



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

---

---

EVALUACIÓN DE UN BIOINSECTICIDA FORMULADO CON  
*Metarhizium anisopliae* Y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin  
PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Meccus pallidipennis* VECTOR  
DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Tesis que para obtener el título de  
BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ DE JESÚS PÉREZ ACOSTA



TUTOR: JOSÉ LINO ZUMAQUERO RÍOS

MAYO 2016

## ÍNDICE

RESUMEN .....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
CONTROL DE VECTORES.....	5
<b>LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS</b> .....	6
MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS .....	9
<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Beauveria bassiana</i></b> .....	12
<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Metarhizium anisopliae</i></b> .....	14
<b>LA ENFERMEDAD DE CHAGAS (TRIPANOSOMIASIS AMERICANA)</b> .....	15
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO.....	16
2 HIPÓTESIS .....	18
3 OBJETIVOS.....	18
OBJETIVO GENERAL .....	18
OBJETIVOS PARTICULARES .....	18
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
OBTENCIÓN DEL HOSPEDANTE ( <i>Meccus pallidipennis</i> ).....	19
OBTENCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS .....	19
BIOENSAYOS .....	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	22
5. RESULTADOS .....	23
6. DISCUSIÓN .....	27
7. CONCLUSIONES .....	30
8. BIBLIOGRAFÍA.....	31

## RESUMEN

La Tripanosomiasis americana, también conocida como enfermedad de Chagas, es un padecimiento potencialmente mortal cuyo agente etiológico es el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909 Kinetoplastida: Trypanosomatidae). A pesar de contar con una amplia evidencia clínica se desconocen las cifras de prevalencia en el país ya que para el sistema de salud público mexicano en este momento dicha enfermedad no constituye una prioridad.

La existencia de al menos 33 especies de vectores y con elevados índices de infección natural redundan en la aparición de casos positivos que llegan a incluir niños, lo que demuestra una vía activa de transmisión y da fortalezas a criterios de endemidad. La transmisión del parásito que produce la enfermedad se da a través de varias vías pero en el 33% de los casos se ha reconocido que es por vía vectorial, de allí que el éxito de las campañas de control de los insectos permitirá la disminución drástica del número de infectados. Los métodos de control químico han sido inefectivos debido a problemas operacionales en las campañas y a la falta de integración entre estos, así como a la resistencia de los insectos a los productos. Así mismo la implementación del método físico (patio Limpio) ha sido insuficiente para disminuir el número de casos de infectados que cada año se registran en México; razón por la cual se implementaron estudios de una estrategia biológica con el objetivo de integrarla a los programas y reducir el impacto ambiental que los métodos químico y físico generan.

En este estudio se utilizaron dos bioinsecticidas: el primero una formulación comercial llamada Metaplus® formulado a partir de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Metarhizium anisopliae* y el segundo creado a partir de una cepa de *Beauveria bassiana* AFAO IX-4. En ambos casos se evaluó el efecto sobre la especie más abundante y de mayor índice y colonización en el intra y peri domicilio poblano (*Meccus pallidipennis*).

Para ello se utilizaron ninfas del tercer estadio de *Meccus pallidipennis* colonizadas en el laboratorio. Se practicaron tres repeticiones con dosis nominales reconocidas en ensayos practicados en otros países de Latinoamérica y se registró la mortalidad durante 15 días con la finalidad de detectar la eficiencia de los productos.

La evaluación del bioinsecticida Metaplus® presentó una mortalidad hasta del 65% la LC<sub>50</sub> obtenida fue de  $1.023 \times 10^{10}$  conidias/ml. Sin embargo la preparación realizada con la cepa *Beauveria bassiana* AFAO IX-4 fue más virulenta ya que alcanzó una mortalidad del 100%.

Existe evidencia de la factibilidad que la micosis producida por un formulado de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* afecte a *Meccus pallidipennis*.

Palabras claves: *Beauveria bassiana*, Control biológico, *Meccus pallidipennis*, *Metarhizium anisopliae*, Metaplus,

## 1. INTRODUCCIÓN

La organización mundial de la salud (OMS) en su reporte técnico de prioridades de desarrollo para combatir la enfermedad de Chagas, Tripanosomiasis Africana humana y Leishmaniasis ubica al control de vectores en tercer lugar de importancia (WHO, 2002).

La enfermedad de Chagas (ECH) es causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) Chagas 1906 sus formas de transmisión predominantes son: vectorial (vía contaminativa de abrasiones de la piel con las deyecciones del insecto), transfusión sanguínea, vía oral y la congénita. La vía vectorial era considerada la más importante, hoy se manifiesta en algunos países latinoamericanos la importancia de la vía oral como forma de transmisión de la enfermedad dados los brotes epidémicos de los últimos años en Venezuela y Brasil (Muñoz-Calderón *et al.*, 2012; ProMED-mail 2013). De los infectados el 30% sufrirán afecciones cardiovasculares, gastrointestinales y/o neurológicas irreversibles (Klein, 2012). Esta enfermedad es un problema de salud pública importante en América Latina, ya que afecta actualmente a un estimado de 8 millones de personas en 21 países y es transmitida por migración humana a regiones donde la enfermedad no es endémica. (Rassi *et al.*, 2010; Pinto-Díaz, 2012; Klein, 2012).

A pesar de contar con una amplia evidencia clínica se desconocen las cifras de prevalencia en el país ya que para el sistema de salud público mexicano en este momento dicha enfermedad no constituye una prioridad. (Velazco-Castrejón *et al.*, 2008). Se conocen en México al menos 33 especies de triatomos, de las cuales 23 son registros únicos en el mundo (Salazar-Schettino *et al.*, 2010; Martínez-Ibarra *et al.*, 2011).

## CONTROL DE VECTORES

Se denomina vector a todo organismo que actúa como mecanismo trasmisor de un agente patógeno entre el medio ambiente y el hombre o de un organismo a otro.

Rodríguez *et al.* (2008) mencionan 5 modalidades principales para el control de vectores:

<b>Método</b>	<b>Descripción</b>
<b>Manejo Ambiental</b>	Modificaciones el ambiente para privar a las poblaciones de características básicas para su supervivencia.
<b>Insecticidas Químicos</b>	Aplicación de compuestos químicos aplicados de forma peridomiciliaria que atacan juveniles y/o adultos.
<b>Control Genético</b>	Uso de técnicas de manipulación que permiten la esterilización de individuos o la identificación e inserción de genes que hacen a los vectores más propensos a enfermedades.
<b>Trampas</b>	El uso de feromonas y kairomonas para atraer hembras a trampas.
<b>Control Biológico</b>	El uso de depredadores, parásitos y patógenos como bacterias y hongos entomopatógenos para reducir la densidad poblacional de los vectores.

El propósito del control de vectores, es el de reducir la morbilidad y mortalidad de los organismos disminuyendo la densidad poblacional del vector a un nivel suficiente donde se inhiba el impacto de transmisión (Rodríguez *et al.*, 2008).

El uso de insecticidas químicos es el método de control de vectores más utilizado en la actualidad a pesar de las preocupaciones medioambientales que genera la acción residual de productos químicos, la aparición y propagación de la resistencia hizo que la OMS propusiera desde 1970 la resolución 23.33-1, donde propone el estudio de nuevos métodos de control que presenten menos efectos adversos colaterales. Este hecho motivó la búsqueda de alternativas, como el control biológico, que tengan un menor número de efectos secundarios y que sean menos invasivos con los ecosistemas (Pedrini *et al.*, 2009).

Smith utilizó por primera vez el término "control biológico" para referirse al uso de enemigos naturales (introducidos o manipulados) para el control de organismos que impacten negativamente el alimento, vivienda, vestido y salud humana (Barrera, 2007). Estos organismos actúan disminuyendo la actividad, fecundidad y/o longevidad de los vectores. En el control microbiológico, se utilizan microorganismos patógenos como virus, bacterias, protozoarios, nematodos, parásitos, y también hongos, que actúan matando a sus huéspedes o bien disminuyendo su actividad, fecundidad y/o longevidad (McGraw, 2013).

## **LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS**

Los primeros microorganismos que se encontraron causando enfermedad en insectos fueron los hongos, por su crecimiento macroscópico sobre la superficie de sus hospederos (Figura 1). Algunos hongos entomopatógenos sin embargo no producen crecimiento superficial o producen muy poco. La mayoría son patógenos obligados o facultativos y algunos son simbióticos. Su crecimiento y desarrollo están

limitados en un primer orden por las condiciones ambientales externas en particular, alta humedad y temperatura adecuada para la esporulación y germinación de esporas. Las enfermedades causadas por estos hongos son denominadas “micosis” (Tanada y Kaya, 1993).



Figura 1. *Beauveria bassiana* creciendo sobre *Vespula germanica*. Foto por José de Jesús Pérez Acosta

Las enfermedades fúngicas en insectos están ampliamente distribuidas y es frecuente que causen epizootias, virtualmente todos los órdenes de insectos son susceptibles al ataque de una o varias cepas con alta especificidad. (Zavala-Ramírez, 2005; Zimmermann, 2007)

El potencial que ofrece la lucha microbiológica utilizando la patogenicidad de los hongos presenta ventajas ecológicas. El hongo tiene la posibilidad de propagarse en poblaciones de huéspedes y de persistir largo tiempo en el medio ambiente, además de que actúa al contacto y se puede producir masivamente de

forma sencilla (Shahid *et al.*, 2012). Así mismo, este potencial resulta no sólo del conjunto de propiedades del agente y de las poblaciones blanco, sino también de las condiciones ambientales en las que se desarrolla la entomomicosis (Bukhari, *et al.*, 2011).

El uso de una u otra cepa o especie de hongo depende de muchas consideraciones, entre las que se encuentran: 1) ecología del patógeno y su blanco, espectro de acción 2) accesibilidad del agente de control a la plaga, 3) conocimiento básico del modo de acción y 4) disponibilidad de tecnologías de producción, formulación y aplicación del entomopatógeno (Khachatourians, 1986; Samson *et al.*, 1988; Lisansky, 1989).

Existen alrededor de 100,000 especies de hongos y alrededor de 700 han sido identificadas como hongos entomopatógenos. Se considera que un hongo pertenece a esta clasificación cuando afecta a los insectos provocándoles patologías y la muerte. (Khachatourians y Sohail, 2008).

Las especies de hongos más utilizadas como agentes microbianos se encuentran en varios géneros, como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. acridum*, *Lecanicillium lecanii* e *Isaria fumosorosea* entre otras. Estos organismos han sido utilizados para el control biológico de plagas agrícolas, así como en estudios para el control de insectos vectores (Luz *et al.*, 1998; Pedrini *et al.*, 2009; Mnyone, 2012)

De acuerdo a David (1967) Los hongos con actividad entomopatogénica infectan individuos en todos los órdenes de insectos; los estudios se han centrado en: Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera y Orthoptera (citado por Tanada y Kaya 1993). En algunos órdenes de insectos los estados inmaduros (ninfas o larvas) son más a menudo infectados que los maduros o estado adulto, en otros puede suceder lo contrario (Ferron *et al.*, 1978).

## MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

El desarrollo de la micosis puede estar dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación del conidio en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo. Lo cual resulta de manera general en la muerte del insecto.

El primer contacto que hace la espora con la superficie del hospedero es por la cutícula. Las características físicas y químicas de las superficies de la cutícula del insecto y la espora son las responsables de esta unión. En algunos hongos la adhesión es un fenómeno no específico, mientras en otros si lo es. (Khachatourians, y Qazi, 2008). Algunas glicoproteínas pueden servir como un receptor específico para las esporas. Para que esto ocurra es necesario contar con condiciones favorables de temperatura (20 a 30 °C) y humedad (70% a 90).

La cutícula de los insectos posee dos capas, la epicutícula (externa) y la procutícula (interna). La epicutícula es una estructura muy compleja y delgada que carece de quitina pero contiene proteínas estabilizadas por fenoles y está recubierta con una capa cerosa que contiene ácidos grasos, lípidos y esteroides (Hackmann, 1984). La procutícula forma la mayoría de la cutícula y contiene fibras de quitina embebidas en una matriz de proteínas unida con lípidos y quinones (Bereiter-Hahn et al., 1984). Las proteínas forman más de un 70% de la cutícula. En muchas áreas de la cutícula, la quitina está organizada de manera helicoidal, lo cual resulta en estructuras laminadas.

El resultado de la germinación y la penetración no depende sólo del porcentaje total de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, el tipo de espora y la susceptibilidad del hospedero (Samson *et al.*, 1988).

Los hongos pueden infectar insectos a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas de un insecto. Puesto que la humedad no es un problema

en el tracto alimenticio, la espora puede germinar rápido en este ambiente; por otra parte, los fluidos digestivos pueden destruir la espora o la hifa germinativa. En algunos casos, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por micosis (Charnley, 1984).

Guillespie (1988) reportó que los hongos *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces* spp. y *V. lecanii*, producen grandes cantidades de proteasas y quitinazas en medios de cultivo líquido. En varios aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae* la enzima principal es una endoproteasa que disuelve la proteína matriz que cubre la quitina cuticular. Por lo tanto, la producción de quitinaza ocurre después del proceso de infección y una vez que el hongo atraviesa la cutícula debe vencer el sistema inmunológico del hospedero antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del insecto.

Una vez realizada la germinación, el conidio produce un tubo germinal que penetra la cutícula del insecto y entra al hemocele. Dentro del hemocele, el hongo forma protoplastos, cuerpos hifales e hifas. Los protoplastos aparecen al principio de la infección y presentan movimiento ameboideo. (Roberts, 1981). A continuación toda la cavidad celomática es llenada por el hongo. Hay mucha evidencia de la presencia de toxinas en la muerte de los huéspedes de los hongos. La acción de citotoxinas es sugerida por la desestabilidad celular previa a la penetración por parte de las hifas. Cambios en el comportamiento de los insectos, como parálisis parcial o general, desorientación y un decremento en la irritabilidad en los insectos infectados son síntomas consistentes con la acción de toxinas neuromusculares (Charnley, 1984).

Después de llegar al hemocele, la mayoría de los hongos convierten el crecimiento micelial en una fase de levadura o sea crecimiento por gemación. Se producen toxinas y enzimas, aunque de manera aparente algunos hongos no poseen toxinas, matan el insecto al consumir todos los nutrientes o por física destrucción (Bustillo, 2001).

El tiempo requerido para matar al insecto depende de muchos factores como: Tipo de huésped, temperatura, humedad y estado de desarrollo del huésped. Al momento de la muerte, casi todos los órganos internos del insecto han sido colonizados por el hongo (Figura 2). El periodo desde la infección hasta la muerte puede ser desde los 3 a los 12 días, ocurriendo la mayoría de la mortandad entre los días 5 al 8 (MacLeod, 1963). Una vez que huésped muere, un antibiótico (oosporein) es producida a fin de contrarrestar la competencia producida por las bacterias intestinales (Vining *et al.*, 1962).



**Figura 2.** *Meccus pallidipennis* totalmente colonizado por *Beauveria bassiana*. Foto por José de Jesús Pérez Acosta

Cuando las condiciones son favorables, el hongo saldrá a través de las partes suaves del cuerpo del insecto, produciendo una apariencia de algodón en la superficie del mismo (figura 3) (Bassi, 1835). La humedad relativa debe de ser superior al 92% para que *B. bassiana* pueda crecer en el exterior del huésped. Las hifas externas producen conidias las cuales se rompen y se liberan al ambiente completando el ciclo (Mahr, 1997).

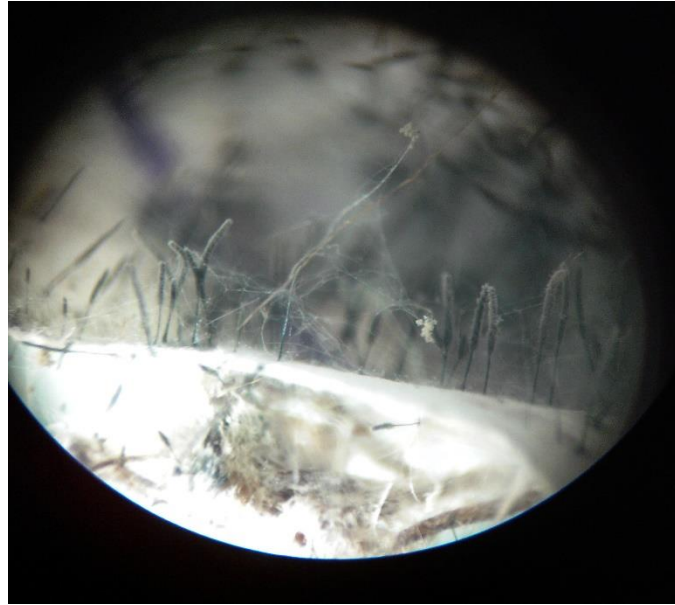


Figura 3. Crecimiento de *Beauveria bassiana* sobre tegumento de *Meccus pallidipennis*

### **CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Beauveria bassiana***

El género se caracteriza por presentar un micelio blanco, conidióforos sencillos, y agrupados de forma irregular o en grupos verticilados, en algunas especies hinchados en la base y adelgazándose hacia la porción que sostiene la conidia, la cual se presenta en forma de zig-zag después de que varias conidias se producen; las conidias son hialinas, redondeadas a ovoides y unicelulares (Bustillo 2001). *B. bassiana* posee conidias de globosas a subglobosas (2-3 x 2.0-2.5  $\mu\text{m}$ ) y las estructuras conidióforos forman densos grupos (Samson *et al.*, 1988).

El género *Beauveria* está compuesto por varias especies, las que son de manera frecuente aisladas y estudiadas son *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *B. brongniartii* (= *B. tenella*). *B. bassiana* presenta por lo menos el 50% de las conidias redondeadas, mientras que en *B. brongniartii* alrededor del 98% de las conidias son ovoides (Kuno y otros, 1982 citados por Bustillo 1987; Tanada y Kaya, 1993).

La efectividad de *Beauveria* es afectada por la temperatura y la humedad en el microclima; aunque las condiciones de microclima pueden ser importantes, la luz

solar y es posible que la actividad biológica de otros organismos afectan la habilidad de *B. bassiana* para sobrevivir e iniciar las infecciones (Bustillo, 1987); la germinación de estas conidias en el integumento y en medios de cultivo es dependiente de ciertos requerimientos nutricionales (Figura 4). Según Tanada y Kaya (1993) estas fuentes nutricionales son: una fuente utilizable de carbono como glucosa, glucosamina, quitina, y almidón y también una fuente de nitrógeno para el desarrollo hifal.



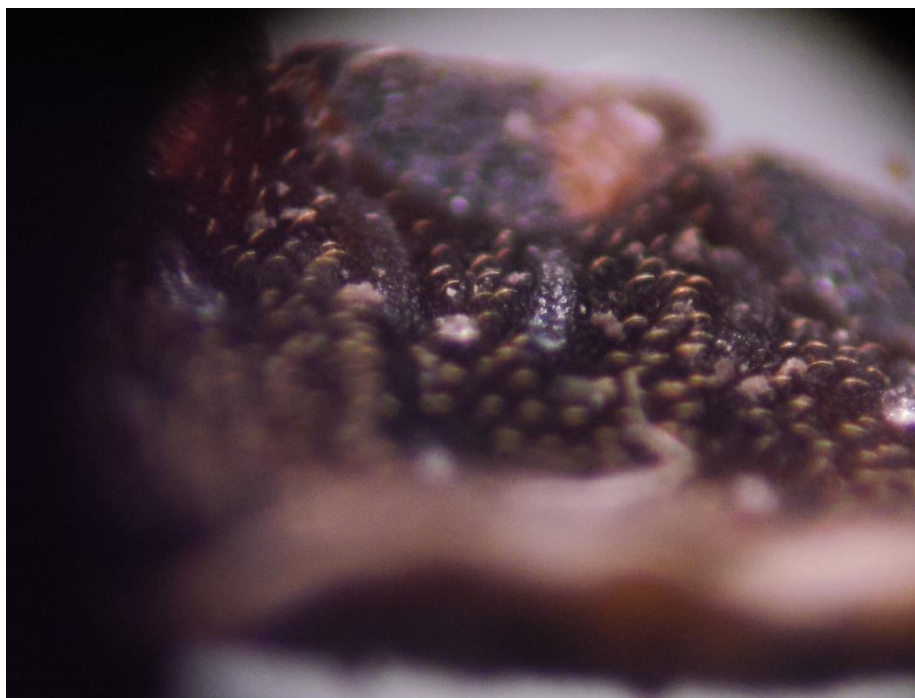
**Figura 4.** Efecto entomopatogénico de *Beauveria bassiana*

En 1999 la Agencia de Protección ambiental Norteamericana hizo un estudio sobre la posibilidad de que *B. bassiana* podría infectar plantas de maíz y presentar un riesgo de toxicidad oral tanto humano como veterinario, el estudio reveló que a pesar de presentar cierta toxicidad al ser probada en ratas y conejos, no hubo ninguna mortalidad animal, y tampoco presentaba un riesgo directo contra las

plantas de maíz, ya que se *B. bassiana* se encuentra de forma nativa en los suelos a nivel mundial.

### **CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Metarhizium anisopliae***

El uso de características morfológicas para identificar las especies de *Metarhizium* puede ser imprecisas, ya que a menudo puede haber superposición de caracteres entre las especies. Las técnicas moleculares han demostrado que lo que antes se denominaba *M. anisopliae* representa un complejo de nueve especies (Bischoff *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Crecimiento de *M. anisopliae* sobre *Meccus pallidipennis*

El primer uso de *M. anisopliae* como un agente de control de plagas contra insectos fue en 1879 cuando Elie Metchnikoff lo utilizó contra *Anisopliae austriaca*.

*Metarhizium anisopliae* se caracteriza por la formación de micelio septado con producción de conidias de aproximadamente 0.5 a 0.8 micras de diámetro o

formas de reproducción asexual, en conidióforos que nacen a partir de hifas ramificadas (Figura 5).

Se ha reportado que infecta alrededor de 200 especies de insectos y otros artrópodos. A pesar de que *M. anisopliae* no es tóxica para los mamíferos, en algunos casos la inhalación de esporas puede causar reacciones alérgicas a individuos sensibles (Ward *et al.*, 1998).

El hongo puede producir metabolitos secundarios como destruxina, la cual tiene un efecto insecticida en algunas larvas. Algunos insectos han desarrollado mecanismos fisiológicos para reducir la infección de hongos como *M. Anisopliae* (Wilson, 2002).

### **LA ENFERMEDAD DE CHAGAS (TRIPANOSOMIASIS AMERICANA)**

Tripanosomiasis americana llamada también la enfermedad de Chagas, es una zoonosis parasitaria endémica del continente americano, que constituye uno de los problemas prioritarios de salud pública en Latinoamérica (Schofield, 1994).

Según datos de la OMS (2012) existen unos 8 millones de personas infectadas en todo el mundo, principalmente en América Latina. En algunos países de Centro y Sudamérica, la enfermedad es un problema prioritario en las acciones de salud pública, en México aún no se considera de elevada prioridad, debido a que los casos comprobados de la enfermedad de Chagas son muy pocos, focalizados en áreas marginales de diversas regiones del país pero los casos presuntivos por serología o sintomatología se comprenden quizás al aumento de las migraciones humanas y transfusiones sanguíneas infectadas con *Trypanosoma cruzi* (Velasco-Castrejón & Salazar-Schettino, 1997; Guhl *et al.*, 2000; Pinto-Díaz, 2012).

De forma reciente han aumentado los casos de ECH en Estados Unidos debido al alto flujo de migrantes desde países pobres. Se considera que en Texas

y en la región del Golfo se localizan más de 300,000 casos (Bern y Montgomery, 2009). De igual manera se han documentado apariciones de ECH en Canadá, Australia, Japón, España y otros países europeos (Gascon *et al.*, 2010).

## LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO

En México es difícil contar con datos epidemiológicos sobre la mortalidad por Chagas, esto es resultado de la falta de pruebas diagnósticas postmortem y a la falta de conocimiento clínico de la enfermedad de parte de los profesionales de salud. La presencia rural de la infección se intensifica con el acelerado proceso de urbanización al poner en contacto a grandes sectores de la población con el vector. El cual es también modificado por las migraciones humanas hacia los mayores núcleos poblacionales. Ocho estados (Chiapas, Veracruz, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Michoacán, México, Oaxaca) tienen más del 69% de los casos seropositivos, los cuales representan entre el 5.9% y el 11.0% de las poblaciones respectivas en esas entidades (Ramsey, 2001).

La incidencia anual de la enfermedad de Chagas se estima en 69 072 casos por año, y el 52.1% de esos casos ocurren en zonas rurales. Se estima que el 18.6% de los casos incidentes (12 553 casos) ocurren en zonas sin un riesgo de infestación permanente (Ramsey, 2001).

En el Hospital Central de PEMEX en Salina Cruz, Oaxaca, el 85% de los casos de insuficiencia cardíaca, 16% de todas las consultas en el servicio de Cardiología, se deben a la enfermedad (Moreno *et al.* 2001).

Los estudios de morbilidad debido a Chagas en México han sido dispersos, y generalmente no son representativos a nivel poblacional. Un estudio representativo para la población rural en el estado de Morelos se informa de una seroprevalencia de 1.0% para niños de edad escolar (Ramsey *et al.* 2001). Esta cifra contrasta con la seroprevalencia de 0.8% mencionada por el Centro Estatal de

Transfusión Sanguínea (CETS) del mismo estado. Esta diferencia sugiere que la seroprevalencia en zonas rurales, aun cuando éstas representan una menor parte de la población (24% en el caso de Morelos), pueden ser 3 o 4 veces más altas que las tasas en donadores de sangre, una población principalmente urbana.

En un estudio realizado en Veracruz se informa de una seroprevalencia de 2.8 % en la jurisdicción sanitaria de Tuxpan y 2.2 % para la de Pánuco (Segura y Escobar-Meza, 2005). Para el estado de Puebla, se realizó un estudio para identificar la seroprevalencia de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre y el resultado obtenido fue del 1.24 % (Monteón *et al*, 2005).

## 2 HIPÓTESIS

Si los hongos entomopatógenos son capaces de controlar a diversos insectos que son plagas agrícolas y vectores, así como a algunas especies de triatominos, entonces es posible que estos hongos logren en pocos días mortalidades elevadas en *Meccus Pallidipennis* vector de la enfermedad de Chagas, para posteriormente lograr un control biológico de estos organismos.

## 3 OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar en condiciones de laboratorio, el uso potencial como organismos de control biológico, el porcentaje de mortalidad y la concentración letal media (LC50) de dos bioinsecticidas en organismos de *Meccus pallidipennis* vector de la enfermedad de Chagas. Uno comercial llamado Metaplus® formulado con dos especies de hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. El segundo Integrado por la cepa *Beauveria bassiana* AFAO IX-4.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener la concentraciones letal media (LC<sub>50</sub>) de Metaplus® en *Meccus pallidipennis*.
2. Contrastar el efecto del bioinsecticida comercial Metaplus® y *Beauveria bassiana* AFAO IX-4 en *Meccus pallidipennis*.
3. Determinar si Metaplus® y *Beauveria bassiana* AFAO IX-4 tienen un uso potencial en el control biológico de *Meccus pallidipennis*.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### OBTENCIÓN DEL HOSPEDANTE (*Meccus pallidipennis*)

Se utilizaron ejemplares de *Meccus pallidipennis* del tercer estadio sin alimentar. Estos organismos se obtuvieron de la colonia mantenida en el laboratorio de Vectores y Plagas de la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de Puebla, colonia que es mantenida desde el año 2000. Dichos organismos son alimentados con sangre de mamífero cada dos semanas a una temperatura de  $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , y a una humedad relativa de  $50 \pm 5\%$ . Se utilizaron ninfas del tercer estadio porque es la población con mayor estabilidad dentro de la colonia (Martínez-Ibarra et al., 2012; Ibarra-Cedeño et al., 2012).

### OBTENCIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

La cepa de *Beauveria bassiana* se obtuvo a partir de un organismo colectado en San Juan Tlapehuala, Jonotla Puebla. El método utilizado para el aislamiento fue por dilución seriada (Jiménez, 2009), el cual se detalla a continuación: Se coloca un organismo cubierto con las esporas del hongo, en un recipiente conteniendo 10 ml. de agua destilada estéril con 0.01% de Tween 80 (nombre comercial del polioxietileno (20) sorbitanmonooleato, o polisorbato 80, es un aditivo alimentario y farmacéutico con acción detergente que se utiliza para estabilizar y emulsionar las grasas o aceites en soluciones acuosas). La suspensión resultante se agita por 1 minuto para que las conidias se desprendan del cuerpo del insecto. Lo que resulta de la mezcla es una suspensión del inóculo más otras partículas; a esta suspensión será llamada solución madre (Jiménez, 2009).

A partir de la solución madre, se prepararon diluciones en serie ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ). La primera dilución ( $10^{-1}$ ) se obtuvo transfiriendo con una pipeta estéril un ml. de la solución madre a un tubo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de Tween 80, éste se agita de manera vigorosa durante 1 minuto,

luego se toma un ml de esta suspensión y se coloca en otro tubo de ensayo que contiene 9 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de Tween 80, obteniendo así la segunda dilución. Esta operación se repite varias veces hasta lograr obtener una serie de diluciones ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ). Para realizar la siembra del hongo se utilizaron las últimas diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ); esto se hizo principalmente para reducir los riesgos de contaminación con otros microorganismos.

Posteriormente se sembraron las esporas en cajas petri utilizando Agar Dextrosa Saboraud (ADS) agregándole antibiótico penicilina, cloranfenicol para inhibir contaminación bacteriana. En el caso de hongos contaminantes se realizó una limpieza del cultivo, eliminando las colonias del contaminante o realizando una nueva siembra. Si el contaminante ha cubierto todo el cultivo, el plato fue eliminado. Después de realizar la inoculación, las cajas petri se colocaron en una estufa a temperatura de 28° C, durante un tiempo de 6 días. A fin de realizar limpieza de los contaminantes y darle seguimiento al cultivo, se realizaron observaciones cada 24 horas hasta la cosecha de las conidias (Monzón, 2001).

El inóculo se obtuvo raspando cuidadosamente de la superficie del medio de cultivo hasta obtener un polvo de conidias del hongo. Este se colocó en 60 ml de agua destilada estéril, para formar una suspensión de conidias, que deberá tener una concentración aproximada de  $1 \times 10^8$  conidias/ml. El número y la concentración de conidias/ml. se calcularon mediante el conteo en un hematocitómetro (cámara de Neubauer; Hausser Scientific, Horsham, PA.).

Por otro lado el bioinsecticida METAPLUS® se obtuvo de la empresa AFAO® en el estado de polvo humectable que tiene vehículo diatomita. La composición indicada del bioinsecticida es la siguiente:  $1.75 \times 10^{12}$  esporas por gramo de *Metarhizium anisopliae* y  $0.25 \times 10^{12}$  esporas por gramo de *Beauveria bassiana*.

## BIOENSAYOS

Se generaron dos bioensayos, uno para evaluar Metaplus® y otro para *Beauveria bassiana* AFAO IX-4, ambos siguieron la misma metodología para evaluar la mortalidad durante 15 días: El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con 3 repeticiones por tratamiento. Como unidad experimental se considerará cada recipiente de cría de 250 ml. de plástico opaco, donde se depositaron 20 ninfas de *Meccus pallidipennis* del tercer estadio (N3) sobre papel filtro (Tabla 1).

Se aplicaron ambas formulaciones de hongos entomopatógenos en dosis nominales de  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{12}$ , conidias/ml. El volumen aplicado por tratamiento fue de 2.0 ml de suspensión. A los controles se les aplicó agua destilada estéril más Tween 80 al 0.05%, esta metodología servirá para determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>). Es importante mencionar que a pesar de que Metaplus® es una formulación comercial no se cuenta con una dosis media recomendada para el control biológico de *Meccus pallidipennis* ya que el uso que ha tenido es principalmente agrícola.

Concentración de Conidias	Ejemplares por cada Bioensayo	Número de repeticiones	Total de Ejemplares
$1 \times 10^{12}$	20	3	60
$1 \times 10^{10}$	20	3	60
$1 \times 10^8$	20	3	60

**Tabla 1.** Concentración de conidios de *Beauveria bassiana* AFAO IX-4 y Metaplus y ejemplares utilizados para la obtención de la CL<sub>50</sub> en *Meccus pallidipennis*.

Después de la aplicación de las formulaciones los organismos fueron llevados a una cámara ambiental ubicada en el Centro de Agroecología y Ambiente del Instituto

de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde fueron mantenidos a una temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa del 50%.

La mortalidad se registró diariamente y se retiraron los organismos muertos durante 15 días que es el tiempo común entre alimentación de los organismos para disminuir el impacto de los decesos por inanición.

La evaluación se realizó con un microscopio estereoscópico. Las ninfas muertas sin evidencia de micosis se ubicarán en una cámara húmeda para determinar la presencia o no de algún hongo.

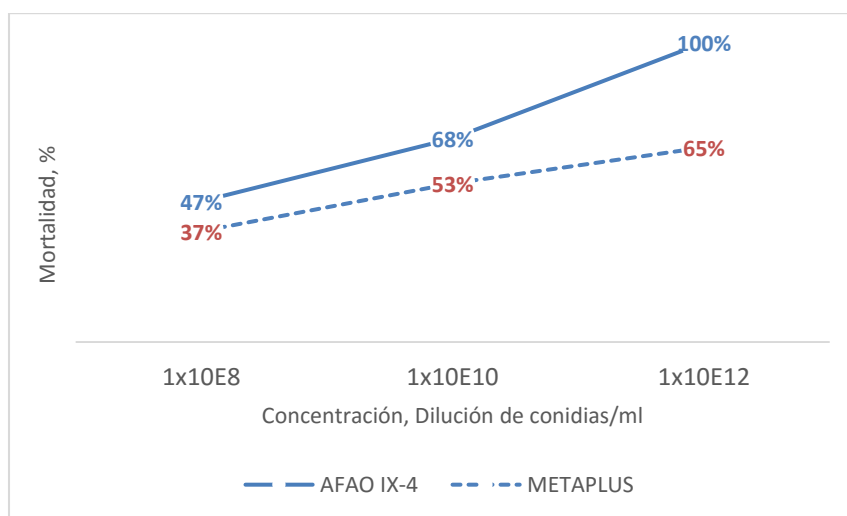
### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos de ambos bioensayos se evaluarán con una prueba de Tukey  $p < 0.05$  para buscar diferencias significativas entre los tratamientos.

Los datos obtenidos en las evaluaciones de los bioensayos serán sometidos a un análisis Probit (Finney, 1978) para calcular la  $CL_{50}$  y de esta manera identificar la concentración del bioinsecticida.

## 5. RESULTADOS

Cuando las ninfas *del tercer estadio* de *Meccus pallidipennis* fueron tratadas con concentraciones seriales ( $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^8$ ) de las formulaciones realizadas a partir de Metaplus® y *Beauveria bassiana* AFAO IX-4 se pudo observar una mayor mortalidad en los bioensayos practicados con *B. bassiana* AFAO IX-4 (Figura 6).



**Figura 6.** Valores de la concentración de las suspensiones aplicadas de Metaplus® y *B. bassiana* AFAO IX-4 y el porcentaje de mortalidad de *Meccus pallidipennis*.

Los resultados de la mortalidad acumulada por cada dosis de Metaplus® aplicada a *Meccus pallidipennis* fueron necesarios para calcular la concentración letal media ( $LC_{50}$ ) y se muestran en la tabla 2. La Concentración media letal ( $LC_{50}$ ) a 15 días de Metaplus® sobre *Meccus pallidipennis* encontrada fue de  $1.023 \times 10^{10}$  conidias/ml con límites de confianza de  $1.452 \times 10^8$  -  $1.85 \times 10^{13}$ .

Concentración de Conidias	Mortalidad 15 días	% de Mortalidad Total
$1 \times 10^{12}$	39	65.0
$1 \times 10^{10}$	32	53.0
$1 \times 10^8$	7	11.7

**Tabla 2.** Mortalidad acumulada obtenida con tres diferentes concentraciones de Metaplus® en *Meccus pallidipennis*.

El mayor número de decesos utilizando Metaplus® se dieron al utilizar la concentración  $1 \times 10^{12}$  donde se registró el deceso de 39 organismos (65% de mortalidad acumulada). El menor efecto entomopatogénico fue con la concentración  $1 \times 10^8$  al identificarse 7 muertes (11.7% de mortalidad acumulada) (Figura 7).

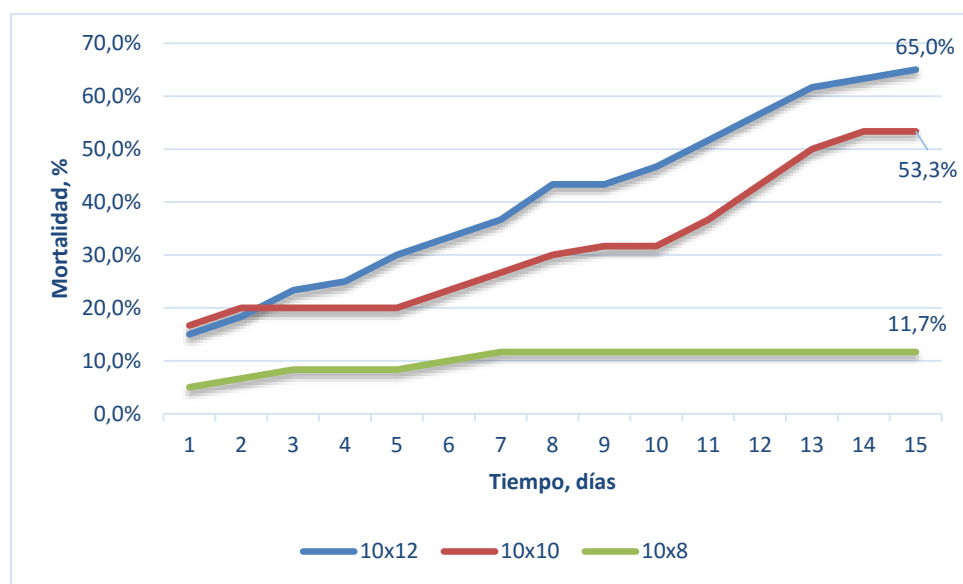


Figura 7. Mortalidad de *Meccus pallidipennis* con Metaplus®

Los resultados de la mortalidad acumulada por cada dosis de *Beauveria bassiana* AFAO-IX aplicada a *Meccus pallidipennis* fueron necesarios para calcular la concentración letal media ( $LC_{50}$ ) y se muestran en la tabla 3. Los datos no fueron suficientes para poder hacer el cálculo de la dosis letal media ( $LC_{50}$ ).

Concentración de Conidias	Mortalidad 15 días	% de Mortalidad Total
$1 \times 10^{12}$	60	100
$1 \times 10^{10}$	41	68
$1 \times 10^8$	28	47

Tabla 3. Mortalidad acumulada obtenida con tres diferentes concentraciones de *Beauveria bassiana* AFAO IX-4 en *Meccus pallidipennis*.

La evaluación del bioinsecticida elaborado a partir de *Beauveria bassiana* AFAO IX-4 tuvo los siguientes resultados después de 15 días: La concentración que presentó una mayor mortalidad fue el  $1 \times 10^{12}$  con una mortalidad acumulada

del 100%, seguido por las concentraciones  $1 \times 10^{10}$  y  $1 \times 10^8$  con una mortalidad acumulada del 68% y 47% (Figura 8), la mortalidad de los grupos control fue inferior al 1%.

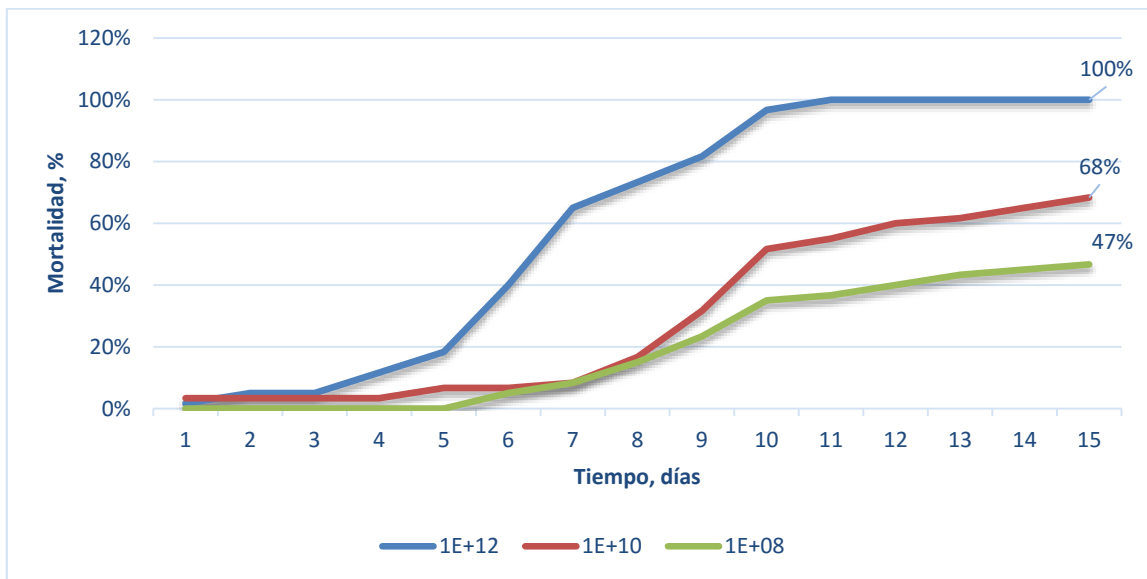


Figura 8. Mortalidad de *Meccus pallidipennis* con un bioinsecticida elaborado con *B. bassiana* AFAO IX-4.

En todos los organismos muertos se pudieron detectar síntomas de la penetración directa de hongos entomopatógenos como son la presencia de parálisis en miembros posteriores y puntos negros en el tegumento como una respuesta inmune.

Efecto de bioinsecticida de <i>Beauveria bassiana</i> en <i>Meccus pallidipennis</i>	Efecto de bioinsecticida de <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Beauveria bassiana</i> en <i>Meccus pallidipennis</i>
	
	
	

## 6. DISCUSIÓN

Los tratamientos con Metaplus® presentaron una mayor mortalidad entre los 3 y 9 días, lo cual es congruente con el comportamiento de un formulado con *Metarhizium anisopliae* utilizado contra varias especies de triatominos (Luz *et al.*, 1998a y *Junqueira et al.*, 2006) reportan en un estudio realizado con *B. bassiana* y *M. anisopliae* en *Triatoma infestans* que a una humedad relativa del 75% la mayoría de los aislados de *M. anisopliae* completan su ciclo de germinación en 12 horas, mientras que *B. bassiana* le toma en 24 horas. El tratamiento con Metaplus® alcanzó los mayores niveles de mortalidad acumulada después de 15 días y no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos con las concentraciones  $10^{12}$  y  $10^{10}$ . Sin embargo la humedad relativa para nuestro caso resulto de un 50% con los cuales se obtuvieron estos resultados. Villalba-Hernández y Zumaquero (2008) ensayaron en condiciones simulados de campo una cepa de *Beauveria bassiana* a temperatura ambiental y humedad relativa en rangos entre un 40 y 65% en el cual obtuvo resultados similares a los aquí obtenidos. Los insectos de su estudio mostraron apatía por la ingesta una vez que se comprobó la existencia de hongos emergiendo por espiráculos y proboscis, aspecto que si es coincidente en nuestro trabajo en condiciones de laboratorio.

Al utilizar el formulado AFAO IX-4 contra *M. pallidipennis* se observó que partir del cuarto día se incrementó la mortalidad de los individuos, hecho que se reafirma con el estudio realizado por Jamboos y Zumaquero (2014).

Las dosis nominales ( $10^{12}$  y  $10^{10}$ ) escogidas de la literatura funcionaron de forma efectiva y se obtuvo una mortalidad acumulada del 100%

Los resultados mostrados en la figura 6 nos permiten ver que existe una relación entre el aumento de las concentraciones y el aumento de la mortalidad máxima así como una reducción en el tiempo necesario para alcanzarla, hecho que también se afirma con los trabajos de Luz *et al.* 1998, Luz 2004, Leucona *et al.* 2001, Zumaquero *et al.* 2014 y Jamboos 2014. Estos trabajos entre muchos otros

destacan la actividad entomopatógena que *B. bassiana* y *M. anisopliae* presentan contra Triatominos.

Existen evidencias de la factibilidad que la micosis producida por un formulado de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* afecte a *Meccus pallidipennis* en condiciones de laboratorio. Se ha estudiado el efecto entomopatógeno de ambos hongos por separado, pero la interacción de ambos organismos en el combate a triatominos está poco estudiada. Durante el experimento realizado por Luz *et al.* (2004) se realizó un bioensayo tanto con *B. bassiana* como con *M. anisopliae* a poblaciones de *Triatoma infestans* y encontró individuos con crecimiento de ambos entomopatógenos. Sin embargo sólo reporta un individuo con crecimiento de ambos en su tegumento.

Luz *et al.* (2004) también reportan que en un sustrato al que le fueron aplicados preparados con ambos hongos, después de tres meses de aplicación no presentó una mortalidad provocada por *B. bassiana*, pero si por *M. anisopliae* en el cual se presentó entre 0 y 10%. No se detectó *B. bassiana* en cadáveres a los que se expuso un sustrato con aplicación después de dos o tres meses. Esto puede indicar *M. anisopliae* presenta un mayor efecto como organismo de control biológico a mediano plazo. No obstante sus limitaciones ambientales han sido reconocidas por Alatorre *et al.* (2000)

Luz *et al.* (2004) detectó cepas de *B. bassiana* y *M. anisopliae* que eran afines en sustratos utilizando a *Triatoma infestans* como carnada. Las pruebas en laboratorio demostraron que la gran mayoría de las cepas obtenidas por la técnica de carnada provocaban el 100% de mortalidad después de quince días, lo que nos indica el alto grado de especificidad que debe de existir para que una cepa sea exitosa para el manejo de vectores. Esta afirmación es también sostenida por el trabajo realizado por Jamboos y Zumaquero (2014). Lo anterior puede servir para explicar el por qué la LC<sub>50</sub> encontrada para Metaplust® es mayor que la reportada

por Luz et al. (1998) y por Zumaquero *et al.* (2014). Cabe destacar que a pesar de lo mencionado con anterioridad el producto alcanzó una mortalidad del 65%.

Es de gran importancia evaluar el impacto en el control de poblaciones de triatomíneos a mediano y largo plazo. Si bien los datos encontrados durante este trabajo son prometedores es necesario evaluar el efecto de ambos hongos en condiciones reales.

Los hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* son considerados más efectivos usualmente a una alta humedad relativa, el crecimiento micelial es favorecido entre 95% y 100% de humedad, pero las comunicaciones al respecto difieren en la importancia de la humedad ambiental en la infección de varios insectos (Akbar *et al.*, 2004), esta característica parecería limitar el crecimiento y las capacidad de infección de los hongos entomopatógenos. Sin embargo, las esporas son capaces de obtener la humedad micro ambiental necesaria a través de las membranas intertegumentarias y de esta manera ser capaces de infectar organismos en climas áridos (Bateman *et al.*, 1993).

Bukhari *et al.* (2011) encontraron que la patogenicidad de las esporas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en un medio seco se reducen considerablemente en un periodo de cinco días. Las esporas de *B. bassiana* pierden su efectividad después de estar en contacto con el agua por tres días, a las de *M. anisopliae* les pasa lo mismo después de 5 días. Además de las consideraciones en humedad y temperatura conocidas la radiación solar afecta la viabilidad de las conidias de ambos organismos (Daust y Perein, 1986). Es necesario desarrollar métodos de dispersión en campo que permitan tomar en cuenta los factores ambientales anteriormente expuestos a fin de incrementar el efecto entomopatógeno en los triatomíneos.

## 7. CONCLUSIONES

La dosis letal de Metapulus® es de  $1.023 \times 10^{10}$  conidias/ml y que alcanzó una mortalidad acumulada media

La formulación AFAO IX-4 es más virulenta que Metapulus®, al alcanzar una mortalidad de hasta el 100% en menor tiempo que una formulación comercial

Ambas formulaciones biológicas son buenos candidatos para ser utilizados en el control biológico de *Meccus pallidipennis*

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alatorre, R., Barrera, J. F., De La Rosa, W., & Toriello, C. (2000). Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *Journal of Economic Entomology*, 93(5), 1409-1414.
- Akbar, W., Lord, J.C., Nechols, J.R., Howard R.W. (2004). Diatomaceous earth increases the efficacy of *Beauveria bassiana* against *Tribolium castaneum* larvae and increases conidia attachment. *Journal Economic Entomology* 97 (2): 273–280
- Barrera, J. F. (2007). Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: *Teoría y aplicación del control biológico*. L. A. Arredondo-Bernal, y H. C. Rodríguez-del-Bosque. México: Sociedad Mexicana de Control Biológico (Capítulo 1. 2-13).
- Bassi, A. (1835) Del mal del segno calcinaccio o moscardino malattia che affligge i bachi de seta. 1. *Teórica*. Orcesi, Lodi.,
- Bern, C, Montgomery, SP. (2009). An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 49: e52–e54.
- Bartlett, B. R. (1956). Natural predators. Can selective insecticides help to preserve biotic control? *Agricultural Chemistry*, 11(2)
- Bereiter-Hahn, J., Matoltsy, A. G., & Richards, K. S. (1984). *Biology of the integument*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 611-625.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A. y Humber, R.A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101: 512-530.
- Bustillo, A. (2001). Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario *Uso de entomopatógenos en Colombia*. Sociedad Colombiana de entomología. Bogotá. 30-53.
- Bukhari, T. Takken, W. Koenraadt, C. (2011). Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae. *Parasites and Vectors* 4: 23. doi: 10.1186/1756-3305-4-23
- Clavijo, S. (2001). *Fundamentos de manejo de plagas*. Universidad central de Venezuela. Venezuela. 3-22.
- Champlin, F. R., y Gula, E. A. (1979). Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. *Applied Environmental Microbiology*. 37: 1122-1126.
- CHARNLEY, A. K. (1984). Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi; a speculative review. In *Invertebrate - Microbial Interactions*, pp. 229-

270. British Mycological Society Symposium 6. Cambridge: Cambridge University Press.
- Daoust, R. y Pereirn, R. (1986). Stability of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on Beetle-attracting Tubers and Cowpea Foliage. En *Environmental Entomology*. Dec 1986, 15 (6) 1237-1243; DOI: 10.1093/ee/15.6.1237
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pest by entomopathogenous fungi. En: *Annual review of entomology* (United States). (23): 409-442.
- Ferron, P. (1981). Pest Control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. En: *Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980* (ed. H.D. Burges), Academic Press, New York p.465-482.
- Finney, D. J. (1978). *Statistical method in biological assay*. 3rd ed. Charles Griffin and Col Ltd., London. 508 pp.
- Gascon J., Bern C., Pinazo M.J. (2010). Chagas disease in Spain, the United States, and other non-endemic countries. *Acta Tropica*. 115: 22–27.
- Gillespie, A. (1988). Use of fungi to control pest of agricultural importance. En: Burge, M. (Ed) *Fungi in biological control systems*. Manchester University Press, Manchester, England. 269 p.
- Groome H. (1998) Investigación agropecuaria y agricultura sustentable: Algunos interrogantes. En: *Genes en el laboratorio y en la fábrica*. A. Duán, J Riechmann eds. Trotta Editorial. Madrid.141-152.
- Guhl, F., Jaramillo. C., Vallejo. G.A., F. Cárdenas-A-Arroyo & A. Aufderheide. (2000). Chagas Disease and Human Migration. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 95 (4) 553-555.
- Jamboos J, (2014). *Evaluación de dos cepas de Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin como controlador biológico de Meccus pallidipennis Hemiptera: Reduviidae* (tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- Jiménez, E. (2009). *Métodos de control de Plagas*. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- Junqueira, L. G., Nunes Rocha M., Luz, C. (2006). Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycological Research*. pp. 485-492.
- Hackmann, R. H., (1984). Cuticle: Biochemistry, en: *Biology of the integument*, Volume I (J. Bereiter-Hann, A.G. Mateltsy y K.S. Richards, editores), Springer-Verlag, Berlin, pp. 583-610.

- Khachatourians, G.G. (1986). Production and use of biological pest control agents. *Trends in Biotechnology*. 12: 120-124.
- Khachatourians, G. G., & Qazi, S. S. (2008). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En: *The Mycota* (pp. 33–53). Berlin & Heidelberg: Springer-Verlag.
- Lecuona, R.E., Edelstein, J.D., Berretta, M.F., La Rossa F.R., Arcas J.A. (2001). Evaluation of *Beauveria bassiana* (hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 38:172-179.
- Lisansky, S. (1989). Biopesticides fall short of market projections. *Performance Chemistry*. 16: 396-387
- Luz, C., Fargues J (1998). Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus-killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol* 72: 97-103.
- Luz, C., Tigano, M., Silva, I., Cordeiro, C., Aljanabi, S., (1998a). Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 839-846.
- Luz, C., Silva, G., Cordeiro, C., Tigano, M., (1998b). *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) as a possible control agent for the vectors of Chagas disease. *J Med Entomol* 35: 977-979. Luz C, Silva IG, Magalhães BP, Cordeiro CMT, Tigano MS 1999. Control of *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) with *Beauveria bassiana*: preliminary assays on formulation and application in the field. *An Soc Entomol Bras* 28: 101-110.
- Luz, C., Rocha L, Nery G, Magalhaes B y Tigano M 2004 Activity of Oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in Peridomestic Areas in Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(2): 211-218.
- McGraw, E. A. & O'Neill, S. L. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Rev. Microbiol.* 11, 181–193 (2013).
- Mahr, S. University of Wisconsin- Madison Vol. IV No. 10. 1997.
- Magallón- Gastélum, E., N. C. , Magadaleno-Peñalosa., G. Katthain-Duchateau., F. Trujillo-Contreras., F.J. Lozano-Kasten & R.J. Hernandez-Gutierrez. 1998.
- Mallis, A. Handbook of Pest Control 8th ed. CIE Mallis, A. 1997. Handbook of Pest Control 8th ed. CIE. 1997.

- Maroni, M., Fait, A., Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975-1991 literatures. *Toxicology* 78:1-180. 1993.
- McCoy, C., Samson, R., Boucias, D., (1988). Entomogenous fungi, pp. 151-236. In C. M. Ignoffo and N. B. Mandava (eds.) *Handbook of natural pesticides, Vol V, microbial insecticides*, part A. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- MacLeod, D. (1963) Entomophthorales infections, In E. A. Steinhaus (ed.) *Insect pathology: an advanced treatise*, Vol. 2. Academic Press, New York, NY. pp. 189-231.
- Mnyone, L., Lyimo, I., Lwetoijera, D., Mpingwa, M., Nchimbi, N., Hancock, P., Russell, T., Kirby, M., Takken, W., Koenraadt, C., (2012). Exploiting the behaviour of wild malaria vectors to achieve high infection with fungal biocontrol agents. *Malaria Journal*, 11:87.
- Monzon, A. (2001). *Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica. 95-103.
- Moreno, R., Sánchez, L., Muñoz, L., Monteón V., Reyes, P., (2001) Cardiopatía chagásica en Tehuantepec: informe preliminar. *Archivos del Instituto de Cardiología de México*. 71:43-49. 2001.
- Muñoz-Calderón, A., Santaniello, A., Pereira, A., Yannuzzi, J., Díaz-Bello, Z., (2012). Susceptibilidad in vitro a nifurtimox y benznidazol de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas infectados por mecanismos de transmisión oral y vectorial. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*: 71:14–22.
- Nava, S., (2002). *Dinámica de infestación, de la broca del café Hypothenemus hampei (Coleoptera: SCOLITIDAE) Durante el Periodo 2001 en el municipio de Cuetzalan del progreso, Sierra norte del estado de Puebla*, Tesis, BUAP.
- Olea, N. (1996). Health effects of pesticides. En: *The International Conference on Regulatory Issues in crop protection and their implications for the Food Supply*. Shuman JM ed. Boston, 1997, 38-40.
- Parrón, T, Hernández, A., Villanueva, E., (1996). Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12 year retrospective study. *Forensic Science nt* 17:56-63.
- Pedrini, N., Mijailovsky, S., Girotti, J., Stariolo, R., Cardozo, R., Gentile, A., Juárez, P., (2009). Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 3(5): e434.

- Pinto-Dias, J. (2012). Tendencias sociales de la enfermedad de Chagas para las próximas décadas. *Salud Colectiva*; 8: 39-48.
- ProMED. (2012). *Enfermedad de Chagas oral, brote, trabajadores de mercado de alimentos. Venezuela: Caracas*. promedmail.org.
- Rabb, R. L. (1970). Introduction to the conference. *Concepts of pest management*. Proc. of a conference held at North Carolina State University at Raleigh. Raleigh, North Carolina: 1-5.
- Ramsey, J., Alvarez, E., Chávez, V., Danis, R., Rojo, J., (2000). Seroprevalence and risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors from the General Hospital, México City. En: *XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 25-28*; Cartagena, Colombia.
- Ramsey, J., Tello, A., Pohls, J., (2001). *Iniciativa para la vigilancia y el control de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana*. Instituto nacional de salud pública. 217.
- Rassi, A., Rassi, A., Marin, J., (2010). Chagas disease. *Lancet*. 375:1388–1402.
- Rodríguez, M., Ulloa, A., Ramsey, J., (2008). *Manual Para La Vigilancia y El Control Del Paludismo En Mesoamérica*. 1. ed. México: INSP.
- Roberts, D. W., (1981). Toxins of entomopathogenic fungi, pp., 441-446. In H. D. Burges (ed.), *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, London, UK. .
- Samson, R. A., Evans, H. C., Latgé, J., (1988). *Atlas of entomopathogenic fungi*. Berlin: Springer-Verlag. 128-139.
- Salazar-Schettino, P., Rojas-Wastavino, G., Cabrera-Bravo, M., Bucio-Torres, M., Martínez-Ibarra, J., Monroy-Escobar, M., Rodas-Retana, A., Guevara-Gómez, Y., Vences-Blanco, M., Ruiz-Hernández, A., Torres-Gutiérrez, E., (2010). Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas en México. *Journal of the Selva Andina Research Society*. 1:57-80.
- Salazar-Schettino, P., Bucio, J., Cabrera, M., Bautista, J., (1997). First case on natural infection in pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in México. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 92 (4) 499-502.
- Shahid, A., Rao, A., Bakhsh, A., Husnain, T., (2012). Entomopathogenic fungi as biological controllers: new insights into their virulence and pathogenicity. *Archives of Biological Sciences* 64: 21–42.

- Smith, R.F. y Allen, W.W., (1954). Insect control and the balance of nature. *Scientific American* 190: 38-92.
- Smith, R. F. y Reynolds. H. T., (1966). Principles, definitions and scope of integrated pest control. Proc. FAO Symposium on Integrated Pest Control 1 (11-17).
- Schofield, C.J., (1994). *Triatominae: Biología y Control*. Zeneca Public Health. 71.
- Tanada, Y. y Kaya H. K., (1993). *Insect pathology*. Academic Press, Inc., New York, NY.
- Tay, J., (1980). *La Enfermedad de Chagas en la República Mexicana*. Salud Pública de Mexico 22:409-450. 1980.
- Velasco-Castrejón, Ó, & Rivas-Sánchez, B., (2008). Apuntes para la historia de la enfermedad de Chagas en México. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 65(1), 57-79.
- Velasco-Castrejón, O. (1991). *La enfermedad de Chagas*. Publicación técnica del instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE). México. 25.
- Vicentini, S., Faria, M., Oliveira, M., (2001). Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay method. *Neotrop. Entomol.*, vol.30, no.1, 97-103.
- Vidal-Acosta, V., Ibáñez-Bernal, S., Martínez-Campos, C., (2000). Infección Natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública de México*. 42:496-503. 2000.
- VINING, L.C., KELLEHER, W.J., SCHWARTING, A.E., (1962). Oosporein production by a strain of *Beauveria bassiana* originally identified as *Amanita muscaria*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.8, 931-933.
- Ware, G.W., (1984). *The Pesticide Book*. 4th ed. Thomson Publications, Fresno, CA. 386.
- WHO, (2002). Expert Committee on Control of Chagas Disease. *Control of Chagas disease*. Recuperado de <http://apps.who.int/iris/handle/10665/42443>
- Zárate, L.G., Zárate, R.J., (1985). A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *International Journal of Entomology*. 27:102-127.
- Zavala-Ramírez, M., (2005). *Evaluación de la virulencia de 16 aislados del hongo entomopatógeno Metharhizium anisopliae var. anisoplia en Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenebrionidae)*. Tesis de Licenciatura, UAM-Xochimilco

- Zimmerman, G., (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*. 17: 879-920
- Zumaquero-Rios, J.L., López-Tlacomulco, J.J., Rojas, G.R., Sansinenea, E., (2014). Lethal effects of a Mexican *Beauveria bassiana* (Balsamo) strain against *Meccus pallidipennis* (Stal). *Brazilian Journal of Microbiology*. 45,551–557.