



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**

TESIS

**AISLAMIENTO DE HONGOS NEMATÓFAGOS DE UNA GRANJA DE GANADO
OVINO EN PACHACÁMAC, LIMA - 2017**

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE MEDICO VETERINARIO

HAMMER ADOLFO QUISPE EULOGIO

Bachiller en Medicina Veterinaria

LIMA-PERU

2017

Dedico este trabajo de investigación:

A mi padre Adolfo y mi madre Liliana por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, personalmente, con su apoyo moral y confianza. Gracias por ayudarme a alcanzar este primer gran paso. A mis hermanos, por sus consejos y buenas vibras y a todas mis amigos y compañeros que tengo, para todos ustedes mis más sinceros agradecimientos.

AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias a Dr. Hugo Samame por su valioso tiempo, ayuda en asesoramiento y siempre un buen recibimiento y paciencia ante cualquier duda y consulta.

Doy gracias a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Alas Peruanas por el apoyo brindado en el laboratorio con el prestado de los equipos y materiales de laboratorio, siendo posible la realización de esta investigación.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento de hongos nematófagos de una granja de ganado ovino, en Pachacámac. Se recolectaron aleatoriamente 21 muestras de suelo de sendos cuadrantes en los que dividió el área de trabajo. La siembra se realizó mediante espolvoreo en agar-agua al 2% suplementado con cloranfenicol. Se seleccionaron cepas compatibles a hongos y fueron sembrados en agar papa-dextrosa para su aislamiento, y purificación mediante diluciones. Se utilizó micro-cultivos para su identificación morfológica. Se logró el aislamiento e identificación de 23 cepas de hongos; las cepas identificadas fueron, *Paecilomyces* spp., *Mucor* spp. y *Aspergillus* spp., de estos el *Paecilomyces* spp. es descrito como hongo nematófago, ovicida. Se concluye el aislamiento del hongo *Paecilomyces* spp. de suelo de ganado ovino, con potencial característica nematófaga.

Palabras claves: hongos nematófagos, aislamiento, control biológico, *Paecilomyces* spp.

ABSTRACT

The present study had as objective to isolate fungi from a sheep farm in Pachacámac. Twenty - one ground samples from quadrants were randomly collected in which the work area was divided. The seeding was done by sprinkling in 2% agar-water supplemented with chloramphenicol. Strains compatible with fungi were selected and seeded on potato-dextrose agar for isolation, and purification by dilutions. Micro-cultures were used for their morphological identification. Isolation and identification of 23 strains were achieved; the strains identified were, *Paecilomyces* spp., *Mucor* spp. and *Aspergillus* spp., the *Paecilomyces* spp. is described as ovicidal nematophagous fungus. The isolation of fungus *Paecilomyces* spp from ground of ovine cattle, with potential characteristic nematophagus.

Key words: nematophagous fungi, isolation, biological control, *Paecilomyces* spp.

INDICE

	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
I. INTRODUCCION.....	1
II. MARCO TEORICO.....	3
III. MATERIALES Y METODOS.....	23
IV. RESULTADOS.....	29
V. DISCUSION.....	34
VI. CONCLUSIONES.....	33
VII. RECOMENDACIONES.....	38
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	39
XI. ANEXOS.....	44

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por parásitos gastrointestinales causadas por nematodos son una de las principales problemas sanitarios en la producción de ovinos y limitantes en la producción ovina, siendo *Cooperia* spp., *Bunostomun* spp., *Haemonchus* spp. , *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomun* spp. los de mayor relevancia ya que afectan al ganado ovino del Perú. Los métodos tradicionales de control de nematodos gastrointestinales son el manejo del pastoreo y el uso de antiparasitarios químicos, para este último se han descrito casos de resistencia, un nuevo método de control recientemente usado es el control biológico, ya que es ecológico y reduce las poblaciones de larvas de nematodos.

El uso de estos hongos nematófagos se debe a su habilidad atrapadora y destrucción de nematodos en las heces de los animales y porque no se alteran al pasar por el tracto gastrointestinal, posteriormente germinan y se extienden por la materia fecal para poder atrapar las larvas, reduciendo la población del nematodo sin ocasionar efectos negativos en el medio ambiente. Los hongos nematófagos son antagonista naturales de los nematodos debido a esto se pueden considerar cosmopolitas, debido a esto se pueden extraer de diversos lugares.

En medicina veterinaria el control biológico con productos como los hongos nematófagos viene cobrando gran importancia debido a la carne ecológica, y evitando la resistencia producida por los antiparasitarios químicos, lo que resulta beneficioso para la salud animal y la salud pública.

El objetivo del presente trabajo fue aislar hongos nematófagos, *Duddingtonia flagrans*, *Paecilomyces* spp. *Arthrobotrys oligospora*, de ganado ovino de una granja en Pachacámac.

II. MARCO TEORICO

2.1. Producción ovina en el Perú.

La población de ovinos es de 9 523,2 mostrando un descenso de 21,2% con respecto al censo agropecuario de 1994. La raza que concentra la mayor población es la de Criollos y representa el 81,0% del total. Le sigue en orden de importancia la raza Corriedale con el 11,4%, Hampshire Down 2,6%, Black Belly 0,9% y otras razas 4,1% respectivamente.

La población de ganado ovino se concentra en la Sierra con 8 972,2 cabezas, que representa el 94.2% del total. Considerando las razas, son los Criollos los que tienen mayor participación 80,5%, seguidos por los Corrietas 11, 3%. En la Costa, la raza predominante es criollos con 79,8%. La Sierra cuenta con una mayor proporción de ovinos de la raza criollos 80,6% y finalmente en la Selva la raza predominante es criollos con 71,3% (1).

2.2. Factores que limitan la producción ovina.

La problemática de la crianza de ovinos en el país radica, principalmente, en los siguientes factores: baja producción y productividad, bajos índices reproductivos, escasa disponibilidad de material genético de calidad, deficiente manejo animal y sanitario, escasa disponibilidad

de paquetes tecnológicos al nivel de pequeños productores, inadecuado uso de residuos de cosecha y subproductos agroindustriales, falta de suplementación mineral y alimenticio en épocas de estiaje, falta de tecnologías sobre obtención, conservación y transformación de productos y subproductos (1).

Agregado a esto se suman los problemas de sanidad animal ocasionados por agentes infecciosos que disminuyen de manera considerable el potencial zootécnico de los animales. Tal como es el caso de las enfermedades parasitarias, causadas por un grupo de nematodos que provocan una gastroenteritis parasitaria y que puede conducir a la muerte (1).

Estos nematodos son considerados una de las principales limitantes en los sistemas de producción de carne bovina y ovina a pastoreo. Si bien un bajo porcentaje se debe a mortalidad de animales, las pérdidas ocasionadas se deben, principalmente, a mermas en las ganancias de peso vivo de animales en engorda, problemas de desarrollo en vaquillas de reposición, disminución en la producción de leche e inversiones en antiparasitarios con limitado retorno económico (2).

2.3. La Parasitosis constituye un gran problema de sanidad animal.

El parasitismo es una de las principales problemas de la sanidad animal en el mundo debido a su impacto negativo en los sistemas de producción ganaderos, esto se ve reflejado en la

digestión y la disponibilidad de aminoácidos absorbibles, pérdidas de proteínas en el tracto gastrointestinal, reducción en la ingestión de alimentos, minerales, disminución en la actividad enzimática y diarrea, esto se ve reflejado en pérdidas económicas en los ganaderos (3).

Los nematodos gastrointestinales son los parásitos más frecuentes de los animales rumiantes en todo el mundo, especialmente en zonas templadas y húmedas, causando gastroenteritis parasitarias, procesos generalmente endémicos, de curso crónico y de mortalidad baja, y es ocasionado por diversos tipos de parásitos, que causan daño en mayor o menor proporción de acuerdo con variables como el tipo de parásito, clima, carga parasitaria, estado inmunológico, edad y nutrición del animal (4). Las principales especies de nematodos que afectan al ganado ovino en el Perú son *Cooperia* spp. , *Bunostomun* spp., *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomun* spp. (5).

El *Haemonchus* spp. su patogenicidad consiste en anemia hemorrágica aguda causada por los hábitos hematófagos de los parásitos. La *Cooperia* spp. y el *Trichostrongylus* spp. son consideradas moderadamente patógenas llegando a penetrar en la superficie epitelial del intestino delgado y causan atrofia de las vellosidades y reducción del área de absorción. El *Oesophagostomun* spp. Se localiza en el ciego y colon; pueden llegar a causar enteritis y formación de nódulos entéricos. *Bunostomun* spp. se localiza en el intestino delgado y en estado adulto son hematófagos y pueden producir anemia, pérdida de peso y/o diarrea (6).

2.4. Ciclo de vida de los nematodos gastrointestinales.

El ciclo de vida más común de es el ciclo directo, las larvas evolucionan en el medio ambiente, experimentando dos mudas y la infección se produce por ingestión de la larva L3. Sin embargo, hay excepciones importantes, a veces la infección se produce por la penetración de las larvas a través de la piel o por ingestión de huevos que contienen en su interior ⁽⁶⁾. En los parásitos gastrointestinales su desarrollo tiene lugar totalmente en la luz del intestino o bien pueden introducirse en el interior de la mucosa. En el ciclo muchas especies producen una fase migratoria a través del cuerpo ⁽⁶⁾.

2.5. Control de nematodos gastrointestinales.

2.5.1. Manejo del pastoreo.

Algunos ovinocultores han logrado reducir parcialmente las parasitosis cuando llevan un programa de manejo del pastoreo en el que dividen las áreas de pastoreo en sub-áreas con la finalidad de dejar descansar el potrero por un período de tiempo antes de que los animales regresen a la misma área. Para que las larvas infecten a los animales tienen que ser ingeridas con el pasto; pero si los animales no regresan al mismo potrero por un período de tiempo, las larvas van perdiendo fuerza y se van muriendo poco a poco, de manera que cuando los animales regresan a la misma área la cantidad de larvas en los pastos ha disminuido. Este sistema es muy recomendable, aunque es difícil de adoptar ya que los productores quieren aprovechar al máximo el pasto como fuente de alimento y no cuentan

con la superficie tan grande de pastizal como para dejar descansar por tanto tiempo un terreno (7).

2.5.2. Antiparasitarios químicos.

Con la finalidad de contrarrestar los efectos negativos de los nematodos gastrointestinales, se han utilizado antihelmínticos de manera indiscriminada para lograr un buen estado de salud los animales. Por su gran disponibilidad y amplio espectro, los Becimidazoles y las Lactonas Macroclínicas son los antiparasitarios más usados en ovinos. A las Bencimidazoles también se les conoce como tomas blancas. El triclanbendazol solo actúa contra la *Fasciola hepatica* sin efecto contra otro nematodo gastrointestinal. Por su parte los salicilanilidos y los nitrofenoles solo tienen efecto antiparasitario contra los nematodos gastrointestinales hematófagos. Cabe mencionar que el tratamiento de los nematodos gastrointestinales debe contemplar un conjunto de acciones que combinen los tratamientos estratégicamente con prácticas que limiten los riesgos de infección (8).

2.6. Resistencia a los antiparasitarios.

La resistencia a los antihelmínticos se define como el aumento significativo del número de individuos de una población de parásitos, capaces de soportar niveles de fármaco que han probado ser letales para la mayoría de los ejemplares de la misma especie parasitaria. Se trata de un mecanismo de adaptación y supervivencia de las especies de parásitos ante la presión impuesta por el uso de antihelmínticos. El carácter de resistencia viene asociado a

determinados genes que normalmente, antes de la exposición a los fármacos, se encuentran en baja frecuencia en la población parasitaria. Al ser un carácter heredable, la selección ejercida por los antihelmínticos a lo largo de los sucesivos tratamientos conlleva el incremento de la frecuencia de estos genes en la población parasitaria, ya que cada vez que se realiza un tratamiento antihelmíntico se reduce la población de cepas de parásitos sensibles al fármaco pero no la de parásitos resistentes, por lo que después de cada tratamiento la proporción de estos últimos sobre el total de la población parasitaria se incrementa en mayor o menor medida. Esta progresiva selección de las cepas de parásitos resistentes es más rápida con la práctica de tratamientos indiscriminados o aplicados inadecuadamente, favoreciendo el predominio y la expansión a medio y largo plazo de las cepas resistentes ⁽⁹⁾.

Uno de los aspectos más importantes del fenómeno de la resistencia a los antihelmínticos es su irreversibilidad, es decir, una vez que aparece, la posibilidad de que la intensidad del fenómeno disminuya de forma natural es nula. Otro punto de trascendental importancia es que cuando la resistencia aparece en un rebaño, su intensidad crece exponencialmente hasta que la eficacia de los antihelmínticos desaparece prácticamente por completo ⁽⁹⁾.

La principal estrategia para retrasar la pérdida de eficacia de los antihelmínticos es la detección precoz de la resistencia y el establecimiento de medidas de manejo orientadas a prevenir, o retardar lo máximo posible, su desarrollo ⁽⁹⁾.

La resistencia incrementa los costes de producción, reduce la eficacia del sistema y la calidad de los productos, y entraña un riesgo para la salud pública y el medio ambiente debido a la necesidad de incrementar la dosis y frecuencia de tratamientos para poder mantener la producción (9).

2.7. Control biológico.

Se define como un método ecológico desarrollado por el hombre para disminuir la población parásita o plaga a densidades subclínicas aceptables o para conservar esta población en niveles no perjudiciales usando antagonistas naturales vivos. El control biológico podrá ofrecer una alternativa eficiente y segura en la reducción de las poblaciones de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales en las pasturas (9).

Los nematodos tricostrongiloideos desarrollan parte de su ciclo de vida en el ambiente (fase externa). Para cumplir con éxito su ciclo, durante esta fase necesitan superar las dificultades originadas por factores abióticos y por una gran barrera biológica formada por microorganismos que bloquean o limitan el crecimiento de las poblaciones parasitarias. Esos enemigos naturales requieren nuestra atención, pues pueden ser utilizados como herramientas que reduzcan satisfactoriamente las cargas parasitarias de las pasturas y, por lo tanto, de los animales. El concepto de control biológico es la profilaxis o prevención de las parasitosis, y su aplicación se fundamenta en el uso de microorganismos que puedan actuar en las fases de vida libre de los nematodos parásitos (9).

Dado que los nematodos tienen muchos enemigos naturales, varios agentes han sido estudiados como posibles agentes de control biológico, encontrándose entre ellos bacterias, hongos, protozoos, nematodos, y artrópodos. Dentro de los que han mostrado tener un efecto de reducción en las poblaciones larvales de parásitos de rumiantes, pueden mencionarse los escarabajos de heces animales, lombrices de tierra, y hongos ⁽¹⁰⁾.

2.8. Hongos nematófagos para el control de nematodos gastrointestinales.

Existe un grupo de hongos en diversos sustratos como heces de animales, suelo microbiológicamente activo, material vegetal en descomposición, en raíces de diversas plantas atacan y se alimentan de nematodos en la naturaleza y se les conoce como hongos nematófagos. Estos microorganismos, poseen la capacidad para desarrollar órganos especializados para capturar y destruir a los nematodos. Dentro de estos órganos se encuentran anillos, ramas, conidios y esporas adhesivas, que sirven para capturar y posteriormente, digerir al parásito. Algunas especies de hongos nematófagos como *Duddingtonia flagrans* son capaces de producir de manera espontánea grandes cantidades de clamidosporas que son estadios de resistencia de estos hongos y les confieren una mayor capacidad de sobrevivir después de su paso a través del tracto gastrointestinal de rumiantes, sin perder su actividad depredadora contra nematodos. Cuando animales reciben por vía oral un tratamiento con Hongos Nematófagos se observa una sustancial reducción en el número de larvas de los nematodos gastrointestinales en las heces. Esta metodología sirve como un método de control biológico indirecto ya que rompe el ciclo biológico de los parásitos a nivel de heces e impide la diseminación de la infección al resto del pastizal ⁽¹¹⁾.

Los Hongos Nematófagos pueden clasificarse en:

2.8.1. Hongos predadores de nematodos.

Son hongos con una capacidad saprótrofa y producen estructuras trampa adhesivos y no adhesivos de nematodos (hifas, anillos constrictores y no constrictores, ramas, nudos, redes) que crecen en el micelio superficial, Ej. *Arthrobotrys oligospora*, *Dactylaria candida* (11).

2.8.2. Hongos endoparásitos.

Son parásitos obligados que infectan nematodos vivos y generalmente muestran mayor especificidad producen esporas que se adhieren a la cutícula del nematodo o son ingeridas por los nematodos. El mecanismo molecular no está bien explicado, pero se basa en las investigaciones realizadas sobre hongos entomopatógenos, cuyo modo de infección es similar a los nematofagos, en el que participan enzimas hidrolíticas en varios pasos de la infección. A menudo, son parásitos obligados de nematodos vivos y generalmente demuestran, a diferencia de los hongos predadores, una alta especificidad de hospedador. Ej.: *Drechmeria coniospora*, *Hirsutella rhossiliensis*, *Catenaria anguillulae* (11).

2.8.3. Hongos parásitos de quistes y huevos.

Solamente atacan ciertos estadios del ciclo de vida de los nematodos como los huevos y quistes a través de sus zoosporas y son hongos oportunistas como por ej. *Nematophthora gynophila*, *Paecilomyces* spp o por terminaciones hifales como *Verticillium chlamydosporium*. Estos hongos liberan quitinasas que son enzimas inducibles que catalizan la quitina, componente de los huevos de nematodos (11).

2.8.4. Hongos productores de toxinas.

Se pueden encontrar entre los hongos descomponedores de madera como *Pleurotus* spp. y otros géneros como el *Pleurotus ostreatus* libera toxinas de su micelio que inmoviliza nematodos antes que el hongo los invada y usa su contenido como fuente de nitrógeno. Esta toxina fue aislada y se identificó como ácido trans-2-decenodioico e inmoviliza al nematodo *Panagrellus redivivus* (12).

2.8.5. Estructuras de atrapamiento de los hongos predadores de nematodos

a. Botón adhesivo: Estructura en forma de pequeños bulbos y botones que producen una sustancia adhesiva que inmoviliza a los nematodos.

b. Ramas o dedos adhesivos: En forma de columna o dedos, donde los nematodos se adhieren a ellas.

c. Botón simple: Son órganos pasivos de diámetro similar al de los nematodos del suelo. Los nematodos del suelo. El nematodo es capturado al deslizarse a través del anillo.

d. Redes escaliformes: Inician su desarrollo como ramas adhesivas pero se anostoman en su parte superior, los nematodos son capturados por adhesión.

e. Redes tri-dimensionales: Son redes adhesivas de anillos tridimensionales.

f. Anillos constrictores: Están formados por tres células que se hinchan al momento que el nematodo para por el interior del anillo (Anexo 01) (13).

2.9. Hongos nematofagos mas importantes.

2.9.1. *Duddingtonia flagrans*.

Es un hongo depredador que desarrolla estructuras especializadas (anillos y redes adhesivas) (anexo 02), con las cuales captura e inmoviliza a los nematodos, penetra el cuerpo y finalmente consume el contenido. Esta especie, produce una gran cantidad de clamidosporas resistentes a los procesos digestivos, y una vez que han sido administradas

en los animales, son finalmente eliminadas al ambiente junto con las heces, desarrollando in situ y ejerciendo su efecto depredador de nematodos. Los estudios *in vitro* con esta especie han probado que se logra una reducción del número de larvas de los estadios de vida libre de los nematodos parásitos por otra parte, debido a que este hongo es saprofítico, y también capaz de cambiar su alimentación dependiendo del tipo de sustrato en el cual se encuentre, lo cual puede modificar su capacidad nematófaga (19,20).

2.9.2. *Paecilomyces* spp.

El hongo conocido como ampliamente como *Paecilomyces* spp. se encuentra en todo lugar. Este es comúnmente aislado de suelo, materia orgánica en descomposición, insectos, nematodos; es contaminante del aire de laboratorio y materiales médicos; y es una causa de infección en el hombre y otros vertebrados. Desde el punto de vista nematológico, *Paecilomyces* spp. es el agente de control biológico más estudiado de los nematodos, y una cepa está registrada como bionemática en algunos países. Se encuentra comúnmente que parasita los huevos de los nematodos del nudo de la raíz, la plaga de nematodo más dañina del mundo, y por lo que se ve como un agente de control biológico potencialmente útil en muchos sistemas de cultivo (anexo 03), además el hongo crecerá en una amplia gama de sustratos y esporulará prolíficamente, por lo que el inóculo es fácil de producir con fines experimentales. Desde el punto de vista clínico, las infecciones causadas por *Paecilomyces* spp. son más comúnmente como queratitis y generalmente se encuentra en pacientes con sistemas inmunes comprometidos o implantes intraoculares (14).

2.9.3. *Arthrobotrys oligospora*.

El primer reconocido hongo atrapador de nematodos, es el más común y aislado con mayor frecuencia y es de lejos el más abundante hongo atrapa nematodos en el medio ambiente. El hongo demostró que su micelio está especializado en atrapar nematodos, penetra la cutícula del gusano, el micelio crece dentro de la presa y se digiere el contenido del nematodo. Esta red de anillos está cubierta por un tipo de lectina que reacciona con los azúcares de la piel de los nemátodos formando un adhesivo sumamente tenaz, además que los anillos de la red son constrictores. Poco después de la muerte del hospedero, las hifas surgen del cadáver, produciendo conidióforos y conidios (anexo 04 y 05). Se ha observado que estas estructuras especializadas solo se forman en la presencia de nemátodos, lo que indica que el hongo reacciona ante estímulos bioquímicas. Adicionalmente se ha comprobado que el hongo produce toxinas que paralizan rápidamente a los nematodos atrapados (13).

2.10. Interacción hongo-nematodo.

Los Hongos Nematófagos predadores reducen las poblaciones de nematodos capturándolos inicialmente mediante la formación de diferentes tipos de trampas, cuyo desarrollo depende de diversos factores como, por ejemplo, estímulos provocados por los movimientos de los nematodos, sustancias excretadas por estos nematodos, escasez de agua y nutrientes o de manera espontánea, como ocurre en algunos hongos. Los estudios llevados a cabo para dilucidar el proceso de captura de los nematodos han permitido descubrir que los Hongos Nematófagos actúan e infectan nematodos a través de una serie sucesiva de etapas conocidas como etapas de reconocimiento, selección y adhesión, precursores al proceso de infección y digestión de los nematodos, siendo este proceso una combinación entre fuerzas mecánicas y secreción de enzimas hidrolíticas (15).

Se informa de una proteína llamada lectina, que es la responsable inicialmente del reconocimiento del nematodo; esta proteína está presente en las hifas de los hongos y se une a los carbohidratos constituyentes de la cutícula del nematodo, lo cual demuestra una interacción entre la proteína lectina y el carbohidrato receptor del nematodo ⁽¹⁵⁾.

La etapa de selección de los nematodos por parte del hongo, es dependiente de la presencia de las enzimas proteasas serinas. Estas enzimas son las encargadas de hidrolizar catalíticamente los enlaces peptídicos, teniendo éstas una preferencia por determinados sustratos que, en el caso de *A. oligospora*, se denominan PII y Aoz1. Las serinas actúan sobre la caseína y la gelatina de la cutícula de los nematodos, entre otras. Entonces, se cree que el reconocimiento y la posterior infección de los nematodos ocurren por el estímulo de los sustratos para que se produzcan las enzimas serinas ⁽¹⁵⁾.

Adicionalmente, a la proteasa se le adjudica una acción nematotóxica, que interfiere en los movimientos del parásito, lo cual facilita el atrapamiento de este por parte del hongo impidiendo que escape. En algunos estudios se ha descrito que la proteasa serina PII, también tiene una acción nematotóxica, que interfiere en los movimientos del parásito, lo cual facilita el atrapamiento de este por parte del hongo y limita su escape ⁽¹⁵⁾.

En la etapa de adhesión, posiblemente para facilitar la adhesión y la penetración el hongo hace uso de unas fibrillas extracelulares, constituidas por carbohidratos y proteínas, las cuales se colocan perpendicularmente en la superficie del nematodo. Debido a que los resultados de estos estudios sugieren que estas diferencias pudieran deberse a diferencias

antigénicas en la cutícula de los nematodos o a diferencias en los aislados de la misma especie, los investigadores señalan la necesidad de profundizar en el conocimiento de la interacción hongo-nematodo, empleando nematodos de animales domésticos, pues esto es un aspecto crucial en la adecuada selección de un hongo predador para ser empleado como agente de biocontrol ⁽¹⁵⁾.

Otras enzimas que intervienen en la interacción de los hongos predadores con los nematodos son la quitinasa y la colagenasa. La primera es importante en los hongos endoparásitos debido a que la quitina es un polímero estructural que hace parte de la cáscara de huevos de nematodos. Por tanto, estos hongos facilitan la infección secretando la enzima quitinasa. Uno de los componentes primarios y más importantes de la estructura de la cutícula de los nematodos es el colágeno, es por esto que la enzima secretada por los Hongos Nematófagos, y más relevante para el proceso de infección, es la colagenasa. Esta es una enzima que cataliza la hidrólisis de colágeno y gelatina, lo cual hace que la cutícula del nematodo se debilite hasta el punto de facilitar la entrada del hongo, para concluir el proceso de infección ⁽¹⁵⁾.

Ya dentro del nematodo, en una hifa trófica del hongo se forma una especie de ensanchamiento, encargada de digerir el nematodo. Durante este proceso, se producen altas cantidades de lectina, las cuales se distribuyen a lo largo de la hifa trófica para ir facilitando la destrucción del nematodo, a medida que se va produciendo la digestión del mismo y para acelerar el crecimiento de la hifa. Aunque la acción de las lectinas no es muy clara todavía, sí se sabe que éstas están directamente relacionadas con la penetración del nematodo y la posterior digestión de sus tejidos internos. Los Hongos Nematófagos muestran una especificidad variable respecto a las especies de nematodos que infectan,

pero en general sólo infectan nematodos vermiformes o huevos de nematodos. Como muchos otros microorganismos patógenos, los Hongos Nematófagos, han desarrollado un método de reconocimiento de sus huéspedes. La presencia de lectinas en hongos atrapadores de nematodos se ha relacionado con su papel en el reconocimiento de residuos glucídicos en la superficie de los nematodos (15).

De otro lado, se han realizado estudios cuyos resultados han permitido observar diferencias en la susceptibilidad de nematodos de vida libre, de ovinos, de bovinos o fitonematodos, cuando los nematodos de vida libre se enfrentaron a los hongos. El mismo fenómeno se ha observado cuando se han usado diferentes aislados de diferentes especies del género *Arthrobotrys*, así como en aislados diferentes de la misma especie de hongo (15).

Los hongos predadores presentan algunas ventajas que pueden ser aprovechadas para usarlos como agentes de control biológico, como las siguientes:

- a. Tienen un ciclo de vida corto y alta capacidad reproductiva.
- b. Algunos son específicos, como los endoparásitos.
- c. Producen clamidosporas, o quedan en fase saprofitica en ausencia de hospedadores.

d. No son patógenos para los seres humanos.

e. Reducen, en vez de eliminar, las poblaciones parasitarias.

Esto lo convierte en estímulo permanente de respuestas inmunológicas de los bovinos contra los parásitos. Sin embargo, es necesario identificar aquellos que sean patógenos agresivos de los nematodos y ser capaces de identificar e infectar eficientemente a los organismos blanco ⁽¹⁵⁾.

2.11. Uso de *Duddingtonia flagrans*.

Duddingtonia flagrans por ser el hongo que ha demostrado tener mayor habilidad para atrapar y destruir larvas de parásitos *Trichostrongylidos* spp. en heces de animales y porque no se altera luego de pasar a través del tracto gastrointestinal de los rumiantes debido a las esporas resistentes que produce. Estas esporas posteriormente germinan y se extienden por toda la materia fecal fresca para atrapar larvas en movimiento antes de que éstas migren a las pasturas, poniendo de manifiesto el gran potencial que tienen estos microorganismos para ser utilizados en formulaciones biológicas tendientes al control de endoparásitos del ganado, siendo esta característica un aspecto crucial del control. Una de las características de los Hongos Nematófagos usados como antagonistas naturales es que éstos no actúan sobre los estados parasíticos de los nematodos sino contra las formas libres de éstos en el estiércol que se encuentra en las praderas, disminuyendo así la fuente de infección de los hospedadores sin ocasionar efectos negativos en el ambiente, tal como ocurre con el uso de compuestos químicos. Así mismo, estos microorganismos deben tener especificidad de

acción, alta capacidad reproductiva y soportar las condiciones ambientales locales en los cuales el control es llevado a cabo ⁽¹⁵⁾.

Recientemente, esfuerzos para la reanudación de investigación en esta temática se vienen haciendo en diversas partes del mundo como en México, país en el cual se evaluaron dos cepas de *Duddingtonia flagrans*, una mexicana y otra francesa en un cultivo de agar harina de maíz con larvas de *Panagrellus redivivus*, y se observaron reducciones de larvas de 98.9% con la cepa mexicana, y de 97.7% con la cepa francesa. En el mismo país, se evaluó el porcentaje de reducción de larvas de *Haemonchus contortus* en pastos mediante la administración oral de conidios de *Dactylaria* spp., *Arthrobotrys oligospora* y clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* a ovejas, observándose que *Duddingtonia flagrans* era el microorganismo con mayor habilidad para reducir el número de larvas de nematodos de *Haemonchus contortus* ⁽¹⁵⁾.

En relación con el potencial reproductivo de *Duddingtonia flagrans* se ha reportado que la tasa de producción de trampas de este hongo, en temperaturas óptimas de 30° C, es de 700-800 trampas/cm² en dos días cuando se les induce con 20 larvas L3 de nematodos/cm² (78), informándose también que el número de esporas requeridas para el control adecuado depende de la especie animal ⁽¹⁵⁾.

Así, por ejemplo, un estudio llevado a cabo en el año 2000 menciona que dosis diarias de 1x10⁶ clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* por kilogramo de peso en terneros redujeron significativamente las infestaciones en las praderas y, por lo tanto los niveles de infección,

mientras que en otro estudio se observó un control efectivo de larvas de *Haemonchus contortus* en heces de ovejas dosificadas diariamente con 2.5×10^4 a 5×10^5 esporas/kg de peso. De igual forma, en otra investigación, se observaron reducciones por encima del 90% de larvas L3 de *Haemonchus contortus*, empleando dosis de 1×10^6 clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* en ovejas, sugiriendo el uso de este hongo como una alternativa para el control de esta especie de parásito. De otro lado, otro estudio realizado el mismo año, reportó que dosis de 2×10^6 esporas/kg de peso reducían eficientemente la transmisión de larvas L3 de *Cyathostomun* spp. equina en pastos cercanos a las porciones fecales durante un año. Otras especies de hongos han demostrado buenas habilidades para el control de larvas de nematodos de parásitos gastrointestinales de rumiantes, pero con la desventaja, hasta ahora, de alterarse durante su paso por el tracto gastrointestinal de estos animales (15).

Sin embargo, a pesar de las bondades de *Duddingtonia flagrans* para el control parasitario, persisten algunos retos que es necesario superar para el uso comercial de este hongo en el futuro, tales como:

- a. Comercialización.
- b. La producción de grandes cantidades de esporas a muy bajo costo.
- c. La estabilidad para el mantenimiento de la viabilidad de las esporas durante su almacenamiento.

No obstante estos importantes retos, la contaminación ambiental, la resistencia a los antiparasitarios y la probable presencia de residuos químicos en los productos de origen animal, asociada con el uso indiscriminado de compuestos químicos como única herramienta de control de los parásitos gastrointestinales, claman por el desarrollo de alternativas no químicas de control de endoparásitos, requiriéndose el aislamiento de cepas nativas y la posterior evaluación de su capacidad para reducir la contaminación de larvas infectivas de nematodos gastrointestinales en las pasturas ⁽¹⁵⁾.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Espacio y tiempo.

La presente investigación se realizó en una granja de ovinos, ubicada en el distrito de, Pachacámac- Lima, en el mes de agosto del año 2016. El corral cuenta con un área aproximada de 250 m², de donde se encuentran estabulada una población de dieciocho ovinos, los cuales son mantenidos con propósito educacional.

Se midió la temperatura promedio del mes de recolección de las muestras, la cual fue de 21.2° Celsius y humedad de 90 % , el suelo de la granja contenía materia orgánica con alto contenido de restos vegetales, heces de animal y de suelo arcilloso, la granja no contaba con techo. Los animales de la granja recibían una alimentación de chala con concentrado y tenían dos desparasitaciones externa e interna al año.

3.2. Población y muestra.

El área total de la granja es 247 m² y se dividió en 23 cuadrantes, del cual se tomó una muestra aleatoria de suelo de cada cuadrante, de una granja de ovinos colindantes con las instalaciones de la Universidad Alas Peruanas.

3.3. Diseño de la investigación.

El estudio es de tipo observacional descriptivo y transversal.

3.4. Equipos.

3.4.1. Materiales de campo.

- ✓ Tres cajas Guantes (material: Latex, marca: Family doctor)
- ✓ Una caja de Mascarilla (material: Algodón, marca: Family doctor)

3.4.2. Equipos de laboratorio.

- ✓ Una cabina de flujo laminar (modelo: I-A, marca: HE & A)
- ✓ Una balanza electrónica (modelo: SPJ 2001, marca: Ohaus)
- ✓ Una microscopio binocular (modelo: CME, marca: Leica)
- ✓ Un estereoscopio binocular (marca: Leica, modelo: zoom 2000)
- ✓ Una autoclave (modelo: 25x, marca: All american)
- ✓ Una refrigeradora (modelo: ERSB56b2MMS marca: Electrolux)
- ✓ Una cocina eléctrica (modelo: hp -10, marca: Ika)
- ✓ Una estufa (modelo: universal oven, marca: Memmert)
- ✓ Ph-metro (modelo: MP511, marca: San-xin)
- ✓ Microondas (modelo: HMM-1220, marca: Miray)

3.4.3. Materiales de laboratorio.

- ✓ 50 bolsas de polipropileno (marca: Ziploc).
- ✓ Agar-agua (composición: agar con agua destilada).
- ✓ Agar papa-dextrosa (composición: papa, dextrosa, agar y agua destilada)
- ✓ Tres Asas bacteriológicas (marca: Veravitrum).
- ✓ Un rollo de papel parafinado (marca: parafilm).
- ✓ 50 placas petri (marca: Pyrex, dimensiones: 100x15mm)
- ✓ 30 placas petri (marca: Pyrex, dimensiones: 60x15).
- ✓ 30 ml azul de lactofenol (marca: Biogen)
- ✓ Cuatro capsulas de cloranfenicol (marca: Bago)
- ✓ Tubos con tapa rosca (marca: Pyrex, dimensiones: 16x100)

3.5. Procedimiento y métodos.

3.5.1. Recolección y transporte de muestras.

Las muestras de suelo para el aislamiento se obtuvieron de la granja de ovinos. Se dividió el área total del corral en 21 cuadrantes de 9 m² y 2 de cuadrantes de 31 m², obteniéndose una muestra por cada cuadrante. En cada cuadrante se consideró cinco zonas (las 4 esquinas y el centro) seleccionándose aleatoriamente una de estas para la toma de la muestra (anexo 06). La muestra consistió en 3-5 g de sustrato tomado a 5-8 cm de profundidad. Luego las muestras fueron transportadas al laboratorio en bolsas de polipropileno, separadas por área y debidamente identificadas.

3.5.2. Siembra y selección de muestras.

Las muestras de suelo se sembraron, mediante la técnica de espolvoreo, en agar- agua al 2 % con cloranfenicol al 0.02% y se incubaron a temperatura ambiente, durante 15 días. El crecimiento de hongos nematófagos de cada muestra se evaluó por observación directa y a través de un estereoscopio. En base a las características morfológicas se seleccionó las muestras posiblemente positivas a hongos hematófagos, y se sembró nuevamente en placas con agar-agua al 2% con cloranfenicol, la cuales fueron selladas con papel parafinado e incubada a temperatura ambiente (20-22°C) durante 15 días.

3.5.3. Aislamiento de hongos-nematófagos.

Las placas probablemente positivas a hongos nematófagos se trasladaron en tubos con agar-agua al 2% con cloranfenicol al 0.02% al Laboratorio de Micología Aplicada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Mayor de San Marcos en el cual se realizó un primer repique directo de las muestras probablemente positivas en agar papa-dextrosa.

3.5.3.1. Preparación de Agar papa-dextrosa (PDA).

El agar papa-dextrosa tiene los siguientes ingredientes: 300 g de papa, 20 g de glucosa, 20 g de agar y 1000 mL de agua destilada. Se realizó el PDA cortando 300 g de papa en cuadros, se hirvió en un litro de agua destilada hasta su reblandecimiento y desprendimiento de almidón. Luego se filtró a través de capas de gasa y en el filtrado se agregó agua

destilada hasta 500 mL, posterior se le adicionó 20 g de glucosa y 20 g de agar. Se hirvió la disolución total, ajustando el pH-5,6 luego se esterilizo en autoclave a 121°C por 10 minutos y finalmente se enfrió a 45°C y se sirvió en placas Petri (anexo 7).

3.5.3.2. Dilución de las muestras posiblemente positivas.

Se realizó la técnica de diluciones para reactivar las cepas trasladadas en tubos posiblemente positivas a hongos nematófagos:

Fase I: A los tubos con las muestras probablemente positivas se le adicionó 5 mL de suero fisiológico estéril y 5mL de Tween 80 al 0.1% y se dejó reposar por 15 minutos.

Fase II: Se tomó un 1mL de la suspensión inicial y se vertió en otro tubo con 9 mL de suero fisiológico para obtener una dilución decimales (10^{-1})

Fase III: Se midió 1 mL del tubo de la fase II y se le agrego 9 mL se suero fisiológico estéril, se obtuvo diluciones decimales de las muestras (10^{-2}).

Posteriormente 1 mL las diluciones obtenidas (10^{-1} y 10^{-2}) fueron sembradas por diseminación en placas con agar malta y se incubo a temperatura ambiente por un periodo de 3-7 días. Después se realizó un segundo repique de las colonias encontradas en placas con PDA (anexo 8).

3.5.4. Identificación de las cepas encontradas en PDA

Se realizó la técnica de micro-cultivos para la identificación de estructuras de los hongos cultivados en placas con PDA:

Fase I: El PDA se sirvió en placa y se dejó enfriar, luego el PDA servido, se cortó en bloque de tamaño de 0,5 cm x 0,5 cm.

Fase II: Se tomó el bloque de PDA, se colocó sobre una lámina portaobjeto dentro de una placa Petri y luego se le puso una lámina cubre-objeto encima, con un trozo de algodón remojado en agua estéril.

Fase III: Se sembró el segundo repique de las colonias e se incubo por 5 días a temperatura ambiente bajo observación.

Fase IV: Finalmente retiró la lámina cubre-objeto al observar el crecimiento evidente del hongo, seguidamente la lámina cubre-objeto fue colocada sobre una nueva lamina porta-objeto con una gota de azul de lactofenol y se selló con esmalte de uñas.

Se realizó el estudio de las láminas selladas en microscopio compuesto a diferentes aumentos comparando su morfología con las descripciones disponibles. Se tomó fotografías con microscopio con cámara digital y además se conservó las cepas en tubos.

IV.RESULTADOS

4.1. Aislamiento e identificación de hongos-nematófagos.

Se aisló un total de 25 cepas asociadas a una granja de ovinos. A partir de observaciones de características microscópicas y macroscópicas. Identifico tres especies de hongos del total de cepas aisladas. El género más frecuentemente aislado e identificado fue *Aspergillus* spp. (18/25), seguido de *Paecilomyces* spp. (4/25) y *Mucor* spp. (1/25). Dos cepas no lograron ser identificadas por no producir estructuras de reproducción (micelo estéril). Al analizar la diversidad de hongos encontrados en la granja de ovinos se determinó una especie positiva al hongo nematófago: *Paecilomyces* spp.

Se logró un mayor número de aislamientos a partir de las muestras correspondientes a los cuadrantes colindantes al comedero (M1, M2, M3, M4, M5), seguido de las muestras colindantes a la primera fila de cuadrantes (M8, M12) y finalmente las colindante al bebedero (M21). Se comprobó la existencia del hongo nematófago (*Paecilomyces* spp.) en los cuadrante (M1, M5 y M8), *Aspergillus* spp. (M1, M2, M3, M4, M5, M8, M12, M2) y *Mucor* spp. (M3).

Cuadro 1. Número y especie de hongo obtenido de las muestras de granja.

Especies de hongos	Numero de muestras positivas a hongos / total de cepas	Positivo a hongo nematófago
<i>Aspergillus spp.</i>	18/25	-
<i>Paecilomyces spp</i>	4/25	+
<i>Mucor spp.</i>	1/25	-
Otros	2/25*	-

* Micelo estéril sin estructuras de reproducción

Cuadro 2. Distribución de hongos en corral de ovinos la granja.

comedero						
M1 Pae.	M2 Asp.	M3 Asp. Muc.	M4 Asp.	M5 Pae. Asp.	M6	M7
M8 Pae. Asp.	M9	M10	M11	M12 Asp.	M13	M14
M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21 Asp.
M22			M23			

bebedero

Pae. = *Paecilomyces* spp. Muc. = *Mucor* spp. Asp. = *Aspergillus* spp.

Cuadro 3. Identificación de cepas de hongos aisladas según especie.

Número de cepas aisladas	Especies de hongos			Otros
	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Mucor</i> spp.	
1	+	-	-	-
2	-	+	-	-
3	-	+	-	-
4	-	+	-	-
5	-	+	-	-
6	-	+	-	-
7	-	+	-	-
8	-	-	+	-
9	-	+	-	-
10	-	+	-	-
11	+	-	-	-
12	+	-	-	-
13	-	+	-	-
14	-	+	-	-

15	-	+	-	-
16	-	+	-	-
17	-	+	-	-
18	-	+	-	-
19	-	+	-	-
20	-	-	-	+
21	-	+	-	-
22	-	+	-	-
23	-	+	-	-
24	-	-	-	+
25	+	-	-	-
Total	4	18	1	2

V.DISCUSIÓN

El hallazgo realizado permitió la determinación de hongos nematófagos, para esto se eligió la granja de ovinos que cuenta con una población de dieciocho ovinos, con un bebedero y comedero. Este estudio analizó veinticinco muestras, al analizar las muestras de suelo se encontró cepas de hongos nematófagos de *Paecilomyces* spp., lo cual demuestra la presencia de este hongo y corrobora su distribución mundial incluyendo Perú. Otros hallazgos de este estudio fueron *Mucor* spp. y *Aspergillus* spp. siendo el más encontrado este último y en muy poco porcentaje de *Mucor* spp. concordando con otro estudio de aislamiento de hongos nematófagos en zonas costera de Costa Rica, donde también se encontró *Aspergillus* spp. y *Paecilomyces* spp. (17).

De los hongos aislados *Paecilomyces* spp. es una especie de hongo nematófagos de huevos por otro lado *Mucor* spp. y *Aspergillus* spp. se consideran especies medioambientales, algunas de estas cepas pueden producir enfermedades e infecciones.

La técnica de espolvoreado en placa descrita por Barrón (1977) (25) y utilizada en esta investigación, si bien no permitió medir la cantidad de propágulos presentes en el suelo, si reflejó la presencia de hongos en las zonas estudiadas. A partir de las muestras

recolectadas colindantes al comedero se aisló tres especies de hongos. De las muestras colindantes a la primera fila se aisló dos especies de hongos, las obtenidas cerca al bebedero solo una especie de hongo. Esta distribución explicaría que los hongos predominan en suelos ricos con alto contenido de restos vegetales donde pueden sintetizar y utilizar hidratos de carbono, alcoholes, ácidos orgánicos sencillos y hasta descomponer compuestos polimerizados, como la celulosa y la lignina. Además los hongos tiene la capacidad de adaptarse a condiciones desfavorables como: sequia, calor o mucha humedad Wild (1992) ⁽²⁴⁾. Sin embargo, pueden declinar rápidamente cuando las condiciones locales, especialmente de pH y de contenido de humedad cambian.

Tres especies de hongos fueron aislados de los cuadrantes M1, M2, M3, M4, M5, seguido de M8, M12 con dos especies de hongos, y finalmente M21 con solo una especie. El hongo nematófago *Paecilomyces* spp. se encontró en M1, M5, M8, y analizando esta información se determinó que para la proliferación de este hongo se necesita de materia orgánica presente lo cual concuerda con la presencia del comedero, además esto incluye una mayor concentración de heces. Por otra parte se puede verificar que el hongo *Aspergillus* spp. tiene requerimientos alimenticios menos exigentes y mayor capacidad de proliferación que los hongos nematófagos.

En un estudio de aislamiento de hongos nematófagos se describe, al *Aspergillus* spp. con un nivel bajo de acción ovicida y al *Mucor* spp. sin actividad ovicida ⁽¹²⁾. Así mismo se le otorga al *Paecilomyces* spp. un efecto deletéreo que ocasiona en las larvas y/o embriones de los huevos⁽¹⁵⁾.

El *Paecilomyces* spp. ha sido descrito como hongo nematófago ovicida, que presenta una alta capacidad para infectar huevos de *Toxocara* spp. (20) Además, el *Paecilomyces* spp. se menciona en otros estudios como antagonista de huevos de fitonematodos.(21). Por otra parte en otra investigación se menciona que los géneros más comunes encontrados con capacidad de hongo ovicida son *Paecilomyces* spp. y *Pochonia* spp.(13). En la revisión bibliográfica realizada por Olivares-Bernabeu (2002) se menciona la presencia de hongos oviparasitos en suelo siendo en su mayoría uno de los descritos el *Pochonia chlamydosporia*, además *Verticillium Lecanii* y *Paecilomyces* spp., habiendo sido demostrada su actividad nematófaga *in vitro* (22).

En un estudio realizado en Argentina se logró aislar hongos nematófagos: *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Chrysosporium* spp., *Fusarium* spp, *Humicola* spp., *Mortierella* spp., *Penicillium* spp. y *Paecilomyces* spp, siendo este último el más estudiado debido a su capacidad ovicida independientemente del ecosistema y de la clase de nematodo (23).

VI.CONCLUSIÓN

El estudio permitio aislar tres especies de hongos: *Paecilomyces* spp., *Aspergillus* spp. y *Mucor* spp. en una granja de ovinos de la localidad Pachacámac.

Se determinó la presencia de un hongo reconocido como nematófago: *Paecilomyces* spp., mediante técnicas de aislamiento.

Las muestras colindantes al comedero donde había mayor cantidad de residuos de alimento se lograron aislar mayor cantidad de hongos.

VII.RECOMENDACIONES

- Probar la cepa encontrada de *Paecilomyces* spp. en ensayos *in vitro* encontrada frente a huevos de nematodos para medir su nivel de eficacia como antiparasitario, para posteriormente en un estudio siguiente realizar estudios clínicos en animales mayores, y medir la acción predadora de huevos de nematodos en lugares “*in situ*”.
- Se recomienda seguir con las investigaciones buscando aislar otras especies de hongos nematófagos (diferentes mecanismos efectores) de otros lugares que tengan contacto con otras especies de animales, considerando diferentes suelos y condiciones ambientales (humedad y temperatura).
- Se podría considerar el uso de hongos nematófagos como una alternativa a productos químicos tradicionales, y/o usarlos como complemento a estos para poder disminuir su excesivo uso que termina en una resistencia frente a los nematodos.

VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Ministerio de Agricultura y Riego. [INEI]. Lima: Instituto Nacional de Estadística e Informática; 2012.pg..
2. Fundación para la Innovación Agraria. Resultados y Lecciones en Control Biológico de Nematodos en Ovinos. Chile: FIA; 2009. Serie Experiencia de Innovación para el Emprendimiento Agrario: 29.pg. 6.
3. Gonzales E. Evaluación *in vitro* de Hongos Nematófagos sobre larvas L3 de Nematodos Gastrointestinales de Bovinos. [Tesis doctoral]. Bogotá: Pontífice Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias; 2013. pg.7.
4. Cordero del campillo M. Parasitología Veterinaria. 2ª ed. España: McGraw-Hill-Interamericana de España; 2001.pg.237.
5. Trigueros A. Parasitosis Gastrointestinales en Ovinos Tropicales pelibuey en Pucallpa-Perú. Revista de Investigación Pecuaria. 1998; 1(9):32-37.

6. Urquhart G. Parasitología Veterinaria. 2ª ed. España: Editorial Acribia; 2001.pg. 7, 11, 21-29, 63.

7. Mendoza de Guives P. Fortalecimiento del Sistema Producto Ovinos. [SAGDPA]. México: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Unidad Nacional de Ovinocultores; 2007.pg. 255.

8. Cuellas A. Nuevas opciones para el Control de Parásitos en la Ovinocultura Tropical. En: 1er Simposio de Ovinocultura Tropical. México. 2009. pg.3-4.

9. Dirección General de desarrollo Rural. Resistencia a los Antiparasitarios de uso común en Ganaderías Ovinas de Aragón. España: Diputación general de Aragón. Dirección general de desarrollo Rural. Servicio de programas rurales; 2008. Informaciones técnicas: 193.pg.3-4.

- 10.Saumell C, Fernández A. Hongos Nematófagos para el Control Biológico de Nematodos Parásitos de Rumiantes. Rev Med Vet. 2000; 81(270-273):6.

- 11.Mendoza de Guives P. Microorganismo en el Manejo de Parasitos de Ganado. [INIFAP]. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias. Área de Helminología. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria; 2015.pg. 3.

12. Ciarmela M. Efecto Ovicida de Hongos del Suelo sobre Huevos de *Toxocara canis*. [Tesis doctoral]. Rio de la Plata: Universidad de la Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo; 2008.pg.26-28.
13. Mejía M. Alternativa de Control Biológico de Parásitos Gastrointestinales en Pequeños Animales Rumiantes: Hongos Nematófagos. [Tesis]. Torreón: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. División regional de Ciencia animal; 2014.pg.13-14.
14. Stirling GR. Biological control of plant parasitic nematodes.2^a ed. Reino unido: CPI Group; 2014.pg.119-120.
15. Gonzales E. Evaluación *in vitro* de Hongos Nematófagos sobre larvas L3 de Nematodos Gastrointestinales de Bovinos. [Tesis doctoral]. Bogotá: Pontífice Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias; 2013. pg.2,7-36,42.
16. Mendoza de Guives P, Valero R. Uso de Hongos Nematófagos: Una Herramienta Biotecnológica para el Control de Nematodos Parásitos del Ganado. México: Rodrigo Rosario Cruz; 2009.Folleto Tecnico: 7.
17. Peraza W, Orozco M, Esquivel A, Rivera G, Chaverri P. Aislamiento e Identificación de Hongos Nematófagos nativos de Zonas Arroceras de Costa Rica. Agronomía mesoamericana. 2011; 22(2):236.

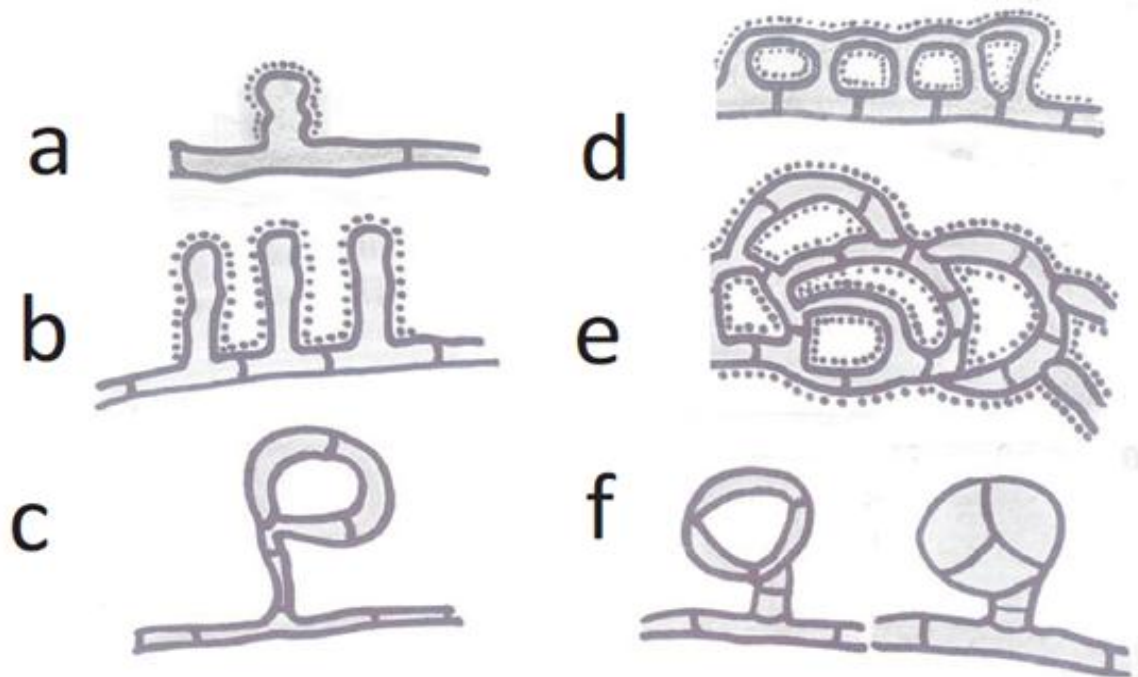
18. Gonzales R. Estudio *in vitro* de la capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* contra larvas de nematodos gastrointestinales de ovinos de pelo. *Téc Pecu Méx.* Mayo 2005; 43(3):405-414.
19. Arroyo F. Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina en condiciones controladas. *Téc Pecu Méx.* Dic 2008; 46(2):217-223.
20. Olivares-Bernabeu C, Lopez-Llorca LV, Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 104-110.
21. Silva A, Araujo J, Breaga F, Alves C, Frassy L. *In vitro* ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Vet Parasitol.* 2010; 172:76-9.
22. Olivares-Bernabeu C, López-Llorca LV. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19: 104-110.
23. Gortari C, Cazau C, Hours R. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24:24–8.
24. Wild, A. 1992. Condiciones de suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Versión Española de P. Urbano Terrón y C. Rojo Fernández. Mundi-Prensa. Madrid, España. 1045 p.

25. Barrón, GL. 1977. The nematode destroying fungi. Lancaster, Pennsylvania. Editorial Lancaster Press, Inc. 140 p.

ANEXOS

Anexo 01

Figura 1. Aspectos de órganos de captura de hongos nematófagos

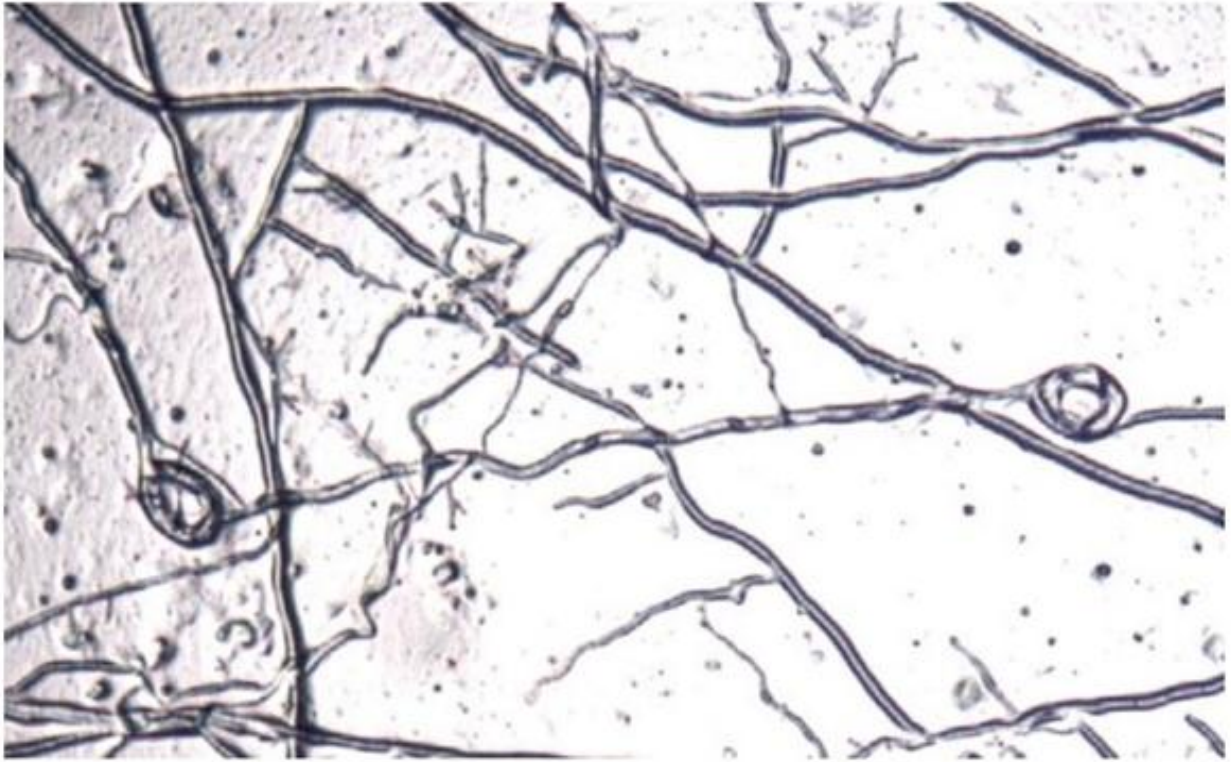


a) Botón adhesivo; b) Ramas o dedos adhesivos; c) Botón simple; d) Redes escalariformes; e) Redes tri-dimensionales; f) Anillos constrictores.

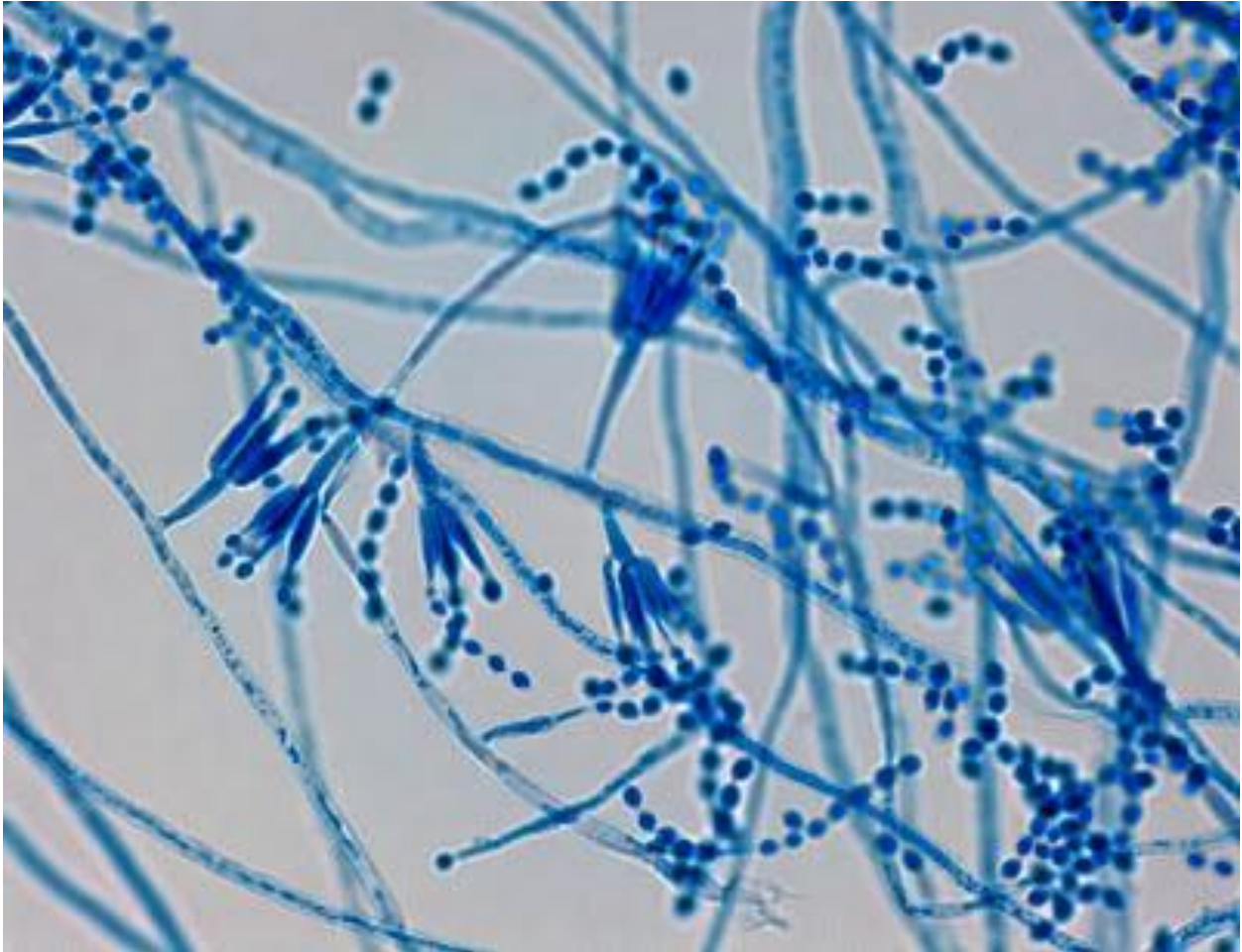
Fuente: Mendoza de Guives P, Valero R. Uso de Hongos Nematófagos, Una Herramienta Biotecnológica para el Control de Nematodos Parásitos del Ganado.

Anexo 02

Figura 2. Formación de hifas de *Duddingtonia flagrans* en la que se intercalan anillos (10x).



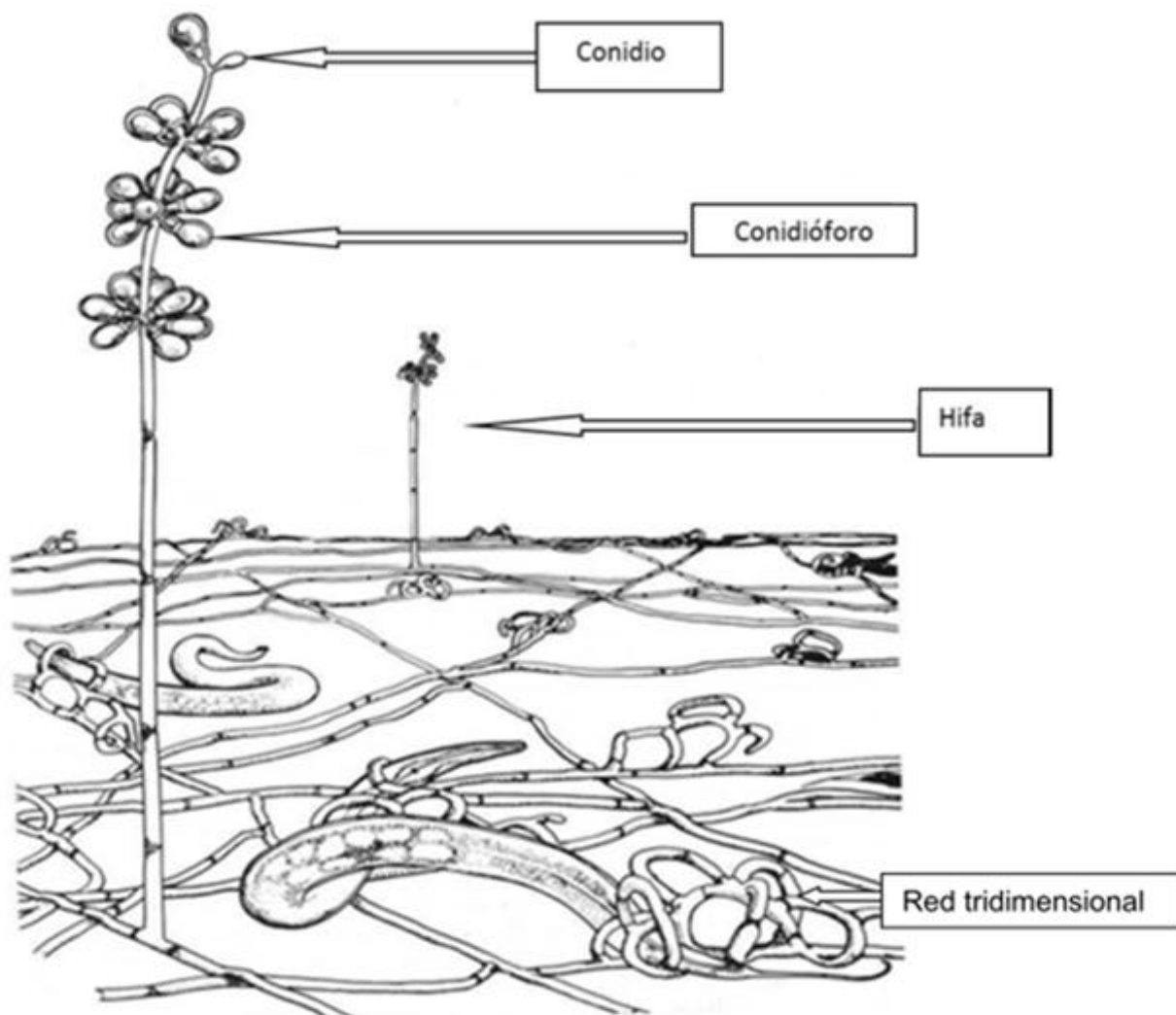
Fuente: Gonzales E. Evaluación *in vitro* de Hongos Nematófagos sobre larvas L3 de Nematodos Gastrointestinales de Bovinos.

Anexo 03**Figura 3. Estructura de *Paecilomyces* spp.(100x azul de lactofenol).**

Fuente: <https://goo.gl/7icTyW>

Anexo 04

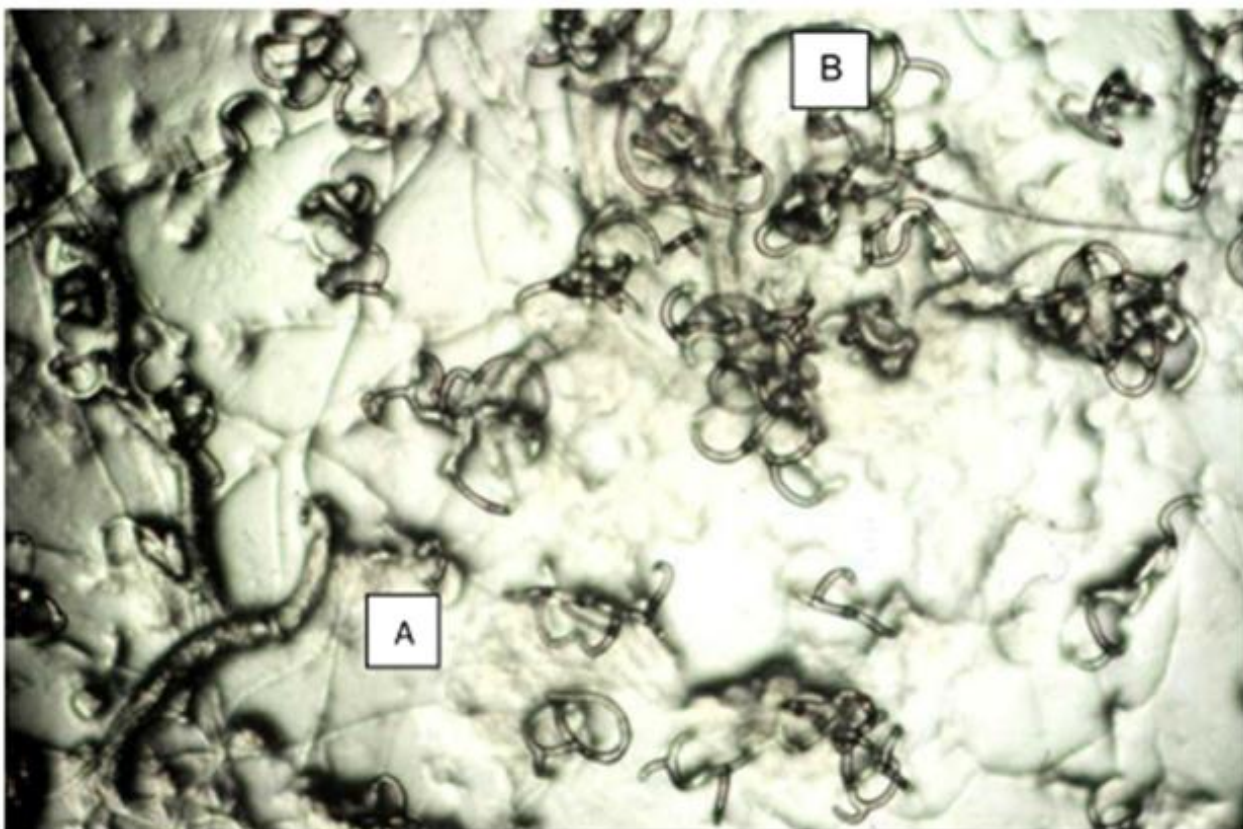
Figura 4. Muestra de conidios, conidióforos, hifas y captura de nematodos.



Fuente: Barron GL. The nematode destroying fungi.

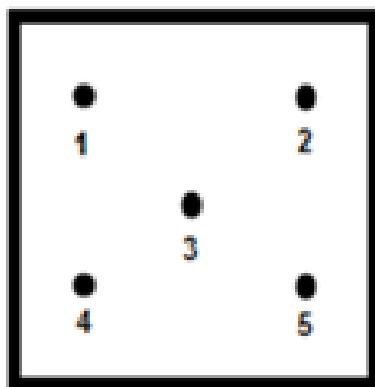
Anexo 05

Figura 5. Redes producidas por el género *Arthrobotrys*.



A) Larva de nematodo atrapada por redes bidimensionales, B) Redes tridimensionales

Fuente: Gonzales E. Evaluación *in vitro* de Hongos Nematófagos sobre larvas L3 de Nematodos Gastrointestinales de Bovinos.

Anexo 06**Figura 6. Puntos de consideración en cuadrantes para la toma de muestras**

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 07

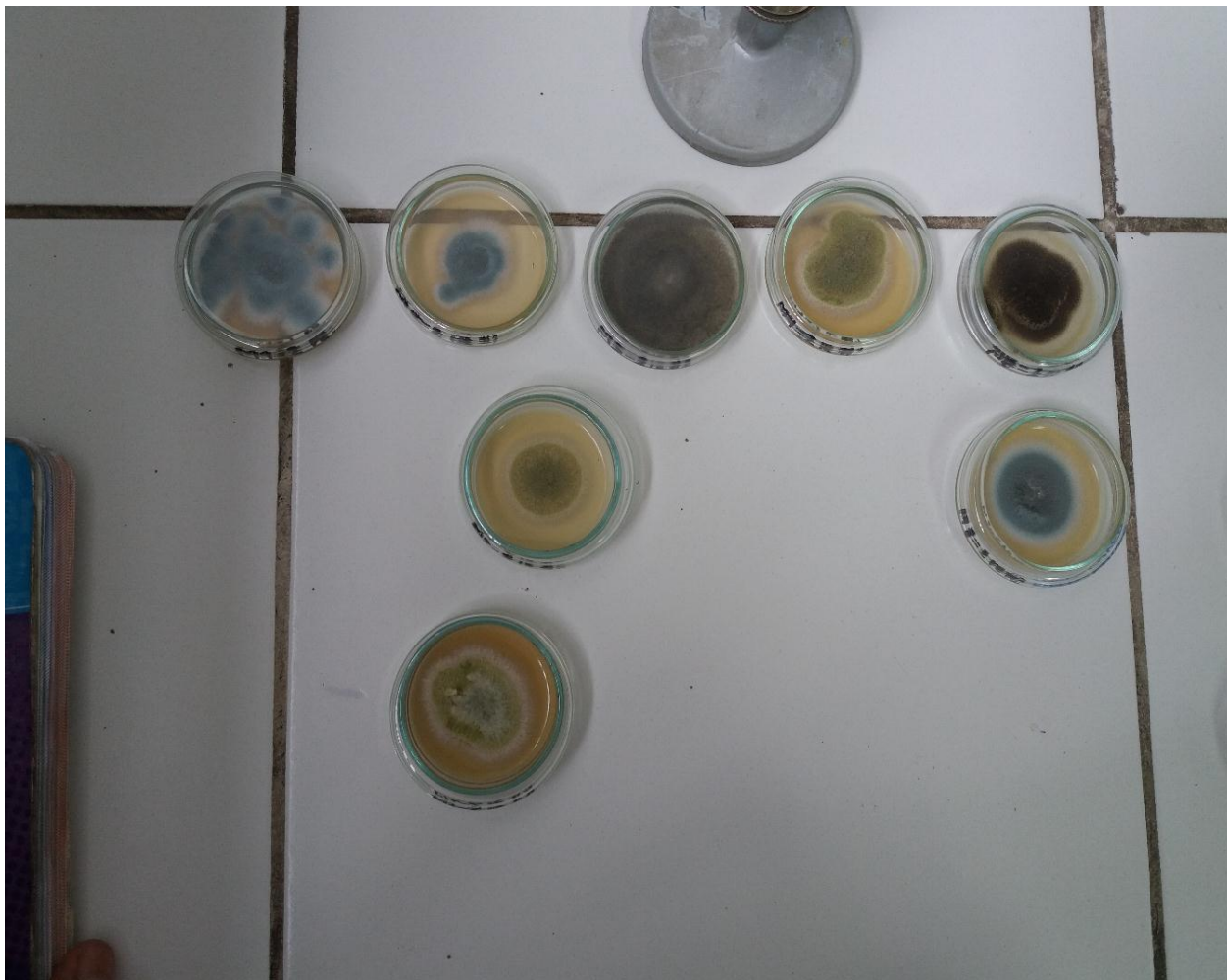
Figura 7. Preparación de Agar papa-dextrosa



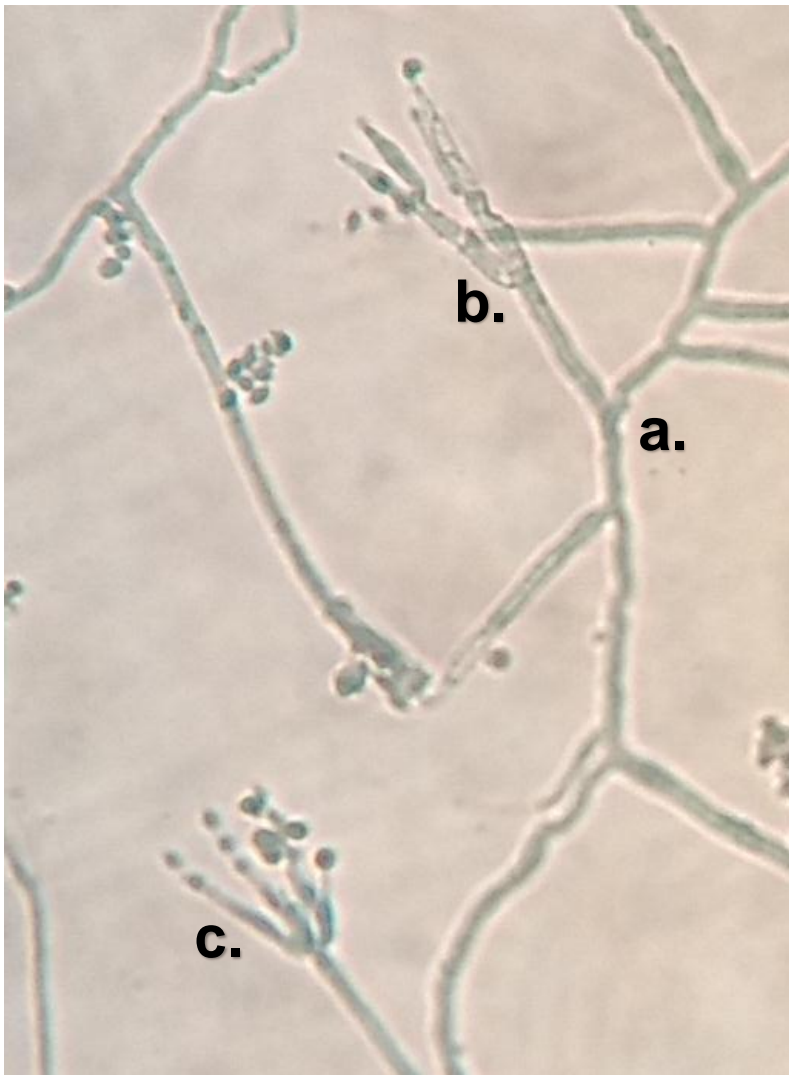
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 08

Figura 8. Selección de colonias para micro-cultivo.



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 09**Figura.9. Identificación de estructura de *Paecilomyces* spp. (40x azul de lactofenol).**

Microscopio (40x):

a. Conidióforos ramificados.

b. Hifas hialinas septadas, con metulas, múltiples fialides delgadas y largas.

c. Conidias elípticas, organizadas en cadenas en la punta de la fialide.

Fuente: Elaboración propia.