



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA (UNAN-LEÓN)
ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS AGRARIAS Y VETERINARIAS
DIRECCIÓN ESPECÍFICA DE VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Tesis de Investigación para optar al título de:

Máster Profesional en Ganadería Integral Sostenible

Título

“Identificación de especies autóctonas de hongos con potencial uso para el control
de nematodos en rumiantes”

Autor:

Lic. Sayda Carolina Castillo Martínez

Tutor:

MSc. Ronald José Betancourt Barrantes

Abril, 2026

2026: 47/19 Nicaragua, Cristiana, Socialista, Solidaria, Siempre más allá!





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA (UNAN-LEÓN)
ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS AGRARIAS Y VETERINARIAS
DIRECCIÓN ESPECÍFICA DE VETERINARIA Y ZOOTECNIA



UNAN
Universidad Nacional
Autónoma de Nicaragua, León

Tesis de Investigación para optar al título de:

Máster Profesional en Ganadería Integral Sostenible

Título

“Identificación de especies autóctonas de hongos con potencial uso para el control de nematodos en rumiantes”

Lic. Sayda Carolina Castillo Martínez _____

M.Sc. Ronald José Betancourt Barrantes _____

(TUTOR)

Enero, 2026

2026: 46/19 Siempre más allá! Avanzamos en la Revolución!



Dedicatoria

Dedico este trabajo de investigación

En primer lugar, a Dios, fuente de sabiduría y fortaleza, por guiar cada paso de esta investigación por lograr el cumplimiento de mis objetivos. Sin Su luz y dirección, este trabajo no habría sido posible.

A mi hija, cuya compañía han sido el motor que me impulsó a perseverar en los momentos de cansancio y dificultad. Ella representa la esperanza de un futuro mejor y me inspira a contribuir con alternativas sostenibles para la ganadería y el cuidado del medio ambiente.

A mi madre, por su apoyo incondicional, sus consejos llenos de sabiduría y su ejemplo de esfuerzo y dedicación. Su presencia constante me ha recordado que la ciencia y la vida se construyen con amor, paciencia y entrega.

Este logro es también suyo, pues cada avance en la investigación refleja la fe, el cariño y el respaldo que he recibido de quienes más amo.

Agradecimiento

A quienes han sido pilares fundamentales en mi formación y en la culminación de este proyecto.

Al M.Sc. Ronald José Betancourt Barrantes, mi tutor de tesis, por su guía, paciencia y valiosos aportes científicos que orientaron cada etapa de este estudio, fortaleciendo mi compromiso con la investigación y la búsqueda de soluciones sostenibles para la ganadería.

A mi hija Dacne Belén Cabrera, fuente de inspiración y motivo de perseverancia, cuya presencia me impulsa a construir un futuro mejor, basado en el conocimiento y en el amor por la ciencia y la naturaleza.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León), institución que me abrió las puertas al conocimiento y me brindó las herramientas necesarias para desarrollar esta investigación, consolidando mi formación profesional y mi vocación por contribuir al desarrollo sostenible del país.

Contenido

I. Introducción.....	1
II. Hipótesis.....	2
III. Objetivo General	3
IV. Objetivo Especifico.....	3
V. Marco Teórico	4
1. Sistemas de producción en Nicaragua	4
2. Afectaciones de nematodos gastrointestinales en la salud de los Bovinos	4
3. Ciclo de vida de los nematodos del Bovino	11
4. Acción Dañina de los parásitos gastro Intestinales.....	12
5. Signos clínicos que presentan los animales con parasitosis gastrointestinal	13
6. Diagnóstico de las enfermedades parasitarias gastrointestinales.....	14
7. Control biológico.....	15
8. Depredadores	16
9. Endoparásitos	19
10. Control mediante Vacunas	20
VI. Diseño Metodológico	22
8. Identificación de estructura de hongos.....	28
8.1. Aislamiento de hongos con capacidad de captura	29
8.2. Enfrentamiento del hongo más larva en tubo de ensayo con agua esterilizada	30
8.3. Identificación de Hongos	31
4.3. Identificación de hongo a nivel estructural	32
VII. Resultados y discusión.....	36
VIII. Conclusiones.....	51
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	54
X. ANEXOS	63

Resumen

La investigación sobre la identificación de especies autóctonas de hongos con potencial uso para el control de nematodos gastrointestinales en rumiantes se enfocó en tres objetivos principales: Aislar cepas capaces de formar estructuras de captura de larvas, Evaluar su sobrevivencia mediante digestión artificial y Estimar in vitro su actividad hematófaga sobre larvas de nematodos. Se lograron identificar y caracterizar diez especies de hongos, entre ellas *Aspergillus orizae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysagenum*, *Trichoderma spp*, *Rizophus orizae*, *Geotrichum candidum* y *Fusarium proliferatum*, siendo *Aspergillus niger* y *Trichoderma spp* los que se presentaron con mayor frecuencia. Las pruebas demostraron que *Geotrichum candidum*, *Fusarium proliferatum* y *Trichoderma spp* desarrollaron estructuras de atrapamiento como redes de hifas y perforación de la cutícula larval. Los porcentajes de captura fueron significativos: *Fusarium proliferatum* (47.1%), *Geotrichum candidum* (41.73%) y *Trichoderma spp* (39.75%), evidenciando un buen potencial depredador. Estos resultados confirman la capacidad de ciertos hongos para actuar como agentes biológicos de control, reduciendo la dependencia de antiparasitarios químicos y aportando alternativas sostenibles para la producción bovina. Se observó que varios hongos como *Trichoderma spp*, *Aspergillus orizae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysagenum* y *Rizophus orizae* poseen relevancia en la industria alimenticia y farmacológica, lo que amplía su valor más allá del control biológico. Sin embargo, *Fusarium proliferatum*, pese a su alto porcentaje de captura, no se recomienda por sus efectos negativos en la salud animal y el medio ambiente. *Geotrichum candidum* mostró buena capacidad de captura y adaptación al sistema digestivo, pero puede causar patologías respiratorias y digestivas bajo condiciones de estrés o mala nutrición, limitando su uso como controlador. En contraste, *Trichoderma spp* demostró un 40% de eficacia en captura, sin efectos adversos en la salud de los rumiantes, con capacidad de sobrevivir al paso por el tracto digestivo y adaptarse al pH salival y ruminal. Por ello, se recomienda como el hongo más seguro y viable para el control natural de nematodos gastrointestinales en bovinos, consolidando su potencial como herramienta biotecnológica en la ganadería sostenible.

Abstract

Research on the identification of native fungal species with potential use for the control of gastrointestinal nematodes in ruminants focused on three main objectives: isolating strains capable of forming larval-trapping structures, evaluating their survival through artificial digestion, and estimating in vitro their hematophagous activity on nematode larvae.

Ten fungal species were identified and characterized, including *Aspergillus orizae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma spp.*, *Rhizopus orizae*, *Geotrichum candidum*, and *Fusarium proliferatum*, with *Aspergillus niger* and *Trichoderma spp.* being the most frequent. Tests showed that *Geotrichum candidum*, *Fusarium proliferatum*, and *Trichoderma spp.* developed trapping structures such as hyphal nets and larval cuticle perforation. Capture percentages were significant: *Fusarium proliferatum* (47.1%), *Geotrichum candidum* (41.73%), and *Trichoderma spp.* (39.75%), evidencing strong predatory potential. These results confirm the ability of certain fungi to act as biological control agents, reducing dependence on chemical antiparasitics and providing sustainable alternatives for cattle production.

Regarding species applicability, it was observed that several fungi such as *Trichoderma spp.*, *Aspergillus orizae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, and *Rhizopus orizae* have relevance in the food and pharmaceutical industries, which broadens their value beyond biological control. However, *Fusarium proliferatum*, despite its high capture percentage, is not recommended due to its negative effects on animal health and the environment. *Geotrichum candidum* showed good capture capacity and adaptation to the digestive system, but may cause respiratory and digestive pathologies under stress or poor nutrition, limiting its use as a controller. In contrast, *Trichoderma spp.* demonstrated 40% capture efficacy, without adverse effects on ruminant health, with the ability to survive passage through the digestive tract and adapt to salivary and ruminal pH. Therefore, it is recommended as the safest and most viable fungus for the natural control of gastrointestinal nematodes in cattle, consolidating its potential as a biotechnological tool in sustainable livestock farming.

I. Introducción

La producción pecuaria en Nicaragua constituye una de las principales actividades económicas del país, especialmente el sistema de ganadería bovina de doble propósito. Sin embargo, las parasitosis gastrointestinales representan una de las principales limitantes para la producción sostenible de los sistemas ganaderos afectando la salud animal. Las afectaciones por parásitos generan pérdidas significativas debido en la producción pecuaria como la reducción en la ganancia de peso, disminución en la producción de leche, carne y generando aumento en los costos de tratamiento (FAO,2023).

A pesar del uso frecuente de desparasitantes químicos, su eficacia ha disminuido significativamente, desarrollando de resistencia de productos antihelmínticos y los posibles impactos negativos sobre el ambiente y los residuos en los productos de origen animal. Esta situación exige la búsqueda de alternativas sostenibles y accesibles para los productores (Pérez y Gonzalez,2023)

Dentro de las estrategias surge, el uso de hongos con capacidad nematófaga una alternativa de control biológico de nematodos en rumiantes. La diversidad fúngica presente en los ecosistemas nicaragüenses ofrece un potencial aún poco explorado para identificar especies autóctonas con propiedades depredadoras, ovicidas o antagonistas frente a nematodos de importancia veterinaria. El estudio de estos microorganismos no solo contribuye a la innovación en el manejo sanitario del ganado, sino que también fortalece el conocimiento sobre la biodiversidad fúngica del país.

En este contexto, la presente investigación tuvo como propósito identificar especies autóctonas de hongos con potencial uso para el control de nematodos en rumiantes en. A través de la caracterización morfológica de hongos obtenido de muestras de suelos, heces y ambientes asociados a la producción ganadera, se busca generar información científica que permita establecer una base para el desarrollo futuro de bioproductos locales. Con ello se pretende promover alternativas más sostenibles, eficaces y ambientalmente seguras para el control parasitario, contribuyendo a la resiliencia de los sistemas ganaderos nicaragüenses y salud pública.

II. Hipótesis

Hipótesis nula (H0):

No existen especies autóctonas de hongos que tengan actividad nematófaga significativa para controlar nematodos gastrointestinales en rumiantes.

Hipótesis alternativa (H1):

Existen especies autóctonas de hongos que presentan actividad nematófaga significativa y pueden ser utilizadas para el control biológico de nematodos gastrointestinales en rumiantes.

III. Objetivo General

Identificar especies autóctonas de hongos con potencial uso para el control de nematodos en rumiantes.

IV. Objetivo Especifico

- ✓ Aislar cepas de hongos que desarrollen estructuras de captura de larvas de nematodos gastrointestinales de bovinos.
- ✓ Determinar sobrevivencia de cepas aisladas mediante la digestión artificial.
- ✓ Estimar in vitro la actividad nematófagas de los hongos identificados sobre Larvas de nematodos gastrointestinales.

V. Marco Teórico

1. Sistemas de producción en Nicaragua

Los sistemas ganaderos de cada país actualmente se enfrenta con cambios en los sistemas productivos en los cual han forzado a los países con producción ganadera a intensificar sus sistemas productivos debido al crecimiento de la demanda de alimento de origen animal en el mercado debido al crecimiento de la población, donde tienen que suplir las necesidades alimentarias del mercado, lo cual provocado la utilización de varios productos antiparasitarios que garantice la sanidad animal y de buenos resultados productivos a la vez estos productos desencadenan un desequilibrio en la relación parásito-Hospedador favoreciendo al desarrollo de la población parasitaria (Márquez et al ., 2007).

2. Afectaciones de nematodos gastrointestinales en la salud de los Bovinos

Las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas en la salud en el ganado bovino que afecta a todos los países una de las formas que mayormente afecte es la parte subclínica, que se ve reflejada en pérdidas de la producción de leche y carne provocando un incrementando los costos de producción por el uso contante de productos farmacológica como tratamiento de control de las problemáticas parasitarias (Mederos y Banchemo, 2013).

Los parásitos gastrointestinales en la salud de los animales domésticos sobre todo en la especie bovina son los principales causantes de problemas sanitarios provocando una caída de los sistemas productivos, otro factor importante es que se alterado el equilibrio ecológico la relación parásitos – Hospedador. Las alteraciones del ecosistema han favorecido el incremento de los problemas parasitarios lo cual ha llevado a la producción de diferentes productos para eliminar o erradicar los parásitos el uso continuo cada vez en mayor cantidad a creado resistencias frente a estos medicamentos, según Vázquez et al., (2017).

Las parasitosis por Nematodos y cestodos provocan muchas alteraciones en el sistema digestivo causantes de diarrea, inapetencia, hemorragias y deshidratación que descompensa al animal deteriorando su salud. (Mawatari et al., 2014).

Algunos parásitos tienen un ciclo de vida dividido en dos fases una fase es en el cuerpo del animal y la otra fase en las pasturas en donde ocurre la el desarrollo del ooquiste que desarrolla desde el estadio larvario 1 hasta estadio larvario 3 que es la parte infectante (Cordero del Campillo et al., 1999).

Las parasitosis de con más importancia y prevalencia que afectan el sistema digestivo del ganado bovino en el mundo pertenecen a la genero *Trichuris*, *Trichostrongylus*, *Ancylostoms*, *Ascaris* y *Strongyloides* (Regassa et al., 2006).

Los géneros con gran potencial patogenicidad que ponen en riesgo la vida del de los animales jóvenes con los problemas digestivos pueden llevarlos a la muerte si no se tratan a tiempo son *Toxocara* y *Haemonchus* (Quiroz et al., 2011).

Las repercusiones en la salud del animal más importantes provocada por los parásitos que afectan el sistema digestivo dependen de varios factores como: La carga parasitaria , el tipo de especie de parásito que afecta , el grado de infección que depende de las condiciones medioambientales , especie , raza del hospedador y el estado inmunitario; todos estos factores son lo que ponen en riesgo la vida del animal, por ejemplo algunos parásitos hematófagos causan los problemas de anemias recurrente en los animales, por el consumo de sangre en todo su ciclo (Márquez, 2014).

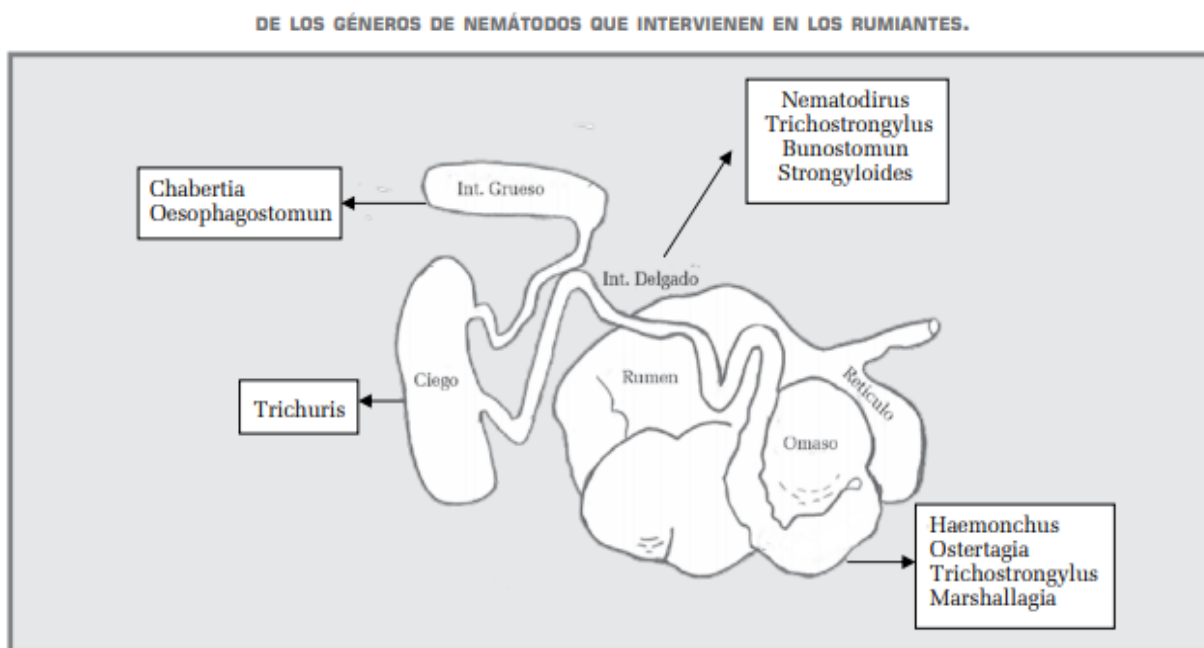
Cuando los síntomas son evidentes en los animales y causan alteraciones en la salud desde complicaciones menores hasta la muerte principalmente en los animales jóvenes esta susceptibilidad puede deberse a factores genéticos, posición geográfica, clima y sistemas productivos (Márquez, 2003).

El aumentos de los costos de producción en el control de parásitos han generado un del sistema digestivo los cuales la concentración de los residuos en leche y carne tiene repercusiones en la salud humana otro problema ocasionado por el uso indiscriminado

de los productos químicos para control de parásitos han provocado resistencia a los productos farmacológicos , lo cual requiere generar nuevas alternativas eficiente que no sean de productos químicos para el control de los parásitos, estas alternativas pretenden reducir las pérdidas económicas en compras de productos nematicidas y garantizar la eficiencia productiva.

Figura 1.

Nemátodos del Sistema Digestivo



(Pérez, 2010)

Los parásitos son los causantes de múltiples afectaciones de la salud de los animales afectando principalmente el sistema digestivo, ocasionando reducción de la producción. En la ganadería los parásitos de mayor importancia económica son de la familia *Trichostrongylidae* dentro de los cuales destacan los géneros : *Haemochus*, *Cooperia*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, y *Oessophagostomum*, los cuales son los de mayor frecuencia que causan patologías en los bovinos (tabla 1), esto debido por la zona geográfica y clima permitiendo el desarrollo de una amplia gama de especies parasitarias las cuales pueden ser muy adaptativas y varían según la zona geográfica (García, 1994).

En los parásitos hay diferenciación sexual los machos por lo general son más pequeños en consideración con las hembras las cuales tienen la capacidad de producir huevos y larvas, no todos los nematodos se reproducen de la misma manera algunos son ovíparos y otros son ovovivíparos. El tiempo para alcanzar la etapa adulta entre cada género es diferente unos lo logran en pocos días y otros en semana. Dentro de las característica de los nematodos los huevos pueden ser fecundados sin que se haya iniciado la segmentación (por ejemplo, el *Acylostoma* y *Enterobius*), otro ejemplo es cuando el embrión se encuentra formado (*Wuchereria*), en otro caso el embrión puede llegar a la formación de tres capas germinativa (Ectoblasto, Mesoblasto y Endoblasto), el pseudoceloma surge en un espacio limitado por el endoblasto y ectoblasto. Los diversos órganos del parasito presentan un número relativamente fijo de células , el cual logra en el momento de la eclosión, el desarrollo es directo dentro de la envoltura del huevo que ocurre dentro de la fase juvenil (denominada larva) las cuales realiza una o dos mudas , en este periodo ocurren un incremento limitado de producción de células durante esta etapa juvenil esto es por consecuencia del incremento de tamaño, en la etapa juvenil tiene prácticamente ya una estructura del adulto, con exención del aparato reproductor. El crecimiento del parasito es acompañado de 4 mudas de la cutícula en la tercera muda en muchas especies es la fase de dispersión, en los casos de los adultos ya no realizan muda, pero siguen en constante crecimiento (Hendrix & Cutler, 1999).

Tabla N° 2.

Principales Nematodos Gastrointestinales en el bovino

Género	Especie	Órgano de localización	Características generales	Efectos en el animal
<i>Cooperia spp</i>	<i>C. oncophora</i> <i>C. punctata</i> <i>C.pectinata</i>	Intestino delgado	<i>C. punctata</i> y <i>C. pectinata</i> , están predominantemente en zonas tropicales y subtropicales. Está asociada a	Penetra la mucosa del duodeno, causando daño general a las vellosidades intestinales,

			gastroenteritis parasitaria en terneros y su forma más común es la enfermedad subclínica.	produciendo respuesta inflamatoria intensa, hipoproteinemia, anemia, anorexia y posible muerte de los animales, según el grado de infección.
<i>Haemonchus spp.</i>	<i>H. placei</i> <i>H. contortus</i>	Abomaso	Es uno de los parásitos más dañinos en rumiantes, debido a su capacidad hematófaga, principalmente en ovinos y caprinos, esta especie tienen un alto potencial reproductivo.	Daño severo en la mucosa abomasal, anemia, gastritis, disturbios en la digestión, hipoproteinemia y diarrea. En infecciones crónicas pueden aparecer cambios grasos en hígado y emaciación.
<i>Ostertagia spp.</i>	<i>O. ostertagii</i> <i>O. circumcincta</i>	Abomaso	Común en la región tropical, su efecto depende de las épocas de lluvias y parasita animales jóvenes y adultos. Se caracteriza por haber 2 tipos: Tipo I: (<i>Ostertagiasis estival</i>) y afecta al ganado joven durante su primera temporada de pastoreo. Tipo II: (<i>Ostertagiasis invernal</i>) afecta sobre todo al ganado adulto y es debido a la reactivación de larvas hipobióticas.	Genera formación de nódulos en la mucosa abomasal, daño en las células parietales y epiteliales, disrupción en la digestión de proteínas. Ocasiona diarreas crónicas y por consiguiente pérdida de peso progresivo

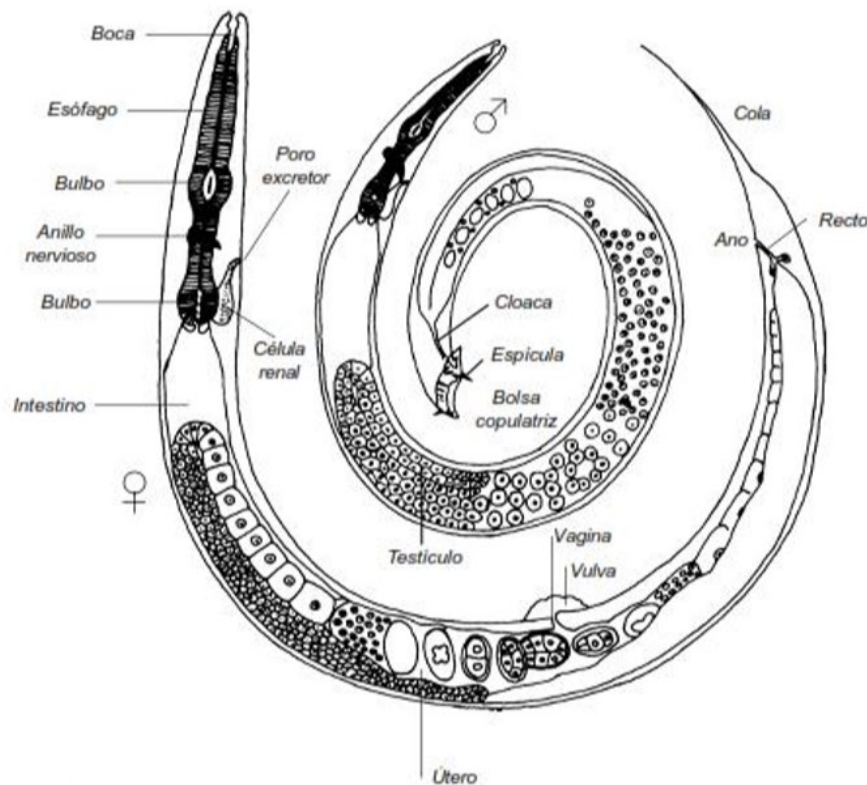
<i>Trichostrongylus spp</i>	<i>T. colubriformis</i> <i>T. axei</i>	Abomaso/ Intestino delgado	Se presenta en infecciones mixtas junto con otros parásitos, y se pueden observar signos clínicos cuando hay altas cargas parasitarias y animales estresados por transporte u otras enfermedades.	Daña la mucosa intestinal o estomacal (en el caso de <i>T. axei</i>) de los hospedadores lo que puede provocar enteritis o gastritis, diarrea o estreñimiento, debilitación general y pérdida de apetito y peso que pueden ser agudos si la infección es masiva y se desarrolla en un tiempo breve.
<i>Oesophagostomum spp.</i>	<i>O. radiatum</i> <i>O. venulosum</i>	Intestino grueso	Aparece en infecciones mixtas con otros NGI. Forman nódulos en el intestino de los hospedadores. Afectan animales jóvenes principalmente donde una infección masiva puede ser letal.	Disturbios en la función intestinal y la absorción de líquidos debido a que perforan la pared intestinal y forman nódulos. Produce fiebre, pérdida de peso y de apetito, colitis y diarrea. Los animales pueden presentar edema, anemia y debilitamiento progresivo.

(Márquez, 2003, 2007)

Los parásitos gastrointestinales afectan a los Rumiantes tiene un ciclo corto de vida dividido en cinco fase larvrias en lo cual las 3 primera se desarrollan en una etapa libre la cual ocurre en los pastos el periodo larvario que se desarrollan son desde el periodo larvario 1 hasta el periodo larvario 3 siendo esta etapa larvaria la forma infectante la cual entra al cuerpo del animal y se desarrollan los otros dos periodos larvario que son etapa larvaria y etapa larvaria 5 y de esa forma se termina de cumplir todo el periodo del ciclo de los nematodos. (O'Connor, et al., 2006).

Figura N° 2.

Estructura Anatómica del Nematodo



(Vignatu et al.,2025)

3. Ciclo de vida de los nematodos del Bovino

En la figura número uno podemos observar el ciclo de los nematodos en el sistema digestivo que ocurre de una forma simple y directa del cual no requiere de otro animal para completar el ciclo, el ciclo está dividido en dos parte una endógena y la otra en el sistema digestivo del hospedador la forma infectante es y que ocurre en las pastura es la que se conoce como fase libre o exógena la que ocurre en el sistema digestivo (Soca et al., 2005; Márquez, 2014).

Fase parasitaria exógena

La fase externa llamada fase exógena inicia con la salida del huevo a través de las heces de animales infectados con las condiciones del ambiente humedad, temperatura y una buena oxigenación el huevo tiene todas las condiciones para eclosionar y dar origen al primer periodo larvario la cual tendrá crecimiento y desarrollara para convertirse en la larva 2 durante estos estadio se alimentara de las bacterias que crecen en la materia luego del periodo larvario 1 y 2 pasa al periodo larvario 3 con doble cutícula protectora esta larva no tiene capacidad de alimentarse y se mantendrá en reserva energética , este periodo de larva 3 es su forma infectante la cual son muy activa realizar una migración de forma horizontal y verticalmente es migración ocurre de las heces a las pasturas donde son consumida por los rumiantes. (Soca et al., 2005; Márquez, 2014).

Fase parasitaria endógena

La fase que ocurre dentro del animal es la fase endógena que empieza con la larva 3 la cual es consumida por el rumiante dentro del sistema digestivo empieza su desarrollo a la etapa adulta la cual tiene su capacidad reproductiva, toda esta fase ocurre dentro del sistema digestivo del animal, en la fase de larva 3 una vez en el intestino tiene la capacidad de penetrar la membrana de la mucosa intestinal donde desarrollará la fase cuatro y fase cinco para convertirse posteriormente en el parásito adulto con capacidad reproductiva , durante este periodo el parásito tiene la capacidad de provocar alteraciones digestivas que dañan el sistema digestivo y deteriora la salud del animal , posteriormente en este periodo ocurre la copula entre el macho y la hembra

dando inicio a la oviposición, donde los huevos serán eliminado por medio de las heces de los animales infectados una vez fuera inicia otro ciclo en su fase exógena (Márquez, 2014; Soca et al, 2005).

El nematodo para poder ingresar al hospedador necesita de diferentes mecanismo para poder llegar al hospedador la mayoría de esos mecanismo tras ingesta de la larva tres que es la forma infectante utiliza los alimentos y el agua para poder ingresar al hospedador, la mayoría de formas de entrada del parasito es de forma oral que mayormente están presente en los pastos, estos tipos de parásitos que ingresan pueden ser (*Trichostrongylus*, *Haemonchus*, *Ostertargia*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Bunostomun* y *Oesophagostomun*), por la vía de ingesta de leche o la vía galactógena (*Neoascaris*) a través de la vía cutánea (*Bunostomum*) (Mestra et al. 2005).

4. Acción Dañina de los parásitos gastro Intestinales

Los parásitos pueden causar daños al hospedador de diferentes formas:

1. Se alimentan de sangres de linfa y mucosas.
2. Se alimenta de contenido solido de lo que ingiere su hospedador.
3. Compiten con su hospedador por el alimento que ingieren tomándolo del intestino en el caso del (Acárididae) o absorbiendo de la superficie de las mucosas como en el caso de los (cestodos).
4. Producen obstrucciones mecánicas en el intestino por la gran cantidad de parásitos como es el caso de (áscaris).
5. Son causantes de atrofia por presión como es el caso de los (quistes hidatídicos).
6. Causan destrucción de células del intestino como los enterocitos ya que se desarrollan en su interior como los (Coccideas).
7. Tiene la capacidad de producir diferente toxina como hemolisina, histolisina, y anticoagulantes.

8. Son causante de procesos alérgicos.
9. Producen diversas alteraciones en el cuerpo del animal como, inflamaciones, hipertrofia, hiperplasia, y formación de nódulos.
10. Estimula el crecimiento de células cancerígenas como en el caso de (*Spirocescalupi*).
12. Tiene la capacidad de alterar el sistema inmune y dejar sin defensas hacia otras.

Las acciones nocivas ejercidas por parásitos gastrointestinales suelen afectar a sus huéspedes provocando lesiones como:

Tener acción 'expoliadora directa o indirecta' en el tubo digestivo. 2. Ejercen acciones 'mecánicas' que serán: de tipo traumático, cuando se manifiestan por la producción de lesiones en los tejidos del huésped (lesiones intestinales por órganos lacerantes de gusanos); de tipo obstructivo, cuando el numero o volumen de los parásitos provocan la obstrucción de un conducto orgánico (al intestino por madejas de ascáridos) y de tipo compresivo cuando el desarrollo del parasito determina fenómenos de compresión en los órganos y tejidos adyacentes (Blood y Herdenson, 2002).

5. Signos clínicos que presentan los animales con parasitosis gastrointestinal

1. Reducción de la ingestión, aunque siguen alimentándose.
2. Adelgazamiento.
3. Heces blandas, se van volviendo líquidas, de color verde oscuro o amarillo.
4. Deshidratación.
5. Diarrea persistente.
6. Con frecuencia los tratamientos antihelmínticos no son eficaces.
7. Pelaje largo y seco.
8. Taquicardia, fiebre de leche.

9. Mucosas pálidas, pero sin anemia.
10. En algunos edema submandibular.
11. Postración.
12. Afecta a animales de toda edad.

(Blood y Herdenson, 2002).

Los rumiantes ante la infestación de estos parásitos gastrointestinales presentan síndromes de anemia, de gastroenteritis y que los daños o lesiones evolucionan en forma crónica muy lenta. Como se puede ver los síntomas no son específicos, en general presentan diarreas, pérdidas de peso, falta o pérdida del apetito. 'Los parásitos matan de hambre a los animales (Caballero y Hervás 1985).

En el huésped, la resistencia, la edad, la nutrición y la enfermedad asociada influyen sobre el curso de la infección parasítica gastrointestinal y actualmente está bien establecido que los animales ligeramente parasitados, que no muestran evidencia clínica de la enfermedad, se comportan menos eficientemente en el campo de pastoreo, la lechería o establecimiento de engorde (Merck, 2000).

6. Diagnóstico de las enfermedades parasitarias gastrointestinales.

El diagnóstico de los parásitos se realiza mediante identificación microscópica en las heces por el método de emigración (técnica del embudo de Baerman o método de copa), para ello es necesario extraer por vía rectal muestras de heces de gran número de animales bovinos, comprendidos entre todas las edades o buscar clínicamente muestras de animales enfermos (Quiroz, 1978).

Método de Mc Master

Se utiliza para detectar y cuantificar ooquistes y huevos por gramo de materia fecal. Se coloca solución saturada de NaCl a la probeta del equipo, son 28ml de solución más 2gr de heces medidos por el desplazamiento de 2 ml que hacen un volumen total de 30ml.

Los compartimentos delimitados de la cámara miden 1cm cuadrado, cada compartimento tiene seis divisiones. El fondo de la cámara mide 1.5 mm por cada lado que dan un total al sumar de .30 ml.

El resultado se expresa como: Número de huevos por gramo de heces (HPG).

Figura N° 3

Método De Mc Máster



(Hummelinck, 1946)

7. Control biológico

El control biológico se constituye en una de las estrategias más prometedoras para un control sustentable de los nematodos gastrointestinales por lo que la búsqueda de formulaciones que vehiculicen su uso como método de control es motivo de investigación. La principal ventaja de esta estrategia biológica es la eficacia sin resistencia de los parásitos de ovinos de sistemas tradicionales, un método ecológico

diseñado por el hombre para disminuir las poblaciones parasitarias a un nivel subclínico aceptable, conservando estas poblaciones en un nivel no perjudicial gracias a antagonistas vivos naturales (Sagüés et al., 2011). Sumado a esto como método de control biológico permite que los productos adquieran un valor agregado, ya que es conocida la preocupación de la tendencia en el mercado de consumir productos orgánicos que no pongan en riesgo la salud humana con residuos de agentes químicos (Torres-Acosta et al. , 2012).

Teixeira et al. (2013) definen el control biológico como una estrategia ecológica cuyo objetivo es disminuir las poblaciones parasitarias a un nivel aceptable, buscando mantener las poblaciones parasitarias en un nivel no perjudicial basado en el comportamiento y acción de antagonistas naturales.

Es importante entender el control biológico, como una medida de regulación cuyo objetivo no es acabar con el organismo diana, sino controlar su población reduciendo así sus efectos nocivos. Este mecanismo de acción es lo que permite diferenciar a este mecanismo de los antihelmínticos, cuyo propósito es eliminar la totalidad de los parásitos que se encuentran en el animal (Mederos et al.,2012).

8. Depredadores

Son hongos saprófitos capaces de formar un sistema miceliar extensivo en el medio empleando como recurso nutritivo las fases de vida libre de los nematodos. Algunos de los géneros más importantes dentro de este grupo son *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* y *Monacrosporium* (Chandrawathani et al, 1999; Ribeiro Vilela et al, 2012). A través de mecanismos como la producción de un material adhesivo sobre las hifas y la formación de complejos anillos constrictores, los hongos depredadores son capaces de atrapar y consumir los estadios larvarios de los nematodos presentes en las heces y en el suelo (Arias et al., 2013). Existe un grupo abundante de hongos depredadores que utilizan como estrategia de captura la formación de redes tridimensionales adhesivas cubiertas por una capa mucilaginosa a la que quedan adheridos los nematodos. La producción de esta red parece estar estimulada por el forcejeo de los nematodos atrapados (Cruz et al., 2009).

El mecanismo de acción de los hongos nematófagos es una combinación de la liberación de enzimas hidrolíticas extracelulares como proteasas séricas, quitinasas y colagenasas que digieren la cutícula del nematodo y fuerza mecánica (órganos de captura) (Paz-Silva et al., 2011). Una hora después de la penetración, el hongo forma un bulbo infectivo en el interior del nematodo y en pocas horas ocupa completamente el cuerpo de este (Assis et al., 2013). El proceso de digestión puede llegar a durar hasta una semana, tras lo cual la hifa trófica se lisa y el hongo se desarrolla de nuevo saprofiticamente, hasta que la presencia de nematodos en el medio estimula nuevamente su actividad depredadora (Burke et al., 2005).

Los géneros de nematodos parásitos de los ovinos, cuyas larvas son más móviles y con mayor capacidad infectante (*Cooperia* , *Ostertagia* y *Haemonchus*), estimulan una mayor producción de redes tridimensionales que aquellas larvas de movimientos más lentos, como *Oesophagostomum* (Assis et al., 2012).

Las L1 y las L2 son más lentas en sus movimientos, pero más susceptibles de morir rápidamente que las L3, las que al mantener la vaina de la L2 obtienen más protección, y son más resistentes a la mortalidad (Paz-Silva et al., 2011).

En la investigación de hongos nematófagos para el control de los nematodos gastrointestinales, la mayoría de los trabajos se han centrado en las especies depredadoras, debido a que su carácter saprofitico permite el aislamiento y mantenimiento en cultivos puros, facilitando así su producción in vitro (Arias et al., 2013). Estos hongos han sido aislados en gran variedad de hábitats, especialmente, en medios ricos en materia orgánica como pastos, estiércol o abono (Jackson y Miller, 2006). Entre las especies conocidas de hongos nematófagos, los *Duddingtonia* *Flugrants* cumplen con todas las características antes descritas y además tienen la capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal de los ovinos y otras especies domésticas como equinos, cerdos y bovinos, pudiendo germinar y luego reducir el número de larvas infectantes en materia fecal; la supervivencia en el tracto gastrointestinal se debe a que sus clamidosporas presentan una pared gruesa que les permite tolerar condiciones extremas (Ribeiro, et al., 2014).

La temperatura óptima para el crecimiento y función depredadora del hongo se sitúa entre 10 y 30 °C, alcanzando su máxima actividad para la formación de redes entre 25 y 28 °C; factores como luz, humedad, pH y la presencia de oxígeno, pueden también influir en la formación de elementos de captura (Paraud *et al.*, 2005).

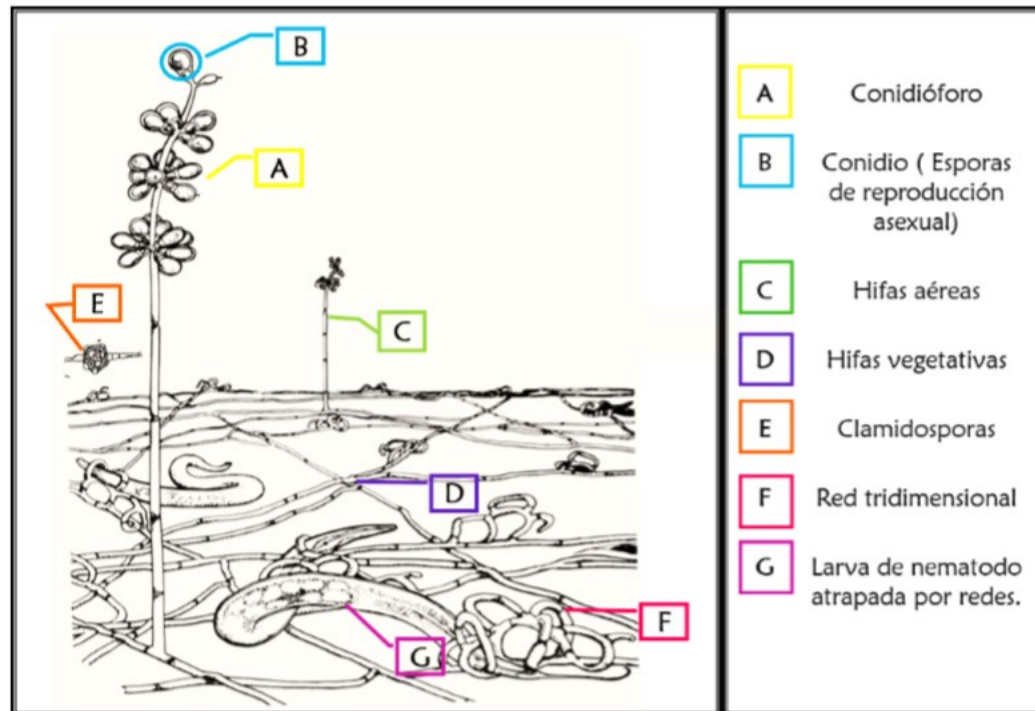
Es indispensable comprender que cualquier agente de control biológico debe resultar inocuo para el medio ambiente, por este motivo debe valorarse si la presencia masiva de clamidosporas, en las heces, puede alterar el equilibrio natural del ecosistema. Maciel *et al.* (2010) observaron que la presencia de *D. flagrans* no provocó cambios en la fauna de nematodos del suelo, y concluyeron que el uso del hongo no tiene efectos ambientales adversos.

Así, también Eysker, *et al.* (2006) y Teixeira, *et al.*, (2013), demostraron, no solo, que el uso masivo de clamidosporas de *D. flagrans* no produce efectos adversos en el ambiente, sino que además el hongo no sobrevive largos períodos en el mismo. *D. flagrans* y otras especies de hongos nematófagos utilizados como agentes de control biológico deben tenerse en cuenta como una medida profiláctica, ya que su acción se ve limitada a los estadios de vida libre de los nematodos gastrointestinales, por lo que debe combinarse con otras estrategias de control que actúen sobre las fases de vida parasitaria. Si bien es indudable que *D. flagrans* es el hongo con mayor potencial, otras especies como *monacrosporium taumasium arthrobotrys oligospora* y *Arthrobotrys conoides* también han demostrado eficacia en el control de nematodos gastrointestinales.

Los hongos nematófagos tienen la capacidad de capturar y preda larvas de nematodos en las heces antes que migren a las pasturas, evitando así su ingestión por parte de los animales en pastoreo. De esta manera logran prevenir ampliamente la infección de los bovinos, pues la fracción más significativa de la biomasa de los parásitos se encuentra en las praderas (95-97%). En la Figura 4, se muestra un esquema con las principales estructuras de los hongos nematófagos.

Figura N° 4

Esquema de las estructuras de los hongos nematófagos



Modificado de Barron (1977).

9. Endoparásitos

Estos hongos se caracterizan porque sus hifas crecen únicamente dentro del nematodo, exceptuando las hifas fértiles que crecen en el exterior. Según la especie, las esporas pueden ser ingeridas para penetrar en el interior del nematodo y, posteriormente, germinar; las esporas se pueden adherir y perforar la cutícula del nematodo o pueden presentar zoosporas móviles que parecen tener un tropismo positivo hacia los *nematodos* (De Oliveira Tavela et al., 2011).

Ensayos invitro realizados con Harposporium anguillulae y Drechmeria coniospora demostraron una alta eficacia en la disminución de larvas en cultivos (Cezar et a l., 2008; Kelly et al., 2009; Wachira et al., 2009). Sin embargo, el carácter de parásito obligado de este grupo de hongos limita su empleo como agentes de control biológico, ya que su dispersión, únicamente, se realiza por contacto directo entre individuos

parasitados, necesitan un medio con alta concentración de agua para difundirse y aquellos que deben ser ingeridos solo serían activos contra los estadios parasitarios L1 y L2 que son los que se alimentan en el medio ambiente y no sobre la L3 infectante que al presentar cutícula doble no se alimenta y, por tanto, no sería atacada (Arroyo Balán et al. , 2008; Ribeiro, *et al.*, 2014).

10. Control mediante Vacunas

Una estrategia de control, aún en desarrollo, es la aplicación de vacunas vivas y recombinantes, las cuales tienen cierto tipo de limitaciones a causa de la dificultad de obtener antígenos de los parásitos en diferentes estadios y el desconocimiento parcial de la respuesta inmune por parte del hospedero (Zhao *et al.*, 2011).

Se desarrolló una vacuna con larvas irradiadas contra *Dictyocaulus viviparus*, la cual ha sido probada varias veces y ha mostrado resultados promisorios, pero las razones del fallo en su comercialización no han sido publicadas (FAO, 2003). En el caso de *Haemonchus contortus*, el uso de larvas irradiadas parecía ser una buena alternativa y en 1987 se produjo una vacuna llamada “Contortin”, sin embargo, por el costo, su eficiencia y el material necesario para su elaboración, se cuestionó su aplicación. Hoy en día, el uso de antígenos excretorios/secretorios y somáticos de este parásito parece ser una buena alternativa (Caballero et al., 2009). Estudios más recientes en cabras, (Zhao *et al.*, 2011) demuestran que, mediante la vacunación con biológicos DNA, se inducen la protección parcial contra *Haemonchus contortus*, en un 47.5% en excreción de huevos y un 51.1% de reducción de parásitos adultos. Otras vacunas como la desarrollada para *Ostertagia ostertagi* reduce el número de huevos de nematodos excretados por los animales, previniendo de forma indirecta la ingestión de los parásitos en las rotaciones siguientes, la limitante de esta vacuna es que ofrece protección únicamente por 2 meses.

Los resultados de estos estudios muestran una reducción de 50 a 70% en la excreción de hpg y una reducción en la carga parasitaria adulta; para mejorar la inmunidad se necesita.

La vacuna comercial

Hoy en día, vacunas basadas en el antígeno Bm86, Gavac ® (Heber Biotec, La Habana, Cuba), TickGARD (Hoechst Salud Animal; Australia), y TickGARD PLUS (Intervet Australia, Australia) están disponible de manera comercial (de la Fuente y Kocan 2006; Odongo *et al.*, 2007), sin embargo la especificidad de la vacuna contra la *R. microplus* es menor en México, es posible que esto se deba al polimorfismo genético entre las cepas de *R. microplus* que ya ha sido reportado por varios autores (Cobon *et al.*, 1995, 1997; García, 1994).

Además del antígeno Bm86 y sus variantes, se han venido investigando otros entre los que se encuentran en etapa experimental como candidatos a vacuna, el Bm91 (Willadsen *et al.*, 1996), ferritin 2 (Hajdusek *et al.*, 2010), extractos de glándula salival de garrapata (Jittapalapong *et al.*, 2008), RAS-3, RAS-4 y RIM36 (Bishop *et al.*, 2002; Imamura *et al.*, 2008), vitellin-degrading enzyme (VTDCE) (Seixas *et al.*, 2008), el fragmento sintético n-terminal del BMti (Andreotti, 2007) y el BD86 (Kopp *et al.*, 2009) entre otros. Estos antígenos han demostrado tener mayor o menor éxito, sin embargo ninguno de ellos ha alcanzado la fase comercial, y seguramente su efectividad estará sujeta a las variables antigénicas de las cepas de garrapatas de donde fueron clonadas (Guerrero *et al.*, 2012; Nuttall *et al.*, 2006).

Caracterización Macroscópica de los Hongos

Las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración, blancas - verdes, amarillo – verdosas; las áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos. (Chávez, 2006).

Caracterización Microscópica de los Hongos

Los hongos en su estado vegetativo presentan micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. (Infante *et al.*, 2009).

VI. Diseño Metodológico

1. Tipo de estudio

Este estudio fue de tipo experimental aplicado con componente descriptivo, dado que busco caracterizar especies nativas y probar su potencial funcional para control biológico, ya que se realizará la identificación de hongos y capacidad de control de los nematodos gastrointestinales; donde cada hongo depredador aislado se considerará un tratamiento con 4 réplicas cada uno.

Este análisis se realizó para la evaluación de la variable capacidad depredadora de los hongos, lo que permite describir la diversidad fúngica I y determinar potenciales agentes biocontroladores para aplicaciones futuras en campo.

El estudio dividido en dos fases principales:

Aislamiento e identificación de cepas de hongos autóctonos de muestras de suelo y heces provenientes de rumiantes, mediante clave morfológica.

Evaluación in vitro de la capacidad depredadora de los hongos aislados contra larvas infectantes (L3) de nematodos gastrointestinales de rumiantes, para seleccionar las cepas con mayor potencial biocontrolador.

2. Área de estudio

El estudio se realizó en el Centro de Desarrollo Tecnológico del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA) ubicado en el municipio de Posoltega, departamento de Chinandega y en el Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos (CIRCB) de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la UNAN-León, ubicado a 1.5 Km al sureste de la ciudad de León, carretera hacia La Ceiba. Los aislamientos se realizaron a partir de muestras de suelo, heces y larvas de nematodos recolectadas en fincas del departamento de León y Chinandega, las cuales tuvieron una distribución de 4 fincas en el viejo Chinandega de la comunidad el manzano II y 12 fincas de león de los municipios de Nagarote y León.

3. Población de estudios

Fueron bovinos seleccionados de 20 fincas de Innovación tecnológicas del INTA en León y Chinandega.

4. Muestra de estudio

La muestra de estudio fue tomada de la base de datos del INTA utilizando un muestreo aleatorio simple que permite estimar parámetros poblacionales y que además es un plan de muestreo que se caracteriza por que otorga la misma probabilidad de elegir a todos los elementos de una población especialmente cuando la población es pequeña. (Balzarini *et al* 2008)

5. Fuente de Información

Es una fuente primaria que se obtuvo de los productores, propietarios del ganado, e información secundaria por resultados laboratoriales

6. Instrumentó de recolección de datos

Se utilizó un cuestionario que proporcionara información sanitaria de los animales de donde se obtendrán las muestras de heces, se utilizó una hoja de campo para registrar los resultados, (ver anexos 3, 4 y 5).

7. Procedimiento de recolección de datos

7.1. Obtención de muestras de suelo y compost:

Para aislar los hongos nematófagos se tomaron muestras de suelo y heces de bovinos de diferentes fincas del occidente del país, seleccionaron las fincas con producción orgánica y de compost debido a que normalmente tienen un alto contenido en hongos nematófagos (DACKMAN y col., Microbiol. Ecology 3, 89-93 (1987), porque es un ambiente óptimo de supervivencia de los hongos en estado saprofítico.

Las muestras se tomaron del suelo entre 5 y 10 cm de profundidad, cerca de sitios en los que se observó estiércol seco de rumiantes y materia orgánica.

Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, cada una fue rotulada con el nombre del municipio y la finca.

Posteriormente se transportaron al laboratorio. Las muestras se sembraron en cajas de Petri de 9 cm con agar agua (PDA) mas 20 gr de Agar dextrosa y 1000mg de amoxicilina equivalente a dos capsulas, (Ver en anexos), mediante la técnica de dilución del suelo y heces se agregó a platos Petri aplicando con pipeta plástica graduada. Cada muestra se sembró por triplicado. El agar nutritivo se utilizará para el aislamiento de microorganismos poco exigentes. Posteriormente, los cultivos se sellaron con papel parafilm y se mantuvieron en la incubadora a 27°C y a una Humedad de 75% por 4 día. El seguimiento del crecimiento se realizó diariamente con la ayuda del estereoscopio y del microscopio de luz invertida.

7.2. Aislamiento de los Hongos

Una vez pasado los cuatro días en los platos Petri se llevó a observación al estereoscopio para medir crecimiento e identificación de hongos por medio de su maduración fisiológica, identificados cada uno de los hongos se aislaron en nuevos platos Petri para obtener un cultivo puro por cada hongo, luego pasaron a la Incubadora por otros cuatro días.

Pasado los 4 días de Incubación y purificados los hongos se colocaron en cada plato Petri con las larva obtenida , luego fue sellada y colocada en la Incubadora por 4 día, se estuvo observando diariamente el enfrentamiento de la larva de vida libre y el hongo, en este caso las larvas constituyo la única fuente de nutrición de los hongos, por una parte, y, por otra, su movilidad estimula la formación de estructuras de atrapamiento de los hongos, ya que algunas especies no forman trampas espontáneamente sino gracias a los movimiento de la presencia de las larvas.

7.3. Técnica de coprocultivo para obtención de L1 y L2 de *Strongyloides* con la técnica de migración Larvaria o de Baermann

Par la obtención de la larva se usaron muestras frescas tomadas directamente del recto de los animales, una vez obtenida la muestra fue depositada en frasco plástico de muestras y se trasladó al laboratorio del INTA (CEO Chinandega).

Una vez en el laboratorio se utilizó la técnica de Baermann

Este método está basado en la capacidad de captura de larvas de nematodos la cual tiene la capacidad de migrar dentro de un sustrato líquido, se pasará a sedimentarse al fondo de un recipiente plástico

Materiales utilizados: Embudo de 7 a 10 cm de diámetro, Tubo de ensayo, Manguera de látex, Gasa, Caja Petri, Microscopio

Técnica:

Se unió el embudo al tubo de ensayo por medio una manguera de látex, luego se añadió una capa de papel toalla y una capa de gasa al embudo.

Luego se disolvió 10 gr de heces con agua destilada con temperatura ambiente

Agregar la solución al embudo:

La muestra debe de permaneció húmeda entre 6 a 24 horas para permitir la migración larvaria, por un periodo de siete días a temperatura ambiente

Pasado el tiempo se retiró el tubo de ensayo con el sedimento de la larva se extrae el contenido con una pipeta y se pasa a un tubo de ensayo con sacarosa, se centrifugo a 2000 rpm la larva quedo al fondo del tubo de ensayo donde se tomaron una muestra con una pipeta plástica para evaluar su movilidad con un microscopio con lente de 40x.

7.4. Aislamiento de hongos con capacidad nematófaga

A partir de los cultivos en los que se observen larvas atrapadas, se realizaron transferencias a otras cajas con Agar Agua; el número de transferencias dependió de

la obtención de cultivos de hongos puros. Para esta transferencia se tomaron con asas metálicas conidios que fueron sembrados en cajas con AA, con el objeto de aislar y purificar el hongo, lo cual se puede lograr luego de tres transferencias. Posterior a la obtención del hongo puro se sembró en agar papa dextrosa (PDA) y agar harina de maíz (AHM), para su óptimo crecimiento, multiplicación y posterior identificación.

7.5. Identificación de los hongos

Para la identificación de los hongos se caracterizó microscópicamente y microscópicas como:

- El color, la textura y pigmentación de las colonias; así como el cambio de color del medio
- La morfología de los conidios, tamaño y número de los mismos por arreglo, si eran septados o no y la forma de las células.
- Hifas: si éstas eran hialinas y/o si eran septadas o no
- Producción de clamidosporas
- Características de las estructuras de atrapamiento: dedos adhesivos, anillos simples o constrictores y redes tridimensionales.

Para la observación de las características microscópicas, así como para la medición de los conidios se utilizó el azul de lactofenol (Anexo 5). Una vez establecidas las características de cada hongo se identificaron los aislados siguiendo las claves morfológicas de Cooke y Godfrey (Cooke & Godfrey, 1964).

7.6. Selección por estrés primario: Prueba de digestión artificial

Para evaluar si los aislamientos conservaban su capacidad nematófaga se sometieron a una prueba de digestión artificial. Se evaluó la resistencia y viabilidad de los conidios y/o clamidosporas cuando son sometidas a pruebas de saliva sintética y digestión ruminal y digestión abomasal. Para esta prueba fue necesario obtener los conidios y clamidosporas. Cada uno de los aislamientos se sembró previamente en medios como

PDA y AHM para favorecer la producción de conidios y clamidosporas (Osorio & Victoria, 2014).

El número de clamidosporas y conidios fue calculado por recuento en la cámara de Neubauer. Se partirá de una concentración inicial de 6×10^6 conidios y clamidosporas/ml. A partir de esta concentración se obtendrán seis suspensiones con una concentración final de 6×10^6 /ml, 5×10^6 /ml, 4×10^6 /ml, 3×10^6 /ml, 2×10^6 /ml, 1×10^6 /ml. Cada concentración será confirmada por recuento en cámara de Mac master

Cuando se obtuvo todas las concentraciones se sometieron a incubación in vitro simulando la digestión ruminal.

7.7. La prueba de digestión artificial se realizara de la siguiente forma:

siguiendo el procedimiento descrito por Tilly and Terry, modificado (Ojeda-Robertos et al., 2009), teniendo en cuenta que se hizo una sustitución del alimento a evaluar por clamidosporas.

Se tomarán tubos con capacidad de 75 ml que contengan:

- 1gr de alimento seco (50% maíz y 50% forraje)
- 32,5 ml de saliva
- 7,5 ml de cada concentración de clamidosporas y/o conidios
- 10 ml de líquido ruminal

El volumen total de la mezcla en cada tubo se agregó 50 ml; a los tubos se les tomaron un volumen de 5ml para realizar la evaluación que se denominará Tiempo CERO; este valor fue usado como referencia para evaluar la pérdida de clamidosporas durante los procesos de incubación.

Digestión de saliva artificial y Líquido Ruminal: Los tubos correspondientes a las 6 diluciones, con ocho réplicas cada una se distribuirán en dos grupos: el primer grupo (cuatro replicas) se incubará a 39°C por 12 horas (R1) y el segundo grupo (cuatro replicas) se incubara a 39°C por 24 horas (R2), en agitación constante a 150 rpm

después de cada periodo de incubación (12 y 24h), de cada uno de los tubos se tomaran muestras de 5ml, para realizar recuento de conidios y/o clamidosporas(Ojeda-Robertos et al., 2009). Todas las muestras tomadas de los diferentes tiempos de incubación serán refrigeradas (4°C), para su posterior cuantificación.

7.8. Cuantificación de las clamidosporas y determinación de la calidad

Para evaluar el número de conidios y/o clamidosporas de las muestras obtenidas en cada una de las digestiones, CERO horas, R1, R1+A, R2 y R2+A, se realizó una dilución 1:5 de cada muestra previa homogenización en agua destilada estéril, con un volumen final de 5 ml. En cada dilución se cuantificó el número de conidios y/o clamidosporas por medio de tres conteos independientes en la cámara de Mac master (Ojeda-Robertos et al., 2009).

8. Identificación de estructura de hongos

En la identificación de los hongos se observó durante 15 días pos-inoculación el crecimiento de las colonias en su forma y color, la observación fue cada 24 horas hasta llegar a la madures del hongo en la observación se consideró: El color, la textura y pigmentación de las colonias; así como el cambio de color del medio

Figura N° 5

Crecimiento de colonias



Para la identificación de estructura del hongo se realizó un montaje de muestra en medio de PDA.

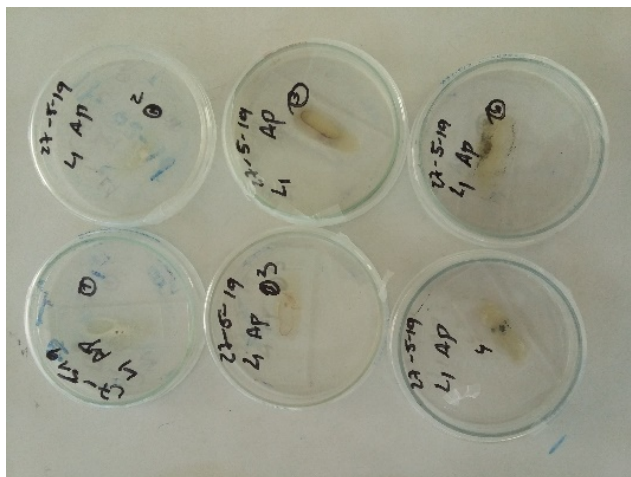
Lo cual se utilizó portaobjeto con medio de PDA se depositó muestra de cada hongo y se le colocó un cubreobjeto, luego a en plato Petri y sellado, se dejó por 7 día en la cámara de cultivo, se le dio observación de crecimiento cada 24 hr, una vez desarrollado el hongo se selló con esmalte.

Una vez montado y sellados se dejó reposar por 4 hr, para luego ser observadas con el microscopio de luz invertida lo observado fue:

- La morfología de los conidios, tamaño y número de los mismos por arreglo, si eran septados o no y la forma de las células.
- Hifas: si éstas eran hialinas y/o si eran septadas o no
- Producción de clamidosporas

Figura N°6

Montaje de hongos con medio AP en portaobjeto y cubre objeto



8.1. Aislamiento de hongos con capacidad de captura

Una vez identificados los hongos se sometieron a prueba de captura de nematodos, se realizaron dos tipos de prueba:

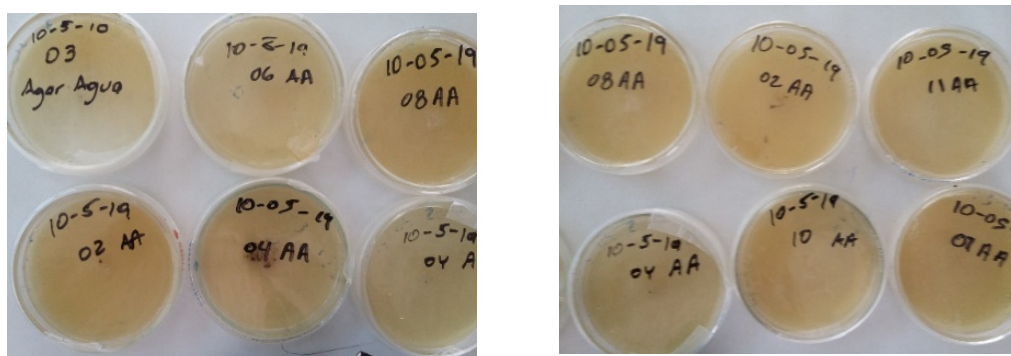
Aislamiento del hongo más larva *Strongyloides* en AA:

Se realizaron 4 replica de cada hongo identificado en AA, Luego de tres días de incubación del hongo en AA , a cada plato Petri se le agregara larvas de nematodos gastrointestinales previamente lavadas con sacarosa al 40%; en este caso las larvas constituirán la única fuente de nutrición de los hongos, por una parte, y, por otra, su movilidad estimula la formación de estructuras de atrapamiento de los hongos, ya que algunas especies no forman trampas espontáneamente sino gracias a la presencia de las larvas.

El plato Petri estuvieron en el medio de incubación a temperatura de 27° y humedad relativa de 75%, el cual se observó el crecimiento cada 24hr por 7 días.

Figura N°7

Aislamiento en AA alimentadas con Larvas *Strongyloides* de día 1



8.2. Enfrentamiento del hongo más larvade *Strongyloides* en tubo de ensayo con agua esterilizada

En tubos de ensayo conteniendo agua esterilizada se agregaron un promedio de 160-180 larvas por tubo el cual se realizó un conteo por muestra de la cámara de **McMaster**, de lo cual se realizaron 4 replica por cada hongo identificado, los tubos de ensayo fueron sellados con parafinas, los tubos estuvieron en el medio de incubación a temperatura de 27° y humedad relativa de 75%, el cual se observó el crecimiento cada 24hr por 7 días.

8.3. Identificación de Hongos

Cada una de las muestras fueron identificadas con códigos únicos de cada finca que se obtuvieron las muestras, los códigos establecidos fueron:

Tabla N° 2

Código y réplicas de muestras

Código de muestra	N° de Replica	N° de Hongos encontrados sin identificar
Dip1	4	8
Dip2	4	8
Dip3	4	8
Am	4	6
HS1	4	6
HS2	4	6
ML	4	6

Figura N°8

Muestra de suelo

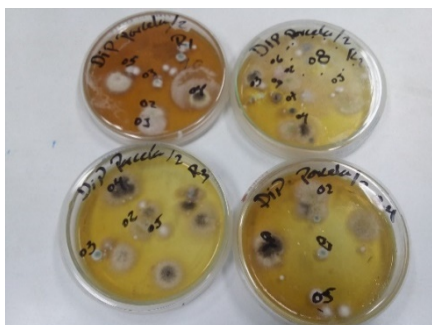


Figura N°9

Muestra de Heces de corral



Luego de codificar cada una de las replica se procedió a codificar y aislar cada hongo encontrado dándole la numeración del 1 al 11 las de suelo y códigos únicos las de heces y larvas en medio de PDA.

Figura N°10

Purificaron de hongo de suelo

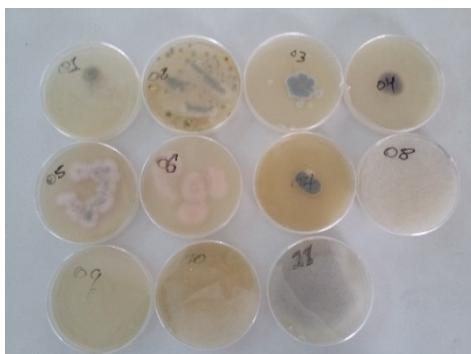
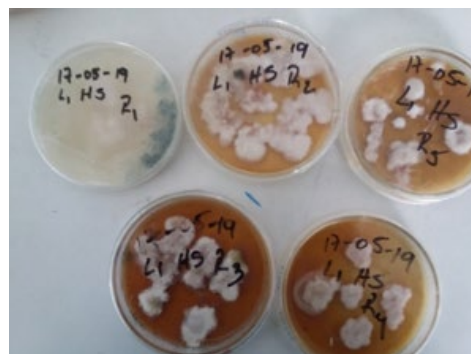


Figura N°11

Purificación Hongos de heces y larva

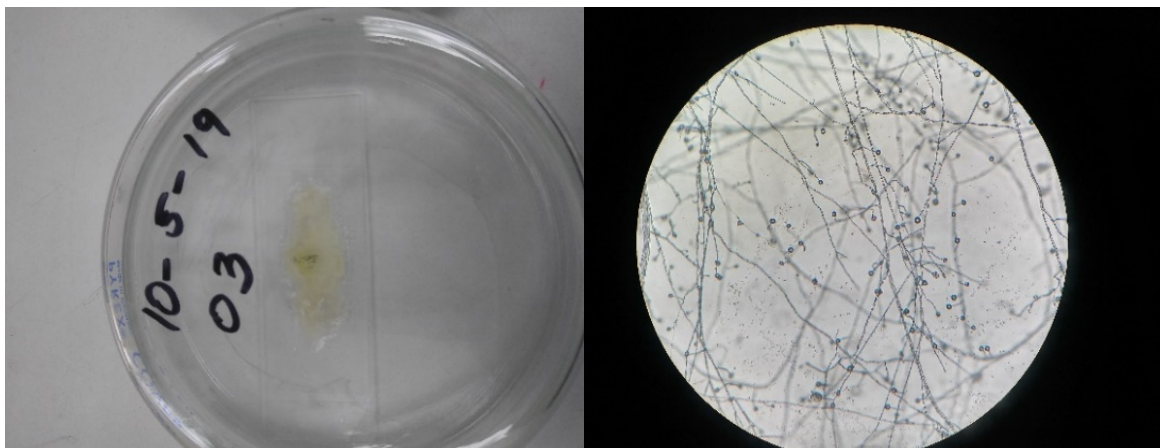


8.3.1. Identificación de hongo a nivel estructural

Una vez elaborado el montaje se observó al microscopio con luz invertida La morfología de los conidios, tamaño y número de los mismos por arreglo, si eran septados o no y la forma de las células, Hifas: si éstas eran hialinas y/o si eran septadas o no, Producción de clamidosporas, características de las estructuras de atrapamiento: dedos adhesivos, anillos simples o constrictores y redes tridimensionales. Una vez establecidas las características de cada hongo se identificaron los aislados siguiendo las claves morfológicas de (Cooke & Godfrey,.et al., 1964).

Figura N°12

Identificación nivel estructural



9. Variables de estudio

- **identificación de hongos nematófagos:** capacidad de desarrollar estructuras de Atrapamiento. La identificación de los hongos nematófagos se basaba en la morfología de las estructuras trampa y de los conidios (Cooke & Godfrey, 1964)
- **Caracterización de las especies de Hongos**
- **Sobrevivencia de una prueba de digestión artificial:** Determinación de la viabilidad de conidios y/o clamidosporas post digestión artificial.
- **Caracterización macroscópica y microscópica**
- **Capacidad predadora de los hongos in vitro.**

9.1. Porcentaje de atrapamiento teniendo en cuenta la siguiente

Fórmula (Garduño et al., 2012): (Garduño et al., 2012)

$$A = \frac{X}{X + Y + W + z} \times 100$$

Donde:

A= % de larvas atrapadas

X= número de larvas atrapadas

Y= número de larvas libres

W= número de larvas enroscadas

Z= número de larvas muertas

Además de las Cuatros réplicas por cada aislamiento, se montaron también por cada aislamiento un control consistente en sólo larvas, para evaluar y descartar posibles contaminaciones con otros hongos nematófagos.

Tabla N° 3

Operacionalización de las variables

Variable	Concepto de definición	operacional	Indicadores	Instrumentos / Métodos
Especies autóctonas de hongos	Hongos naturales del área vinculados a rumiantes	Identificación mediante morfología	Número y tipo de especies aisladas	Microscopía, mediante clave morfológica
Sobrevivencia de Cepas aisladas	Capacidad del Hongo para sobrevivir en ph de la saliva y Ruminal	Resistencia de digestión Artificial	% de cepas viables sometida a saliva del rumiante y liquido ruminal	Microscopia evaluado movilidad del hongo
Potencial para el control biológico	Capacidad para reducir nematodos gastrointestinales.	Porcentaje de larvas capturadas/eliminadas in vitro	% de reducción de larvas en cultivo	Ensayo in vitro, conteo microscópico

10. Procesamiento y análisis de datos (Estadísticos)

Se usaron estadística descriptiva y los datos fueron analizados usando estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal Wallis para la comparación de medias de los datos. Los datos se procesarán en Excel y Infostat versión estudiantil

11. Consideraciones Éticas

El presente estudio se enfocó en los principios éticos que contribuyan al desarrollo de las investigaciones científicas especialmente con el cuidado del medio ambiente y el bienestar animal, de los cual se tomaran las siguientes consideraciones

- Respeto por el entorno natural: La toma de muestras de suelo y excreta serán tomas sin alterar el ecosistema natural y la biodiversidad de la zona.
- Bienestar animal: No se someterá a ningún estrés al bovino ya que las muestras de heces serán tomadas del corral y no directamente del animal
- El aislamiento y Bioseguridad de las cepas se realizará bajo un protocolo estricto de Bioseguridad
- Consentimiento de la Información: Se solicitará permiso a los propietarios para la toma de muestras de excretas y suelo, se les informará el objetivo de la toma de muestra.

VII. Resultados y discusión

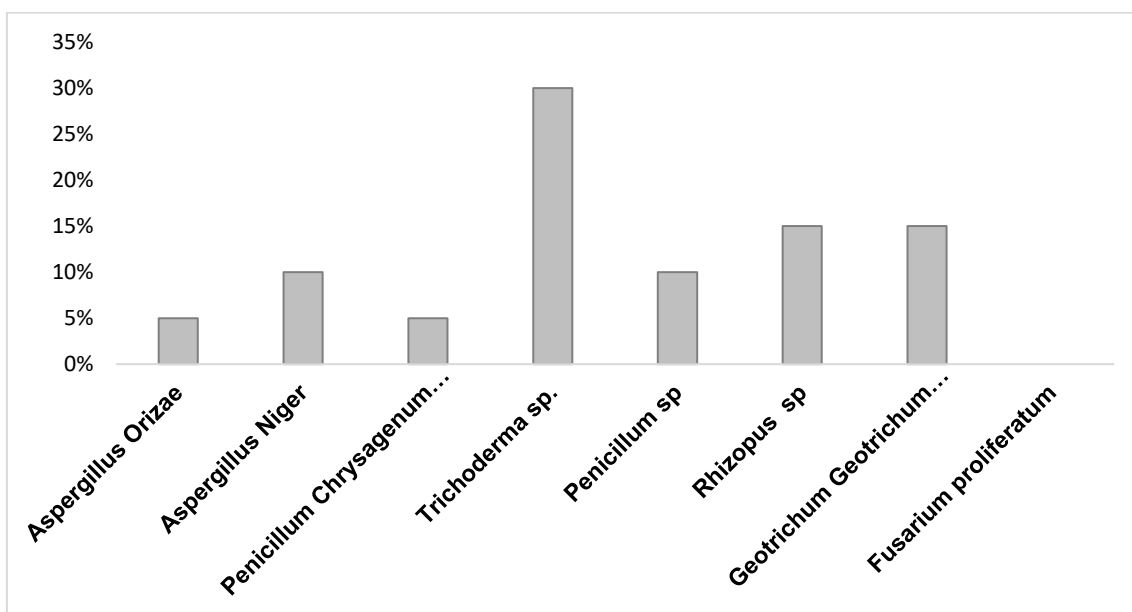
1. Identificación de hongos de muestras de suelo de corral, heces de rumiantes y muestras de larvas

De las 24 muestras obtenidas de suelo de corral heces de rumiantes y cultivos de larvas se identificaron 8 especies de hongos, presentando mayor frecuencia fue el *Trichoderma sp* con un, seguido de *Rhizopus sp*, y *Geotrichum*.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio realizado en En la Ciudad de D, C., Colombia, González (2013), que identificó en las muestras de suelo y larvas 3 tipos de especies de hongo (*Arthorobotrys ologospora* y *Arthorobotrys musiformis*)

Figura N° 13

Identificación de hongos de muestras de suelo de corral, heces de rumiantes y muestras de Larvas



2. Identificación de hongos de muestras de suelo de corral

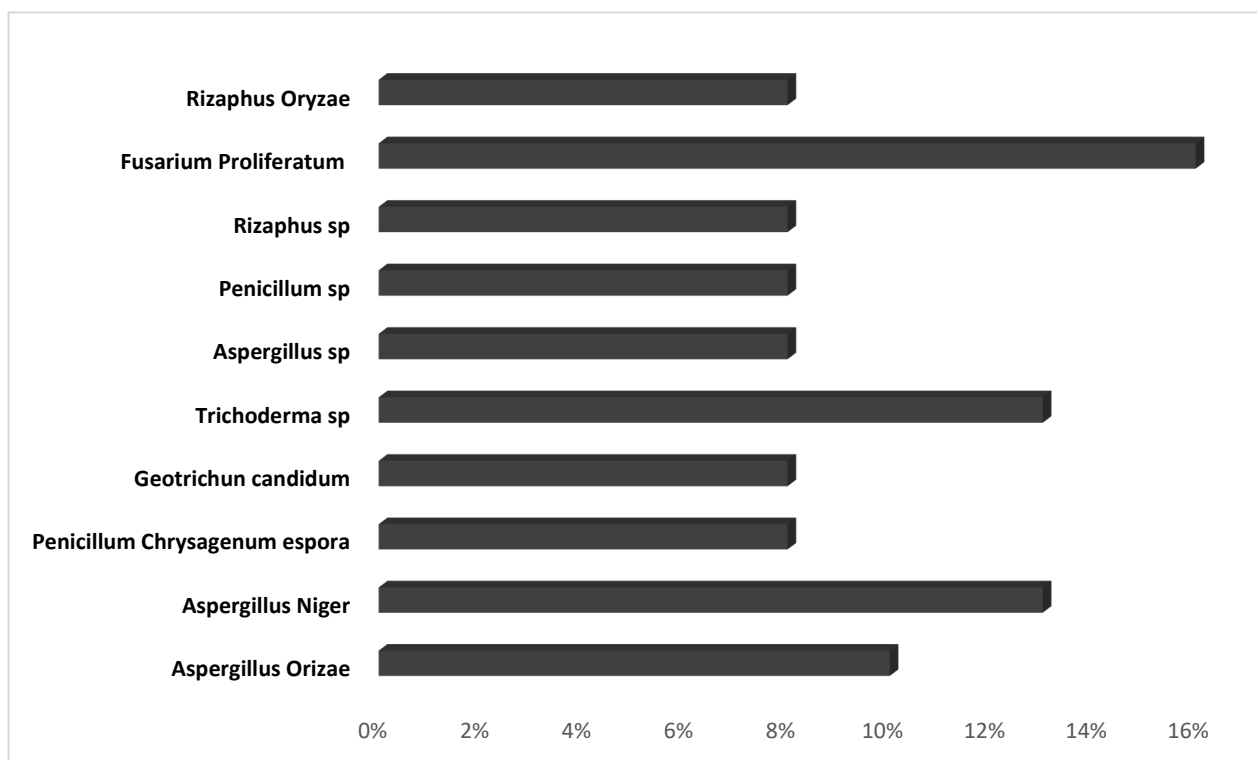
En las muestras de suelo se pudieron identificar 10 géneros de hongos, de los cuales el *Fusarium Proliferatum* fue el de mayor frecuencia con un 16% seguido del *Trichoderma sp* con un 13% y *Aspergillus Niger* con un 13%.

Esto nos indican que los suelos de los corrales tienen ciertos factores que favorecen al desarrollo de las colonias de los hongos como son la húmeda, temperatura y ph.

Estos datos con cuerda por los obtenidos por Paraud et al.(2005), que nos dice que a temperatura óptima para el crecimiento y función predadora del hongo se sitúa entre 10 y 30 °C, alcanzando su máxima actividad para la formación de redes entre 25 y 28 °C; factores como luz, humedad, pH y la presencia de oxígeno, pueden también influir en la formación de elementos de captura

Figura N° 14

Identificación de hongos de muestras de suelo de corral



3. Hongos identificados de muestras de heces de corral

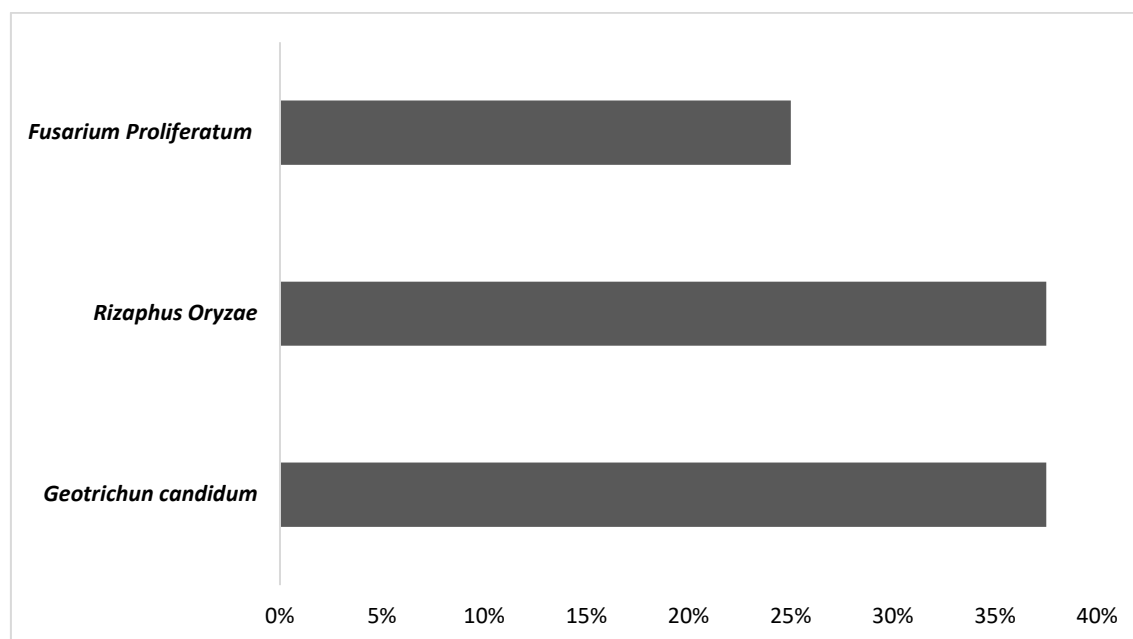
De las muestras recolectadas de las heces de los corrales se lograron identificar tres tipos de especies de hongos los cuales son *Fusarium Proliferatum* 25% siendo uno de los hongos más frecuentes en el ambiente, *Rizaphus Oryzae* con 37.5 % y *Geotrichun Candidum* 38%, siendo estos dos ultimo los de mayor frecuencia en el crecimiento en las heces.

La identificación de estos hongos en las heces encontradas en el corral nos indicas que las excretas de los rumiantes proporcionan condiciones adecuadas para el crecimiento de los hongos suministrando nutrientes por la descomposición del alimento, humedad, temperatura y ph optimo.

Estos datos concuerdan por los obtenidos por Ribeiro, et al (2014), quien indica que los hongos tienen la capacidad de atravesar el tracto gastrointestinal de los ovinos y otras especies domésticas como equinos, cerdos y bovinos, pudiendo germinar y luego reducir el número de larvas infectantes en materia fecal

Figura N° 15

Hongos identificados de muestras de heces de corral



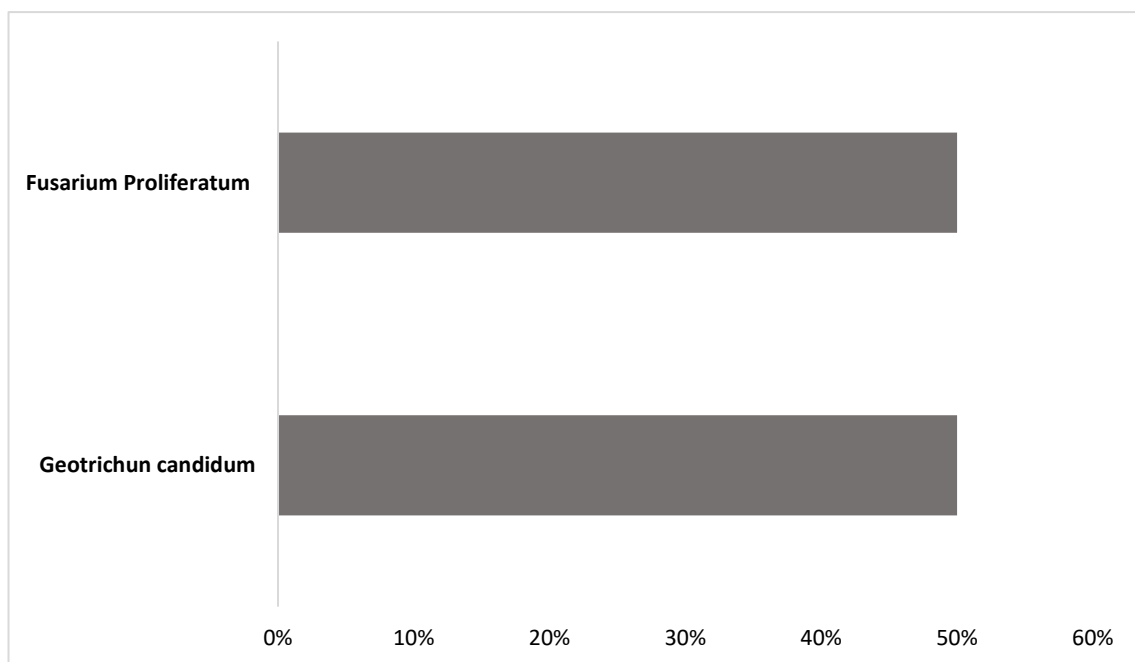
4. Hongos identificados de muestras de larvas de nematodos gastrointestinales.

De las muestras recolectadas de larvas se lograron identificar dos tipos de especies de hongos los cuales son *Fusarium Proliferatum* 50% y *Geotrichun Candidum* 50% siendo , ambos tuvieron el mismo porcentaje de crecimiento de colonias , la identificación de estos hongos en las larvas encontradas indicas que el que ambos hongos no solo tienen la capacidad de mayor tolerancia a las condiciones digestivas optimo.

En comparación con el estudio de Márquez Lara et al., (2016) que aislaron y evaluaron in vitro hongos nematófagos nativos, sobre larvas L3 de nematodos gastrointestinales de bovinos. Identificaron tres cepas de *Arthrobotrys oligospora* y una de *Arthrobotrys musiformis*.

Figura N° 16

Hongos identificados de muestras de larvas de nematodos gastrointestinales



5. Caracterización de hongos

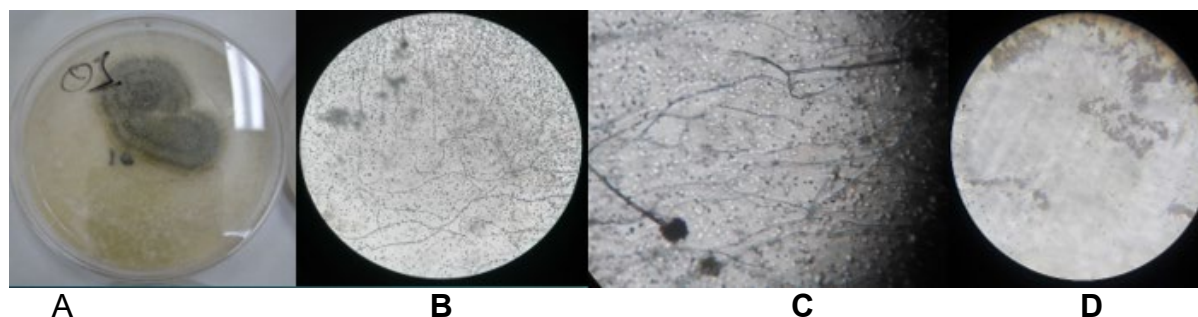
En las imágenes podemos Observar que de cada muestra procesada y aisladas se purificaron las muestras para purificar y poder observar el crecimiento y cambio de estructura de las colonias .

las caracterizaciones por cada hongo aislado fueron descripción de color y crecimiento de la colonia, Crecimiento y estructura de conidióforos y estructura de conidias.

Estos datos concuerdan con (Chávez, 2006), que nos dice que la identificación macroscópica de las colonias se reconoce fácilmente por su crecimiento rápido y su cambio de coloración que puede ser coloración, blancas - verdes, amarillo – verdosas; , así mismo ; así mismo en el estudio realizado por (Infante et. al., 2009), nos dice que la identificación microscópica de los hongos se da por las características de su estado vegetativo presentan micelio

Figura N°17

Caracterización del *Aspergillus Orizae*

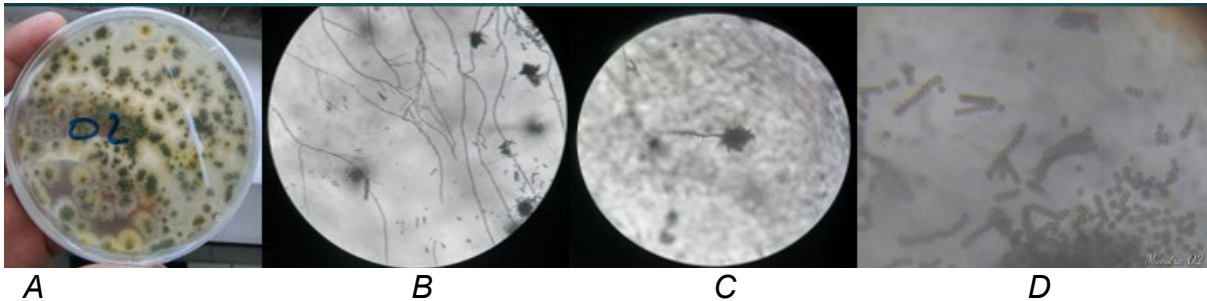


Aspergillus Orizae. (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B)Crecimiento del micelio, (C) Crecimiento de conidióforo, (D) conidias.

Útil para la elaboración de alimentos fermentados y producción de biomasa, por lo cual el *Aspergillus Orizae* estilizado como probiótico en los alimentos para promover las vitaminas del complejo B, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

Figura N°18

Caracterización del *Aspergillus Niger*

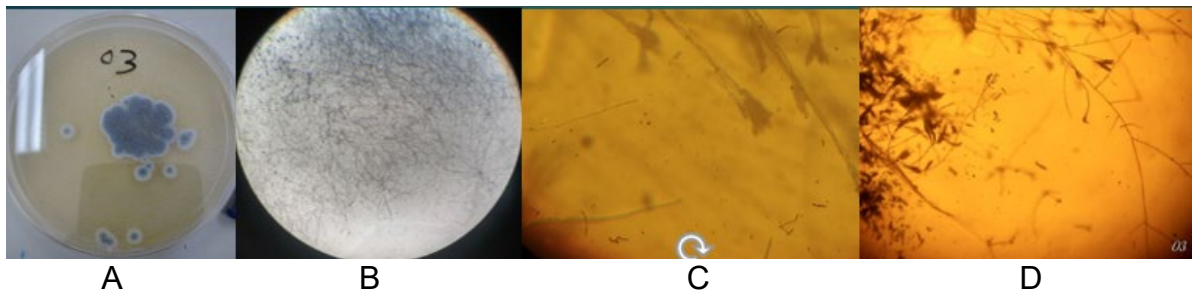


Aspergillus Niger. (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B) Crecimiento del micelo, (C) Crecimiento de conidioforo, (D) conidias.

El Aspergillus niger encontrado en los suelos puede emplearse para favorecer el desarrollo de distintos cultivos, esto debido a una pequeña porción del fósforo que contiene.

Figura N°19

Caracterización del *Penicillium chrysogenum* espora

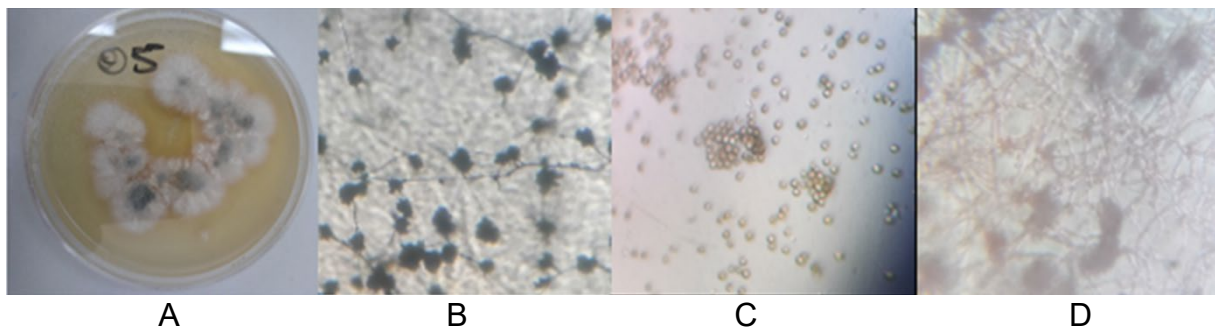


Penicillium chrysogenum espora. (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B) Crecimiento del micelio, (C) Crecimiento de conidióforo, (D) conidias.

Penicillium chrysogenum es la especie de hongo que se utiliza más frecuentemente en la producción de penicilina.

Figura N° 20

Caracterización del *Trichoderma spp.*

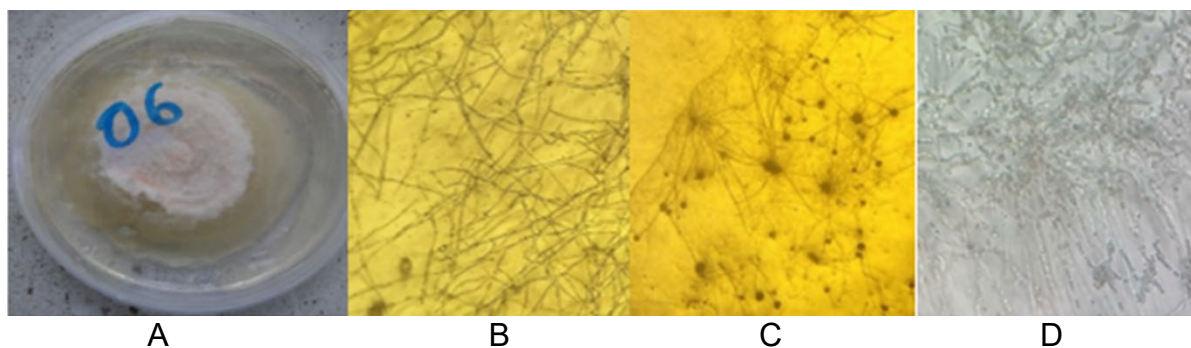


Trichoderma spp (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B) Crecimiento del micelio, (C) Crecimiento de conidióforo, (D) conidias. (La cepa del hongo no se identificó a nivel de género, pero si a nivel de su división.)

Trichoderma es un hongo que también es usado como fungicida. Se utiliza en aplicaciones foliares, tratamiento de semillas y suelo para el control de diversas enfermedades producidas por hongos.

Figura N°21

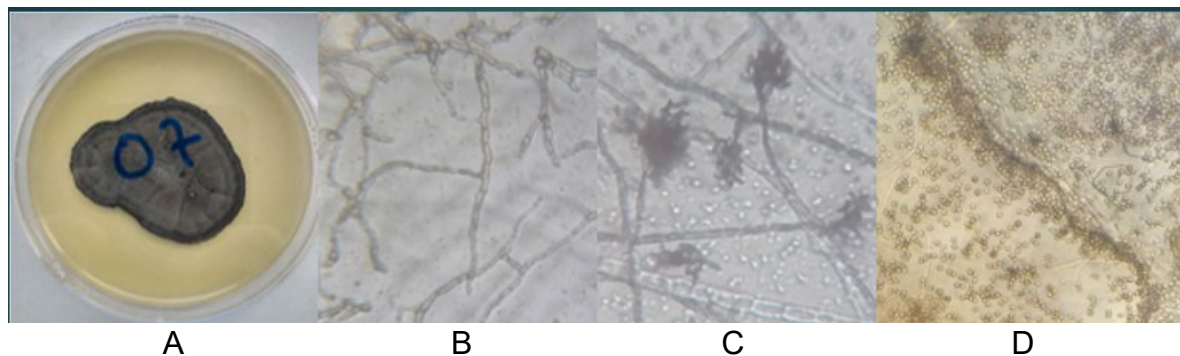
Caracterización del *Aspergillus spp.*



Aspergillus.spp (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B)Crecimiento del micelio, (C) Crecimiento de conidióforo, (D) conidias.

Figura N° 22

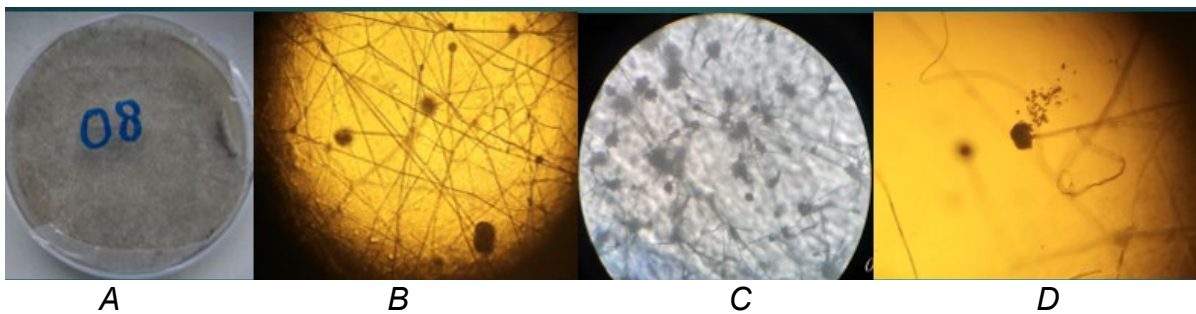
Caracterización del *Penicillium spp.*



Penicillium spp. (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B) Crecimiento del micelo, (C) Crecimiento de conidióforo, (D) conidios.

Figura N° 23

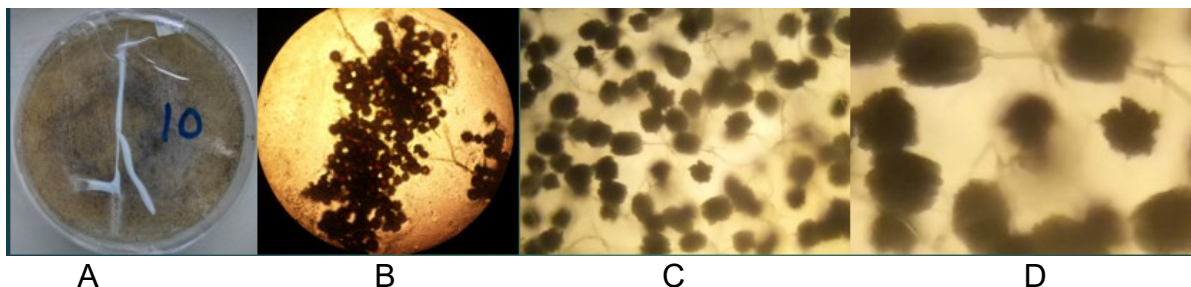
Caracterización del *Rizopus spp.*



Rizopus.spp. (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, B) Crecimiento del micelio, (C) Crecimiento de conidióforo, (D) conidios.

Figura N° 24

Caracterización del *Rizopus orizae. Candidum*

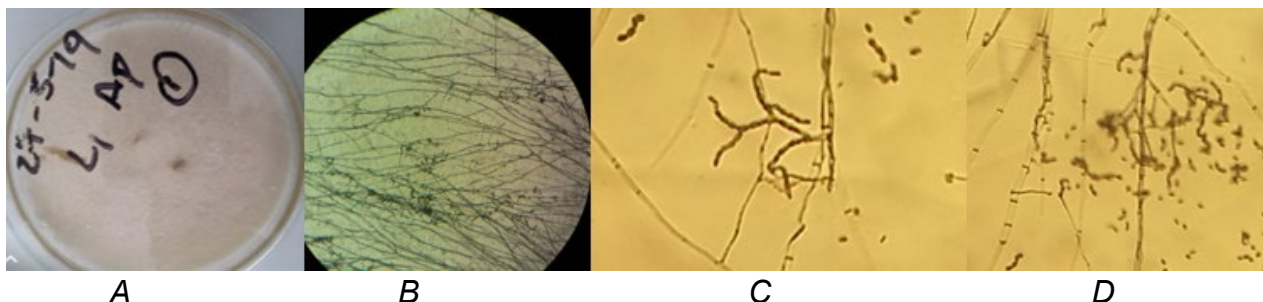


Rizopus orizae. Candidum. (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B) Crecimiento del micelio, (C) Crecimiento de conidióforo, (D) conidios

Sus usos son múltiples en la industria de alimento de este hongo se obtiene, Ácido láctico lo cual se usa en la conservación de alimento y en los productos farmacológicos.

Figura N° 25

Caracterización del *Geotrichum candidum*.

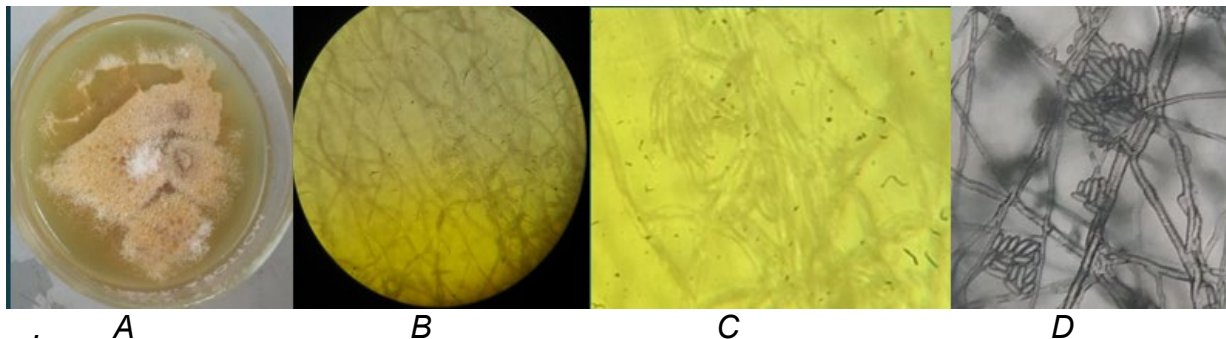


Geotrichum candidum (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B) Crecimiento del micelio, (C) Crecimiento de conidióforo, (D) Conidios.

Geotrichum candidum es un hongo extremadamente común con una distribución mundial. La afectación pulmonar es la forma más frecuente de la enfermedad en humanos y animales, pero también se han observado infecciones bronquiales, orales, vaginales, cutáneas y alimentarias (Arendrup et al. 2014).

Figura N° 26

Caracterización del *Fusarium proliferatum*. *Candidum*.



Fusarium proliferatum. *Candidum*. (A) Crecimiento de colonia en plato con medio de cultivo PDA, (B) Crecimiento del micelio, (C) Crecimiento de conidióforo, (D) conidios. Son fitopatógenos, en ocasiones causan infecciones en el paciente normal (queratitis, onicomicosis, etc.).

Las infecciones por el género *Fusarium* se incluyen dentro de las hialohifomicosis, y uno del principal causante de pérdidas de cosechas.

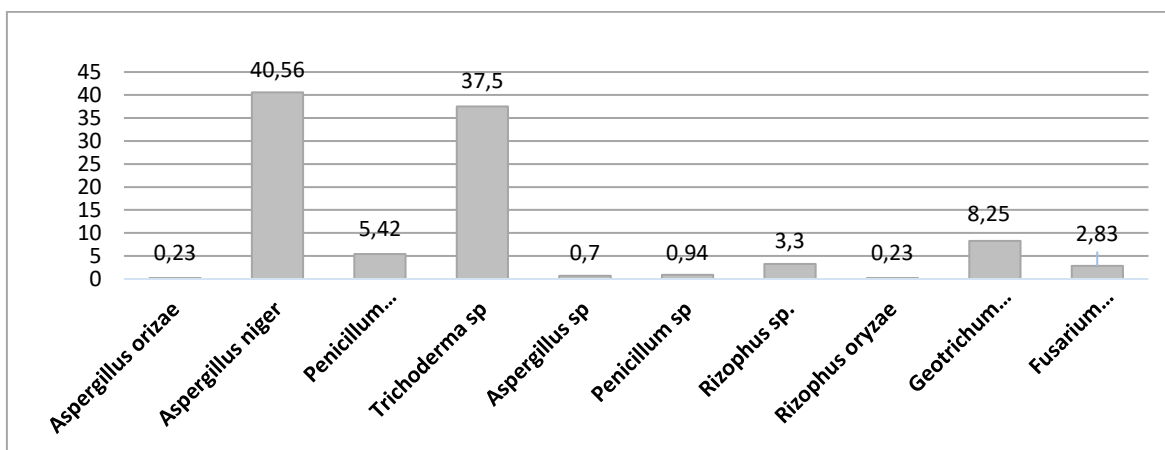
6. % de Frecuencia de los hongos identificados

En la figura podemos observar que de los 10 hongos identificados de las muestras de suelo de corral heces y muestras de larvas los que tuvieron mayor porcentaje de frecuencia más alto fueron *Aspergillus niger* con 40.56% seguido de *Trichoderma sp* con 37.5%.

Estos datos coinciden por los presentados por Sánchez-Moreno et al. (2009), que identificaron 16 cepas de hongos nematófagos autóctonos de Costa Rica, incluyendo especies como *Arthrobotrys oligospora* y *Candelabrella musiformis* provenientes de estiércol bovino

Figura N° 27

Porcentaje de Frecuencia de los hongos identificados



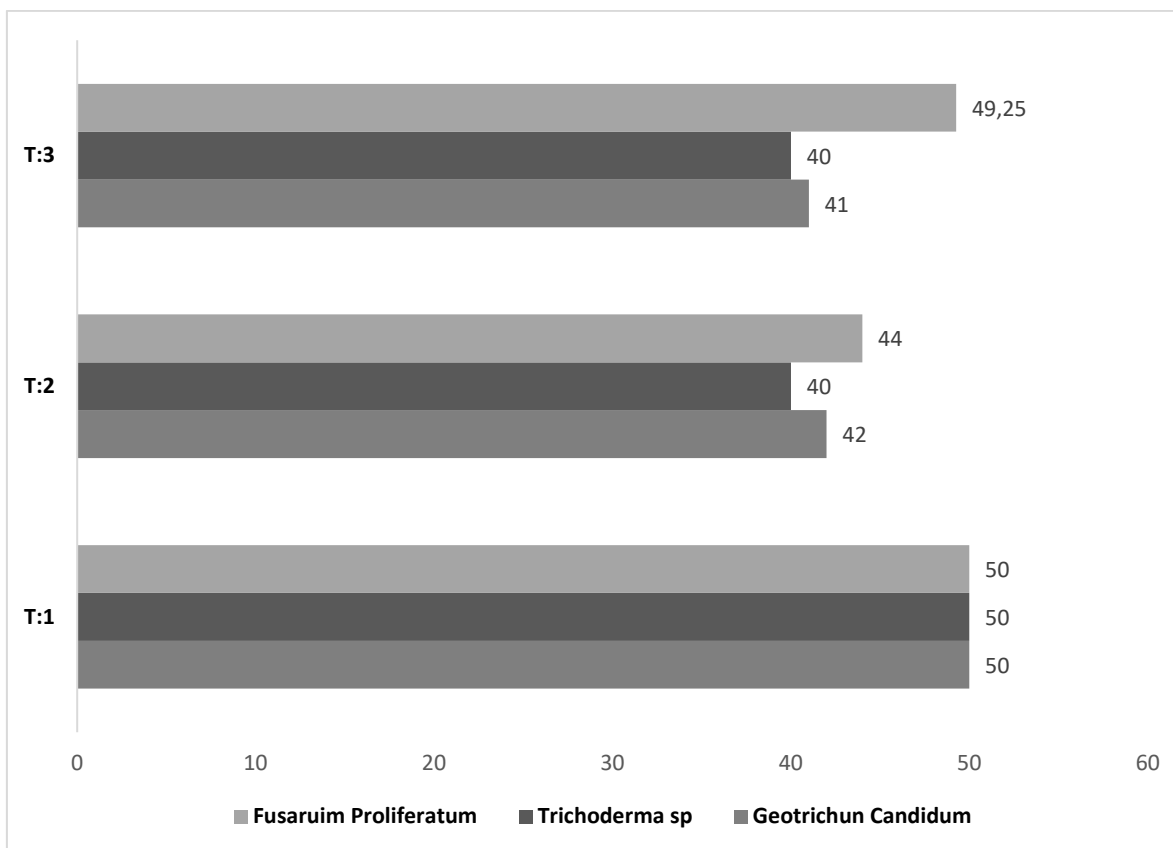
7. Evaluación in vitro de la nematofagia de los hongos identificados y larvas

Las tres especies de Hongos identificados con capacidad de captura , los que demostraron mayor capacidad depredadora fueron *Fusarium Proliferatum* con un 49.25% para T:3, 44% para T:2 y un 50% para T:1, en segundo nivel está el *Geotrichum Candidum* con 41% para T:3, 42% para T:2 y un 50% T:1, se puede observar que los tres hongos identificados con capacidad de captura tuvieron el mismo porcentaje de captura en el tratamiento control con un 50%.

Por lo cual estos resultados no concuerdan con los de Márquez Lara et al., (2016) que evaluaron in vitro hongos nematófagos nativos, sobre larvas L3 de nematodos gastrointestinales de bovinos. Identificaron tres cepas de *Arthrobotrys oligospora* y una de *Arthrobotrys musiformis*. La cepa de *A. musiformis* mostró la mayor capacidad predadora con un 96.8% de captura larvariaque indican.

Figura N° 28

Porcentaje de captura según tipo de tratamiento



T: 1 Agua destilada T:2 Saliva de Rumiante T4: Liquido Ruminal

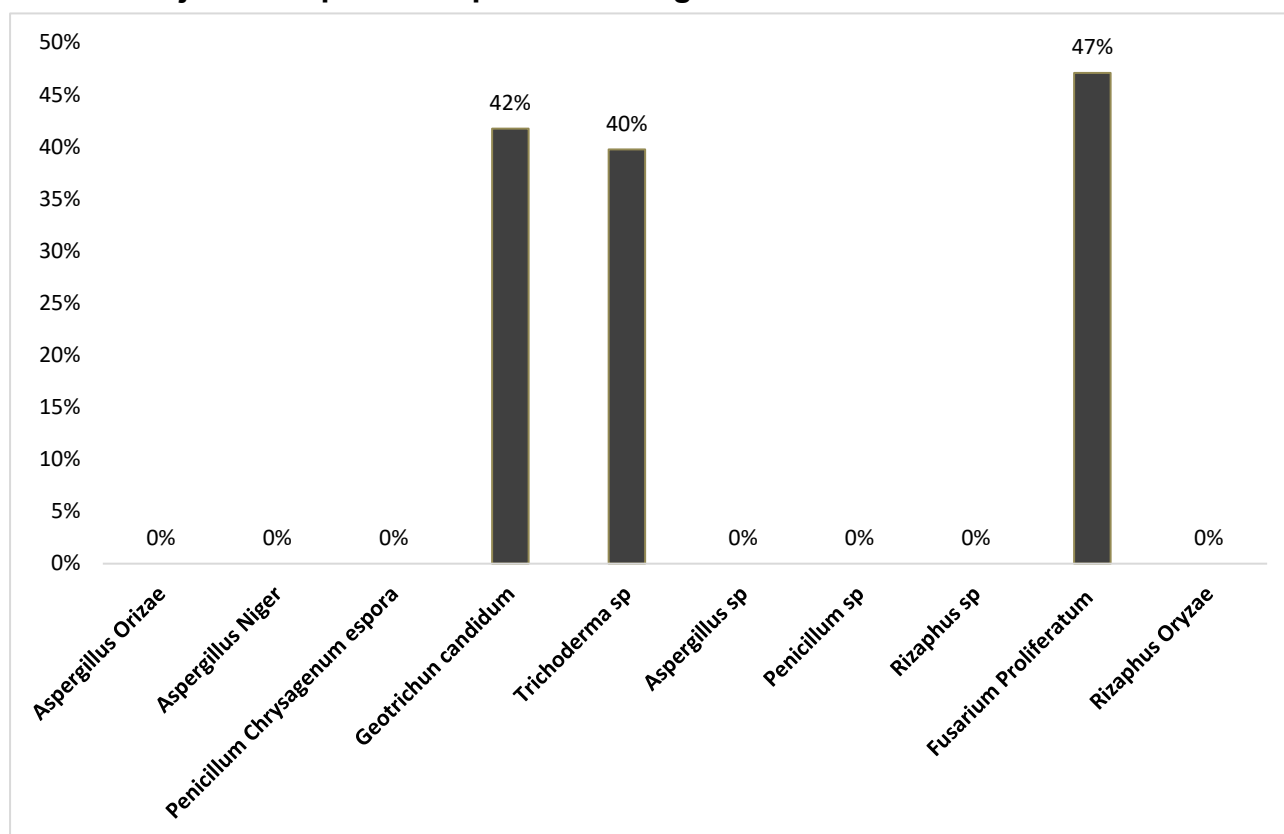
8. Porcentaje de atrapamiento por cada Hongo

De los tres hongos con capacidad nematófagas identificados con mayor actividad depredadora, fueron: *Fusarium Proliferatum* un 47% de captura, *Geotrichum candium* con 42 y *Trichoderma sp* con 40%.

Estos datos coinciden con Márquez Lara et al. (2016) que identificaron tres cepas de *Arthrobotrys oligospora* y una de *Arthrobotrys musiformis*. La cepa de *A. musiformis* mostró la mayor capacidad predadora con un 96.8% de captura larvaria.

Figura N° 29

Porcentaje de atrapamiento por cada hongo



9. Caracterización de captura

Las estructuras desarrolladas identificadas de los hongos con potencial de captura fueron Redes Adhesivas las cuales tiene la función de atrapar y consumir a los estadios larvarios, los hongos que desarrollaron la capacidad depredadora con redes adhesivas fueron: *Geotrichum candidum*, *Trichoderma sp* y *Fusarium proliferatum*.

Estos datos concuerdan con el estudio de (Cruz et al., 2009), que describe que la producción de esta red parece estar estimulada por el forcejeo de los nematodos atrapados.

Tabla N° 4

Caracterización de captura

Observación de caja Petri de la captura Invitro , después del enfrentamiento hongo-Nematodos				
Código	Hongo	Larva	Comportamiento de Atrapamiento	Tipo de Atrapamiento
0-1	<i>Aspergillus orizae</i>	<i>Strongylus</i>	No Captura	Ninguna
0-2	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Strongylus</i>	No Captura	Ninguna
0-3	<i>Penicillium Chrysagenum espora</i>	<i>Strongylus</i>	No Captura	Ninguna
0-4	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Strongylus</i>	Si Captura	Redes Adhesivas
0-5	<i>Trichoderma sp</i>	<i>Strongylus</i>	Si Captura	Redes Adhesivas
0-6	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Strongylus</i>	No Captura	Ninguna
0-7	<i>Penicillium sp</i>	<i>Strongylus</i>	No Captura	Ninguna
0-8	<i>Rizaphus sp</i>	<i>Strongylus</i>	No Captura	Ninguna
0-9	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Strongylus</i>	Si Captura	Redes Adhesivas
0-10	<i>Rizaphus oryzae</i>	<i>Strongylus</i>	No Captura	Ninguna

Enfrentamiento Hongo – Nematodo

Durante el enfrentamiento del Hongo con el Nematodo gastrointestinal se puede observar el desarrollo de las redes adhesivas y su función de atrapamiento y adsorción de los nematodos, donde *Fusarium proliferatum* y *Geotrichum candidum* con mayor cantidad de redes desarrollo atrapando en un 100% y *Trichoderma spp* con un 90% de atrapamiento.

Delos hongos que demostraron mayor capacidad de adsorción fueron *Fusarium proliferatum* y *Trichoderma spp* que demostraron un 90%.

Estos datos concuerdan por los expuesto por Sánchez-Moreno et al. (2009) , que evaluaron in vitro 16 cepas de hongos nematófagos autóctonos de Costa Rica,

incluyendo especies como *Arthrobotrys oligospora* y *Candelabrella musiformis* provenientes de estiércol bovino y otros pequeños rumiantes. La actividad depredadora varió entre 9.8% y 99.6%.

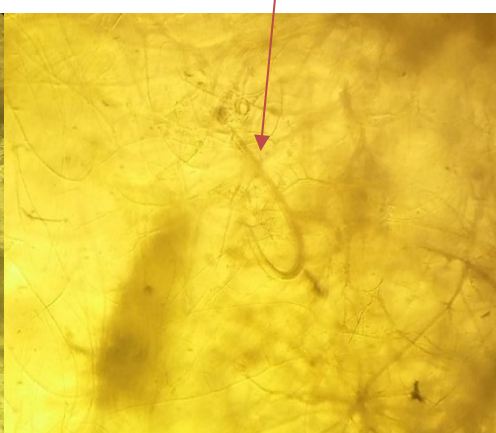
Figura N° 30

Enfrentamiento Hongo – Nematodo

Fusarium proliferatum.



Geotrichum candidum.



Trichoderma spp.



VIII. Conclusiones

1. En la investigación se lograron identificar , aislar y caracterizar 10 especies de hongos de los cuales fueron: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus Niger*, *Penicillium chrysogenum* espora, *Trichoderma sp*, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Rizophus oryzae*, *Rizophus sp* *Geotrichum candidum* y *Fusarium proliferatum*, , siendo el *Aspergillus Niger* y *Trichoderma sp* los de mayor frecuencia.
2. Las cepas de hongos que mostraron características de captura fueron aisladas, caracterizadas y sometidas a pruebas frente a larvas de nematodos gastrointestinales (NG). Las especies que evidenciaron actividad depredadora fueron *Geotrichum candidum*, *Fusarium proliferatum* y *Trichoderma spp*. Entre las estructuras de atrapamiento observadas se identificaron redes de hifas adhesivas y la perforación de la cutícula de las larvas NG.
3. Los porcentajes de captura de larvas NG fueron los siguientes: *Geotrichum candidum* (41,73%), *Fusarium proliferatum* (47,1%) y *Trichoderma spp*. (39,75%). Los tres hongos con capacidad depredadora mostraron un adecuado desarrollo de redes adhesivas. El mayor nivel de captura y consumo de larvas L3 se observó en *Fusarium proliferatum*, seguido de *Geotrichum candidum*.
4. Entre los resultados también se resalta la importancia de hongos como *Trichoderma spp.*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Rhizopus oryzae*, en la industria alimentaria y farmacéutica, debido a su participación en diversos procesos industriales y en la producción de compuestos de interés farmacológico.
5. Aunque *Fusarium proliferatum* presentó uno de los mayores porcentajes de atrapamiento de larvas NG, no se recomienda su uso como controlador biológico de

nematodos gastrointestinales, debido a sus efectos adversos potenciales en el medio ambiente y en la salud de los rumiantes.

6. En el caso de *Geotrichum candidum*, a pesar de mostrar un buen porcentaje de captura y adaptación al sistema digestivo de los rumiantes, estudios indican que, aunque es utilizado en la industria láctea como fermento en derivados lácteos y puede encontrarse de manera transitoria en el sistema digestivo y respiratorio sin causar patología en pequeñas cantidades, bajo condiciones de estrés, mala nutrición u otros factores predisponentes puede provocar afecciones respiratorias (como neumonía micótica) y trastornos digestivos, incluyendo diarrea. Por estas razones, tampoco se recomienda su uso como controlador de NG.
7. En cuanto a *Trichoderma spp.*, que mostró un potencial de captura cercano al 40%, se recomienda su uso como controlador de NG, ya que no se le atribuyen efectos negativos en la salud animal. Además, presenta capacidad de adaptación al pH salival y ruminal, sobrevive al paso por el tracto digestivo y, aunque su nivel de reproducción en este medio es menor en comparación con *Fusarium proliferatum* y *Geotrichum candidum*, mantiene su potencial como agente de control biológico.

IX. RECOMENDACIONES

- Aumentar el número de muestreos sistémicos con distintas condiciones climáticas como temperatura y humedad con el fin de lograr identificar más especies con capacidad de control.
- Aplicar Técnicas combinadas de marcadores genéticos (8 ITS,LSU), para una mejor identificación morfológica de y molecular.
- Realizar en sayos a nivel de campo con productores para medir adaptación y capacidad de control del hongo por el tránsito del sistema digestivo del Rumiante.
- Identificación en campo del hongo *A. oligospora* para prueba de campo ya que hay investigaciones que indican que tiene gran capacidad de control.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Araújo, J. P., Sampaio, O., Vasconcellos, M., & Campos, P. (2010). Efectividad del control biológico de nematodos gastrointestinales en bovinos mediante el uso de hongos nematófagos incorporados en la alimentación. *Revista Brasileira de Parasitología Veterinaria*, 19(4), 303-310.
- Arroyo, F., Mendoza, P., López, M., Liébano, E., Vázquez, V., Estefán, M. (2008). Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina en condiciones controladas. *Técnica pecuaria en México* (2002), 217-223.
- Assis, RCL, Luns, FD, Araújo, JV, Braga, FR (2012). Control biológico de tricostrongídeos en ganado vacuno por el hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* en el sureste tropical de Brasil. *Exp Parasito*, 132: 373-377.
- Barron, G. (1977). Hongos destructores de nematodos. *Temas de Microbiología N.º 1*. Publicaciones Biológicas Canadienses, Guelph, Ontario. 144 págs.
- Blood, D. C., Radostits, O. M., y Henderson, J. A. (2002). *Medicina veterinaria: un libro de texto sobre las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino* (10ª ed.). Saunders Ltd.
- Burke, J. M., Miller, J. E., Larsen, M., Terrill, T. H. (2005). Interacción entre partículas de alambre de óxido de cobre y *Duddingtonia flagrans* en corderos. *Vet Parasitol*, 134: 141-146.
- Caballero Y Hervás, (1985). *Producción lechera en la sierra Ecuatoriana*. 1 ed. Quito, Ec. REVISTA. 128p.
- Caballero, A., Torres, A., Cámara, S. (2009). Importancia del parasitismo gastrointestinal en ovinos y situación actual de la resistencia antihelmíntica en México. Tabasco, México: Universidad Autónoma Chapingo. 1

- Caballero, D., López, J., & Morales, C. (2018). Efectividad de hongos nematófagos en la alimentación para el control de nematodos gastrointestinales en bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 39(1), 55-62.
- Cezar, AS, Catto, JB, Bianchin, I. (2008). Controle alternativo de nematodeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Cien Rural*, 38(7): 2083-2091.
- Cobon, G., Hungerford, J., Woodrow, M., Smith, D., Willadsen, P. (1995). Vacunación contra *Boophilus microplus*: Experiencia de campo en Australia. En: *Vacunas recombinantes para el control de la garrapata del ganado*, J. de la Fuente Elfos Scintiae., (ed.), págs. 163–176.
- Cobon, G., Moore, JT, Johnston, LAY, Willadsen, P., Kemp, DH, Sriskantha, A., Riding, GA, Rand, KN (1997). ADN que codifica una glicoproteína de la membrana celular del intestino de una garrapata. *Física Nuclear B.*, 15(3): 661-661.
- Contexto Ganadero (2024). 4 tipos de parásitos internos en bovinos. Recuperado el 24 de agosto de 2025, de <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/4-tipos-de-parasitos-internos-en-bovinos>
- Cooke, RC y Godfrey, BES (1964). Una clave para los hongos destructores de nematodos. *Transactions of the British Society*, 47(1), 61-74. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(64\)80081-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(64)80081-4)
- Cordero del Campillo, M., et al. (1999). Ciclo biológico de nematodos gastrointestinales en bovinos. *Revista Argentina de Parasitología*, 12(2), 89-97.
- Cruz, M. et al. (2010). Parasitosis gastrointestinal primera parte. (En línea). *Revista Producción Agroindustrial del NOA*. República Argentina. Consultado el 23-06-2013. Disponible en http://www.produccion.com.ar/96jul_08.htm

- De Oliveira Tavela, A., Araújo, JV, Ribeiro Braga, F., Silva, AR, Oliva Carvalho, R., Milani Araújo, J., Ferreira, SR, Ribeiro Carvalho, G. (2011). Control biológico de ciatostomina (Nematoda: Cyathostominae) con el hongo nematófago *Monacrosporium thaumasium* en el sureste tropical de Brasil. *Veterinario Parasitol*, 175: 92-96.
- Eysker, M., Bakker, N., Van der Hall, Y., Van Hecke, I., Kooyman, F., Van der Linden, D., Schrama, C., Ploeger, H. (2006). El impacto de la aplicación diaria de *Duddingtonia flagrans* a ovejas lactantes sobre las infecciones por nematodos gastrointestinales en sus corderos en los Países Bajos. *Parasitología Veterinaria*, 141, 91-100.
- FAO (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. ISSN 1014-1200. Dirección de producción y sanidad animal No.157. Roma, ISBN 92-5-304967-7. 55p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2003). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina (Boletín 157). Roma: FAO.
- García-Romero, P. (1994). Presencia y prevalencia de nematodos gastrointestinales en bovinos: influencia de la zona geográfica y clima en el desarrollo de especies parasitarias. *Revista de Medicina Veterinaria*, 15(2), 112-120.
- Garduño, RG, Da, PM de, Hernández, GT, Pérez, CB, Jiménez, EO, & Mendo, OH (2012). Estudio in vitro de la capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* contra larvas de nematodos gastrointestinales de ovinos de pelo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 43(3), 405-414.
- Guerrero, F. D., Miller, R. J., Scoles, G. A., y Nene, V. (2012). Vacunas contra garrapatas: una visión general. *Annual Review of Entomology*, 57, 47-71. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100639>

- Hendrix, C. M., & Cutler, W. G. (1999). *Parasitología veterinaria* (2ª ed.). Editorial Acribia.
- Hummelinck, PW (1946). Investigación de los huevos de estrongilos de caballo. *Diario Tijdschr Diergeneeskde*, 71, 411–427.
- Maciel, AS, Araújo, JV, Campos, AK, Lopes, EA, Freitas, LG (2010). Depredación de larvas infectivas de *Ancylostoma* spp. en perros por hongos nematófagos en diferentes concentraciones de conidios. *Vet Parasitol*, 161: 239-247.
- Manual Merck de Medicina Veterinaria (2000). *El manual veterinario de Merck*. 5ª ed. Barcelona, Es. CO. 420 p.
- Manual Merck de Veterinaria (2000). *Parasitología veterinaria: resistencia, curso de la infección y efectos en la producción animal*. Merck & Co., Inc.
- Manueli, PR, Waller, PJ, Faedo, M., Mahommed, F. (1999). Control biológico de nematodos parásitos del ganado en Fiyi: Análisis de estiércol fresco de pequeños rumiantes para detectar la presencia de hongos nematófagos. *Parasitología Veterinaria*, 81(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00217-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00217-4)
- Márquez Lara, D., Patiño Burbano, R. E., Cubides Cárdenas, J. A., Montero Acero, K., Díaz Sabogal, D., & Gómez Sánchez, Y. (2016). Capacidad predadora in vitro de hongos nematófagos nativos de Cundinamarca sobre nematodos gastrointestinales de bovinos. *Revista Medicina Veterinaria*, 31, 45-58.
- Márquez, D. (2003). *Nuevas tendencias para el control de los parásitos bovinos en Colombia*. Bogotá DC, Corpoica. 186p.
- Márquez, D. (2007). *Resistencia a los antihelmínticos en nematodos de rumiantes y estrategias para su control*. Bogotá, Colombia: Corpoica. Produmedios. 166p.

- Márquez, D. (2014). Control sostenible de los nematodos gastrointestinales en rumiantes. Bogotá, Colombia: Corpoica, 368 p.
- Márquez, D., Jiménez, G., García, F., Garzón, C. (2008). Resistencia a los antihelmínticos en nematodos gastrointestinales de bovinos en municipios de Cundinamarca y Boyacá. *Revista Corpoica- Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 9(1), 113-123.
- Márquez, J. (2003). Factores genéticos y ambientales en la susceptibilidad a parasitosis en bovinos jóvenes. *Boletín de Investigación Veterinaria*, 18(1), 34-41.
- Márquez, J. (2014). Impacto de las parasitosis hematófagas en la salud animal. *Revista de Ciencia Animal*, 29(4), 215-222.
- Martínez, F., Jiménez, M., & Salinas, P. (2019). Integración del control biológico de nematodos en programas sanitarios para bovinos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 40(2), 89-96.
- Mawatari, M., et al. (2014). Parásitos gastrointestinales en bovinos: manifestaciones clínicas y ciclo de vida. *Revista de Medicina Veterinaria*, 25(3), 145-152.
- Mederos, A., Waddell, L., Sánchez, J., Kelton, D., Peregrine, AS, Menzies, P., Van Leeuwen, J., Rajic, A. (2012). Revisión sistemática-metaanálisis de investigaciones primarias que investigan el efecto de tratamientos alternativos seleccionados sobre nematodos gastrointestinales en ovejas en condiciones de campo. *Prev Vet Med*, 104: 1-14.
- Mestra, A., Mestra, L., Betancur, O. (2005). Eficiencia de la formulación antihelmíntica M-010204-B (Megamectina 3.5) en infecciones parasitarias gastrointestinales y pulmonares del ganado bovino de Córdoba Colombia. Manejo estratégico del parasitismo en el ganado bovino. *Helmintiosis gastrointestinal*. Bogotá, Cía.

- Nuttall, P. A., Labuda, M., y Hornok, S. (2006). Interacciones garrapata-hospedador-patógeno: biología, factores y control. *Trends in Parasitology*, 22(6), 263-267. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.03.009>
- O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W., y Kahn, L. P. (2006). Ecología de las etapas libres de los principales parásitos tricostrongílidos de ovejas. *Parasitología Veterinaria*, 142(1-2), 1-15.
- Ojeda-Robertos, NF, Torres-Acosta, JF, Ayala-Burgos, AJ, Sandoval-Castro, CA, Valero-Coss, RO y Mendoza-de-Gives, P. (2009). Digestibilidad de clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* en rumiantes: estudios in vitro e in vivo. *Investigación veterinaria BMC*, 5, 46. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-46>
- Osorio, G. y Victoria, E. (2014). Evaluación in vitro de hongos nematofagos sobre larvas L3 de nematodos gastrointestinales de bovinos. Recuperado de <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/9802>
- Paraud, J., Richard, C. y Cortet, J. (2005). Influencia de factores ambientales en la actividad predatora del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans*. *Revisiones de Biología Fúngica*, 19(2), 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2005.05.004>
- Paz-Silva, A., Francisco, I., Valero-Coss, RO, Cortiñas, FJ, Sánchez, JA, Francisco, R., Arias, M., Suárez, JL, López-Arellano, ME, Sánchez-Andrade, R., Mendoza de Da, P. (2011). Capacidad del hongo *Duddingtonia flagrans* para adaptarse a la producción de huevos de ciatostomía mediante la propagación de clamidosporas. *Veterinario Parasitol*, 179: 277-282.
- Pérez, J. (2010). *Parasitología veterinaria: nematodos gastrointestinales de rumiantes*. Editorial Académica Veterinaria.

- Pérez, J., & Gómez, M. (2023). Impacto de la parasitosis por nematodos gastrointestinales en la producción ganadera sostenible: desafíos y alternativas de control. *Revista de Medicina Veterinaria*, 34(2), 45-58.
- Publicaciones Novartis de Colombia (sf). Sanidad animal Novartis. Recuperado el 13 de junio de 2013, de <https://www.sanidadanimalnovartis.com>
- Quiroz, E., et al. (2011). Patogenicidad y riesgos de *Toxocara* y *Haemonchus* en animales jóvenes. *Veterinary Parasitology Journal*, 178(3-4), 170-177.
- Quiroz, H. (1978). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México. LIMUSA, SA. CV 201 pág.
- Quiroz, RH (2003). *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Ed Limusa, México, DF
- Regassa, F., et al. (2006). Prevalencia de los géneros *Trichuris*, *Trichostrongylus*, *Ancylostoma*, *Ascaris* y *Strongyloides* en bovinos. *Journal of Veterinary Parasitology*, 143(1-2), 45-53.
- Ribeiro Braga, F. A., Silva, J. W., Almeida, N. N., y Oliveira, J. A. (2014). [Potencial de control biológico del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* en animales domésticos]. *Journal of Helminthology*, 95, e31. <https://doi.org/10.1017/S0022149X14000569>
- Rimbaud, E., Reyes, M., Gutiérrez, M. (2008). Diagnóstico Epidemiológico y Reproductivo en hatos de ganado de Occidente.
- Sagüés, M., Purslow, P., Fernández, S., Fusé, L., Iglesias, L., Saumell, C. (2011). Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(4), 143-147.

- Sánchez-Moreno, M., Vargas, M., & Mora, A. M. (2009). Evaluación in vitro de hongos nematófagos para el control biológico de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes y bovinos en Costa Rica. *Revista de Microbiología Tropical*, 47(3), 201-210.
- Schumtterer, H. (1995). El árbol de Neem. Fuente de productos naturales únicos para el manejo integrado de plagas, la medicina, la industria y otros fines. Weinheim. Edición VCH. pág. 36.
- Soca, M., Roque, E., Soca, M. (2005). Epizootiología de los nematodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes. *Pastos y Forrajes*, 28(3). Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Matanzas, Cuba.
- Teixeira de Paula, A., Ribeiro Braga, F., de Carvalho, LM, Teixeira Lelis, R., Kramer de Mello, IN, de Oliveira Tavela, A., de Freitas Soares Fillipe, E., Maldonado Junior, A., da Silva García, J., & de Araújo, JV (2013). Primer informe de la actividad de hongos depredadores sobre larvas de primer estadio de *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). *Acta Trópica*, 127, 187-190. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.011>
- Torres-Acosta, J., Molento, M., Mendoza De Gives, P. (2012). Investigación e implementación de nuevos enfoques para el control de nematodos parásitos en América Latina y el Caribe: ¿Existen incentivos suficientes para un mayor esfuerzo de extensión? *Vet Parasitol*, 186: 132–142.
- Velázquez, F., Rodríguez, M., & Pérez, L. (2017). Prevalencia y factores de riesgo asociados a parásitos gastrointestinales en bovinos: implicaciones para la producción y salud animal. *Revista de Ciencias Veterinarias*, 35(2), 123-132. <https://doi.org/10.xxxx/rcv.2017.35.2.123>
- Waller, P. (1999). Enfoques internacionales para el control integrado de nematodos parásitos del ganado. *Revista Internacional de Parasitología*, 29, 155-164.

Waller, P. J., Faedo, M., & Ellis, K. (2001). Potencial de los hongos nematófagos para el control biológico de las etapas libres de los nematodos parásitos de ovinos y bovinos. *Parasitología*, 122(Suplemento), S101–S111. <https://doi.org/10.1017/S0031182000007433>

Zhao, G., Yan, R., Muleke, C., Sun, Y., Xu, L., Li, X. (2011). La vacunación de cabras con vacunas de ADN que codifican H11 e IL-2 induce protección parcial contra la infección por *Haemonchus contortus*. *The Veterinary Journal*, 15, 29-34.

Chávez. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). (En línea). Bogotá. D.C.

Infante, Danay, Martínez, B Y González, Noyma., 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* Vol. 24. No. 1.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Presupuesto

Categoría	UM	Descripción	cantidad	C.U. C\$	Total C\$
materiales e insumos					
papel toalla	Rollo	papel toalla	6	50	300
Cloro	Galón	Cloro	1	100	100
Alcohol	Galón	Alcohol 95%	2	500	1000
Jabón liquido	Galón	Jabón liquido	1	500	500
Algodón	lb	Algodón	5	200	1000
MATERIALES PARA LABORATORIO (CULTIVOS BACTERIOLÓGICOS)					
Guantes de látex	Caja	talla M	4	240	960
papel Aluminio	Rollo	papel Aluminio	4	60	240
Pipetas Pauster	Unidad	Pipetas Pauster fabricadas a base de polietileno, graduada, uso único, no estéril, con capacidad de 3 a 5 ml y longitud de 16 a 22 mm aproximadamente	200	12.7	2540
Papel parafil	Rollo	Papel parafil	1	1441.6	1441.6
Beaker	Unidad	Beaker de 1000 ml	1	1849.6	1849.6
MEDIOS DE CULTIVOS					
PDA	frasco 500 gr	PDA - Potato Dextrose Agar 500 Gr	1	6806.8	6806.8
MAA	frasco 500 gr	Medio Agar -agar bote	1	5540	5540
Cloruro de tetraciclina	frasco 25 gr	Cloruro de tetraciclina	1	1186	1186
Medio Corn meal Agar bote	frasco 100 gr	Medio Corn meal Agar bote	1	2772	2772

Hexameta fosfato de sodio	kg	Hexameta fosfato de sodio	1	1232	1232
ácido clorhídrico	botella 500 ml	ácido clorhídrico	1	1848	1848
Gasto operativos					
VIÁTICOS					
	Visita	Viáticos Especialista	11	230	2530
		Combustible del investigador			
	lts	Diésel	221	32	7072
Materiales de oficina					
Resma de papel	Unidad	papel carta	2	120	240
usb	Unidad	32 G	2	500	1000
		Total			40158

Anexo 2. Formato de Registro Sanitario

Departamento	Municipio	Nombre de la Finca	Código del animal	Condición sanitaria

Anexo 3. Formato de registro de la información código y origen de cada hongo

Código	Municipio	Aislado	Altitud (msnm)	Sustrato

Anexo 4. Formato de proceso de la información de

Código de cepa	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4

Anexo 5. Preparación de medios de cultivo

Agar agua 2% (1 litro)

Disolver 20 gr de agar en un litro de agua destilada

Esterilizar la solución en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Dejar enfriar la solución (+ó – 60°C). En una cabina de flujo laminar servir la

Solución en cajas de petri.

Agar PDA Para un litro

Disolver 39 gr de agar PDA en un litro de agua destilada

Autoclavar a 121°C durante 20 minutos

Cuando se obtenga una temperatura de +ó- 60°C, servir en cajas de petri en la cabina de flujo laminar

Agar Harina de Maíz (1 litro)

Disolver 39 gr de agar AHM en un litro de agua destilada

Autoclavar a 121°C durante 20 minutos

Cuando se obtenga una temperatura de +ó- 60°C, servir en cajas de petri en la cabina de flujo laminar

Lavado de larvas por medio de la Técnica de Separación de Gradientes

1. Colocar 7.5 ml de solución de sacarosa 40% (40 gr de sacarosa en 100 ml de agua destilada) en un tubo, posteriormente agregue 2.5 ml del material que contiene las larvas suavemente a través de las paredes.

2. Centrifugar a 3.500 rpm durante tres minutos. Luego de la centrifugación se observará la formación de tres capas bien diferenciadas: la primera constituida por agua, la segunda por larvas y la tercera por sacarosa.

3. Extraer el anillo del medio correspondiente a las larvas, con una pipeta Pasteur cuidando de no tomar sacarosa. Verter en otro tubo y llenar con agua de la llave.

4. Centrifugar en centrífuga refrigerada a 4°C a 3500 rpm durante tres minutos. Eliminar el sobrenadante.

5. Repetir el paso anterior tres veces

6. Luego del cuarto lavado se elimina el sobrenadante, se tapan los tubos y se refrigeran a 4°C.

De esta manera se mantienen larvas limpias que pueden ser usadas en cualquier momento.

Técnica de coprocultivo de Roberts y O`Sullivan para obtención de larvas de nematodos gastrointestinales L3

Recolectar de 20-30 gr de materia fecal tomada directamente del recto, positivas en Mc Master

- Homogenizar las heces hasta obtener una masa uniforme. Si las heces están muy secas se mojan con agua destilada, si por el contrario se encuentran muy acuosas, se mezclan con aserrín estéril para darle una consistencia más uniforme.

- Se depositan las heces en un frasco de vidrio o plástico a $\frac{3}{4}$ de su capacidad.

- Se limpia el borde del frasco y se tapa con papel craft ajustándola con una banda de caucho asegurándose de dejar orificios de ventilación en el craft que recubre la tapa del frasco.

- Incubar de 7-10 días de 27- 30 °C. Monitoreando con termómetro de máxima y mínima la temperatura, para evidenciar a tiempo variaciones que pudieren afectar la eclosión desarrollo y supervivencia de las larvas.

- Retirar los recipientes de la incubadora, adicionar agua común hasta cubrir la mezcla de heces y vertir los recipientes en cajas de Petri durante 4-8 horas, para permitir que las larvas migren a la caja de Petri.
- Pasado ese tiempo, levantar ligeramente el frasco, para permitir la salida del agua acumulada en la boca del frasco; el agua contiene las larvas.
- Colectar las larvas de la caja de Petri llenando un tubo de ensayo de 15 ml con pipeta Pasteur y centrifugue a 2000 rpm durante dos minutos.
- Descartar el sobrenadante dejando 5 ml en el fondo del tubo, el cual contiene las larvas concentradas.
- Proceder al lavado de las larvas con solución de sacarosa.

Azul de lactofenol

Fenol 0,1 gramos

Ácido láctico 8 mililitros

Agua destilada 10 mililitros

Glicerina 20 mililitros

Azul de anilina 0.5 gramos

Se disuelve calentando ligeramente en fenol, el ácido láctico, el agua destilada y la glicerina; se deja enfriar y se añade el azul de anilina. Se deja reposar durante 24 horas. Se filtra y se guarda en botella de color ámbar.

Conteo de conidios en el hemocitómetro o cámara de Neubauer

Para determinar el número de conidios por volumen contenidos en una determinada suspensión, se utiliza un hemocitómetro o cámara de Neubauer. El hemocitómetro es una lámina de vidrio que tiene dos cámaras de 0.1 mm de profundidad. Cada cámara está dividida en nueve cuadrados de 1 mm². La

superficie cubre un área total de 9 mm². Adicionalmente, el cuadrado del centro está subdividido en cinco por cinco cuadrados agrupados de 0.2 mm de lado y una superficie de 0.04 mm² cada uno. Los cuadrados del centro a su vez están subdivididos en 16 cuadrados más pequeños de 0.0025 mm² cada uno. Cinco de estos cuadrados se utilizan para el conteo de los conidios. Se debe dar especial atención al hecho de que la cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados. Esto es importante para definir cuáles son los conidios que se encuentran en el límite y que deben ser contados. Generalmente se cuentan los conidios que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no así los conidios que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda.

Procedimiento:

- Preparar una suspensión de conidios en agua destilada con Tween 80 al 0.1%.
- Con una pipeta Pasteur llenar la cámara con la suspensión de conidios y cubrirla con el cubreobjeto.

Buffer de MC Dougall

Contiene sales de sodio, calcio, potasio y magnesio.

Reactivos gr por litro

NaHCO₃ 9.8

Na₂HPO₄ 2.77

KCl 0.57

NaCl 0.47

MgSO₄·7H₂O 0.12

*CaCl₂ 0.12

* Se adiciona después de que todos los demás componentes están en solución.

Anexo 6: Identificación de Hongos

N°	Código	Reyno	Filo	Orden	Familia	Genero	Especie
1	0-1	Fungi	Ascomycota	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	Orizae
2	0-2	Fungi	Ascomycota	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	Niger
3	0-3	Fungi	Ascomycota	Eurotiales	Trichocomaceae	Penicillium	Chrysagenum espora
4	0-4	Fungi	Ascomycota	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	Niger
5	0-5	Fungi	Ascomycota	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma	identificada solo a nivel de genero
6	0-6	Fungi	Ascomycota	Eurotiales	Trichocomaceae	Aspergillus	identificada solo a nivel de genero
7	0-7	Fungi	Ascomycota	Eurotiales	Trichocomaceae	Penicillium sp	identificada solo a nivel de genero
8	0-8	Fungi	Zygomycota	Mucorales	Mucoraceae	Rizophus sp.	identificada solo a nivel de genero
9	0-9	Fungi	Ascomycota	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma sp.	identificada solo a nivel de genero
10	0-10	Fungi	Zygomycota	Mucorales	Mucoraceae	Rhizopus	Rhizopus Oryzae
11	0-11	Fungi	Zygomycota	Mucorales	Mucoraceae	Rhizopus sp.	identificada solo a nivel de genero
12	L-1	Fungi	Zygomycota	Saccharomycetales	Endomycetaceae	Geotrichum	Geotrichum Candidum
13	L-2	Fungi	Zygomycota	Saccharomycetales	Endomycetaceae	Geotrichum	Geotrichum Candidum
14	L-3	Fungi	Ascomycota	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	Fusarium proliferatum
15	L-4	Fungi	Ascomycota	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma sp.	identificada solo a nivel de genero
16	L-5	Fungi	Ascomycota	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma sp.	identificada solo a nivel de genero
17	L-6	Fungi	Ascomycota	Hypocreales	Hypocreaceae	Trichoderma sp.	identificada solo a nivel de genero
18	HS	Fungi	Zygomycota	Saccharomycetales	Endomycetaceae	Geotrichum	Geotrichum Candidum
19	HS	Fungi	Ascomycota	Hypocreales	Nectriaceae	Fusarium	Fusarium proliferatum
20	HS	Fungi	Ascomycota	Eurotiales	Hypocreaceae	Trichoderma	identificada solo a nivel de genero

Anexo 7: Código y origen de cada hongo

DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	COMUNIDAD	DIRECCION EXACTA	NOMBRE DE LA FINCA	NOMBRE DEL PRODUCTOR	TIPO DE FIIT	ZONA AGROCLIMATICA	Numero de muestras	tipo de muestra	Nematodos
Chinandega	El Viejo	El Manzano II	Tendal EMPASA 2	El Diamante	Juan Manuel Sanchez torres	Agropecuaria	Seca	6	Suelo de corral, heces frescas, heces secas con crecimiento de hongos	Trichostrongylus, Strongylus
Chinandega	El Viejo	El Manzano II	Tendal EMPASA 2	El Diamante	Ronaldo López Garmendia	Agropecuaria	Seca	6	Suelo de corral, heces frescas, heces secas con crecimiento de hongos	Trichostrongylus, Strongylus
León	Nagarote	San Antonio	De la iglesia evangélica 150 vrs al sur	El Garabato	Francisco Ramón Solís Muñoz	Agropecuaria	Intermedia	5	Heces frescas	Trichostrongylus, Strongylus
León	Nagarote	Las parcelas	del colegio 200 vrs al sur	El Nancite	German Baca	Agropecuaria	Intermedia	5	Suelo de corral , heces frescas	Trichostrongylus, Strongylus
León	León	Chacraseca	El recreo		Miguel Henriquez Dip	Agropecuaria	seca	7	Suelo de corral , heces frescas	Trichostrongylus, Strongylus
León	León	Chacraseca	El recreo	las esquinas	Armando Caballero	ganadera	seca	5	Suelo de corral , heces frescas	Trichostrongylus, Strongylus
León	León	Los positos	De la escuela los positos 200 mtrs al norte	Los limones	Erasmós Munguia	Agropecuaria	seca	6	Suelo de corral, heces fresca,	Trichostrongylus, Strongylus

Anexo 8: Frecuencia de repetición de hongos

N ° de replica	Aspergillus Orizae	Aspergillus Niger	Penicillium Chrysagenum espora	Trichoderma .sp	Aspergillus, sp	Penicillium sp	Rizophus sp.	Rizophus Oryzae.	Geotrichum Candidum	Fusarium proliferatum
Dip1	1	7	0	11	0	0	0	0	0	0
Dip1	0	12	0	22	0	1	0	0	0	0
Dip1	0	11	0	10	0	0	0	0	0	0
Dip1	0	11	0	8	0	0	0	0	0	0
Dip2	0	9	0	8	0	0	0	0	0	0
Dip2	0	2	0	9	0	0	1	0	0	0
Dip2	0	9	1	15	1	0	0	0	0	0
Dip2	0	9	1	0	1	1	0	0	0	0
Dip3	0	2	3	4	0	0	0	1	0	0
Dip3	0	2	3	4	0	0	0	0	0	0
Dip3	0	1	4	4	0	0	0	0	0	0
Dip3	0	3	5	6	1	2	1	0	0	0
Am	0	30	4	0	0	0	0	0	0	0
Am	0	29	0	8	0	0	0	0	0	0
Am	0	14	0	0	0	0	11	0	0	0
Am	0	21	2	0	0	0	1	0	0	0
HS1	0	0	0	3	0	0	0	0	4	0
HS1	0	0	0	2	0	0	0	0	3	2
HS1	0	0	0	5	0	0	0	0	1	0
HS1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
HS2	0	0	0	5	0	0	0	0	4	3
HS2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0
HS2	0	0	0	4	0	0	0	0	2	1
HS2	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0
ML	0	0	0	5	0	0	0	0	3	0
ML	0	0	0	8	0	0	0	0	4	4
ML	0	0	0	9	0	0	0	0	5	2
ML	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0
Total	1	172	23	159	3	4	14	1	35	12
%	0.23	40.56	5.42	37.5	0.7	0.94	3.3	0.23	8.25	2.83

Anexo 9: Preparación de medios de cultivo

Agar agua 2% (1 litro)

Disolver 20 gr de agar en un litro de agua destilada

Esterilizar la solución en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Dejar enfriar la solución (+ó – 60°C). En una cabina de flujo laminar servir la

Solución en cajas de petri.

Agar PDA Para un litro

Disolver 39 gr de agar PDA en un litro de agua destilada

Autoclavar a 121°C durante 20 minutos

Cuando se obtenga una temperatura de +ó- 60°C, servir en cajas de petri en la cabina de flujo laminar

Agar Harina de Maíz (1 litro)

Disolver 39 gr de agar AHM en un litro de agua destilada

Autoclavar a 121°C durante 20 minutos

Cuando se obtenga una temperatura de +ó- 60°C, servir en cajas de petri en la cabina de flujo laminar

Lavado de larvas por medio de la Técnica de Separación de Gradientes

1. Colocar 7.5 ml de solución de sacarosa 40% (40 gr de sacarosa en 100 ml de agua destilada) en un tubo, posteriormente agregue 2.5 ml del material que contiene las larvas suavemente a través de las paredes.

2. Centrifugar a 3.500 rpm durante tres minutos. Luego de la centrifugación se observará la formación de tres capas bien diferenciadas: la primera constituída por agua, la segunda por larvas y la tercera por sacarosa.

3. Extraer el anillo del medio correspondiente a las larvas, con una pipeta Pasteur cuidando de no tomar sacarosa. Verter en otro tubo y llenar con agua de la llave.
4. Centrifugar en centrífuga refrigerada a 4°C a 3500 rpm durante tres minutos. Eliminar el sobrenadante.
5. Repetir el paso anterior tres veces
6. Luego del cuarto lavado se elimina el sobrenadante, se tapan los tubos y se refrigeran a 4°C.

De esta manera se mantienen larvas limpias que pueden ser usadas en cualquier momento.

Técnica de coprocultivo de Roberts y O`Sullivan para obtención de larvas de nematodos gastrointestinales L3

1. Recolectar de 20-30 gr de materia fecal tomada directamente del recto, positivas en Mc Master
2. Homogenizar las heces hasta obtener una masa uniforme. Si las heces están muy secas se mojan con agua destilada, si por el contrario se encuentran muy acuosas, se mezclan con aserrín estéril para darle una consistencia más uniforme.
3. Se depositan las heces en un frasco de vidrio o plástico a $\frac{3}{4}$ de su capacidad.
4. Se limpia el borde del frasco y se tapa con papel craft ajustándola con una banda de caucho asegurándose de dejar orificios de ventilación en el craft que recubre la tapa del frasco.
5. Incubar de 7-10 días de 27- 30 °C. Monitoreando con termómetro de máxima y mínima la temperatura, para evidenciar a tiempo variaciones que pudieren afectar la eclosión desarrollo y supervivencia de las larvas.

6. Retirar los recipientes de la incubadora, adicionar agua común hasta cubrir la mezcla de heces y vertir los recipientes en cajas de Petri durante 4-8 horas, para permitir que las larvas migren a la caja de Petri.
7. Pasado ese tiempo, levantar ligeramente el frasco, para permitir la salida del agua acumulada en la boca del frasco; el agua contiene las larvas.
8. Colectar las larvas de la caja de Petri llenando un tubo de ensayo de 15 ml con pipeta Pasteur y centrifugue a 2000 rpm durante dos minutos.
9. Descartar el sobrenadante dejando 5 ml en el fondo del tubo, el cual contiene las larvas concentradas.
10. Proceder al lavado de las larvas con solución de sacarosa.

Azul de lactofenol

Fenol 0,1 gramos

Acido láctico 8 mililitros

Agua destilada 10 mililitros

Glicerina 20 mililitros

Azul de anilina 0.5 gramos

Se disuelve calentando ligeramente en fenol, el ácido láctico, el agua destilada y la glicerina; se deja enfriar y se añade el azul de anilina. Se deja reposar durante 24 horas. Se filtra y se guarda en botella de color ámbar.

Conteo de conidios en el hemocitómetro o cámara de Neubauer

Para determinar el número de conidios por volumen contenidos en una determinada suspensión, se utiliza un hemocitómetro o cámara de Neubauer. El hemocitómetro es una lámina de vidrio que tiene dos cámaras de 0.1 mm de profundidad. Cada cámara está dividida en nueve cuadrados de 1 mm². La

superficie cubre un área total de 9 mm². Adicionalmente, el cuadrado del centro está subdividido en cinco por cinco cuadrados agrupados de 0.2 mm de lado y una superficie de 0.04 mm² cada uno. Los cuadrados del centro a su vez están subdivididos en 16 cuadrados más pequeños de 0.0025 mm² cada uno. Cinco de estos cuadrados se utilizan para el conteo de los conidios. Se debe dar especial atención al hecho de que la cámara se encuentra delimitada por tres líneas blancas entre los cuadrados. Esto es importante para definir cuáles son los conidios que se encuentran en el límite y que deben ser contados. Generalmente se cuentan los conidios que están en la primera línea de arriba y de la derecha, no así los conidios que se encuentran en la línea de abajo y de la izquierda.

Procedimiento:

1. Preparar una suspensión de conidios en agua destilada con Tween 80 al 0.1%.
2. Con una pipeta Pasteur llenar la cámara con la suspensión de conidios y cubrirla con el cubreobjetos.
3. Conteo de conidios

Anexo: 10. Porcentaje de atrapamiento

Pruebas por Grupo	Hongo	N° de Larva por Replica				
N° de Larva por Grupo		1	2	3	4	PROMEDIO
	<i>Geotrichum candidum</i>	180	180	180	160	175
	<i>Fusarium proliferatum</i>	160	160	180	160	165
	<i>Trichoderma sp.</i>	160	160	160	160	160
	Control	160	160	160	160	160
% de Atramental	<i>Geotrichum candidum</i>	40	48.48	40	38.46	41.73
	<i>Fusarium proliferatum</i>	48.14	50	44.44	45.83	47.1
	<i>Trichoderma.sp</i>	47.58	36.95	41.66	33.33	39.75
	Control	0	0	0	0	0

Anexo 11 : Preparación y selección de Muestras



Anexo 12: Preparación de Medio de Cultivos



Anexo 13: Toma de muestras de suelo y muestras de heces



Recolecta de Muestra
de Suelo

Recolecta de muestra
Fecal para obtención de
Larvas Larva

Recolecta de Muestras de
Heces de Corral

Anexo 14: Preparación de muestras para enfrentamiento Hongo- Nematodo

