

Evaluación de la efectividad de tres agentes entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Heterorhabditis bacteriophora* como controladores biológicos de la garrapata *Boophilus microplus* en ganado lechero Zamorano, Honduras

**Dylan Garibaldy Pensamiento Monterroso
Jessica Daniela Durán Moreno**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Evaluación de la efectividad de tres agentes
entomopatógenos *Beauveria bassiana*,
Metarhizium anisopliae y *Heterorhabditis
bacteriophora* como controladores biológicos
de la garrapata *Boophilus microplus* en
ganado lechero Zamorano, Honduras**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Dylan Garibaldy Pensamiento Monterroso
Jessica Daniela Durán Moreno**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

**Evaluación de la efectividad de tres agentes entomopatógenos *Beauveria bassiana*,
Metarhizium anisopliae y *Heterorhabditis bacteriophora* como controladores
biológicos de la garrapata *Boophilus microplus* en ganado lechero Zamorano,
Honduras**

**Dylan Garibaldy Pensamiento Monterroso
Jessica Daniela Durán Moreno**

Resumen. Las garrapatas son una de las principales problemáticas de la ganadería, debido a la transmisión de enfermedades. Los métodos de control químico actuales han generado diversas desventajas para mantener las poblaciones de garrapatas debajo del nivel crítico, una de ellas es la resistencia. Por lo tanto, se han iniciado investigaciones con controles biológicos como alternativa. Este estudio ofrece una perspectiva a nivel de laboratorio, evaluando teleoginas recolectadas, y las alícuotas de estas. Los tratamientos fueron *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, ambos combinados, y *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88, dando resultados relevantes sobre todo con el nematodo para el control de huevos de un 100%. También se evaluó a nivel de campo 75 vacas, por 70 días usando siempre los mismos tratamientos biológicos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, ambos combinados, *H. bacteriophora* cepa HP88 y un testigo químico Overtraz[®], con tres frecuencias distintas una vez por semana, dos veces por semana y una cada 15 días, haciendo un análisis marginal de tasa interna de retorno entre la relación de dichas aplicaciones y el impacto en la producción de leche. A los 35 días los tratamientos aplicados dos veces por semana a excepción de *M. anisopliae* lograron controlar en su totalidad las garrapatas. Al estimar los costos de aplicación por animal se determinó que *M. anisopliae* a pesar de tener un modo de acción más lento que los otros tratamientos, obtuvo la mayor tasa de retorno equivalente a USD1.59 por cada dólar invertido.

Palabras claves: Control biológico, ectoparásitos, entomopatógeno, producción de leche.

Abstract. Ticks are one of the main problems in livestock, due to transmission of diseases. The current chemical control methods have generated several disadvantages to keep the populations of ticks below the critical level, one of them is resistance. Therefore, investigations have been initiated with biological controls as an alternative. This study offers a perspective at laboratory level evaluating females carrying eggs collected, and the aliquots of these. The treatments applied in the laboratory were *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, both combined and *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88 giving relevant results especially with the nematode for the control of eggs of 100%. There was also an evaluation at field level with 75 cows for 70 days, always using the same biological treatments *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, both combined, *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88 and a chemical control Overtraz[®], with three different frequencies once a week, twice a week and one every 15 days. After 35 days, the treatments applied twice a week, with the exception of *M. anisopliae*, were able to control ticks in their entirety. When estimating application costs per animal, it was determined that *M. anisopliae*, despite having a slower mode of action than the other treatments, get the highest rate of return equivalent to USD1.59 per dollar invested.

Key Words: Biological control, ectoparasites, entomopathogenic, milk production.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros y figura	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4. CONCLUSIONES	21
5. RECOMENDACIONES	22
6. LITERATURA CITADA	23
7. ANEXOS	26

INDICE DE CUADROS, FIGURA Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Tratamientos evaluados y dosis utilizada para el control de <i>Boophilus microplus</i> en ganado lechero Zamorano, Honduras.....	7
2. Análisis ANDEVA ($P \leq 0.05$) para la evaluación de los agentes entomopatógenos en el control de <i>Boophilus microplus in vitro</i>	9
3. Porcentaje de infestación en adultos de <i>Boophilus microplus</i> Canestrini. Zamorano, Honduras.....	10
4. Tiempos Letales 50 y 99 de BAZAM [®] , METAZAM [®] , <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y tratamiento combinado de BAZAM [®] /METAZAM [®] sobre garrapatas adultas obtenidos por medio del análisis Probit.....	11
5. Porcentaje de eclosión, inhibición de oviposición y porcentaje de control sobre huevos de <i>Boophilus microplus</i> , Canestrini. Zamorano, Honduras.....	13
6. Análisis ANDEVA ($P \leq 0.05$) de los tratamientos Overtraz [®] , BAZAM [®] , METAZAM [®] , BAZAM [®] /METAZAM [®] y <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> con distintas frecuencias sobre la densidad poblacional de <i>Boophilus microplus</i>	13
7. Dinámica poblacional semanal de la garrapata (<i>Boophilus microplus</i> Canestrini), para determinar la eficiencia de los agentes biológicos BAZAM [®] , METAZAM [®] , BAZAM [®] / METAZAM [®] , <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y el tratamiento control Overtraz [®] en ganado lechero Zamorano, Honduras.....	16
8. Análisis ANDEVA ($P \leq 0.05$) de los tratamientos BAZAM [®] , METAZAM [®] , BAZAM [®] /METAZAM [®] , <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y el tratamiento control Overtraz [®] sobre la producción de leche.....	17
9. Evaluación de la producción de leche en vacas de producción baja y media durante los meses de junio a agosto de 2018 Zamorano, Honduras.....	19
10. Análisis Marginal del impacto en la producción de leche al aplicar Overtraz [®] , BAZAM [®] , METAZAM [®] , BAZAM [®] /METAZAM [®] y <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> para tres frecuencias distintas.....	20

Figura	Página
1. Representación de Tiempo Letal 50 y 99, obtenida en la prueba de estimación para BAZAM [®] , METAZAM [®] , BAZAM [®] /METAZAM [®] y <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> sobre <i>Boophilus microplus</i>	11

Anexos	Página
1. Infestación <i>in vitro</i> de BAZAM [®] , BAZAM [®] /METAZAM [®] , METAZAM [®] y <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> en <i>Boophilus microplus</i>	26
2. Cronograma de actividades para la elaboración del estudio.....	27
3. Ciclo biológico de la garrapata <i>Boophilus microplus</i>	28
4. Densidad poblacional general de garrapatas (<i>Boophilus microplus</i>) al aplicar BAZAM [®] , BAZAM [®] /METAZAM [®] , METAZAM [®] y <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> en el hato de ganado lechero Zamorano, Honduras.....	28
5. Densidad poblacional semanal de la garrapata (<i>Boophilus microplus</i> Canestrini), para determinar la eficiencia de los agentes biológicos BAZAM [®] , METAZAM [®] , BAZAM [®] / METAZAM [®] , <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> y el tratamiento control Overtraz [®] aplicados dos veces por semana, una vez por semana y una vez cada 15 días en ganado lechero Zamorano, Honduras.....	29

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente las ganaderías especializadas en la producción de leche se enfocan en mantener sus estándares de calidad y aumentar la productividad de su rebaño, por lo que se ven obligados a implementar controles sanitarios, que se cumplan con puntualidad, para asegurar el bienestar animal del hato. Una de las razones por las cuales se implementan estos controles se debe a que las ganaderías se enfrentan con la problemática de agentes ectoparásitos. Según SENASA en Argentina (2017) la garrapata del ganado bovino *Boophilus microplus* se alimenta de sangre y otros fluidos de los animales que parasita, lo que provoca mortandad a causa de la transmisión de enfermedades hemoparasitarias como babesiosis y anaplasmosis, conocidas también como tristeza bovina o anemia. Las garrapatas se encuentran distribuidas en casi todas las regiones ganaderas del mundo de zonas templadas, subtropicales y tropicales.

La garrapata *Boophilus microplus* pertenece a la familia Ixodidae (garrapatas duras), es un ectoparásito de un solo hospedero. Según el IICA (2000) este género es el más común en Honduras y afecta las regiones ganaderas causando pérdidas económicas en la producción de leche del país. Los daños directos por *Boophilus microplus* tienen efectos negativos en la productividad del hato. Jonsson *et al.* (1998), demostró que cada hembra de la especie *B. microplus* es responsable de pérdidas en la producción bovina equivalentes a 8.9 ml de leche/día y de 1 a 10 gr de peso corporal al día debido a la reducción del consumo de alimento (4.37 kg) en comparación con animales no expuestos a garrapatas (5.66 kg).

Ojeda-Chi *et al.* (2010) determinaron que la pérdida de peso de un bovino parasitado por garrapatas del género *Boophilus microplus* es de 0.26 kg/garrapata/año, lo que representa pérdidas de millones de dólares en la economía pecuaria mundial. Almada (2015) estimó un cálculo económico de las pérdidas ocasionadas por parasitosis en Brasil, considerando solamente las reducciones en producción, sin contemplar el impacto económico relacionado con honorarios veterinarios, costo del personal de campo y de los medicamentos, de USD 3.24 billones/año.

Almada (2015) menciona que el grado de infestación está relacionado con las lluvias, las altas temperaturas y la carga animal. Haciendo énfasis en que la fase parasitaria que cumple en el animal tiene una duración de 22 días aproximadamente y que cada hembra coloca alrededor de 4,500 huevos, los que tardan en eclosionar como mínimo 20 días, así en el norte de Uruguay y Argentina es factible ver entre dos y tres generaciones de garrapatas al año, mientras que en Brasil y Colombia es común ver hasta cuatro generaciones, y finalmente en México y América Central es factible ver hasta siete generaciones.

Desde que la infesta de garrapatas ha causado serios daños económicos y sanitarios en las explotaciones ganaderas se han lanzado al mercado diversidad de productos llamados Ixodicidas, estos químicos desde sus inicios han sido una solución parcial a este problema, pero la falta de conocimiento sobre su debido uso, ha generado resistencia múltiple en las garrapatas. Rodríguez *et al.* (2013) mencionan que se tienen registros desde 1993 sobre los primeros casos de resistencia a los piretroides y amidas con la aparición de garrapatas pertenecientes al género *Boophilus* por lo que el control químico se ha vuelto ineficaz en algunas regiones del trópico latinoamericano, por ello es cada vez más complicado el manejo de este tipo de poblaciones.

Basado en lo anteriormente expuesto sobre el impacto económico y la resistencia múltiple que se ha generado durante años en la industria ganadera, surge la necesidad de realizar investigaciones sobre el uso de productos no químicos, con potencial para reducir eficazmente las poblaciones de *B. microplus*, sin generar daños ambientales, animales y especialmente intoxicaciones de personas que se exponen a la aplicación de estos productos. Actualmente se han desarrollado estudios sobre la eficiencia de agentes biológicos con la capacidad de reducir las poblaciones de garrapatas hasta en un 100% de los parásitos en laboratorio y efectividades técnicas de campo entre 75 y 80% utilizando *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Espinoza Silva 2005).

Fernández-Larrea (2004), menciona que los hongos poseen características biocontroladoras, por su alto poder patogénico y capacidad de producir epizootias. Los hongos entomopatógenos actúan principalmente por contacto, cuando el hongo es capaz de penetrar dentro de la garrapata e invadirla provocando la muerte por micosis.

Carvajal Ciomina (2012), realizó pruebas de susceptibilidad *in vitro* con el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditis indica*, en hembras adultas de la garrapata *B. microplus*, demostrando que las mismas son susceptibles a este agente de control biológico, y muestra que estos nematodos son capaces de provocar la muerte antes de las 72 horas después de la aplicación de los mismos, alcanzando un máximo de mortalidad a las 168 horas posteriores al tratamiento. Debido a estos resultados surgió la necesidad de comparar cual controlador biológico es más efectivo.

Los objetivos de este estudio fueron:

- Determinar la efectividad *in vitro* de los tres agentes biológicos y los TL₅₀ y TL₉₉ en garrapatas teleoginas.
- Determinar la frecuencia y agente biológico de mayor efectividad para controlar las poblaciones de garrapatas a nivel de campo.
- Evaluar los rendimientos de leche para estimar el impacto en los costos de los tratamientos con sus distintas frecuencias a través de un análisis marginal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo I, parte I. Determinación de la efectividad *in vitro* de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Heterorhabditis bacteriophora* sobre *Boophilus microplus* adultas.

Ubicación. El estudio se realizó durante los meses de mayo a julio de 2018 en el Laboratorio de Control Biológico de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano ubicada en el departamento Francisco Morazán, Honduras.

Establecimiento del experimento. Se recolectaron 250 garrapatas adultas completamente repletas de sangre entre 4-8 mm de longitud, extrayéndolas directamente de los animales, sujetándose de la parte superior del cuerpo con los dedos índice y pulgar para que al momento de retirarlas no se dañaran el sistema bucal de las garrapatas. Los ejemplares fueron identificados en laboratorio por medio de un estereoscopio binocular marca LEICA serie EZ4 y el uso de claves taxonómicas descritas por Hoskins (1991). Una vez identificados los adultos, se utilizó el protocolo descrito por Cardona y Vergara (2006) para determinar la efectividad de los tres agentes entomopatógenos *Heterorhabditis bacteriophora*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*. Los adultos se separaron en grupos por su tamaño y se colocaron 10 garrapatas por plato Petri, que contenían un disco de papel toalla para mantener la humedad en el plato. Previo a aplicar los tratamientos se realizó un proceso de desinfección de las garrapatas adultas, en el cual fueron sumergidas en una solución de cloro al 2% y seguidamente sumergidas dos veces en agua estéril. Cada remojo tuvo una duración de un minuto. Posterior a la desinfección se colocó cada garrapata sobre papel absorbente para retirar la humedad y luego pesarlas de esta forma uniformizar los grupos en cada tratamiento.

Tratamientos y aplicaciones. En el ensayo se seleccionaron 50 garrapatas colocadas en platos Petri de 8.5 cm de diámetro. Se evaluaron los siguientes tratamientos: *Metarhizium anisopliae* (0.25 gr con concentración de 4.3×10^7 esporas disuelto en 100 mL de agua), *Beauveria bassiana* (0.25 gr con concentración de 4.2×10^6 esporas disuelto en 100 mL de agua), *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* combinados (0.25 gr de cada hongo en concentraciones de 4.16×10^7 y 4.2×10^6 esporas respectivamente, disueltos en 100 mL de agua), *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88 (concentración de 1.2×10^3 nematodos por garrapata que fueron también colocados en 100 mL de agua) metodología usada por Monteiro *et al.* (2010) y el testigo con únicamente 100 mL de agua estéril. Se prepararon cinco repeticiones por tratamiento, siguiendo las mismas condiciones iniciales, diez garrapatas por plato Petri con discos de papel toalla humedecidas, una vez cada 24 horas para mantener la humedad relativa. Las variables medidas fueron:

- Estimación de Tiempo Letal₅₀ y Tiempo Letal₉₉.

Se realizaron observaciones cada 24 horas y se cuantificó la cantidad de garrapatas muertas por día hasta que murieran todas. En las observaciones realizadas a cada tratamiento se observó la mortalidad y el número de masas de huevos ovipositadas para posteriormente retirarlas, ya que también forman parte del experimento.

Se realizó el análisis de los datos obtenidos con el procedimiento Probit por medio del programa "Statistical Analysis System" (SAS versión 9.4[®]). Este permite estimar el porcentaje de mortalidad de una concentración a través del tiempo. Con el objetivo de determinar el tiempo letal del 50 y 99 de la población y de esta forma identificar el tratamiento más virulento.

- Porcentaje de infección de los tratamientos sobre las garrapatas adultas.

Se obtuvo el porcentaje de eficacia de *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *H. bacteriophora* mediante la ecuación 1 descrita por Bittencourt *et al.* (2003):

$$\% \text{ de Infección} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad [1]$$

Dónde:

A= Total de garrapatas con presencia de conidios o nematodos.

B= Total de garrapatas adultas sin presencia de conidios o nematodos.

Ensayo I, parte II. Determinación de la efectividad *in vitro* de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Heterorhabditis bacteriophora* sobre *Boophilus microplus* en huevos.

Establecimiento del experimento. Transcurrida la oviposición de las garrapatas expuestas a los tratamientos mencionados en el ensayo anterior, se recolectó cada alícuota (masas de huevo) con espátula, se pesaron y fueron colocadas en tubos de ensayo de vidrio por tratamiento según la garrapata que los ovipositó.

Tratamientos y aplicaciones. En este ensayo se evaluaron cinco tratamientos colocados en tubos de ensayo con las masas de huevos de las garrapatas tratadas en el ensayo anterior. Se preparó para cada tratamiento 40 mL de cada solución que contenía las siguientes concentraciones: *Metarhizium anisopliae* (0.25 g con concentración de 4.3×10^7 esporas disuelto en 100 mL de agua), *Beauveria bassiana* (0.25 gr con concentración de 4.2×10^6 esporas disuelto en 100 mL de agua), *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* combinados (0.25 g de cada hongo en concentraciones de 4.16×10^7 y 4.2×10^6 esporas respectivamente, disueltos en 100 mL de agua) y *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88 (concentración de 1.2×10^3 nematodos por garrapata que fueron también colocados en 100 mL de agua) metodología usada por Monteiro *et al.* (2010) y el testigo con 100 mL de agua estéril, los cuales se colocaron durante 10 minutos dentro de las respectivas soluciones, posteriormente se eliminaron las soluciones y los tubos fueron tapados y llevados a una

cámara de temperatura a 28 °C y 76% humedad relativa durante 21 días. Se elaboraron cinco repeticiones por tratamiento. Las variables que se midieron fueron las siguientes:

- Porcentaje de eclosión de huevos.

Se extrajo una alícuota de cada tratamiento y se contó hasta obtener 100 huevos separando los cascarones (huevos ya eclosionados) y se utilizó la siguiente ecuación 2 descrita por Arguedas *et al.* (2008), esto se hizo para cada repetición:

$$\% \text{ de Eclosión} = \frac{C}{H+C} \times 100 \quad [2]$$

Dónde:

C = cascarones

H = huevos

- Porcentaje de inhibición de oviposición.

Con los datos del peso de las garrapatas y los huevos de cada lote, se determinó el porcentaje de inhibición de oviposición aplicando la ecuación 3 descrita por Arguedas (*et al.* 2008):

$$\% \text{ Inhibición de Oviposición} = (PQLt / PQLT - PHLt / PHLT) \times 100 \quad [3]$$

Dónde:

PQLt = Peso de hembras de cada tratamiento

PQLT = Peso de hembras del testigo sin tratamiento

PHLt = Peso de huevos de cada tratamiento

PHLT = Peso de huevos del testigo sin tratamiento

- Porcentaje de control de reproducción.

Para obtener este dato primero fue necesario indicar la reproducción estimada utilizando la ecuación 4:

$$\text{Reproducción Estimada} = \frac{\text{Peso de huevos}}{\text{Peso de hembras}} \times \% \text{ Eclosión} \quad [4]$$

Posteriormente con el dato de reproducción estimada ya identificado se obtuvo el porcentaje de control con la siguiente ecuación 5 Arguedas (*et al.* 2008):

$$\% \text{ Control} = \frac{RET-REt}{RET} \times 100 \quad [5]$$

Dónde:

RET= reproducción estimada del testigo sin tratamiento

REt= reproducción estimada de cada tratamiento

Diseño estadístico. Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con cuatro tratamientos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* combinados y *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88 y un testigo, cinco repeticiones por tratamiento. Se tomó como unidad experimental cada garrapata inoculada y como repetición cada plato Petri con 10 unidades experimentales.

Análisis estadístico. Se evaluaron los resultados utilizando un Modelo Lineal General (GLM) y una separación de medias con el método Duncan con un nivel de significancia $P < 0.05$ con el programa "Statistical Analysis System" (SAS versión 9.4®).

Ensayo II. Experimento en campo, determinación de la efectividad de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Heterorhabditis bacteriophora* y el testigo químico Overtraz sobre *Boophilus microplus*.

Ubicación. El segundo experimento se realizó en las instalaciones de Ganado de Leche de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, a 30 km de Tegucigalpa, Honduras. Ubicada a 14° latitud norte y 87° longitud Oeste, con una precipitación de 434 mm durante junio a agosto del año 2018 meses en que se realizó el estudio, temperatura promedio de 25 °C y una altura de 800 msnm.

Diseño de grupos y muestreos. Se seleccionaron 75 vacas de la unidad de ganado lechero, las cuales fueron identificadas con collares de diferentes colores y separadas en 5 grupos, cada uno conformado por 15 animales. Se hizo muestreos semanales en las siguientes zonas de infestación: Parte ventral del barril, ubre, flancos, corvejones, unión del rabo e isquiones, cuello, orejas, extremidades anteriores y posteriores. Se cuantificó la cantidad de garrapatas en las áreas antes mencionadas por medio de un rectángulo de 20 × 20 cm.

Tratamientos y aplicaciones. La aplicación de los tratamientos se realizó con las frecuencias: dos veces por semana, una vez por semana y una vez cada dos semanas. Se aplicó durante horas frescas del día, 4:00 a.m. hasta 9:00 y 15:00 hasta 17:30 horas, después de ser ordeñadas para evitar el estrés en el hato, asegurar que logren establecerse con normalidad los agentes entomopatógenos y reducir el impacto negativo de la radiación solar sobre la efectividad de los tratamientos. Se utilizaron cinco bombas de mochila (una para cada tratamiento), con capacidad de 20 litros. Cada una de las soluciones se asperjaron de forma directa a contra pelaje, realizando movimientos de abajo hacia arriba, haciendo énfasis en las áreas con mayor cantidad de garrapatas para optimizar el área de contacto de los productos, usando 4 litros por animal. Los tratamientos utilizados fueron *Metarhizium anisopliae* (METAZAM®), *Beauveria bassiana* (BAZAM®), *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* combinados (BAZAM®/ METAZAM®), *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88 y Overtraz® (cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados y dosis utilizada para el control de *Boophilus microplus* en ganado lechero Zamorano, Honduras.

Tratamiento	No. animales	Frecuencia	Cepa/ I. Activo Concentración	Dosis / Animal
METAZAM [®]	5	2 vez/semana	Zamorano	4.0 g
	5	1 vez/semana		
	5	Cada 15 días	Espinoza Silva (2005)	
BAZAM [®]	5	2 vez/semana	Zamorano	2.4 g
	5	1 vez/semana		
	5	Cada 15 días	Fernández Tondelli (2006)	
BAZAM [®] / METAZAM [®]	5	2 vez/semana	Zamorano / Zamorano	6.4 g
	5	1 vez/semana		
	5	Cada 15 días		
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	5	2 vez/semana	HP88	4.0 mL
	5	1 vez/semana	5,000,000/vaca	
	5	Cada 15 días	Mbata y Shapiro-Ilan (2005)	
Overtraz [®]	15	Cada 15 días	Amitraz 12.5% 1 mL / L	
BREAK [®] THRU*			2 mL/L de agua	8.0 mL

*El adherente se utilizó en cada uno de los tratamientos excepto en Overtraz[®], ya que según las instrucciones de la etiqueta por su modo de acción también contiene propiedades adhesivas.

Nivel crítico de infestación de garrapatas.

De acuerdo a Almada (2015), el nivel crítico de la carga parasitaria mínima requerida para llevar a cabo la aplicación de control químico, debe iniciar cuando la infestación de *B. microplus* llega a 20 individuos por animal en un 30% del hato. En cambio, la filosofía con respecto al control biológico es principalmente preventiva. Tomando este punto en consideración las variables a evaluar fueron:

Mortalidad.

Se cuantificaron las garrapatas vivas al inicio del experimento en cada animal y 7 días después de cada aplicación para determinar mortalidad. Este proceso se llevó a cabo durante los 70 días del estudio hasta que los animales no presentaran garrapatas.

Producción de leche.

Se recolectaron los datos de producción en litros de leche, cada 15 días, para cada una de las vacas que conformaban los tratamientos evaluados desde el 15 de junio hasta el 30 de agosto de 2018, lapso de tiempo que duro el estudio en la unidad de ordeño de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras.

Análisis de costo beneficio.

Se identificaron los costos de protección para cada tratamiento según el valor del mismo de acuerdo con la frecuencia de aplicación.

Diseño estadístico. Se utilizó un diseño de arreglo factorial con cinco tratamientos y tres frecuencias de aplicación. Cada uno de los 75 animales representó una unidad experimental. Cada repetición estaba formada por 15 unidades experimentales.

Análisis estadístico. Se hizo un análisis de varianza con un Modelo Lineal General (GLM), y una separación de medias por el Método Duncan con el programa "Statistical Analysis System" (SAS versión 9.4[®]).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo I. Determinación de la efectividad *in vitro* de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Heterorhabditis bacteriophora* sobre *Boophilus microplus*.

Parte I. Prueba de susceptibilidad en laboratorio para garrapatas adultas. La mortalidad de garrapatas fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2), en el tratamiento con *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88, se alcanzó la mortalidad total en menor tiempo en comparación al resto de los tratamientos (Cuadro 4), lo que concuerda con Carvajal (2012) quien realizó evaluaciones con *Heterorhabditis indica* y demostró que estos “nematodos son capaces de provocar la muerte antes de las 92 horas, después de la aplicación”, esto se debe a que en garrapatas penetra a través del ano o el poro genital de las hembras, muestran un diente largo, anterior y terminal, el cual es usado para facilitar la ruptura de las membranas inter segmentarias, al raspar y romper la cutícula de los mismos. Una vez que el nematodo se instala en el hemocele, libera las células de la bacteria a través del ano, las que proliferan y matan al hospedero a partir de las primeras 24 horas, Samish *et al.* (2006).

Heterorhabditis bacteriophora presento mortalidad en menor tiempo de acción en comparación al tratamiento testigo, por otra parte, es importante mencionar que al mezclar BAZAM® y METAZAM® se obtienen resultados efectivos en función del tiempo de mortalidad de los adultos, comparado al uso individual de cada uno de estos hongos entomopatógeno (Cuadro 4).

Cuadro 2. Análisis ANDEVA ($P \leq 0.05$) para la evaluación de los agentes entomopatógenos en el control de *Boophilus microplus in vitro*.

Factores	Nivel de significancia entre variables
Mortalidad adultos	***
Porcentaje de infestación	***
Porcentaje de eclosión	***
Porcentaje de control	***
Eficiencia de tratamientos	***

***Diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$)

Infestación de garrapatas adultas. Los tratamientos *Heterorhabditis bacteriophora*, BAZAM[®]/METAZAM[®], METAZAM[®], y BAZAM[®], presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en comparación al tratamiento Testigo, esto indica que los agentes biológicos cuentan con porcentajes altos de infectividad para el control de *Boophilus microplus* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de infestación en adultos de *Boophilus microplus* Canestrini. Zamorano, Honduras.

Tratamiento	Porcentaje de infestación en adultos
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	82.0 a
BAZAM [®] /METAZAM [®]	82.4 a
METAZAM [®]	78.0 a
BAZAM [®]	78.4 a
Testigo	0 b
Probabilidad	<.0001
R ²	0.95
CV	14.42

ψ: valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Estimación de TL₅₀ y TL₉₉ de BAZAM[®], METAZAM[®], *Heterorhabditis bacteriophora* y tratamiento combinado de BAZAM[®]/METAZAM[®]. Se realizó el análisis de los datos obtenidos con el procedimiento Probit con límites con confiabilidad del 95% (Cuadro 4). La TL₉₉ calculada para el tratamiento de *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88 se alcanza a las 126 horas (rango 98.61 a 216.47 horas) después de aplicada la solución (1.2×10^3 nematodos/adulta) a las garrapatas teleoginas. Esto indica que al utilizar *H. bacteriophora* se obtiene una reducción de 131 horas para eliminar el 99% de las poblaciones de garrapatas en comparación al tratamiento METAZAM[®] el cual obtuvo el mayor Tiempo Letal₉₉ de 257 horas (rango 225.72 a 313.55 horas).

El tratamiento BAZAM[®]/METAZAM[®] presento TL₉₉ de 167 horas (rango 143.4 a 219.8 horas), el cual redujo TL₉₉ en 50 y 90 horas comparado con los tratamientos BAZAM y METAZAM respectivamente, esto se debe a que, al utilizar los hongos combinados, se crea un efecto sinérgico el cual resulta ser más efectivo para aumentar la mortalidad de las garrapatas adultas en menor tiempo comparado a la acción que se ejerce de forma individual de cada hongo entomopatógeno (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tiempos Letales 50 y 99 de BAZAM[®], METAZAM[®], *Heterorhabditis bacteriophora* y tratamiento combinado de BAZAM[®]/METAZAM[®] sobre garrapatas adultas obtenidos por medio del análisis Probit.

Tratamiento	TL ₅₀ (LF 95%)		TL ₉₉ (LF 95%)	
BAZAM [®]	89.15^a ψ		167.87^a	
	74.62	103.28	143.40	219.80
METAZAM [®]	136.018^b		257.20^b	
	118.45	153.05	225.72	313.55
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	43.94^c		126.43^c	
	17.42	59.18	98.61	216.47
BAZAM [®] /METAZAM [®]	111.00^{ab}		217.86^{ab}	
	94.12	127.22	188.19	274.55

ψ : valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

La mezcla de BAZAM[®]/ METAZAM[®] redujo el TL₅₀ en 25 horas debido al efecto de sinergia entre estos dos hongos. Es importante también mencionar las diferencias en TL₉₉ que indican que para el tratamiento de *Heterorhabditis bacteriophora* fue de 126 horas mucho menos que los otros tratamientos y el tratamiento METAZAM[®] fue el que tuvo el mayor TL₉₉ con 257 horas (Figura 1). Al comparar el tiempo de mortalidad total de *Heterorhabditis bacteriophora* se determinó que existe una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en comparación con los demás tratamientos y el testigo (Cuadro 4).

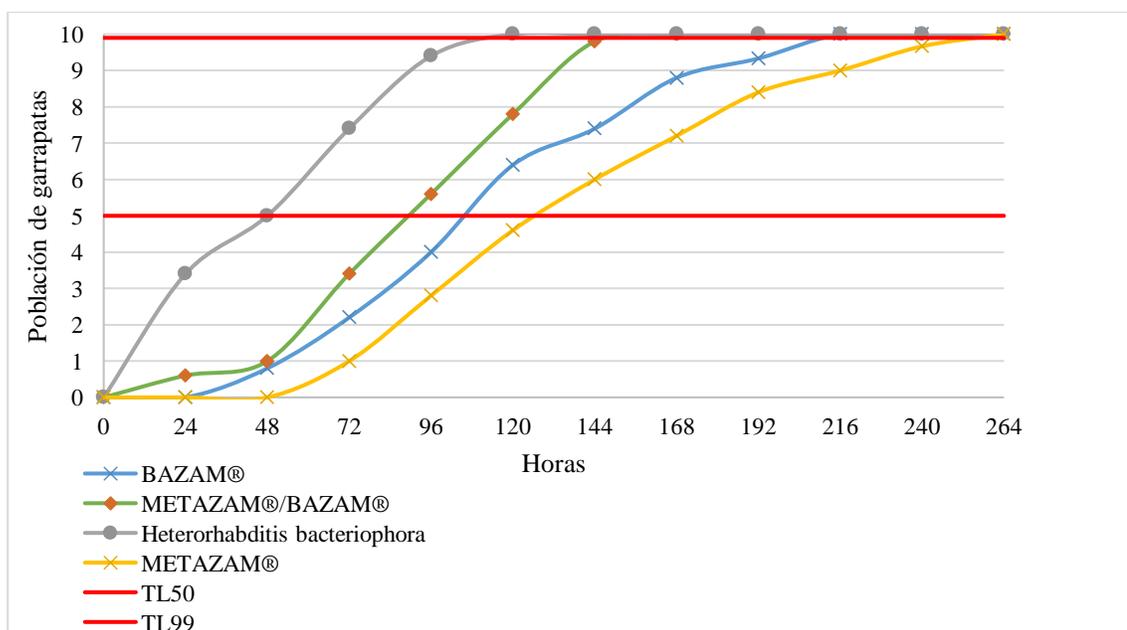


Figura 1. Representación de Tiempo Letal 50 y 99, obtenida en la prueba de estimación para BAZAM[®], METAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®] y *Heterorhabditis bacteriophora* sobre *Boophilus microplus*.

Parte II. Eclosión en huevos. Para la variable eclosión de huevos el tratamiento *Heterorhabditis bacteriophora* permitió un 2.8% de eclosión de huevos, significativamente menor que la eclosión de huevos del resto de los tratamientos, seguido por la mezcla de BAZAM[®]/ METAZAM[®] y por ultimo BAZAM[®] y METAZAM[®] con un 13% de eclosión y BAZAM[®] y METAZAM[®] con un porcentaje de eclosión de 28 y 33% respectivamente, pero significativamente menor que el testigo (100% de eclosión) ($P \leq 0.05$). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Oliveira Monteiro *et al* (2013) quien reporto un 3.1 % en eclosión de huevos con *Heterorhabditis bacteriophora* cepa HP88, misma que fue utilizada en esta investigación (Cuadro 5).

Porcentaje de control de reproducción. Para el parámetro de porcentaje de control *Heterorhabditis bacteriophora* presentó un 100% en el control de huevos, el tratamiento con los hongos combinados de METAZAM[®]/BAZAM[®] obtuvo un 98.7%, lo que refleja que no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos ($P > 0.05$), esto indica que ambos pueden ser una alternativa eficaz para el control de huevos de garrapatas. Sin embargo, ambos tratamientos presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) al resto de los tratamientos y al testigo evaluado. Investigaciones hechas en Brasil por Oliveira Monteiro *et al.* (2013) obtuvieron un 100% de control sobre huevos al utilizar la cepa HP88 de *Heterorhabditis bacteriophora* combinado con la cepa IBCB 116 del hongo *Metarhizium anisopliae* y un 95.6% de control al utilizar únicamente la cepa HP88 del nematodo, resultados que coinciden con los obtenidos en este estudio. Esto demuestra que *Heterorhabditis bacteriophora* y las asociaciones de hongos entomopatógenos cuentan con un potencial mayor en el control de huevos al infestarlos (Cuadro 5).

Inhibición de oviposición. La inhibición de oviposición se vio completamente afectada por el tratamiento de *Hererorhabditis bacteriophora* y esta fue significativamente mayor a todos los tratamientos. La mezcla de METAZAM[®]/BAZAM[®] y el tratamiento solo de METAZAM[®] no presentaron diferencias en la inhibición. El tratamiento BAZAM[®] presentó inhibición en la eclosión únicamente con el testigo significativamente ($P \leq 0.05$). Los resultados concuerdan con los realizados por Oliveira Monteiro *et al.* (2013) ya que demostró un efecto de agresividad mayor sobre los huevos en comparación a *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, esto se debe al modo de acción del nematodo *Hererorhabditis bacteriophora* que infestan los huevos de garrapatas en un lapso menor de tiempo, lo cual hace más rápido el efecto de estresar a la garrapata y disminuir la oviposición ya que esta muere antes de lograr dejar crías (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de eclosión, inhibición de oviposición y porcentaje de control sobre huevos de *Boophilus microplus*, Canestrini. Zamorano, Honduras.

Tratamiento	Porcentaje Eclosión de huevos	Porcentaje Inhibición de oviposición	Porcentaje control reproductivo de huevos
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	2.8 d ψ	93.1 a	100.0 a
BAZAM [®] /METAZAM [®]	13.0 c	80.5 b	98.7 a
METAZAM [®]	33.0 b	76.4 bc	94.4 b
BAZAM [®]	28.0 b	74.0 c	91.9 c
Testigo	100.0 a	0 d	0 d
Probabilidad	<.0001	<.0001	<.0001
R ²	0.99	0.99	0.9995
CV	13.95	6.42	1.40

ψ : valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Ensayo II. Determinación de la efectividad en campo de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Heterorhabditis bacteriophora* sobre *Boophilus microplus*.

Es importante recalcar que las interacciones entre los tratamientos Overtraz[®], BAZAM[®], METAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®] y *Heterorhabditis bacteriophora* y las tres frecuencias una vez por semana, dos veces por semana y una vez cada 15 días son altamente significativos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis ANDEVA ($P \leq 0.05$) de los tratamientos Overtraz[®], BAZAM[®], METAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®] y *Heterorhabditis bacteriophora* con distintas frecuencias sobre la densidad poblacional de *Boophilus microplus*.

Factores	Densidad poblacional de garrapatas
Tratamiento	***
Frecuencia	***
Tratamiento \times Frecuencia	***

*** Diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$).

Mortalidad de las garrapatas con tratamientos aplicados dos veces por semana. Al evaluar los tratamientos por su frecuencia de aplicación es visible que dos veces por semana durante los primeros 14 días que se realizaron las aplicaciones y muestreos de los productos biológicos y el testigo Overtraz[®] no se observó diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos, pero si hubo una mínima disminución de la población inicial de garrapatas. Hasta el día 21, se dieron los primeros resultados importantes entre los tratamientos aplicados con BAZAM[®], *Heterorhabditis bacteriophora*, BAZAM[®]/METAZAM[®] y

Overtraz[®] los cuales presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) y lograron llevar las poblaciones por debajo del nivel crítico, en comparación al tratamiento aplicado con METAZAM[®] (Cuadro 7) quien aún no presentaba mayores cambios. Los resultados fueron similares a los obtenidos por Muñoz Medina (2007), quien afirma que *Beauveria bassiana* (BAZAM[®]) tiene un efecto de mortalidad similar a los de Amitraz (Overtraz[®]).

La dinámica poblacional se mantuvo estable hasta el día 35 y el tratamiento evaluado con METAZAM[®] presentó diferencias significativas en comparación al resto de tratamientos ($P \leq 0.05$), entre los cuales, Overtraz[®], BAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®] y *Heterorhabditis bacteriophora* no tuvieron diferencia significativa ($P > 0.05$). Al día 49 todos los tratamientos aplicados mostraron resultados eficaces ya que no se presentó diferencia estadística significativa ($P \geq 0.05$) entre tratamientos, logrando mantener las poblaciones de garrapatas en cero por 21 días más.

Mortalidad de las garrapatas con tratamientos aplicados una vez por semana. El efecto de aplicar los tratamientos con frecuencia semanal presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre las poblaciones del tratamiento Overtraz[®] en comparación al resto de los tratamientos, por otra parte, se obtuvieron resultados favorables a partir del día 14, debido a que las medias poblacionales de *B. microplus* se encontraban por debajo del nivel crítico similar a lo ocurrido en día 21 y 28.

Al día 35 todos los tratamientos, a excepción de METAZAM[®], no presentaron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellos, la razón por la que sucede esta diferencia según Bittencourt et al. (2003) se debe a que el hongo *M. anisopliae* suele tener mecanismos de acción más lento para establecer sus conidios en las garrapatas en comparación a otros hongos como *B. bassiana*.

Los productos biológicos y químico utilizados no presentaron diferencia significativa entre tratamientos a partir del día 49 ($P > 0.05$), lo que nos indica que después de 7 aplicaciones semanales se obtienen resultados similares al tratamiento control Overtraz[®] y con dos aplicaciones más (día 63) se logró controlar las poblaciones de *B. microplus* en su totalidad (Cuadro 7).

Mortalidad de las garrapatas con tratamientos aplicados cada 15 días. Los resultados obtenidos a partir del día 21 muestran que el tratamiento Overtraz[®] presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al resto de tratamientos (Cuadro 7), así mismo se determinó en la misma fecha que todos los tratamientos llevaron las poblaciones de *B. microplus* por debajo del nivel crítico (20 garrapatas/animal) con tan solo dos aplicaciones de los tratamientos.

La dinámica poblacional de los tratamientos aplicados con BAZAM[®], METAZAM[®] y BAZAM[®]/METAZAM[®] al día 63 no presentaron diferencia significativa ($P > 0.05$) en comparación al tratamiento control Overtraz[®], sin embargo no sucedió lo mismo para el tratamiento en el que se utilizó *Heterorhabditis bacteriophora* ya que presentó niveles poblacionales mayores de garrapatas, esto concuerda con investigaciones realizadas por Junquera (2017), en las cuales menciona que los hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* toleran temperaturas externas entre los 19 °C

a 32 °C y pueden propagarse con facilidad en el ambiente por medio del viento. Por otra parte, estudios preliminares han mostrado que las cualidades del suelo pueden afectar enormemente los resultados, así como la temperatura de las garrapatas, de modo similar a lo descrito para los hongos entomopatógenos: los nematodos muestran una eficacia óptima a temperaturas entre 22 y 26 °C, que declina rápidamente por debajo de los 18 °C y por encima de los 30 °C.

Una dificultad adicional para el uso de nematodos en el campo es que la mayoría de las garrapatas no son huéspedes viables para los nematodos en cuestión, es decir, estos nematodos no completan su ciclo vital en las garrapatas (Junquera 2017).

.

Cuadro 7. Dinámica poblacional semanal de la garrapata (*Boophilus microplus* Canestrini), para determinar la eficiencia de los agentes biológicos BAZAM[®], METAZAM[®], BAZAM[®]/ METAZAM[®], *Heterorhabditis bacteriophora* y el tratamiento control Overtraz[®] en ganado lechero Zamorano, Honduras.

Tratamiento	Frecuencia Días	Media Poblacional de <i>Boophilus microplus</i>										
		Días										
		0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70
Overtraz [®]	15	30.0 a ^ψ	20.4 a	11.4 a	3.8 a	0.8 a	0.2 a	0.4 a	0 a	0 a	0 a	0 a
BAZAM [®]	3.5	29.6 a	15.8 ab	11.6 a	3.4 a	1.4 ab	0 a	0.8 a	0 a	0 a	0 a	0 a
BAZAM [®] /METAZAM [®]	3.5	29.6 a	15.8 ab	11.6 a	3.4 a	1.4 ab	0 a	0 ab	0 a	0 a	0 a	0 a
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	3.5	32.6 a	20.2 a	11.0 a	5.0 a	0.8 a	0 a	0 ab	0 a	0 a	0 a	0 a
METAZAM [®]	3.5	27.0 a	30.6 c	14.2 a	8.8 b	3.6 b	5.6 b	2.0 ac	5.0 b	0 a	0 a	0 a
Overtraz [®]	15	29.6 a	20.6 a	13.2 a	5.4 a	0.6 a	0.2 a	0.4 a	0 a	0 a	0 a	0 a
BAZAM [®]	7	26.2 a	17.0 ab	14.2 ab	8.2 b	4.8 b	1.0 a	1.6 ab	0.4 a	0 a	0 a	0 a
BAZAM [®] /METAZAM [®]	7	26.2 a	17.0 ab	14.2 ab	8.2 b	4.8 b	1.0 a	0 a	0 a	1.4 a	0 a	0 a
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	7	34.0 a	27.2 ac	15.8 ab	9.4 b	4.2 b	1.4 a	0.2 a	0 a	0 a	0 a	0 a
METAZAM [®]	7	27.0 a	25.2 ac	18.4 b	10.0 b	6.4 b	6.0 b	2.8 b	0 a	0.6 a	0 a	0 a
Overtraz [®]	15	41.0 a	28.2 a	15.6 a	5.8 a	1.0 a	0.8 a	0.2 a	0 a	0 a	0 a	0 a
BAZAM [®]	15	33.0 b	24.8 a	16.6 a	10.8 b	7.8 b	12.0 b	9.8 b	6.8 bc	4.2 b	0 a	0 a
BAZAM [®] /METAZAM [®]	15	35.0 a	24.8 a	16.6 a	10.8 b	7.8 b	12.0 b	7.4 c	6.2 b	5.4 b	0 a	0 a
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	15	35.6 a	31.6 a	17.6 ab	11.4 b	13.4 c	15.2 c	12 d	6.4 b	5.2 b	1.6 b	0 a
METAZAM [®]	15	37.0 a	30.6 a	21.0 b	11.6 b	8.4 b	7.0 d	6.0 c	5.0 bd	4.2 b	0.4 a	0 a
Probabilidad	<.0001											
R ²	0.947											
CV	18.81											

C.V: Coeficiente de Variación

ψ: valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según la prueba Duncan (P ≤ 0.05)

Evaluación de la producción de leche y eficiencia de los agentes entomopatógenos.

La producción de leche se ve influenciada por los tratamientos aplicados BAZAM[®], METAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®], *Heterorhabditis bacteriophora* y el tratamiento control Overtraz[®] pero no hay ningún impacto en dicha producción al haber distintas frecuencias de aplicación (cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis ANDEVA ($P \leq 0.05$) de los tratamientos BAZAM[®], METAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®], *Heterorhabditis bacteriophora* y el tratamiento control Overtraz[®] sobre la producción de leche.

Factores	Producción de leche
Tratamiento	**
Frecuencia	Ns
Tratamiento \times Frecuencia	Ns

**Muy significativas

Ns. No significativo

Producción de leche evaluada en tratamientos aplicados dos veces por semana.

Durante las primeras ocho semanas que se aplicaron los productos biológicos no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0.05$). Pero, dos semanas después el tratamiento BAZAM[®]/METAZAM[®] mantuvo constante la producción de leche significativamente diferente ($P \leq 0.05$) al resto de los tratamientos, a excepción del tratamiento METAZAM[®], quien presentó rendimientos de leche similares a los iniciales (Cuadro 9).

Producción de leche evaluada en tratamientos aplicados una vez por semana. La

producción de leche evaluada durante las primeras seis semanas, muestra una variabilidad significativa entre los tratamientos, pero al llegar a la octava semana dejan de haber diferencias significativas entre ellos ($P > 0.05$). A partir de la semana diez hasta la semana doce los tratamientos BAZAM[®] Y BAZAM[®]/METAZAM[®] resultaron tener rendimientos mayores al presentar diferencias significativas ($P \leq 0.05$) al resto de tratamientos aplicados (Cuadro 9).

Producción de leche evaluada en tratamientos aplicados cada 15 días. Los

tratamientos BAZAM[®]/METAZAM[®] y METAZAM[®] presentaron diferencias significativas al resto de los tratamientos a la semana cuatro, ya que muestran producciones mayores de leche (Cuadro 9). A partir de la semana seis el grupo de vacas tratado con BAZAM[®] presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$), comparado con el grupo control Overtraz[®] y *Heterorhabditis bacteriophora*, Durante la semana ocho se determinó que el grupo de vacas tratado con METAZAM[®] presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$), al resto de los tratamientos. Estos resultados cambiarían nuevamente en la semana diez ya que los tratamientos BAZAM[®]/METAZAM[®], BAZAM[®] y METAZAM[®] repetirían el mismo patrón mostrado en la semana seis al tener diferencias significativas ($P \leq 0.05$) con el grupo control Overtraz[®] y *Heterorhabditis bacteriophora* (Cuadro 6).

Las variabilidades entre las medias de producción se justifican debido a que a menor cantidad de aplicaciones el control de poblaciones de garrapatas es más lento, Almada (2015) menciona que en América Central se pueden observar hasta siete generaciones de una misma garrapata, lo que podría afectar seriamente la producción de leche. Dados estos resultados se podría inferir que el uso de *H. bacteriophora*, *M. anisiopliae* y *B. bassiana*, utilizados por separado o combinados pueden estar relacionados al aumento o constancia de la producción de leche, es importante mencionar que dicha producción de leche se ve afectada por varios factores como la genética, alimentación, manejo y condiciones climáticas. Sin embargo, estos controladores biológicos podrían ser una adecuada alternativa para establecerse en explotaciones ganaderas orgánicas de forma preventiva, ya que a largo plazo resultan ser más benéficos que el control químico, debido a que no generan resistencia y se diseminan en el ambiente para mantener un equilibrio en las poblaciones de garrapatas.

Cuadro 9. Evaluación de la producción de leche en vacas de producción baja y media durante los meses de junio a agosto de 2018 Zamorano, Honduras.

TRATAMIENTO	Frecuencia Días	Fechas de medición de producción de leche (L)					
		6/15/2018	6/29/2018	7/17/2018	7/31/2018	8/15/2018	8/30/2018
BAZAM®	3.5	16.1 a ^ψ	16.7 a	18.9 a	15.5 a	10.3 c	16.9 b
BAZAM®/METAZAM®	3.5	16.4 a	14.7 a	15.9 a	14.4 a	16.4 a	20.4 a
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	3.5	14.2 a	14.5 a	18.5 a	14.1 a	14.4 ab	18.8 ab
METAZAM®	3.5	16.5 a	15.7 a	17.0 a	15.0 a	13.8 cb	11.2 c
BAZAM®	7	18.5 a	18.8 a	18.6 a	17.0 a	18.8 a	19.9 a
BAZAM®/METAZAM®	7	16.4 ab	17.3 ab	18.3 a	17.1 a	18.8 a	17.9 a
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	7	14.0 b	13.2 c	15.1 a	12.0 b	12.8 b	10.3 c
METAZAM®	7	15.3 ab	14.2 bc	18.2 a	13.5 b	14.5 b	14.7 b
Overtraz®	15	13.2 a	13.1 a	15.6 a	11.1 a	10.3 a	9.2 a
BAZAM®	15	14.5 a	14.4 a	19.8 b	14.8 b	14.8 b	12.4 bc
BAZAM®/METAZAM®	15	17.2 ab	16.1 ab	18.9 b	15.5 b	16.8 b	16.9 d
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	15	15.2 ab	13.6 a	14.5 a	12.7 ab	11.3 a	11.1 ab
METAZAM®	15	18.6 b	18.1 b	19.3 b	17.9 c	16.6 b	15.1 cd
Probabilidad	<.0001						
R ²	0.749						
CV	16.67						

ψ: valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

C.V: Coeficiente de Variación

Análisis de costo marginal.

Según el análisis marginal elaborado en este estudio se determinó que METAZAM[®] genera un mayor retorno con frecuencia de 2 veces por semana, ya que por cada dólar invertido se obtendría USD1.59. Otra alternativa es BAZAM[®] ya que genera un retorno de USD0.45 al ser aplicado una vez cada 15 días, adicionalmente BAZAM[®]/METAZAM[®] retornaría USD0.17 si se aplica una vez por semana (Cuadro 10). Todos estos datos tomaron en cuenta la producción de leche desde el día en que se inició el experimento hasta los 70 días, último día de aplicación para algunos de los tratamientos. Es importante mencionar que sin considerar otras interacciones los aumentos en la producción de leche influyeron en la tasa de retorno marginal. Todo el análisis se basó en vacas de baja y mediana producción por lo tanto el precio de la leche que se estableció es con base al actual a nivel de Honduras L.12/Lt Adicionalmente en términos económicos *H. bacteriophora* y Overtraz[®] no resultaron ser muy convenientes a pesar de los resultados efectivos que se obtuvieron en campo.

Cuadro 10. Análisis Marginal del impacto en la producción de leche al aplicar Overtraz[®], BAZAM[®], METAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®] y *Heterorhabditis bacteriophora* para tres frecuencias distintas.

Producto	Precio	Cantidad Comercial	Cantidad Producto/ animal	Costo/ Animal (\$)**	Frecuencia Días	Tasa
	(\$)					Retorno Marginal (\$)*
METAZAM [®]	20	240 g	4.0 g	0.33	15	-0.49
					7	-0.05
					3.5	1.59
BAZAM [®]	20	240 g	2.4 g	0.2	15	0.45
					7	-0.05
					3.5	0.15
BAZAM [®] / METAZAM [®]	20	240 g	3.2 g	0.53	15	-0.15
					7	0.17
					3.5	-0.69
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	33.14	200 M	5 M	0.82	15	-0.64
					7	-0.09
					3.5	0.07
Overtraz [®]	37.28	1 L	4 ml	0.15	15	-1.35

*Procedimiento realizado a través del Manual Metodológico de Evaluación Económica (CIMMYT 1988.).

**Los costos incluyen costos fijos (mano de obra) y costos variables.

4. CONCLUSIONES

- El uso de nematodos entomopátogenos, tiene un mecanismo de acción con mayor efectividad en menor tiempo para controlar las poblaciones de garrapatas en comparación a los tratamientos evaluados con hongos entomopátogenos, ya que *H. bacteriophora*, presentó mortalidad total a las 116 horas luego de establecidos los ensayos.
- La aplicación de BAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®], *H. bacteriophora*, con frecuencia de dos veces por semana y una vez por semana, muestran un comportamiento de control de garrapatas similar al producto Overtraz[®] en tan solo 35 días.
- Los tratamientos biológicos METAZAM[®] y BAZAM[®] utilizados de manera individual o combinados influyen positivamente en la producción de leche considerando la frecuencia de aplicación y la tasa de retorno marginal. METAZAM[®] al utilizarse dos veces por semana obtiene una tasa de retorno de USD1.59 por cada dólar invertido, BAZAM[®] cada 15 días obtiene una tasa de retorno de USD0.45 y BAZAM[®]/METAZAM[®] obtiene una tasa de retorno de USD0.17 por cada dólar invertido.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones de *H. bacteriophora* aplicadas a los forrajes para determinar si puede establecerse un mejor control sobre los huevos y larvas de *Boophilus microplus*.
- Implementar sistemas de aspersión mecánicos en la Unidad de Ganado Lechero para agilizar los tiempos de aplicación, uniformizar las dosificaciones y reducir los costos de mano de obra al aplicar los productos biológicos controladores de *Boophilus microplus*,
- Evaluar ensayos preventivos durante la época de verano en Zamorano ya que durante esta estación del año se pueden presentar poblaciones de garrapatas abundantes y prolíferas difíciles de controlar.
- Evaluar aplicaciones combinadas de *H. bacteriophora* y hongos entomopatógenos para determinar posibles sinergias de acción contra *Boophilus microplus*.

6. LITERATURA CITADA

- Almada A. 2015. Parasitosis: pérdidas productivas e impacto económico. *Revista Veterinaria Argentina*. [Consultado 2018 jul 15]; 35(366):1–5. http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/196-Perdidas_productivas.pdf.
- Arguedas M, Bonilla R, Álvarez, V. 2008: Eficacia del hongo entomopatógeno *Metharrizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (acari: ixodidae) [internet]. San José: Ministerio de Agricultura y Ganadería. Servicio Nacional de Salud Animal. [consultado 2018 jul 15] http://www.mag.go.cr/rev_agr/v32n02-137.pdf.
- Bittencourt VR, Bahiense TC, Fernandes EK, De Souza EJ. 2003. Avaliação da ação *in vivo* de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1833 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini 1887). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 12(1): 38–42.
- Cardona E, Vergara R. 2006. Evaluación de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre los estados de desarrollo de *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae). *Control Biológico de Plagas, Patógenos y Arvenses en la Agricultura*. Organismo Internacional para Control Biológico IOBC, Mayo-Junio 2006. Palmira, Colombia: Sección Regional Neotropical.
- Carvajal Ciomina E. 2012. *Heterorhabditis indica*, una alternativa para el control biológico de *Boophilus microplus* [Tesis]. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas-Cuba. 33 p.
- Espinoza Silva L. 2005. Evaluación de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en control biológico de *Boophilus microplus* [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 29 p.
- Fernández-Larrea VO. 2004. Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de hongos entomopatógenos y su control de calidad. Laboratorio de Hongos Entomopatógenos. La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
- Fernández Tondelli JA. 2006. Evaluación de la eficiencia del control de garrapatas (*Boophilus microplus*) con tres frecuencias de aplicación de BAZAM® (*Beauveria bassiana*) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 36 p.

- Hoskins JD. 1991. Ixodid and Argasid Ticks: Keys to their Identification. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 21(1):185–197.
- IICA-RN (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, Secretaria de Recursos Naturales). 1984. Programa de Fomento de la Producción Bovina Y Sanidad Animal PROFOGASA [internet]. Tegucigalpa: Dirección General de Ganadería. [consultado 2018 jun 8]. https://books.google.hn/books?id=M9EqAAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- Jonsson NN, Mayer DG, Matschoss AL, Green PE, Ansell J. 1998. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. *Veterinary Parasitology*. 78(1):65–77. doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00118-6.
- Junquera P. 2017. Control biológico de garrapatas y ácaros del ganado con depredadores (aves, hormigas y ácaros), parasitoides (avispas) y patógenos (bacterias, hongos, nematodos y virus). Suiza. [consultado 2018 jun 8] https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=133&Itemid=207.
- Mbata GN, Shapiro-Ilan DI. 2005. Laboratory Evaluation of Virulence of Heterorhabditid Nematodes to *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology*. 34(3):676–682. doi.org/10.1603/0046-225X-34.3.676.
- Monteiro CM, Araújo LX, Matos RS, da Silva Golo P, Angelo IC, de Souza Perinotto WM, Coelho Rodrigues CA, Furlong J, Bittencourt VR, Prata MC. 2013. Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 112(10):3645–3651. doi.org/10.1007/s00436-013-3552-7.
- Monteiro CM, Furlong J, Prata MC, Soares AE, Batista ES, Dolinski C. 2010. Evaluation of the action of *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolate HP88 on the biology of engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 170(3):355–358. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.021.
- Muñoz Medina AG. 2007. Eficiencia de BAZAM® (*Beauveria bassiana*) y METAZAM® (*Metarhizium anisopliae*) en el control de garrapatas (*Boophilus microplus*) en ganado lechero de Zamorano, Honduras [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 20 p.
- Ojeda-Chi MM, Pérez-Cogollo LC, Rodríguez RI, Rosado-Aguilar JA, Trinidad-Martínez I, Bolio-González ME. 2013. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos. agropecuarios*. 1(3): 295–308.

- Perrin R, Winkelmann D, Moscardi E, Anderson J. 1988. Formulación de recomendaciones a partir de datos agronómicos: Un manual metodológico de evaluación económica. 6th ed. Ciudad de México (México): CIMMYT. 86 p.
- Rodríguez RI, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Cruz Vázquez C. 2010. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae): Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. [consultado 2018 jun 8]; 2 (2). http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S200711242011000200005&script=sci_arttext&tlng=pt.
- Samish M, Alekseev E, Glazer I. 2006. Biocontrol of ticks by entomopathogenic nematodes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 916(1):589–594. doi: 10.1111/j.17496632.2000.tb05341.x.
- SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 2017. Nueva normativa para el control de la garrapata del bovino [internet]. Buenos Aires: Secretaría de Agroindustria. [consultado 2018 jul 25] <http://www.senasa.gobcadena-animal/bovinos-y-bubalinos/produccion-primaria-sanidad-animal/enfermedades-y-estra-sani/garrapatas-del-bovino>.
- Soberanes CN, Santamaría M, Fragoso H, García VZ. 2002. First case reported of Amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* in Mexico. *Revista Técnica Pecuaria*. [consultado 2018 jul 25]; 40(1):81–92. <https://www.journals.elsevier.com/veterinary-parasitology>.

7. ANEXOS

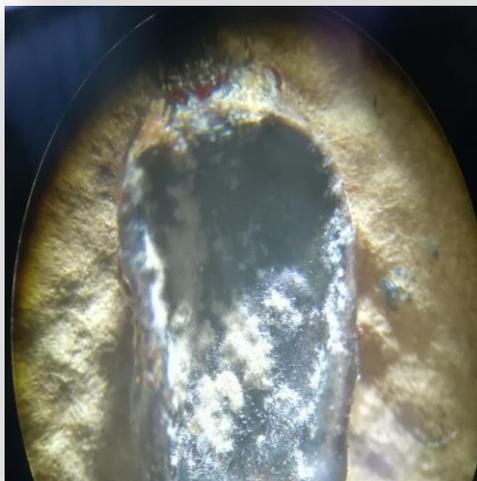
Anexo 1. Infestación *in vitro* de BAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®], METAZAM[®] y *Heterorhabditis bacteriophora* en *Boophilus microplus*



Infestación de METAZAM[®] sobre *B. microplus*.



Infestación de *H. bacteriophora* sobre *B. microplus*.



Infestación de BAZAM[®]/METAZAM[®] sobre *B. microplus*.

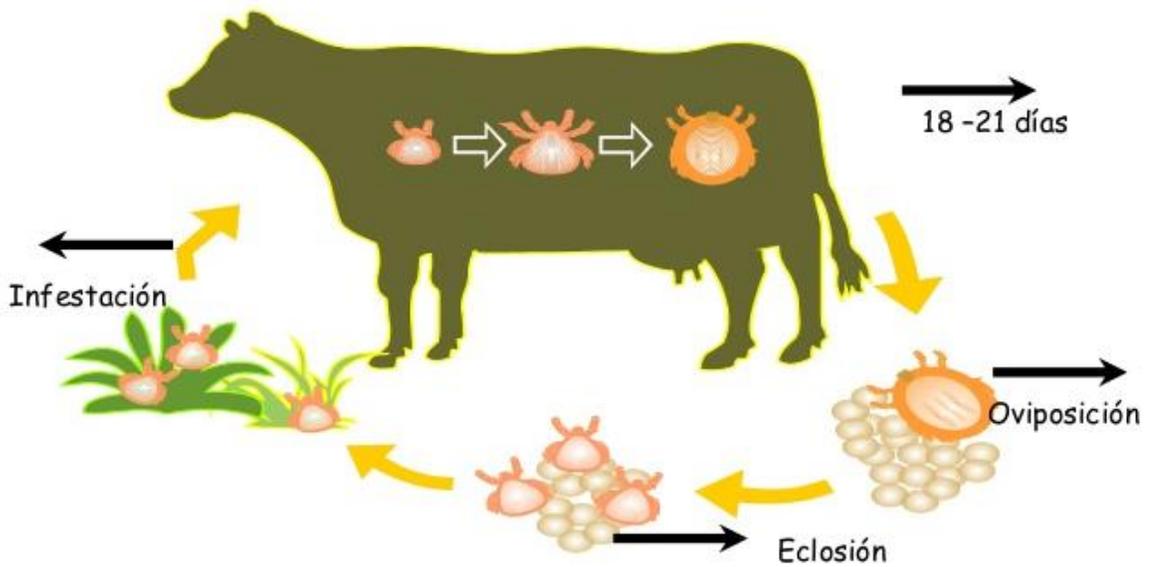


Infestación de BAZAM[®] sobre *B. microplus*.

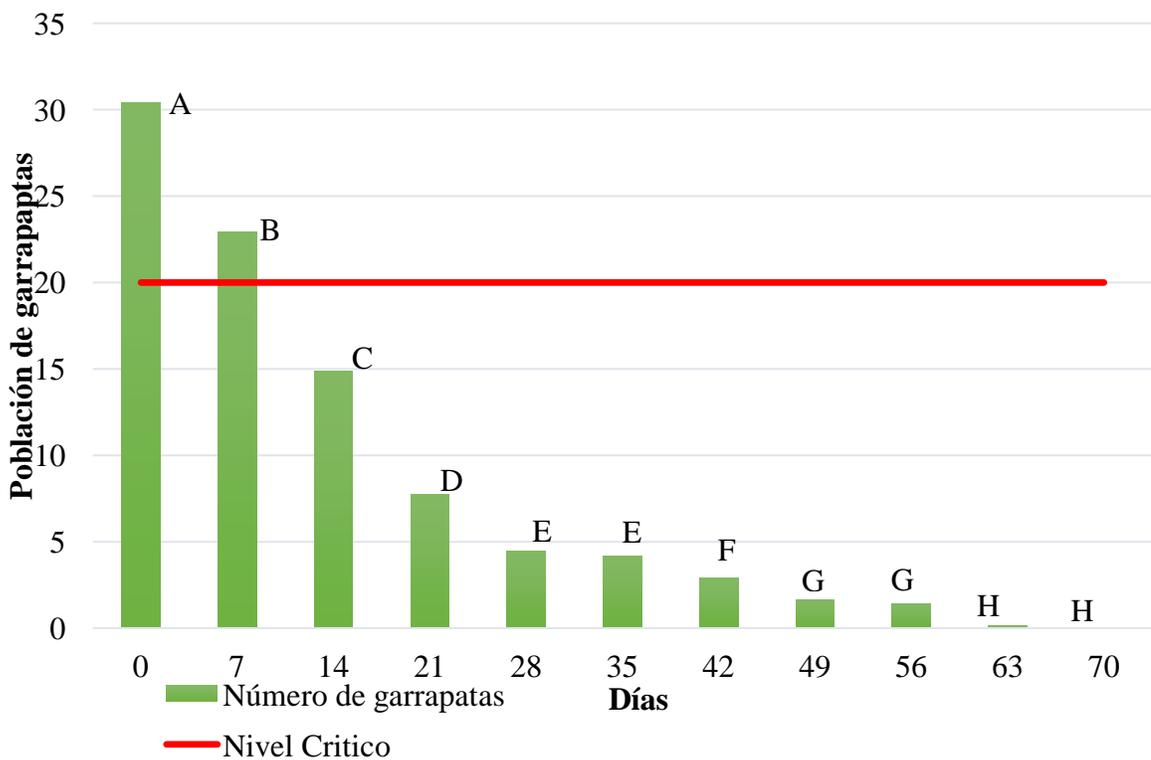
Anexo 2. Cronograma de actividades para la elaboración del estudio.

Actividades	Mayo				Junio				Julio				Agosto				Septiembre			
	SEMANAS																			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Recolección de garrapatas	X	X																		
Identificación de garrapatas		X																		
Montaje de ensayo en laboratorio		X																		
Muestreos y recolección de datos en laboratorio		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Clasificación del Hato			X	X																
Diferenciación del hato con collares						X														
Muestreo de Garrapatas en hato							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Aplicaciones de tratamientos							X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Pesaje de leche						X		X	X	X	X	X	X	X						
Análisis de datos e interpretación de resultados															X	X	X			
Presentación de Tesis																				X

Anexo 3. Ciclo biológico de la garrapata *Boophilus microplus*.



Anexo 4. Densidad poblacional general de garrapatas (*Boophilus microplus*) al aplicar BAZAM[®], BAZAM[®]/METAZAM[®], METAZAM[®] y *Heterorhabditis bacteriophora* en el hato de ganado lechero Zamorano, Honduras.



Anexo 5. Densidad poblacional semanal de la garrapata (*Boophilus microplus* Canestrini), para determinar la eficiencia de los agentes biológicos BAZAM®, METAZAM®, BAZAM®/ METAZAM®, *Heterorhabditis bacteriophora* y el tratamiento control Overtraz® aplicados dos veces por semana, una vez por semana y una vez cada 15 días en ganado lechero Zamorano, Honduras

