

## EVALUACIÓN DEL GRADO DE SEGURIDAD DEL HONGO *Beauveria bassiana* UTILIZADO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE INSECTOS PLAGA

### EVALUATION OF THE DEGREE OF SAFETY OF *Beauveria bassiana* FUNGUS USED FOR BIOLOGICAL CONTROL OF PEST INSECTS

Sara Isabel Tapias<sup>1</sup> y Jenny Dussán<sup>2</sup>

#### Resumen

El uso de bioinsecticidas se ha incrementado a nivel nacional. Un caso concreto es la producción de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café ocasionada por *Hypothenemus hampei*. En Colombia, el hongo *B. bassiana* es producido a nivel industrial o en forma artesanal; esta última, realizada por los caficultores en sus propias fincas, mediante una tecnología muy sencilla, económica y eficiente, con recursos de fácil consecución. Ambas tecnologías permiten obtener un buen bioinsecticida, de alta calidad, por su elevada concentración de conidios, y por la capacidad, superior al 90%, de causar la muerte de la broca. Debido a la amplia aplicación de este hongo es necesario establecer el grado de seguridad que sobre animales y hombre pueda tener, mediante el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda. Por este motivo se realizaron cinco pruebas para evaluar el grado de seguridad de tres cepas de *B. bassiana* (9002, 9205 y 9218), tres de ellas de tipo oral, pulmonar y sistémico, realizadas en ratones, y dos de irritación dérmica y ocular, realizadas en conejos. Los resultados obtenidos en tres de las pruebas de toxicidad, para las tres cepas de *B. bassiana* probadas, mostraron en los ratones 99.9% de comportamiento normal-activo; 100% de normalidad a nivel de piel, pelo, extremidades y mucosas; aumento de peso corporal a través del tiempo; 100% de normalidad en los órganos analizados y, además, la no recuperación del hongo a partir de los mismos. En cuanto a la prueba de irritación dérmica se obtuvo un índice de irritación igual a cero acompañado de 100% de normalidad en piel, y en la prueba de irritación ocular un índice de irritación mayor (IOM) de 0.5, considerado como no irritante, con 99.96% de no alteración. Con base en estos resultados se puede concluir que las tres cepas de *B. bassiana* evaluadas (9002, 9205 y 9218) no producen efectos tóxicos de tipo agudo ni efectos de irritación en los animales blanco probados, por lo que se podría considerar que presentan una acción similar en humanos.

**Palabras clave:** pruebas de toxicidad, control biológico, *Beauveria bassiana*.

#### Abstract

The use of bioinsecticides has increased at a national level, a concrete case is the production of the *Beauveria bassiana* fungus used for the control of the coffee bean borer *Hypothenemus hampei*. In Colombia, *B. bassiana* fungus is produced at an industrial level or in an artisanal form. The latter is produced by the coffee growers on their own farms, by using very simple technology, which is economical and efficient and easily aquired. Both technologies obtain a good bioinsecticide, of high quality, because of their high concentration of conidia and a capacity superior to 90% of killing the coffee bean borer *H. hampei*. Due to the high application of the this fungi, its necessary to establish a degree of safety that the *B. bassiana* fungus may have on animals and on humans by means of developing acute toxicity tests. For this reason five test were developed to determine the degree of safety on three strains of *B. bassiana* fungus (9002, 9205 and 9218); three test were oral, pulmonary and sistemic, which were realized in mice, and two test were of dermic irritation and ocular, wich were performed on rabbits. The results obtained in three of the toxicity test, for the three strains of *B. bassiana* fungus, exhibited in the mice 99.9% of normal-active behavior; 100% of normality at level of skin, hair, extremities and mucoses; an increas in corporal weight through time; 100% of normality in the organs analized and also ont the non-recuperation of fungus in the organs themselves. The testing of dermic irritation was obtained an index equal zero with 100% of normality in skin and an index of major irritation (IOM) 0.5, its considered not irritating with 99.96% of non-alteration. With these results,

Recibido: agosto de 1999; aprobado para publicación: noviembre de 1999.

<sup>1</sup> Universidad de los Andes, Santafé de Bogotá DC, Colombia. E-mail: sarahtapias@yahoo.com.

<sup>2</sup> Directora del Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC), Universidad de los Andes, Santafé de Bogotá DC, Colombia.

it can be concluded that the strain three of *B. bassiana* fungus testing (9002, 9205 and 9218) does not produce toxic effects of acute type and not irritation in model animals whereas the results can show an similar human action level.

**Key words:** toxicity testing, biological control, *Beauveria bassiana*.

## INTRODUCCIÓN

*B. bassiana* (Deuteromycotina-Hyphomycetes) es un hongo de amplia distribución en la naturaleza, y es aislado del suelo y de insectos. Sus condiciones de crecimiento son poco exigentes, con una temperatura óptima de 25 a 30 °C y un pH de 5.7 a 5.9. Los medios para su crecimiento *in vitro* deben tener una fuente de carbono como la glucosa o una fuente de almidón. Adicionalmente, produce una gran variedad de enzimas entre las que se destacan lipasas, proteasas, ureasas, amilasas, quitinasas, celulasas, y 1-2 beta glucanasas (Domsch y Gams, 1993); además, produce sustancias tóxicas como beauvericina, beauverina, bassianólido, isarolido, ácido oxálico (Kucera y Samsinakova, 1968; Burges, 1981) y pigmentos como benzoquinona, oosporeína, tenelina y bassianina (Domsch y Gams, 1993).

*B. bassiana* fue reportado por primera vez en Colombia en Ancuya, Nariño, en 1989, infectando la broca del café, *H. hampei* (Antía, 1992), y desde entonces ha sido utilizado para el control biológico de este insecto (orden Coleoptera), así como para el control de insectos de los órdenes Lepidoptera, Hymenoptera e Hymenoptera, destacándose los que atacan el ciprés, la palma de aceite, el plátano, los cereales, los cítricos y el pasto, así como también para el control del gusano blanco de la papa y el nemátodo del nudo radical del café, entre otros (Calvache, 1993; Posada, 1993; Varela, 1993; Peña, 1997; Leguizamón y Padilla, 1997).

La seguridad para el empleo de *B. bassiana* en el control biológico aún no ha sido claramente establecida en Colombia (Posada, 1993). Se ha encontrado que el hongo es capaz de producir alergias respiratorias (Posada, 1993), procesos infecciosos tipo queratitis (Sachs *et al.*, 1985;

Kwon-Chung y Bennett, 1992) y se ha logrado recuperar de aspirados bronquiales (Rippon, 1982, y Kwon-Chung y Bennett, 1992). El propósito del siguiente estudio fue establecer el grado de seguridad de tres cepas de *B. bassiana* utilizadas para el control de insectos plaga, mediante el desarrollo de pruebas de toxicidad aguda.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas.** *B. bassiana* No. 9002, aislada de *H. hampei* en Ancuya (Nariño); *B. bassiana* No. 9205, aislada de *Diatraea saccharalis* en Candelaria (Valle del Cauca); *B. bassiana* No. 9218, aislada de *Cosmopolites sordidus*.

Estas tres cepas fueron proporcionadas por Cenicafé (Chinchiná, Caldas) y son utilizadas para el control biológico de *H. hampei*, con una patogenicidad superior al 90%. Las cepas fueron conservadas en agua destilada estéril a temperatura ambiente.

Como control de infectividad se utilizó la cepa de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* código L-207, proporcionada por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud.

**Animales.** Ratones cepa BALB/c, machos y hembras, de 41 días de nacidos, y conejos Nueva Zelanda, machos y hembras, de aproximadamente dos meses de edad.

**Preparación de inóculos.** Se utilizaron dos tipos de inóculos: uno viable y otro no viable. A partir de las cepas conservadas en agua se realizó un pase al medio papa dextrosa agar (PDA) + cloranfenicol 0.05 g/ml, el cual se incubó a 25 °C por ocho días; se realizó tanto la observación

macroscópica como la microscópica de la colonia para confirmar género y especie (Domsch y Gams, 1993), y luego se realizó un pase al medio natural de arroz contenido en botellas de vidrio (Antía, 1992, y Boletín Informativo sobre la Broca del Café, Brocarta, 1993), el cual se incubó a 25 °C por veintiún días. Al término de la incubación se le adicionaron 10 ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0.1% por cada botella de medio natural de arroz, se mezcló vigorosamente y se realizó una filtración (método utilizado para separar el hongo de su sustrato cuando se realiza producción artesanal) (Antía, 1992); al filtrado obtenido se le realizó conteo de conidios en cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^8$  conidios/ml.

Para el caso del inóculo no viable, cuando se obtuvo la suspensión con la concentración requerida, ésta se llevó al baño de maría a 77 °C por ocho horas (Harrell, 1976).

Para el control de infectividad la concentración utilizada fue  $1 \times 10^8$  conidios/ml de *C. neoformans* var. *neoformans* (Kown-Chung *et al.*, 1992). El control blanco fue solución salina fisiológica estéril a 0.85%.

### Pruebas de toxicidad aguda

**Oral.** La prueba se realizó con base en el procedimiento descrito por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, 1996), modificando el número de animales utilizados (OPS, 1980; Clu, 1991) y el tiempo de observación (Hall y Zimmermann, 1982, y Ministerio de Salud, (Minsalud, 1996). Además, se llevó a cabo eutanasia de los animales en dos tiempos (21 y 41 días) y siembra directa y en dilución de los órganos en medio PDA + cloranfenicol 0.05 g/ml. El inóculo de *B. bassiana* (9002, 9205 y 9218) fue suministrado a dieciocho ratones machos y dieciocho hembras por cada cepa de prueba, manteniéndose una relación de 2 ml por cada 100 g de peso corporal, mediante entubación esofágica (EPA, 1996). El inóculo blanco fue suministrado a ocho ratones por cepa y el control de infectividad a diez ratones, manteniéndose la misma relación de 2 ml por cada 100 g de peso corporal.

**Pulmonar.** La prueba se realizó con base en el procedimiento descrito por la EPA (1996), modificando el número de animales utilizados (OPS, 1980; Clu 1991) y el tiempo de observación (Hall y Zimmermann, 1982). Además, se llevó a cabo eutanasia de los animales en dos tiempos (21 y 41 días) y siembra directa y en dilución de los órganos en medio PDA + cloranfenicol 0.05 g/ml. El inóculo de *B. bassiana* fue suministrado a veintiún ratones machos y veintiuna hembras por cada cepa de prueba, manteniéndose una relación de 2 ml por cada 100 g de peso corporal, intratraquealmente (EPA, 1996). El inóculo blanco fue suministrado a ocho ratones por cepa y el control de infectividad a ocho ratones, manteniéndose la misma relación de volumen.

**Sistémica.** La prueba se realizó con base en el procedimiento descrito por la EPA (1996), modificando el número de animales utilizados (OPS, 1980; Clu, 1991) y el tiempo de observación (Hall y Zimmermann, 1982). Además, se llevó a cabo eutanasia de los animales en dos tiempos (21 y 41 días) y siembra directa y en dilución de los órganos en medio PDA + cloranfenicol 0.05 g/ml. El inóculo de *B. bassiana* fue suministrado a diecisiete ratones machos y diecisiete hembras por cada cepa de prueba, manteniéndose una relación de 2 ml por cada 100 g de peso corporal, peritonealmente, siendo ésta la más recomendada (Matsumura, 1976; Hall y Zimmermann, 1982; Lumley *et al.*, 1990; The British Pharmacopeia, 1993; The United States Pharmacopeia, 1994; EPA, 1996). El inóculo blanco fue suministrado a seis ratones por cepa y el control de infectividad a diez ratones, manteniéndose la misma relación de volumen.

**Prueba de irritación dérmica.** El método fue realizado como lo sugiere The United States Pharmacopeia (1994) y Pradeau (1998). El procedimiento consistió en delimitar una zona a lado y lado del lomo del conejo, para luego eliminar el pelo de dicha zona y aplicar en forma tópica 1 ml de inóculo viable de cada una de las

cepas de *B. bassiana* de prueba, en una concentración de  $5 \times 10^8$  conidios/ml en uno de los lados, utilizando el otro como control. La aplicación tópica fue realizada en dos conejos (uno de cada sexo) por cepa de prueba.

**Prueba de irritación ocular.** La prueba se realizó con base en el método de Drazier (citado por Balls *et al.*, 1983; Hall y Zimmermann, 1982), modificando el número de animales y la cantidad de inóculo (Minsalud, 1996; Pradeau, 1998). El procedimiento consistió en aplicar 0.1 ml de inóculo viable de cada una de las cepas de *B. bassiana* de prueba en una concentración de  $5 \times 10^8$  conidios/ml en el saco conjuntival de uno de los ojos de cada conejo, utilizando el otro como control, al cual se le aplicó solución salina fisiológica al 0.85%.

### Evaluación de resultados

Para las pruebas de toxicidad oral, pulmonar y sistémica las lecturas fueron realizadas por periodos de 21 y 41 días con observaciones físicas diarias, que comprendieron comportamiento, calificado como normal-activo, sensible, pasivo, agresivo. Se observaron también la piel y el pelo (para detectar casos de edema, eritema y alopecia), las extremidades (para detectar casos de dermatitis o lesiones), las mucosas (para detectar enrojecimiento o inflamación) y el peso corporal (registrado semanalmente). Además se realizaron observaciones de los órganos macroscópica y microscópicamente con solución de KOH al 20% según la prueba de toxicidad realizada (oral: hígado y pulmón; pulmonar: pulmón y tráquea; sistémica: hígado, pulmón y riñón). Estas observaciones fueron comparadas con el control blanco y el control de infectividad. Se realizó también siembra directa y en dilución de los órganos en medio de PDA + cloranfenicol 0.05 g/ml, con el objeto de recuperar el hongo inoculado y así comprobar un efecto de tipo sistémico. En la prueba de irritación dérmica las lecturas fueron a las 24, 48 y 72 horas, registrando la formación de eritema, edema, necrosis e inflamación, para luego determinar el índice de irritación dérmica (The United States

Pharmacopeia, 1994; Pradeau, 1998). Para la prueba de irritación ocular las lecturas fueron a 1, 24, 48 y 72 horas, al día 4 y al día 7; las observaciones consistieron en registrar alteraciones a nivel de conjuntiva, iris y córnea, esta última con la ayuda de una solución de fluoresceína sódica al 2% preparada al momento de la lectura; y fueron calificadas con una escala para luego determinar el índice de irritación ocular mayor (IOM) (Pradeau, 1998).

### Análisis estadístico

Para las observaciones físicas de los animales y la recuperación del hongo a partir de los órganos de los animales inoculados se utilizó la prueba estadística denominada Razón de Verosimilitud de  $X^2$  o prueba G (Zar, 1996). Esta prueba es un método útil para el análisis de datos en escala nominal, ya que éstos son conteos de características o eventos. El nivel de significancia fue 0.05 (\*) y 0.01 (\*\*). Para el caso de los pesos corporales obtenidos se realizó un análisis de varianza factorial (Wayne, 1993; Zar, 1996) con niveles de significancia de 0.05 (\*) y 0.01 (\*\*), acompañado por una prueba de comparaciones múltiples de Duncan. Para las pruebas de irritación los análisis de los índices se acompañaron con la prueba G.

## RESULTADOS

### Pruebas de toxicidad oral-pulmonar-sistémica

**Comportamiento.** En la prueba de toxicidad oral se presentaron en los animales cuatro observaciones catalogadas de tipo sensible y tres de tipo agresivo. De las cuatro sensibles, tres fueron ocasionadas por la cepa 9205 (dos con inóculo viable, una con inóculo blanco) y una de la cepa 9002 (inóculo viable).

De las tres observaciones catalogadas como de tipo agresivo, dos fueron de la cepa 9218 (inóculo blanco e inóculo viable) y una de la 9002 (inóculo viable). Las demás observaciones fueron todas de tipo activo-normal (tabla 1).

En la prueba de toxicidad pulmonar el comportamiento de los animales inoculados con las cepas de *B. bassiana* de prueba (9002, 9205 y 9218) fue normal-activo. Se presentaron 42 observaciones de tipo pasivo y dos de tipo agresivo, las cuales correspondieron al control de infectividad.

En la prueba de toxicidad sistémica todas las observaciones fueron de tipo activo-normal (tabla 1).

Las tres cepas de *B. bassiana* probadas (9002, 9205 y 9218) no afectaron el comportamiento de los animales cualquiera que fuera la técnica de inoculación, ya que se obtuvo 99.90% de comportamiento activo-normal (tabla 1).

**Piel-pelo-extremidades-mucosas.** Todos los animales, tanto machos como hembras, tratados con las cepas de prueba, en forma de inóculos viable y no viable, presentaron 100% de normalidad en piel, pelo, extremidades y mucosas, en las tres pruebas de toxicidad (oral, pulmonar y sistémica).

**Peso corporal.** El peso corporal de los animales, tanto machos como hembras, inoculados con las cepas de prueba en los inóculos viable y no viable, presentaron aumento de peso a través del tiempo, en las tres pruebas de toxicidad (oral, pulmonar y sistémica).

No se observaron diferencias significativas entre los tipos de prueba realizada (oral, pulmonar y sistémica), ni tampoco entre los tipos de inóculo viable y no viable; pero sí se observaron diferencias significativas entre sexos y entre los tiempos de lectura. El tratamiento control de infectividad fue estadísticamente diferente a los demás tratamientos, lo cual se manifiesta por una disminución en el peso de los animales, tanto machos como hembras (tabla 2 y figura 1).

**Observaciones macroscópicas.** Los animales de ambos sexos inoculados con las cepas de prueba, en los inóculos viable y no viable, presentaron 100% de normalidad en el color y en la consistencia de los órganos analizados (hígado, pulmón, tráquea y riñón), en las tres pruebas de toxicidad realizadas (oral, pulmonar y sistémica).

Tabla 1. Relación entre el tipo de prueba de toxicidad aguda realizada y el comportamiento de los animales

		Comportamiento				
Prueba de toxicidad		Activo	Sensible	Pasivo	Agresivo	Total
Número de observaciones						
Oral	F	2.668	4	0	3	2.675
	%	29.52	0.04	0	0.03	29.59
Pulmonar	F	3.528	0	0	0	3.528
	%	39.03	0	0	0	39.03
Sistémica	F	2.833	0	0	0	2.833
	%	31.35	0	0	0	31.35
Total	F	9.029	4	0	3	9.036
	%	99.90	0.04	0	0.03	99.97

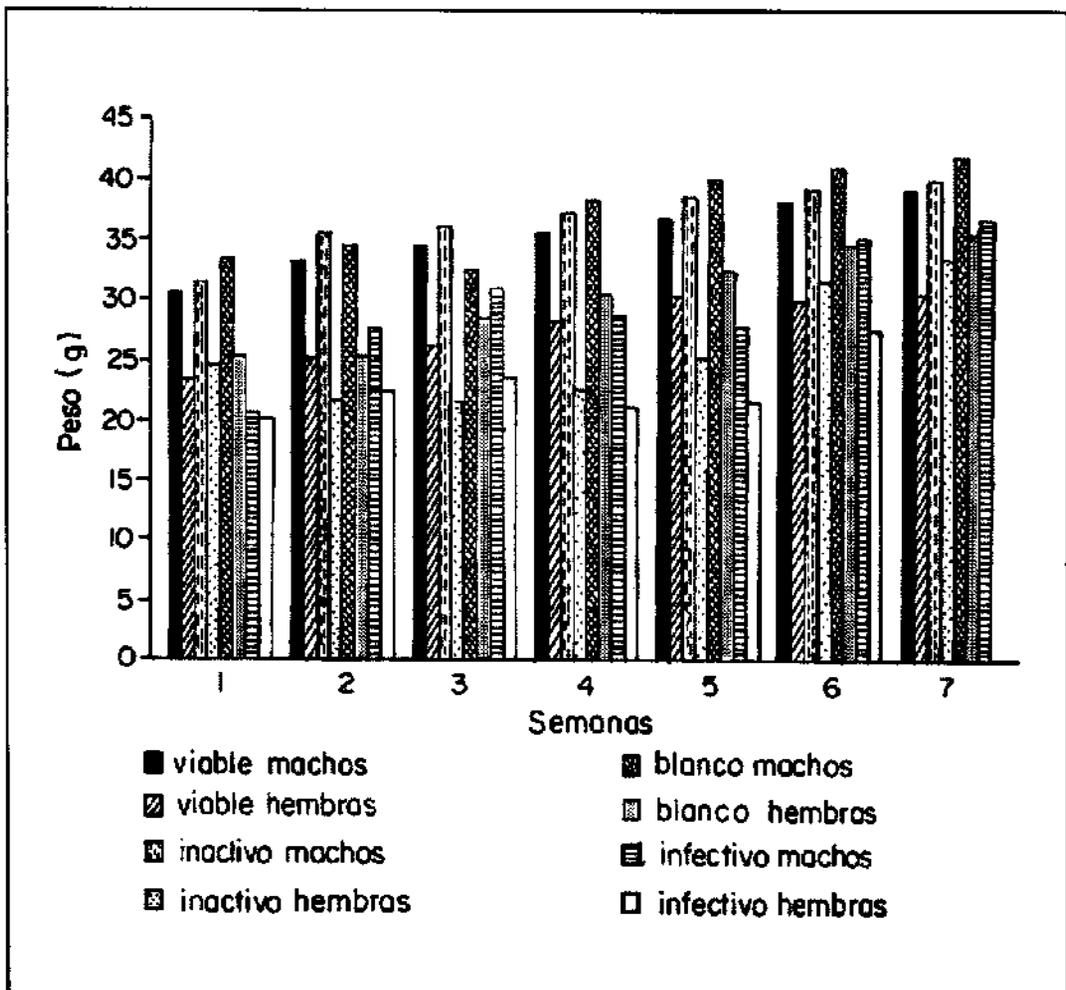
$X^2 = 98.184$ .  
 $p = 0.001$ .

F = número de lecturas.  
 % = porcentaje de las lecturas realizadas.

**Tabla 2.** Promedio (media) del peso corporal en gramos obtenido al final del periodo de observación en los animales inoculados con las cepas de prueba de *B. bassiana* y el control de infectividad

Factor cepa	Media	N	Duncan*
9002	29.8219	517	A
9205	29.4652	474	A
9218	29.7603	438	A
<i>Cryptococcus</i>	25.8619	113	B

\* Valores designados con letras iguales no presentan diferencias significativas entre sí; valores designados con letras diferentes presentan mediciones significativamente diferentes según la prueba de comparaciones múltiples de Duncan



**Figura 1.** Comportamiento del peso corporal en el tiempo. Cepa 9218. Prueba de toxicidad oral

comparados con el control blanco y con el control de infectividad. En este último se observaron alteraciones tanto en el color (el cual se tornó blanco) como en la consistencia de los mismos (blando, duro, absesos) (tabla 3).

**Observaciones microscópicas.** En los montajes con KOH al 20% de cada uno de los órganos analizados (hígado, pulmón, tráquea y riñón), en las tres pruebas de toxicidad, con los inóculos viable y no viable de las tres cepas de prueba, no se observaron esporas o formas miceliales, comparadas con el control blanco. Mientras que en el control de infectividad tratado con *C. neoformans* var. *neoformans* se observó la presencia de levaduras con su respectiva cápsula.

**Recuperación en cultivo.** No se recuperó el hongo *B. bassiana* a partir de siembras directas y de las diluciones de cada uno de los órganos analizados, en las tres pruebas de toxicidad, con los inóculos viable y no viable de las tres cepas probadas. En el control de infectividad se logró recuperar el hongo en todos los órganos, en las tres pruebas de toxicidad (tabla 4).

Todos los animales inoculados con las cepas de prueba de *B. bassiana* en los inóculos viable y no viable, en las tres pruebas de toxicidad, sobrevivieron al período de observación (21 y 41 días); por tanto, a todos se les realizó eutanasia. Los animales del control de infectividad, en su gran mayoría, murieron antes de finalizar el periodo de observación, y se pueden citar como ejemplos los siguientes: la hembra 3 y el macho 5, que murieron los días 29 y 32, respectivamente, en la prueba oral; las hembras 1 y 3, con los machos 1 y 4, que murieron los días 35 y 18, respectivamente, en la prueba pulmonar; y la hembra, con los machos 1, 4 y 5, que murieron los días 8 y 12, respectivamente, en la prueba sistémica.

### Prueba de irritación dérmica

No se presentaron alteraciones dérmicas tipo edema, eritema, inflamación ni necrosis en ninguno de los conejos tratados con las tres cepas de *B. bassiana*. Por tanto, el índice de irritación fue cero, acompañado de 100% de normalidad.

Tabla 3. Relación entre el tipo de cepa de *B. bassiana* probada y las observaciones macroscópicas de los órganos analizados

Cepa	Total	Color		Consistencia		
		Normal	Blanco	Normal	Blando	Duro
9002 F %	222 32.74	222 32.74	0 0.0	222 32.74	0 0.0	0 0.0
9205 F %	200 29.5	200 29.5	0 0.0	200 29.5	0 0.0	0 0.0
9218 F %	190 28.02	190 28.02	0 0.0	190 28.02	0 0.0	0 0.0
<i>Cryptococcus</i> F %	66 9.74	12** 1.77	54* 7.97	12** 1.78	46* 6.78	8* 1.18
Total F %	678 100	624 92.03	54* 7.97	624 92.04	46 6.78	8 1.18

Cepa x color:  $X^2 = 314.7251$ ,  
 $p = 0.001 (**)$  ( $p < 0.01$ ).  
 Cepa x consistencia:  $X^2 = 314.251$ ,  
 $p = 0.001 (**)$  ( $p < 0.01$ ).

\* = control de infectividad.  
 \*\* = control de infectividad - prueba oral.  
 F = número de lecturas.

**Tabla 4.** Recuperación del hongo *C. neoformans* var. *neoformans* (control de infectividad) a partir de órganos de los animales inoculados en cada una de las pruebas de toxicidad realizadas

Prueba de toxicidad	Sexo y No. del animal	Tipo de órgano	UFC/ml
Oral	Macho 2	Hígado	$1 \times 10^5$
	Hembra 2	Hígado	$2 \times 10^5$
Pulmonar	Macho 1	Pulmón	$50 \times 10^5$
	Hembra 1	Pulmón	$20 \times 10^5$
Sistémica	Macho 3	Riñón	$> 16 \times 10^3$
	Hembra 3	Riñón	$> 16 \times 10^3$

### Prueba de irritación ocular

No se presentaron alteraciones de tipo quemosis con lagrimeo en conjuntiva, opacidad en córnea, ni daño en iris, en los conejos tratados con las tres cepas de *B. bassiana*; sólo se presentó un ligero enrojecimiento en conjuntiva de la hembra inoculada con la cepa 9002, pero al determinar el índice de irritación mayor (IOM) éste fue 0,5, y al compararlo con los patrones (Pradeau, 1998) no se considera irritante. El porcentaje de normalidad en este caso fue 99.96%.

### DISCUSIÓN

El aumento en la utilización de *B. bassiana* para el control biológico, su facilidad de producción, la generalización y los reportes como agente causal de enfermedad (Rippon, 1982; Sachs *et al.*, 1985; Kown-Chung y Bennett, 1992; Posada, 1993) hicieron que el objetivo de este trabajo fuera desarrollar pruebas de toxicidad aguda para establecer el grado de seguridad de este hongo.

El comportamiento de tipo sensible y agresivo observado en los animales inoculados con las cepas de prueba de *B. bassiana* fue muy bajo (tabla 1) y se presentó tanto con el inóculo blanco como con el inóculo viable; por tanto, se podría considerar que dicho comportamiento se debió a causas ambientales, ya que los ratones son animales muy sensibles a cambios de temperatura

y humedad, requiriendo una temperatura entre 18 y 29 °C (promedio de  $24 \pm 1$  °C) y una humedad relativa de 30 a 70% (Harkness y Wagner, 1977; Saiz *et al.*, 1983; OPS, 1989).

Ninguna alteración en piel, pelo, extremidades y mucosas se presentó en los animales tratados con las cepas de prueba de *B. bassiana* como con el control de infectividad. En principio esto puede ocurrir, ya que algunas de las enfermedades ocasionadas por hongos no se manifiestan externamente (sólo en fases crónicas), siendo ésta una de las principales razones por las cuales se incluyó en la metodología la observación macroscópica y microscópica de los órganos y su posterior procesamiento para la recuperación del hongo inoculado.

En cuanto al peso corporal las diferencias significativas observadas entre los machos y las hembras es común, ya que por características fisiológicas y morfológicas los machos presentan un peso corporal mayor al de las hembras (Harkness y Wagner, 1977; Saiz *et al.*, 1983); además esto se corrobora con el hecho de que el peso corporal obtenido antes de inocular los animales (denominado peso inicial o peso cero), fue mayor en los machos que en las hembras, a pesar de que los animales pertenecían a la misma camada (los dos sexos) y tenían la misma edad (41 días de nacidos).

Las diferencias significativas de peso entre los ratones tratados con las cepas de prueba y el control de infectividad indican que si el microorganismo inoculado produce daño en el animal, esto se verá reflejado de alguna manera en el peso corporal (Clu, 1991), ya que el microorganismo (caso concreto de *C. neoformans* var. *neofomans*) una vez entra al organismo afecta uno o más órganos y esto a su vez altera todo el sistema fisiológico del mismo (Casadevall, 1998).

Durante todo el tiempo de observación, el cambio de peso de los animales inoculados con las cepas de *B. bassiana* de prueba fue en aumento, hecho que puede llevar a inferir que las cepas de *B. bassiana* probadas (9002, 9205 y 9218) no afectan en forma negativa el peso de los animales, lo que no ocurrió con el control de infectividad, en el cual sí se observaron casos drásticos de disminución de peso corporal.

Los resultados obtenidos en las observaciones macroscópicas y microscópicas y en las siembras directas y en dilución de los diferentes órganos analizados, permiten concluir que las cepas de *B. bassiana* probadas no afectan los órganos de los animales inoculados, comparados con el control de infectividad, en el que se observó cambio en los órganos y se logró la recuperación del hongo a partir de los mismos; esto también permite concluir que cada una de las técnicas realizadas (entubación esofágica, intratraqueal y peritoneal) para las pruebas de toxicidad oral, pulmonar y sistémica fueron adecuadamente realizadas.

Las pruebas de irritación dérmica y ocular por lo general son opcionales, pero en este caso fueron realizadas debido a que el método de aplicación de *B. bassiana* para el control de insectos plaga es por aspersión lo que genera la formación de aerosoles y aumenta la posibilidad de infección. Adicionalmente, las recomendaciones proporcionadas por el Ministerio de Salud (Minsalud, 1996) establecen que las pruebas de toxicidad aguda deben estar acompañadas por pruebas de irritación dérmica y ocular.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que las tres cepas de *B. bassiana* evaluadas (9002, 9205 y 9218) no producen efectos tóxicos de tipo agudo ni efectos de irritación en los animales blanco probados, por tanto pueden presentar una acción similar en humanos.

En cuanto a los estudios de seguridad con relación a agentes microbianos utilizados para el control de plagas a nivel internacional, se destacan los realizados por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Oficina de Evaluación Tecnológica (DTA), la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y el Instituto de Cooperación para la Agricultura (IICA), entre otras. La Agencia de Protección Ambiental es la que más estudios ha realizado a nivel toxicológico, mediante pruebas de toxicidad oral, pulmonar y sistémica, y pruebas de irritación ocular y dérmica, así como también pruebas de hipersensibilidad (EPA, 1996); con el fin de aprobar el uso de microorganismos a nivel comercial; caso concreto es el de la aprobación de la cepa *B. bassiana* ATCC 74040 (uso comercial por parte de Troy BioSciences Inc.) y la cepa *B. bassiana* GHA (uso comercial Mycotech) en 1995 (EPA, 1996).

## AGRADECIMIENTOS

A la doctora María Caridad de García, M.Sc., Profesora Asistente del Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC), por todos los aportes científicos y profesionales recibidos durante la ejecución de este trabajo; a la doctora Elizabeth Castañeda, Ph.D., Directora del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, por su aporte oportuno y su constante estímulo y apoyo ofrecidos; al doctor Fabio Gonzales, Médico Veterinario, por la orientación científica y profesional recibida; y a la doctora Patricia Vélez, del Centro de Investigaciones del Café (Cenicafé), por su gran colaboración al hacer el aporte de las cepas de *B. bassiana* utilizadas en este estudio.

## REFERENCIAS

- Antía O, Posada F, Bustillo A, Gonzales M.** 1992. Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Avances Tecnológicos*, No. 182. Cenicafé, Colombia.
- Balls M, Ridell R, Worden A.** 1983. Testing acute toxicity. *En: Animals and alternatives in toxicity testing*. London, Academic Press, pp. 2-27; 298-327; 337-366.
- Boletín informativo sobre la broca del café (Brocartas).** 1993. Federación Nacional de Cafeteros, No. 10. Colombia.
- Burges H.** 1981. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, London.
- Calvache H.** 1993. El control biológico de las plagas de la palma de aceite en Colombia. *Revista ICA*, pp. 204-216. Colombia.
- Casadevall A.** 1998. *Cryptococcus neoformans*. AMS Press, Washington DC.
- Cla F.** 1991. Conventional toxicity studies. *En: Basic toxicology fundamentals, target, organs, and risk assessment*. Washington DC, Editions Taylor & Francis, pp. 77-93; 327-343.
- Domsch K, Gams W.** 1993. *Compendium of soil fungi*. Edic. IHW Verlag. Vol. I. London.
- EPA.** 1996. Prevention, pesticides and toxic substances. Washington DC.
- EPA.** 1996. Biopesticide decision document *Beauveria bassiana* strain ATCC 74040. Washington DC.
- EPA.** 1996. Biopesticide *Beauveria bassiana* strain GHA. Washington DC.
- Hall R, Zimmermann G, Vey A.** 1982. Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticides. *Entomophaga* 27:121-127.
- Harkness J, Wagner J.** 1977. *Biología y clínica de conejos y roedores*. Acribia. Zaragoza.
- Harrell W.** 1976. Procedural manual for production of bacterial, parasitic reagents. Third ed, in Press. Atlanta, Georgia.
- Kucera M, Samsinakova A.** 1968. Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol* 12:316-320.
- Kwon-Chung K, Wickes B, Stockman L, Roberts G, Ellis D, Howard D.** 1992. Virulence, serotype and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gatti*. *Infection and Immunology* 60:1.869-1.874.
- Kwon-Chung K, Bennett J.** 1992. *Medical mycology*. Editores Lea & Febiger, Philadelphia.
- Leguizamón J, Padilla B.** 1997. Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control del nemátodo del nudo radical del café *Meloidogyne* sp. Memorias. XIX Congreso Nacional de Fitopatología. San Juan de Pasto, Colombia.
- Lumley J, Green C, Lear P, James J.** 1990. Handling, injection and collection of body fluids. London. Butterworths, pp. 17- 25; 64-79. *En: Essentials of experimental surgery*.
- Matsumura F.** 1976. Evaluación toxicológica en animales superiores. *En: Toxicological evaluation in higher animals toxicology of insecticides*. London, Edit Plenum Press, pp. 23-36.
- Minsalud.** 1996. Pruebas toxicológicas. *En: Manual de procedimientos para la evaluación toxicológica de sustancias químicas*. Colombia.
- OPS.** 1980. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas. Criterios de salud ambiental. Parte I, No. 402.
- OPS.** 1989. Manual para técnicos en animales de laboratorio. Centro Panamericano de Zoonosis. Argentina.
- Peña L.** 1997. Evaluación del control del gusano blanco de la papa mediante la utilización del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Procarta Código 266. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Corpoica, San Juan de Pasto, Colombia.
- Posada F.** 1993. Control biológico de la broca del café. *Revista ICA*, pp. 137-151. Colombia.
- Pradeau D.** 1998. *Análisis químico-farmacéutico de medicamentos*. Editores Nenega. 1.ª ed. Limusa Uthea, México.
- Rippon J.** 1982. The pathogenic fungi and the pathogenic. *En: Medical pathology*. WB Saunders, Philadelphia.
- Sachs S, Baum J, Mies C.** 1985. *Beauveria bassiana* keratitis. *Br J Ophthalmol* 69: 548-550.
- Saiz L, García J, Fernández C.** 1983. *Animales de laboratorio, cría, manejo y control sanitario*. Instituto Nacional de Investigaciones, Servicio de Publicaciones Agrarias, Madrid.
- The British Pharmacopeia.** 1993. Published for the Health Ministers on the recommendation of the Medicines Commission pursuant to the Medicines Act. 1968. Department of Health and Social Services for Northern Ireland. Department of Health Scottish Home and Health Department Welsh Office. London. HMSO. December, vol 2.

- The United States Pharmacopeia.** 1994. The National Formulary. UPS 23- NF 18. United States Pharmacopeial Convention, Inc. Washington DC.
- Varela A.** 1993. Diferenciación de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Deuteromicotina: Hyphomycetes). Tesis de grado, Magíster en Microbiología. Universidad de los Andes, Colombia.

- Wayne D.** 1993. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.* Limusa, 3<sup>o</sup>. ed. México.
- Zar J.** 1996. *Biostatistical analysis.* Third ed., Prentice Hall International, New Jersey.