corregido)	111	43.8542			

Anexo 8. Prueba de rango múltiple, para la variable ácaros vivos por tratamiento.

TRATAMIENTOS	CONTEOS	MEDIA	GRUPOS
Concentración 8g / L agua	28	1.50635	A
Concentración 4g / L agua	28	1.55079	BC
Concentración 2g / L agua	28	1.71043	C
Testigo	28	2.39534	D

Anexo 9. Análisis de varianza, para la variable ácaros muertos por tratamiento.

Fuentes	Grados Libres	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Prob P
Tratamientos	3	15.893	5.297666667	56.88	0.00000
Repeticiones	6	0.679262	0.1132103333	1.22	0.3047
Error	3	17.7561	5.9187	63.55	0.00000
Residual	99	9.22013	0.09313262626		
Total (Corregido)	111	43.5485			

Anexo 10. Prueba de rango múltiple para la variable ácaros muertos por tratamiento

TRATAMIENTOS	CONTEOS	MEDIA	GRUPOS
Testigo	28	1.1011	A
Concentración 2g / L agua	28	1.82876	B
Concentración 4g / L agua	28	1.98079	CD
Concentración 8g / L agua	28	2.04381	D

Anexo 11. Análisis de varianza, para la variable ácaros afectados por tratamiento.

Fuentes	Grados Libres	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F	Prob P
Tratamientos	3	13.6492	4.549733333	48.04	0.00000
Repeticiones	6	0.417934	0.06965566667	0.74	0.6222
Error	3	9.30974	3.103246667	32.77	0.00000
Residual	99	9.37522	0.09469919192		
Total (Corregido)	111	32.7521			

Anexo 12. Prueba de rango múltiple, para la variable ácaros afectados por tratamiento.

TRATAMIENTOS	CONTEOS	MEDIA	GRUPOS
Testigo	28	1.1011	A
Concentración 2g / L agua	28	1.43711	B
Concentración 8g / L agua	28	1.69176	C
Concentración 4g / L agua	28	1.9451	D

Anexo 13. Tabla de datos Objetivo 1.

Evaluación de las variables de ácaros vivos, ácaros muertos, ácaros afectados y escala de crecimiento. Cada fecha corresponde a una medición realizada cada 5 días. Cada repetición corresponde a 1 caja de Petri con 5 garrapatas.

Tratamiento	Fecha	Repetición	Ácaros vivos	Ácaros muertos	Ácaros afectados	Escala de crecimiento
Testigo	1	1	5	0	0	0
Testigo	1	2	5	0	0	0
Testigo	1	3	5	0	0	0
Testigo	1	4	5	0	0	0
Testigo	1	5	5	0	0	0
Testigo	2	1	3	2	0	0
Testigo	2	2	4	1	0	0
Testigo	2	3	5	0	0	0
Testigo	2	4	5	0	0	0
Testigo	2	5	5	0	0	0
Testigo	3	1	3	2	0	0
Testigo	3	2	4	1	0	0
Testigo	3	3	5	0	0	0
Testigo	3	4	5	0	0	0
Testigo	3	5	5	0	0	0
Testigo	4	1	3	2	0	0
Testigo	4	2	4	1	0	0
Testigo	4	3	5	0	0	0
Testigo	4	4	5	0	0	0
Testigo	4	5	5	0	0	0
Testigo	5	1	3	2	0	0
Testigo	5	2	4	1	0	0
Testigo	5	3	5	0	0	0
Testigo	5	4	5	0	0	0
Testigo	5	5	5	0	0	0
Testigo	6	1	3	2	0	0
Testigo	6	2	4	1	0	0
Testigo	6	3	5	0	0	0
Testigo	6	4	5	0	0	0
Testigo	6	5	5	0	0	0
Testigo	7	1	2	3	0	0
Testigo	7	2	4	1	0	0
Testigo	7	3	4	1	0	0
Testigo	7	4	4	1	0	0
Testigo	7	5	5	0	0	0
Concentración 7 x 10 ⁵	1	1	5	0	0	0
Concentración 7 x 10 ⁵	1	2	5	0	0	0
Concentración 7 x 10 ⁵	1	3	5	0	0	0
Concentración 7 x 10 ⁵	1	4	5	0	0	0
Concentración 7 x 10 ⁵	1	5	5	0	0	0
Concentración 7 x	2	1	5	0	0	0

10 ⁵						
Concentración 7 x 10 ⁵	2	2	5	0	1	1
Concentración 7 x 10 ⁵	2	3	5	0	0	0
Concentración 7 x 10 ⁵	2	4	5	0	0	0
Concentración 7 x 10 ⁵	2	5	5	0	0	0
Concentración 7 x 10 ⁵	3	1	4	1	2	0
Concentración 7 x 10 ⁵	3	2	4	1	1	1
Concentración 7 x 10 ⁵	3	3	4	1	1	0
Concentración 7 x 10 ⁵	3	4	4	1	1	0
Concentración 7 x 10 ⁵	3	5	5	0	0	0
Concentración 7 x 10 ⁵	4	1	3	2	2	0
Concentración 7 x 10 ⁵	4	2	3	2	2	1
Concentración 7 x 10 ⁵	4	3	3	2	2	1
Concentración 7 x 10 ⁵	4	4	4	1	1	1
Concentración 7 x 10 ⁵	4	5	5	0	0	1
Concentración 7 x 10 ⁵	5	1	3	2	2	1
Concentración 7 x 10 ⁵	5	2	2	3	3	1
Concentración 7 x 10 ⁵	5	3	1	4	3	1
Concentración 7 x 10 ⁵	5	4	2	3	2	1
Concentración 7 x 10 ⁵	5	5	2	3	2	1
Concentración 7 x 10 ⁵	6	1	0	5	2	2
Concentración 7 x 10 ⁵	6	2	1	4	3	1
Concentración 7 x 10 ⁵	6	3	0	5	3	1
Concentración 7 x 10 ⁵	6	4	1	4	2	2
Concentración 7 x 10 ⁵	6	5	2	3	2	2
Concentración 7 x 10 ⁵	7	1	0	5	5	3
Concentración 7 x 10 ⁵	7	2	1	4	5	2
Concentración 7 x 10 ⁵	7	3	0	5	5	3
Concentración 7 x 10 ⁵	7	4	1	4	5	3

Concentración 7 x 10 ⁵	7	5	1	4	5	2
Concentración 4 x 10 ⁹	1	1	5	0	0	0
Concentración 4 x 10 ⁹	1	2	5	0	0	0
Concentración 4 x 10 ⁹	1	3	5	0	0	0
Concentración 4 x 10 ⁹	1	4	5	0	0	0
Concentración 4 x 10 ⁹	1	5	5	0	0	0
Concentración 4 x 10 ⁹	2	1	5	0	0	0
Concentración 4 x 10 ⁹	2	2	4	1	1	1
Concentración 4 x 10 ⁹	2	3	4	1	1	1
Concentración 4 x 10 ⁹	2	4	5	0	0	0
Concentración 4 x 10 ⁹	2	5	5	0	1	0
Concentración 4 x 10 ⁹	3	1	4	1	1	0
Concentración 4 x 10 ⁹	3	2	4	1	1	1
Concentración 4 x 10 ⁹	3	3	1	4	4	1
Concentración 4 x 10 ⁹	3	4	3	2	2	1
Concentración 4 x 10 ⁹	3	5	5	0	3	0
Concentración 4 x 10 ⁹	4	1	4	1	1	1
Concentración 4 x 10 ⁹	4	2	4	1	1	1
Concentración 4 x 10 ⁹	4	3	0	5	4	1
Concentración 4 x 10 ⁹	4	4	3	2	4	1
Concentración 4 x 10 ⁹	4	5	5	0	4	1
Concentración 4 x 10 ⁹	5	1	3	2	1	1
Concentración 4 x 10 ⁹	5	2	0	5	4	1
Concentración 4 x 10 ⁹	5	3	0	5	5	2
Concentración 4 x 10 ⁹	5	4	0	5	4	1
Concentración 4 x 10 ⁹	5	5	0	5	5	1
Concentración 4 x 10 ⁹	6	1	0	5	2	2
Concentración 4 x 10 ⁹	6	2	0	5	4	1
Concentración 4 x 10 ⁹	6	3	0	5	5	3

10^9						
Concentración 4×10^9	6	4	0	5	5	2
Concentración 4×10^9	6	5	0	5	5	2
Concentración 4×10^9	7	1	0	5	5	3
Concentración 4×10^9	7	2	0	5	5	3
Concentración 4×10^9	7	3	0	5	5	3
Concentración 4×10^9	7	4	0	5	5	3
Concentración 4×10^9	7	5	0	5	5	3

Anexo 14. Tabla de datos Objetivo 1.

Identificación de presencia y pureza de cada hongo del consorcio microbiano. Cada repetición corresponde a la caja de Petri con 5 garrapatas. Cada hongo fue identificado de acuerdo al color característico sobre el agar (Verde (V) *M. anisopliae*, Blanco (B) *B. bassiana* y Rosado (R) *P. lilacinus*).

Tratamiento	Repetición	Ácaro	Hongo
Concentración 7 x 10 ⁵	1	1	V
Concentración 7 x 10 ⁵	1	2	V
Concentración 7 x 10 ⁵	1	3	V
Concentración 7 x 10 ⁵	1	4	B
Concentración 7 x 10 ⁵	1	5	B
Concentración 7 x 10 ⁵	2	1	B
Concentración 7 x 10 ⁵	2	2	B
Concentración 7 x 10 ⁵	2	3	V
Concentración 7 x 10 ⁵	2	4	B
Concentración 7 x 10 ⁵	2	5	V
Concentración 7 x 10 ⁵	3	1	B
Concentración 7 x 10 ⁵	3	2	B
Concentración 7 x 10 ⁵	3	3	V
Concentración 7 x 10 ⁵	3	4	B
Concentración 7 x 10 ⁵	3	5	R
Concentración 7 x 10 ⁵	4	1	B
Concentración 7 x 10 ⁵	4	2	B
Concentración 7 x 10 ⁵	4	3	R
Concentración 7 x 10 ⁵	4	4	B
Concentración 7 x 10 ⁵	4	5	V
Concentración 7 x 10 ⁵	5	1	B
Concentración 7 x 10 ⁵	5	2	B
Concentración 7 x 10 ⁵	5	3	B
Concentración 7 x 10 ⁵	5	4	B

Concentración 10^5	7 x	5	5	V
Concentración 10^9	4 x	1	1	V
Concentración 10^9	4 x	1	2	B
Concentración 10^9	4 x	1	3	V
Concentración 10^9	4 x	1	4	V
Concentración 10^9	4 x	1	5	B
Concentración 10^9	4 x	2	1	B
Concentración 10^9	4 x	2	2	B
Concentración 10^9	4 x	2	3	B
Concentración 10^9	4 x	2	4	B
Concentración 10^9	4 x	2	5	B
Concentración 10^9	4 x	3	1	B
Concentración 10^9	4 x	3	2	B
Concentración 10^9	4 x	3	3	B
Concentración 10^9	4 x	3	4	V
Concentración 10^9	4 x	3	5	B
Concentración 10^9	4 x	4	1	B
Concentración 10^9	4 x	4	2	B
Concentración 10^9	4 x	4	3	B
Concentración 10^9	4 x	4	4	B
Concentración 10^9	4 x	4	5	B
Concentración 10^9	4 x	5	1	B
Concentración 10^9	4 x	5	2	B
Concentración 10^9	4 x	5	3	B
Concentración 10^9	4 x	5	4	B
Concentración 10^9	4 x	5	5	B

Anexo 15. Tabla de datos, evaluación capacidad ovicida del consorcio microbiano.

Tratamiento	Fecha	Repetición	Crecimiento	Eclosión
Testigo	1	1	NO	NO
Testigo	1	2	NO	NO
Testigo	1	3	NO	NO
Testigo	1	4	NO	NO
Testigo	1	5	NO	NO
Testigo	1	6	NO	NO
Testigo	1	7	NO	NO
Testigo	1	8	NO	NO
Testigo	1	9	NO	NO
Testigo	1	10	NO	NO
Testigo	2	1	NO	NO
Testigo	2	2	NO	NO
Testigo	2	3	NO	NO
Testigo	2	4	NO	NO
Testigo	2	5	NO	NO
Testigo	2	6	NO	NO
Testigo	2	7	NO	NO
Testigo	2	8	NO	NO
Testigo	2	9	NO	NO
Testigo	2	10	NO	NO
Testigo	3	1	NO	NO
Testigo	3	2	SI	NO
Testigo	3	3	NO	NO
Testigo	3	4	NO	NO
Testigo	3	5	SI	NO
Testigo	3	6	SI	NO
Testigo	3	7	SI	NO
Testigo	3	8	NO	NO
Testigo	3	9	NO	NO
Testigo	3	10	NO	NO
Testigo	4	1	SI	NO
Testigo	4	2	SI	SI
Testigo	4	3	NO	NO
Testigo	4	4	SI	NO
Testigo	4	5	SI	NO
Testigo	4	6	SI	NO
Testigo	4	7	SI	NO
Testigo	4	8	NO	SI
Testigo	4	9	SI	NO
Testigo	4	10	SI	NO
Testigo	5	1	SI	NO
Testigo	5	2	SI	NO
Testigo	5	3	SI	SI
Testigo	5	4	SI	NO
Testigo	5	5	SI	NO
Testigo	5	6	SI	NO
Testigo	5	7	SI	NO
Testigo	5	8	SI	NO
Testigo	5	9	SI	SI
Testigo	5	10	SI	NO

Concentración 10 ⁹	4	x	1	11	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	1	12	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	1	13	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	1	14	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	1	15	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	1	16	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	1	17	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	1	18	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	1	19	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	1	20	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	11	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	12	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	13	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	14	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	15	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	16	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	17	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	18	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	19	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	2	20	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	3	11	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	3	12	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4	x	3	13	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	3	14	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4	x	3	15	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	3	16	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	3	17	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4	x	3	18	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4	x	3	19	NO	NO

10 ⁹					
Concentración 10 ⁹	4 x	3	20	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4 x	4	11	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	4	12	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	4	13	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4 x	4	14	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	4	15	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4 x	4	16	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4 x	4	17	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	4	18	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	4	19	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4 x	4	20	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	5	11	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	5	12	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	5	13	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4 x	5	14	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	5	15	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	5	16	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	5	17	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	5	18	NO	NO
Concentración 10 ⁹	4 x	5	19	NO	SI
Concentración 10 ⁹	4 x	5	20	NO	SI

Anexo 16. Tabla de datos Objetivo 2.

Evaluación de las variables de ácaros vivos, ácaros muertos, ácaros afectados y escala de crecimiento. Cada fecha corresponde a una medición realizada cada 5 días. Cada repetición corresponde a 1 caja de Petri con 5 garrapatas.

Tratamiento	Fecha	Repetición	Ácaros vivos	Ácaros muertos	Ácaros afectados	Escala de crecimiento
Testigo	1	1	5	0	0	0
Testigo	1	2	5	0	0	0
Testigo	1	3	5	0	0	0
Testigo	1	4	5	0	0	0
Testigo	1	5	5	0	0	0
Testigo	1	6	5	0	0	0
Testigo	1	7	5	0	0	0
Testigo	2	1	5	0	0	0
Testigo	2	2	5	0	0	0
Testigo	2	3	5	0	0	0
Testigo	2	4	5	0	0	0
Testigo	2	5	5	0	0	0
Testigo	2	6	5	0	0	0
Testigo	2	7	5	0	0	0
Testigo	3	1	5	0	0	0
Testigo	3	2	5	0	0	0
Testigo	3	3	4	1	0	0
Testigo	3	4	5	0	0	0
Testigo	3	5	4	1	0	0
Testigo	3	6	5	0	0	0
Testigo	3	7	5	0	0	0
Testigo	4	1	5	0	0	0
Testigo	4	2	4	1	0	0
Testigo	4	3	4	1	0	0
Testigo	4	4	5	0	0	0
Testigo	4	5	4	1	0	0
Testigo	4	6	5	0	0	0
Testigo	4	7	3	2	0	0
Conc. 2g / L agua	1	1	5	0	0	0
Conc. 2g / L agua	1	2	5	0	0	0
Conc. 2g / L agua	1	3	5	0	0	0
Conc. 2g / L agua	1	4	5	0	0	0
Conc. 2g / L agua	1	5	5	0	0	0
Conc. 2g / L agua	1	6	5	0	0	0
Conc. 2g / L agua	1	7	5	0	0	0
Conc. 2g / L agua	2	1	4	1	0	0
Conc. 2g / L agua	2	2	3	2	0	0
Conc. 2g / L agua	2	3	2	3	2	0
Conc. 2g / L agua	2	4	5	1	1	0
Conc. 2g / L agua	2	5	0	5	1	0
Conc. 2g / L agua	2	6	0	5	1	0

Conc. 2g / L agua	2	7	3	2	0	0
Conc. 2g / L agua	3	1	2	3	0	1
Conc. 2g / L agua	3	2	3	2	1	0
Conc. 2g / L agua	3	3	1	4	2	1
Conc. 2g / L agua	3	4	5	0	2	2
Conc. 2g / L agua	3	5	0	5	3	2
Conc. 2g / L agua	3	6	0	5	2	1
Conc. 2g / L agua	3	7	2	3	0	1
Conc. 2g / L agua	4	1	0	5	4	1
Conc. 2g / L agua	4	2	0	5	3	1
Conc. 2g / L agua	4	3	0	5	2	2
Conc. 2g / L agua	4	4	0	5	0	2
Conc. 2g / L agua	4	5	0	5	4	2
Conc. 2g / L agua	4	6	0	5	5	2
Conc. 2g / L agua	4	7	0	5	3	2
Conc. 4g / L agua	1	1	5	0	1	0
Conc. 4g / L agua	1	2	5	0	0	0
Conc. 4g / L agua	1	3	4	1	2	0
Conc. 4g / L agua	1	4	5	0	1	0
Conc. 4g / L agua	1	5	5	0	1	0
Conc. 4g / L agua	1	6	5	0	1	0
Conc. 4g / L agua	1	7	5	0	0	0
Conc. 4g / L agua	2	1	2	3	3	1
Conc. 4g / L agua	2	2	2	3	2	1
Conc. 4g / L agua	2	3	2	3	2	1
Conc. 4g / L agua	2	4	0	5	5	2
Conc. 4g / L agua	2	5	1	4	2	1
Conc. 4g / L agua	2	6	0	5	4	1
Conc. 4g / L agua	2	7	0	5	3	1
Conc. 4g / L agua	3	1	2	3	3	2
Conc. 4g / L agua	3	2	2	3	3	2
Conc. 4g / L agua	3	3	3	2	3	1
Conc. 4g / L agua	3	4	0	5	5	2
Conc. 4g / L agua	3	5	1	4	3	2
Conc. 4g / L agua	3	6	0	5	4	1
Conc. 4g / L agua	3	7	0	5	3	3
Conc. 4g / L agua	4	1	0	5	4	3
Conc. 4g / L agua	4	2	0	5	5	3
Conc. 4g / L agua	4	3	0	5	5	3
Conc. 4g / L agua	4	4	0	5	5	3
Conc. 4g / L agua	4	5	0	5	5	3
Conc. 4g / L agua	4	6	0	5	4	3
Conc. 4g / L agua	4	7	0	5	4	3
Conc. 8g / L agua	1	1	5	0	1	0
Conc. 8g / L agua	1	2	4	1	1	1
Conc. 8g / L agua	1	3	5	0	0	1
Conc. 8g / L agua	1	4	4	1	1	0
Conc. 8g / L agua	1	5	4	1	0	1

Conc. 8g / L agua	1	6	3	2	0	1
Conc. 8g / L agua	1	7	5	0	0	0
Conc. 8g / L agua	2	1	3	2	3	3
Conc. 8g / L agua	2	2	1	4	2	3
Conc. 8g / L agua	2	3	0	5	0	3
Conc. 8g / L agua	2	4	0	5	1	3
Conc. 8g / L agua	2	5	3	2	2	3
Conc. 8g / L agua	2	6	2	3	0	3
Conc. 8g / L agua	2	7	1	4	0	3
Conc. 8g / L agua	3	1	2	3	3	3
Conc. 8g / L agua	3	2	1	4	2	3
Conc. 8g / L agua	3	3	0	5	3	3
Conc. 8g / L agua	3	4	0	5	1	3
Conc. 8g / L agua	3	5	1	4	4	3
Conc. 8g / L agua	3	6	0	5	1	3
Conc. 8g / L agua	3	7	0	5	2	3
Conc. 8g / L agua	4	1	0	5	4	3
Conc. 8g / L agua	4	2	0	5	5	3
Conc. 8g / L agua	4	3	0	5	5	3
Conc. 8g / L agua	4	4	0	5	5	3
Conc. 8g / L agua	4	5	0	5	5	3
Conc. 8g / L agua	4	6	0	5	5	3
Conc. 8g / L agua	4	7	0	5	4	3

Anexo 17. Tabla de datos Objetivo 2.

Identificación de presencia y pureza de cada hongo del consorcio microbiano. Cada repetición corresponde a la caja de Petri con 5 garrapatas. Cada hongo fue identificado de acuerdo al color característico sobre el agar (Verde (V) *M. anisopliae*, Blanco (B) *B. bassiana* y Rosado (R) *P. lilacinus*).

Tratamiento	Repetición	Ácaro	Hongo
Conc. 2g / L agua	1	1	B
Conc. 2g / L agua	1	2	B
Conc. 2g / L agua	1	3	B
Conc. 2g / L agua	1	4	B
Conc. 2g / L agua	1	5	B
Conc. 2g / L agua	2	1	B
Conc. 2g / L agua	2	2	B
Conc. 2g / L agua	2	3	B
Conc. 2g / L agua	2	4	B
Conc. 2g / L agua	2	5	B
Conc. 2g / L agua	3	1	B
Conc. 2g / L agua	3	2	B
Conc. 2g / L agua	3	3	B
Conc. 2g / L agua	3	4	B
Conc. 2g / L agua	3	5	B
Conc. 2g / L agua	4	1	B
Conc. 2g / L agua	4	2	B
Conc. 2g / L agua	4	3	B
Conc. 2g / L agua	4	4	V
Conc. 2g / L agua	4	5	B
Conc. 2g / L agua	5	1	V
Conc. 2g / L agua	5	2	V
Conc. 2g / L agua	5	3	V
Conc. 2g / L agua	5	4	B
Conc. 2g / L agua	5	5	B
Conc. 2g / L agua	6	1	V
Conc. 2g / L agua	6	2	R
Conc. 2g / L agua	6	3	V
Conc. 2g / L agua	6	4	B
Conc. 2g / L agua	6	5	B
Conc. 2g / L agua	7	1	R
Conc. 2g / L agua	7	2	B
Conc. 2g / L agua	7	3	B
Conc. 2g / L agua	7	4	B
Conc. 2g / L agua	7	5	B
Conc. 4g / L agua	1	1	V
Conc. 4g / L agua	1	2	B
Conc. 4g / L agua	1	3	V
Conc. 4g / L agua	1	4	V
Conc. 4g / L agua	1	5	V
Conc. 4g / L agua	2	1	B
Conc. 4g / L agua	2	2	B
Conc. 4g / L agua	2	3	B
Conc. 4g / L agua	2	4	R
Conc. 4g / L agua	2	5	R

Conc. 4g / L agua	3	1	B
Conc. 4g / L agua	3	2	B
Conc. 4g / L agua	3	3	B
Conc. 4g / L agua	3	4	V
Conc. 4g / L agua	3	5	R
Conc. 4g / L agua	4	1	B
Conc. 4g / L agua	4	2	R
Conc. 4g / L agua	4	3	R
Conc. 4g / L agua	4	4	R
Conc. 4g / L agua	4	5	R
Conc. 4g / L agua	5	1	B
Conc. 4g / L agua	5	2	B
Conc. 4g / L agua	5	3	B
Conc. 4g / L agua	5	4	B
Conc. 4g / L agua	5	5	B
Conc. 4g / L agua	6	1	B
Conc. 4g / L agua	6	2	R
Conc. 4g / L agua	6	3	B
Conc. 4g / L agua	6	4	B
Conc. 4g / L agua	6	5	B
Conc. 4g / L agua	7	1	R
Conc. 4g / L agua	7	2	B
Conc. 4g / L agua	7	3	V
Conc. 4g / L agua	7	4	R
Conc. 4g / L agua	7	5	B
Conc. 8g / L agua	1	1	R
Conc. 8g / L agua	1	2	R
Conc. 8g / L agua	1	3	B
Conc. 8g / L agua	1	4	R
Conc. 8g / L agua	1	5	R
Conc. 8g / L agua	2	1	V
Conc. 8g / L agua	2	2	V
Conc. 8g / L agua	2	3	B
Conc. 8g / L agua	2	4	B
Conc. 8g / L agua	2	5	R
Conc. 8g / L agua	3	1	B
Conc. 8g / L agua	3	2	B
Conc. 8g / L agua	3	3	R
Conc. 8g / L agua	3	4	R
Conc. 8g / L agua	3	5	V
Conc. 8g / L agua	4	1	B
Conc. 8g / L agua	4	2	R
Conc. 8g / L agua	4	3	R
Conc. 8g / L agua	4	4	R
Conc. 8g / L agua	4	5	B
Conc. 8g / L agua	5	1	B
Conc. 8g / L agua	5	2	B
Conc. 8g / L agua	5	3	R
Conc. 8g / L agua	5	4	R
Conc. 8g / L agua	5	5	R
Conc. 8g / L agua	6	1	B
Conc. 8g / L agua	6	2	B
Conc. 8g / L agua	6	3	R

Conc. 8g / L agua	6	4	B
Conc. 8g / L agua	6	5	R
Conc. 8g / L agua	7	1	B
Conc. 8g / L agua	7	2	R
Conc. 8g / L agua	7	3	R
Conc. 8g / L agua	7	4	R
Conc. 8g / L agua	7	5	B

Anexo 18. Tabla de datos, evaluación capacidad ovicida del consorcio microbiano.

En esta tabla se determinaron las variables de crecimiento sobre la superficie del consorcio microbiano y eclosión de los mismos. Las mediciones fueron tomadas cada 12 días. Cada repetición correspondió a un frasco antibiótico con 80 huevos obtenidos en el laboratorio a partir de las garrapatas bajo condiciones *In vitro*. La variable de larva infestada determinó si el ácaro presentaba o no la presencia del consorcio microbiano sobre su integumento y si presentaba mortalidad el mismo en las fechas de medición.

Tratamiento	Fecha	Repetición	Crecimiento	Eclosión	Larva infestada	Mortalidad de larva
Testigo	1	1	NO	NO	NO	NO
Testigo	1	2	NO	NO	NO	NO
Testigo	1	3	NO	NO	NO	NO
Testigo	1	4	NO	NO	NO	NO
Testigo	1	5	NO	NO	NO	NO
Testigo	2	1	NO	NO	NO	NO
Testigo	2	2	NO	NO	NO	NO
Testigo	2	3	NO	NO	NO	NO
Testigo	2	4	NO	NO	NO	NO
Testigo	2	5	NO	NO	NO	NO
Testigo	3	1	NO	NO	NO	NO
Testigo	3	2	NO	SI	NO	NO
Testigo	3	3	NO	NO	NO	NO
Testigo	3	4	NO	NO	NO	NO
Testigo	3	5	NO	NO	NO	NO
Testigo	4	1	NO	NO	NO	NO
Testigo	4	2	SI	SI	SI	NO
Testigo	4	3	NO	SI	NO	NO
Testigo	4	4	SI	SI	SI	NO
Testigo	4	5	NO	NO	SI	SI
Testigo	5	1	SI	SI	SI	SI
Testigo	5	2	SI	SI	SI	SI
Testigo	5	3	SI	SI	SI	NO
Testigo	5	4	SI	SI	SI	SI
Testigo	5	5	SI	SI	NO	SI
Conc. 8g / L agua	1	6	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	1	7	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	1	8	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	1	9	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	1	10	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	2	6	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	2	7	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	2	8	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	2	9	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	2	10	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	3	6	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	3	7	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	3	8	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	3	9	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	3	10	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	4	6	NO	NO	NO	NO
Conc. 8g / L agua	4	7	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	4	8	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	4	9	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	4	10	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	5	6	NO	NO	NO	NO

Conc. 8g / L agua	5	7	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	5	8	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	5	9	NO	SI	NO	NO
Conc. 8g / L agua	5	10	NO	SI	NO	NO