

**Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Pruebas *in vitro* para determinar la utilización de cepas
costarricenses de hongos nematófagos como potenciales
controladores biológicos de nemátodos gastrointestinales
de ovinos y caprinos**

Modalidad: Tesis de grado

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Natalia Soto Barrientos

**Campus Presbítero Benjamín Núñez
2009**

Miembros del Tribunal Examinador

Dr. Jorge Quirós
Decano

Dra. Laura Castro
Directora

Dra. Jaqueline B. de Oliveira
Tutora

Ing. Rommel Vega Obando
Cotutor

Dr. Danilo Montero Caballero
Lector

Julio, 2009

DEDICATORIA

A Apolonio, mi roble de pelo cano...

A Marina, Antonieta y Sebastián...

A veces el hombre más pobre deja a sus hijos la herencia más rica.
Ruth E. Renkel

AGRADECIMIENTOS

A Sibú por mi clan.

A Marta Obando y Lorena López por adoptarnos y dejarse adoptar...

A mi tutora, la Dra. Jaqueline B. de Oliveira, por su amistad, confianza, ayuda y conocimiento durante toda la carrera.

A mi lector, el Dr. Danilo Montero, por su amistad y colaboración.

A Ruth Romero, Dr. Miguel Obregón, Iván Mora, “Pin”, Jorgito Hernández, Adriana Blanco, Elías Barquero, Sergio Sánchez, Osvaldo, Charlie, Roberto y Castillo, por haber colaborado de una u otra manera en esta tesis.

Al Dr. Pablo Avendaño Castro por sus enseñanzas.

A mis amigos del alma: Lau, Eu, Luis, Gaby, Julieta, Adri, Ce, Lisa y Esteban, por ser como la sangre y acudir a la herida sin esperar a que les llamen, los quiero taaaaaaanto!

A mi grupo de internado: Lau, Eu, Lea, Sil y Marce, porque a pesar de todo fuimos un excelente equipo.

A la Ing. Carmen Durán del INA por su apoyo y darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación.

A Claudio, Lidia, Saulo, Pablo, Fabián, Minor, Ale, Adrián y Salomón del CNEAO-INA, por demostrarme su cariño en todo momento que estuve ahí.

Al Ing. Rommel Vega, por su tiempo, paciencia, ayuda, conocimiento y por la amistad tan bella que dejó la realización de este trabajo de investigación.

A los ingenieros Jorge Sánchez y Adrián Martínez, del CINA-UCR, por su gentil ayuda con las pruebas de digestibilidad.

A los doctores Felipe Torres, Armando Aguilar, Iván Rodríguez, Ramón Cámara y Nadia Ojeda de la UADY por el trato tan especial e inspirar el tema de esta tesis introduciéndome a este bello mundo del control biológico.

A todos mis profesores y técnicos durante la carrera por su ayuda y conocimiento.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. <i>Parasitosis animales y su control con fármacos antihelmínticos</i>	1
1.1.2. <i>Resistencia antihelmíntica</i>	2
1.1.3. <i>Otros problemas relacionados con el uso de fármacos antihelmínticos</i>	3
1.1.4. <i>Nuevas técnicas de control</i>	5
1.1.4.1. <u>Hongos nematófagos</u>	6
1.1.4.1.1. Generalidades.....	6
1.1.4.1.2. Hongos depredadores.....	6
1.1.4.1.3. Ciclo de vida.....	7
1.1.4.1.4. Ventajas y desventajas.....	7
1.2. Justificación	8
1.3. Objetivos	9
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	9
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	9
2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. Muestras	10

2.2. Larvas de nemátodos.....	15
2.3. Aislamiento.....	15
2.4. Identificación taxonómica.....	18
2.5. pH de muestras.....	18
2.6. Prueba de depredación.....	18
2.7. Producción de clamidosporas.....	19
2.8. Prueba de digestibilidad.....	20
2.9. Prueba de viabilidad.....	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Aislamiento.....	21
3.2. Identificación taxonómica.....	23
3.3. pH de las muestras.....	30
3.4. Prueba de depredación.....	32
3.5. Producción de clamidosporas.....	33
3.6. Prueba de digestibilidad.....	35
3.7. Prueba de viabilidad.....	36
4. DISCUSIÓN.....	37
4.1. Aislamiento e identificación taxonómica.....	37
4.2. pH de las muestras.....	41
4.3. Prueba de depredación.....	42
4.4. Producción de clamidosporas, prueba de digestibilidad y prueba de viabilidad.....	45
5. CONCLUSIONES.....	50
6. RECOMENDACIONES.....	52
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
8. ANEXOS.....	63

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Origen de las muestras tomadas y código asignado.....	11
Cuadro 2: Hongos aislados y su técnica de aislamiento.....	22
Cuadro 3: Hongos nematófagos aislados según código de muestra.....	23
Cuadro 4: pH de las muestras	30
Cuadro 5: Producción de clamidosporas en diferentes medios de cultivo de los hongos nematófagos aislados.....	34
Cuadro 6: Hongos nematófagos sometidos a la prueba de digestibilidad.....	35
Cuadro 7: Resumen de datos de los hongos nematófagos que resultaron positivos en la prueba de viabilidad.....	36
Cuadro 8: Pruebas de digestibilidad	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución por provincia de las fincas muestreadas.....	10
Figura 2: Distribución de las fincas muestreadas según su altitud.....	13
Figura 3: Distribución de las fincas muestreadas según la zona de vida.....	14
Figura 4: Espolvoreado de suelo en agar agua con nemátodos.....	16
Figura 5: Cámara húmeda con suelo.....	17
Figura 6: Crecimiento de dilución 1:10.....	21
Figura 7: Cámara húmeda: crecimiento de hongo en suelo.....	21
Figura 8a: Cámara húmeda: crecimiento de hongo en heces.....	22
Figura 8b: Cámara húmeda: crecimiento de hongo en heces.....	22
Figura 9: Morfología macroscópica <i>Arthrobotrys oligospora</i>	25
Figura 10: Morfología macroscópica <i>Arthrobotrys conoides</i>	25
Figura 11: Morfología macroscópica <i>Arthrobotrys dactyloides</i>	25
Figura 12: Morfología macroscópica <i>Candelabrella musiformis</i>	25
Figura 13: Conidia <i>Arthrobotrys oligospora</i>	25
Figura 14: Conidia <i>Arthrobotrys conoides</i>	25
Figura 15: Conidia <i>Arthrobotrys dactyloides</i>	26
Figura 16: Conidia <i>Candelabrella musiformis</i>	26
Figura 17: Nemátodo atrapado por <i>Arthrobotrys oligospora</i> . Redes tridimensionales. 20x.....	26
Figura 18: Nemátodo atrapado por <i>Candelabrella musiformis</i> . Redes bidimensionales. 20x.....	26
Figura 19: Nemátodo atrapado por <i>Candelabrella musiformis</i> . Anillos simples. 10x.....	26
Figura 20: Nemátodo atrapado por <i>Arthrobotrys dactyloides</i> . Anillo contractil. 40x.....	26
Figura 21: Detalle de hifas de <i>Arthrobotrys dactyloides</i> dentro de nemátodo. 40x.....	27

Figura 22: Hongos nematófagos aislados por provincia.....	28
Figura 23: Hongos nematófagos aislados según altitud.....	29
Figura 24: Hongos nematófagos aislados según zona de vida.....	29
Figura 25: pH del suelo de los hongos nematófagos aislados.....	32
Figura 26: Porcentaje de depredación hacia larvas de NGI de ovinos.....	33
Figura 27: Cadena de clamidosporas de <i>Arthrobotrys oligospora</i> . 20x.....	34
Figura 28: Clamidospora de <i>Candelabrella musiformis</i> . 40x.....	34
Figura 29: Fincas positivas al aislamiento de <i>Beauveria</i> sp., <i>Clonostachys</i> sp., <i>Lecanicillium</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.....	64
Figura 30: Morfología macroscópica <i>Beauveria</i> sp.....	65
Figura 31: Morfología macroscópica <i>Clonostachys</i> sp.....	65
Figura 32: Morfología macroscópica <i>Lecanicillium</i> sp.....	65
Figura 33a: Morfología macroscópica <i>Trichoderma</i> sp.....	65
Figura 33b: Morfología macroscópica <i>Trichoderma</i> sp.....	65
Figura 33c: Morfología macroscópica <i>Trichoderma</i> sp.....	65

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C: grados Celsius

AA: Agar agua

CATIE: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

CINA: Centro de Investigación en Nutrición Animal.

CNEAO: Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica

EM: agar extracto de malta

FAH: fármacos antihelmínticos

HM: agar harina de maíz

HN: hongos nematófagos

HND: Hongos nematófagos depredadores

INA: Instituto Nacional de Aprendizaje

ITCR: Instituto Tecnológico de Costa Rica

MSNM: Metros sobre el nivel del mar

NGI: nemátodos gastrointestinales

PDA: papa-dextrosa-agar

PDAac: papa-dextrosa-agar acidificado

PDAatb: papa-dextrosa-agar con antibiótico

PVL: potrero de vacas lecheras

PZ: agar papa-zanahoria

RA: resistencia antihelmíntica

TGI: tracto gastro-intestinal

UCR: Universidad de Costa Rica

RESUMEN

Para el aislamiento e identificación de hongos nematófagos depredadores (HND), se tomaron muestras de cincuenta y un fincas distribuidas entre todas las provincias de Costa Rica. La naturaleza de las muestras incluyó: suelos de diferentes sembradíos (papa, tomate, banano, plantas ornamentales, chayote y café), heces de animales (bovinos, ovinos, caprinos y equinos), suelo y hojarasca de bosques y plantas con signos de enfermedad causada por nemátodos. Las muestras se procesaron mediante 3 técnicas diferentes para la extracción de hongos a partir del suelo: espolvoreado en placa, dilución de suelos y cámara húmeda. Veinticuatro cepas de hongos nematófagos fueron aisladas de 19 fincas; el 83.3% de éstos, aislados mediante las técnica de espolvoreado en placa. Los hongos fueron identificados como: *Arthrobotrys oligospora* (n=13), *Candelabrella musiformis* (n=9) y por primera vez se reporta el aislamiento de *A. conoides* (n=1) y *A. dactyloides* (n=1) en el país. Asimismo, se aislaron 16 cepas de hongos de los géneros *Trichoderma* (n=13), *Beauveria* (n=1), *Clonostachys* (n=1) y *Lecanicillium* (n=1). Adicionalmente se les midió el pH, el cual varió entre 5.2 hasta 9.9, ubicándose los HND dentro de un rango entre 5.6 a 7.5. Las cepas de HND fueron cultivadas en 4 medios diferentes para la producción de clamidosporas: papa dextrosa agar, harina de maíz, extracto de malta y agar papa-zanahoria. El 95.8% de las cepas aisladas produjeron clamidosporas, principalmente en el medio agar papa-zanahoria. De estas cepas, se escogieron las de mayor producción para ser sometidas a la prueba de digestibilidad *in vitro*. Un total de 14 hongos fueron sometidos a esta prueba, de los cuales el 42.9% resultó viable; *A. conoides* y *A. dactyloides* no sobrevivieron a la prueba de digestibilidad *in vitro*. Los hongos nematófagos, aislados en este estudio, tienen acción contra los nemátodos gastrointestinales de

ovinos y caprinos y son promisorios candidatos para ser utilizados en control biológicos de estos organismos.

ABSTRACT

For the gathering and identification of predator nematophagous fungi (PNF), samples were collected from fifty one farms distributed along the seven provinces of Costa Rica. The nature of samples included: soil from different crops (potatoes, tomatoes, bananas, ornamental plants, mirlitons and coffee), animal feces (cattle, sheep, goats and horses), soil and fallen leaves from forests and plants with signs of diseases caused by nematodes. Each sample was processed using 3 different techniques for the extraction of fungi from soil: sprinkling technique, soil dilution and humidity chamber. Twenty four strains of nematophagous fungi were founded in 19 farms; 83.3% of the fungi were isolated by sprinkling technique. The fungi identified were: *Arthrobotrys oligospora* (n=13), *Candelabrella musiformis* (n=9), and for the first time there is evidence of isolation of *A. conoides* (n=1) and *A. dactyloides* (n=1) in the country. Also, 16 strains from *Trichoderma* (n=13), *Beauveria* (n=1), *Clonostachys* (n=1) and *Lecanicillium* (n=1) were obtained. In addition, pH was measured and it varied from 5.2 to 9.9, placing the PNF inside ranges of 5.6 and 7.5. The PNF strains were cultivated in four different media for the production of chlamydospores: potato dextrose agar, corn meal agar, malt extract and potato carrot agar. From this cultures, 95.8% of the strains formed chlamydospores, mainly in the potato carrot agar. Out of the strains, the ones that produced most of these particular spores were subjected to ruminant artificial gastrointestinal conditions. A total of 14 fungi were tested, out of which 42.9% survived the digestive analysis. Neither *A. conoides*, nor *A. dactyloides* were able to grow after the *in vitro* gastrointestinal test. The PNF isolated in this study have an action against ovine and caprine gastrointestinal nematodes and are candidates to be used as biological control of these organisms.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. Parasitosis animales y su control con fármacos antihelmínticos

En los sistemas de producción ganadera ubicados en regiones tropicales y subtropicales del mundo, las afecciones parasitarias tienen un lugar destacado como causa importante de pérdidas en la productividad ganadera, debido a daños tales como: morbilidad y mortalidad de los animales, reducción de los niveles de producción y productividad, alteraciones reproductivas y altos costos del control, entre otros (FAO, 2003; Minglian et al., 2004; Araújo et al., 2006; Su et al., 2007).

Los nemátodos gastrointestinales (NGI) de los pequeños rumiantes incluyen *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp. y *Cooperia* spp. La proporción de cada uno de estos nemátodos en poblaciones de pequeños rumiantes varía de acuerdo a la ubicación geográfica, ubicándose las más altas prevalencias en las regiones tropicales húmedas debido a que permiten el desarrollo de huevos y estadios larvarios durante todo el año. *Haemonchus contortus* y *T. circumcincta* presentan la mayor incidencia en pequeños rumiantes, con *H. contortus* estando presente en mayor número (Chandrawathani, 2004; Fleming et al., 2006).

Debido a los daños ocasionados por estos organismos, los productores se ven obligados a realizar cuantiosas inversiones en procura de minimizar el efecto negativo al que se ven sometidos sus rebaños. Es así como a partir de los años sesenta, cuando aparece el Tiabendazol, primer fármaco antihelmíntico (FAH) de amplio espectro, nace una nueva era en el control de los NGI, caracterizada por cuantiosas, pero efectivas, inversiones en FAH para

limitar las pérdidas en el hato causadas por estas parasitosis (Minglian et al., 2004; Araújo et al., 2006; Vargas-Rodríguez, 2006; Cuellar-Ordaz, 2007; Li et al., 2007; Su et al., 2007).

Actualmente existen 3 clases de FAH de amplio espectro comúnmente usados en pequeños rumiantes: benzoimidazoles, imidatiазoles o agonistas colinérgicos y las lactonas macrocíclicas o avermectinas (Chandrawathani, 2004; Schnyder et al., 2005; Fleming et al., 2006; Vargas-Rodríguez, 2006).

La ivermectina es hoy el antiparasitario más utilizado, con una cifra de mil millones de dólares americanos en 1993. Así, desde 1981, ha sido comercializada en más de 60 países y es utilizada para tratar tanto el ganado bovino, ovino y caprino, como a los caballos, cerdos, perros, camellos, venados y hasta el hombre (Lumaret y Martinez, 2005).

1.1.2. Resistencia antihelmíntica

La resistencia antihelmíntica (RA) se define como el aumento significativo de los individuos de una población de parásitos capaz de tolerar niveles de droga (antihelmíntico), la cual ha probado ser letal para la mayoría de los individuos de la misma especie y es el resultado de la selección activa hecha por los propios antihelmínticos, de los genes que regulan los mecanismos fisiológicos y bioquímicos responsables de evadir el efecto letal de estos fármacos (Sangster y Gill, 1999; Chandrawathani, 2004; Fleming et al., 2006; Cuellar-Ordaz, 2007).

La RA puede clasificarse como intrínseca o adquirida. Un parásito que es naturalmente insensible al efecto de una droga es intrínsecamente resistente. Este fenómeno puede deberse a la falta de receptores específicos ó a que la droga no puede entrar en la célula y así llegar a su sitio de acción. La resistencia adquirida se da cuando poblaciones, que son inicialmente

susceptibles a la acción de un fármaco, dejan de serlo tras la ocurrencia de cambios genéticos heredables de generación en generación (Antonelli, 2003).

Los primeros reportes de RA fueron en parásitos de ovejas y caballos. Ahora, es por mucho, el mayor problema en las industrias de animales así como humanas; cubre todos los grandes grupos químicos de antihelmínticos e incluye varias familias de helmintos, siendo *H. contortus* el que presenta la mayor prevalencia, haciéndolo el NGI más importante económicamente hablando en ovejas y cabras en el mundo (Sangster y Gill, 1999; Geerts y Gryseels, 2000; FAO, 2003; Chandrawathani, 2004; Schnyder et al., 2005; Fleming et al., 2006; Vargas-Rodríguez, 2006; Varady et al., 2007).

Actualmente han sido reportados casos de RA en: Australia, Nueva Zelanda, España, Francia, Dinamarca, Gran Bretaña, América del Sur, Sureste Asiático, África del Sur, Estados Unidos y Suiza (Geerts y Gryseels, 2000; Chandrawathani, 2004; Schnyder, 2005; Fleming et al., 2006; Vargas-Rodríguez, 2006).

1.1.3. Otros problemas relacionados con el uso de fármacos antihelmínticos

Según la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, 2005), en un alimento de origen animal, se le llama residuo a cualquier compuesto presente en tejidos comestibles de animales destinados a consumo, que resulta del uso de un compuesto, incluyendo el compuesto mismo, sus metabolitos, y cualquier otra sustancia formada en alimentos debido al uso del compuesto.

Los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal generan productos de baja calidad y constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, produciendo toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en

el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros (Lozano y Arias, 2008).

Abamectina, Albendazol, Closantel, Doramectina, Eprinomectina, Febantel, Fenbendazol, Flubendazol, Ivermectina, Levamisol, Moxidectina, Oxfendazole, Thiabendazol y Triclabendazol son los antihelmínticos de uso veterinario regulados por el *Codex Alimentarius* (Lozano y Arias, 2008).

En Costa Rica, el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE) ha realizado análisis sobre residuos de ivermectina en bovinos y se ha encontrado que existen muestras de hígados y leche positivas a la presencia de residuos de este desparasitante, con concentraciones arriba de las consideradas como seguras para el consumo humano. Esto podría estar acarreado un problema de salud pública y al comercio de nuestro país con los países a quienes exportamos estos alimentos (Rojas-Martínez y Castro, 2004).

Por otro lado, ciertas drogas de uso veterinario pueden modificar el funcionamiento normal del ecosistema por afectar a los coleópteros y dípteros coprófagos, la mesofauna edáfica y las lombrices; los cuales juegan un rol vital en mantener la higiene de las pasturas, ciclos de nutrientes, aireación del suelo, percolación del agua, contenido de humus y productividad de las pasturas. Su eliminación parcial puede conducir a más que duplicar el tiempo de desaparición de las boñigas de la superficie del suelo, el cual podría llegar a ser de 3 o 4 años en clima mediterráneo (Lumaret y Martínez, 2005; Lumaret et al., 2007).

Sin embargo, no todos los productos veterinarios presentan el mismo riesgo para el ambiente, esto depende de la familia química a la cual pertenecen. Los benzimidazoles y los imidazotiazoles no tienen efectos nocivos significativos sobre los coleópteros coprófagos. En cuanto a las lactonas macrocíclicas (avermectinas y milbemicinas) una parte muy importante

del producto es eliminado progresivamente en las heces de los animales tratados. Las boñigas de estos animales desparasitados con ivermectina resultan ser más atractivas a la microbiota debido al hecho que después del tratamiento hay una liberación de una cantidad importante de aminoácidos en los excrementos, lo que aumenta los factores de riesgo para los insectos coprófagos debido a que la ivermectina conserva toda su eficiencia insecticida durante un largo periodo. Se ha demostrado que los insectos coprófagos podrían intoxicarse, reducir el número de larvas, de tasa de emergencia y porcentaje de fecundidad si consumen boñigas de animales tratados 40 días antes (Lumaret y Martínez, 2005; Lumaret et al., 2007).

1.1.4. Nuevas técnicas de control

Ante la resistencia que adquirieron los NGI a los FAH utilizados para su control, surgió la necesidad de establecer nuevas opciones de manejo, que aparte de solucionar el problema citado también se puedan aplicar fácilmente, de manera tal que los costos de implementación sean poco significativos para las explotaciones involucradas (Vargas-Rodríguez, 2006).

El término control biológico se aplica a la utilización de antagonistas naturales disponibles en el ambiente, para disminuir a un umbral subclínico y económicamente aceptable, la población de un agente causante de pérdidas productivas en la actividad pecuaria o agrícola. Como regla de mantenimiento de los sistemas biológicos, toda población es regulada por antagonistas. Ese proceso ocurre espontáneamente en la naturaleza y no es dependiente de la interferencia del hombre. En ausencia de controladores naturales, la población de un determinado organismo podría aumentar indiscriminadamente (Mota et al., 2003; Araújo et al., 2006).

En la práctica, el control biológico no actúa sobre estadios internos de parásitos; con todo, concentra sus acciones sobre los hospederos intermediarios, paraténicos, vectores y estadios larvarios de vida libre, disminuyendo la fuente de infección para los hospedadores finales; además de eso causa menos efectos negativos en el ambiente que los métodos químicos (Mota et al., 2003; Araújo et al., 2006).

El control biológico ha recibido una atención que va en aumento, particularmente por la demanda de productos libres de residuos de drogas de uso veterinario (Su et al., 2007).

1.1.4.1. Hongos nematófagos

1.1.4.1.1. Generalidades

Dentro de los principales enemigos naturales de los nemátodos en el suelo se encuentran los hongos nematófagos (HN), los cuales son clasificados en 4 grandes grupos: endoparásitos, oportunistas, tóxicos y particularmente los hongos depredadores de nemátodos (HND). Estos hongos pueden ser aislados a partir de muestras de suelo y otros substratos como heces de animales domésticos (Barron, 1977; Duddington, 1955; Minglian et al., 2004; Li et al., 2005; Su et al., 2007).

1.1.4.1.2. Hongos depredadores

Las especies que pertenecen al grupo de los depredadores producen un sistema extensivo de hifas en el ambiente. A intervalos a lo largo de la hifa se producen órganos de captura (hifas, ramas, redes o botones adhesivos y anillos constrictores o no constrictores) para atrapar y detener nemátodos vivos. La víctima capturada luego es penetrada y su cuerpo es rápidamente consumido por completo. Una vez establecidos, tienen un extensivo desarrollo

de hifas en el sustrato. La cantidad de crecimiento dependerá del número y la frecuencia de las capturas (Duddington, 1955; Barron, 1977; Minglian et al., 2004).

1.1.4.1.3. Ciclo de vida

La mayoría de los autores aborda ampliamente el ciclo infectivo de los HN dividiéndolo en dos fases: una parasítica y otra saprofítica. La primera incluye la formación de los órganos de captura a lo largo del micelio. El contacto entre el hongo y el nematodo es seguido por el desarrollo y penetración de haustorias (hifas especializadas para digerir el contenido) por la cutícula de éste. El nemátodo inicialmente es mantenido adherido al hongo por medio de una sustancia fibrilar adhesiva rica en fosfatasa ácida, la cual también es responsable de la degradación de la cutícula. Dentro del nemátodo ocurre crecimiento de las hifas y la digestión de los contenidos internos de éste. La segunda fase se caracteriza por una colonización total con momificación del individuo, emergencia del hongo y su esporulación. Estos conidios pueden diseminarse mediante el viento, el agua, otros organismos y el hombre, para así iniciar un nuevo ciclo infectivo (Barron, 1977; Saumell y Fernández, 2000; Mota et al., 2003; Elósegui-Claro, 2006).

1.1.4.1.4. Ventajas y desventajas

Muchos de estos hongos han sido investigados en todo el mundo, ya que exhiben mucho más ventajas a ser aprovechadas que desventajas. Como desventajas se puede mencionar que su acción es más lenta en comparación con los antihelmínticos y que presentan una marcada sensibilidad a la baja humedad relativa. Por otro lado, como ventajas se pueden mencionar las siguientes: tienen ciclo de vida corto con alta actividad reproductiva, no son

patógenos para los animales, no tienen efectos ambientales adversos, producen esporas de resistencia, quedan en fase saprofítica en ausencia de alimento, son activos contra los estados libres de NGI, pueden sobrevivir el pasaje intestinal en los rumiantes, pueden controlar efectivamente las helmintosis por la reducción de larvas infectantes en las pasturas y al no eliminar totalmente las poblaciones parasitarias queda un estímulo permanente de la respuesta inmunológica contra los parásitos (Saumell y Fernández, 2000; Minglian et al., 2004; González-Garduño et al., 2005; Elósegui-Claro, 2006; Kahn et al., 2007; Su et al., 2007).

1.2. Justificación

Los ensayos *in vitro* proveen información sobre la propiedad inherente de estos hongos de capturar nemátodos, pero sin el estrés al que están expuestos en el suelo debido a la competencia y a la lucha por la sobrevivencia. Con esta información se puede predecir si un hongo podrá o no ser un depredador eficiente en la práctica, ya que un pobre desempeño en la producción de esporas de resistencia (clamidosporas) o en su habilidad para pasar el tracto gastrointestinal de los rumiantes sin ser destruido, da la pauta ya sea para descartarlo como potencial controlador biológico de nemátodos en el ambiente; o bien para buscar una manera diferente de utilizarlo que no dependa de la diseminación en las pasturas por medio de los animales (Orozco-Aceves, 2005).

El presente trabajo pretendió investigar cepas costarricenses de hongos nematófagos como potencial herramienta para el control de los NG en la población caprina y ovina de nuestro país, lo cual es de suma importancia debido al constante desarrollo de resistencia a las drogas antihelmínticas de amplio espectro en las poblaciones de nemátodos (Várady et al., 2007).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar *in vitro* la capacidad de los hongos nematófagos depredadores (HND) de producir clamidosporas que sean capaces de pasar por el tracto gastrointestinal de rumiantes domésticos sin ser destruidas, y así determinar su posible uso como controladores biológicos de parásitos gastrointestinales.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Aislar las especies de HND de los cuales ya se conoce su presencia en Costa Rica, a partir diferentes sustratos.
- Identificar nuevas cepas de estos microorganismos nematófagos en Costa Rica.
- Definir el rango de pH óptimo para el crecimiento de HND.
- Establecer el porcentaje de depredación contra larvas de NGI de las cepas de HND aisladas.
- Reproducir, en sustratos sólidos, cepas costarricenses de HND para inducir sus respectivas clamidosporas.
- Determinar el medio de cultivo más adecuado para la producción de las clamidosporas de las diferentes cepas de HND de Costa Rica.
- Determinar la viabilidad de las clamidosporas luego de ser sometidas a un proceso digestivo artificial.

2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Muestras

Se tomaron muestras de 51 fincas entre todas las provincias de Costa Rica, las cuales se distribuyeron de la siguiente manera: 12 de Alajuela, 17 de Cartago, 2 de Guanacaste, 2 de Heredia, 7 de Limón, 3 de Puntarenas y 8 de San José (Fig. 1).

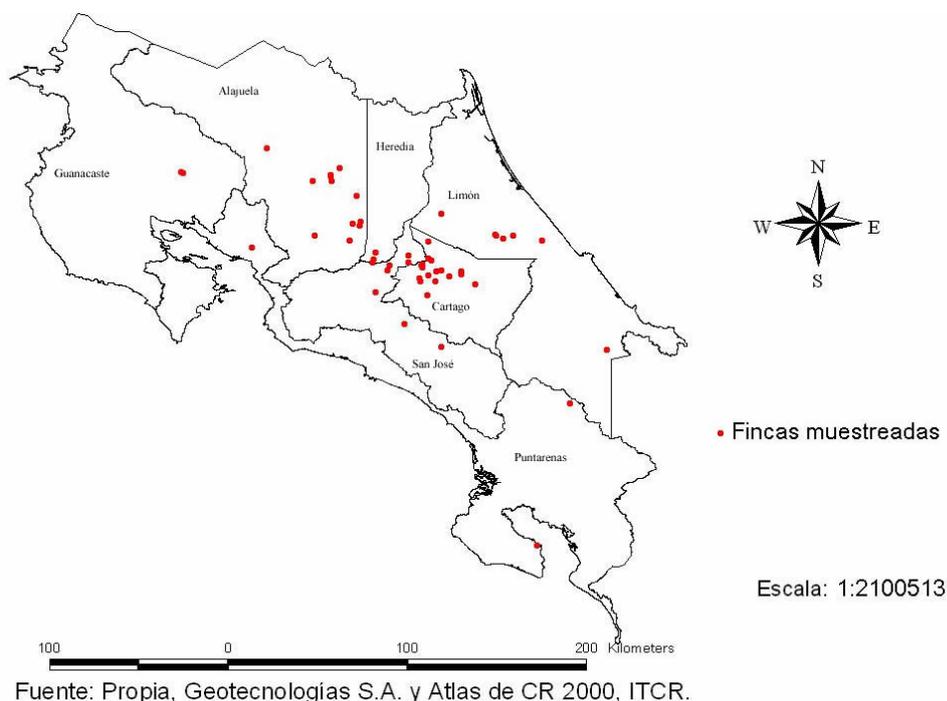


Figura 1. Distribución por provincia de las fincas muestreadas.

La naturaleza de las muestras incluyó suelos de diferentes sembradíos (papa, tomate, banano, plantas ornamentales, chayote y café), heces de animales (bovinos, ovinos, caprinos y equinos), suelo y hojarasca de bosques y plantas con signos de enfermedad causada por nemátodos.

El cuadro 1 contiene el lugar de origen de la muestra, el tipo de muestra y el código asignado a cada una de ellas.

Cuadro 1. Origen de las muestras tomadas y código asignado.

Lugar de origen	Muestra	Código
Alajuela, San Carlos, Cedral Finca Los Vega	Suelo y heces de potrero de equino	ECe
Alajuela, Grecia, Cariblanco Refugio Nacional de Vida Silvestre Bosque Alegre, Laguna Hule	Suelo y hojarasca	SCaB
Alajuela, Los Chiles	Suelo de finca sin manejo	SCh1
Alajuela, Los Chiles	Suelo de finca sin manejo	SCh2
Alajuela, San Carlos, Aguas Zarcas	Suelo y heces de potrero de vacas lecheras (pvl)	VAZ
Alajuela, Sabanilla, Fraijanes Finca La Rosalia	Suelo y heces de pvl	VF
Alajuela, San Carlos, Pital Finca La Josefina	Suelo y heces de pvl y heces de ovejas estabuladas	VOJ
Alajuela, Poas, San Juan Norte Finca La Vistada	Suelo y heces de pvl	VLV
Alajuela, San Carlos, Monterrey	Suelo y heces de pvl	VM
Alajuela, Naranjo	Suelo y heces de pvl	VN
Alajuela, Poas Finca La Rosela	Suelo y heces de pvl	VPo1
Alajuela, Poas Finca La Carmela	Suelo y heces de pvl	VPo2
Cartago Finca La Flor	Heces de cabras lecheras estabuladas	CF
Cartago, Turrialba, Juan Viñas Finca Ricardo Flores	Suelo y heces de potrero de cabras lecheras	CJV
Cartago, Oreamuno, Cipreses Finca Los Cipreses	Suelo y heces de potrero de cabras lecheras	COr
Cartago, faldas del volcán Irazú, antiguamente finca lechera	Papa enferma por nemátodos	PC
Cartago, Oreamuno, La Chinchilla CNEAO-INA	Suelo y hojarasca	SBI
Cartago, Turrialba, Santa Cruz	Suelo de café	SCT
Cartago, Paraíso, Orosi	Suelo de plantas ornamentales	SOC
Cartago, Oreamuno Parque Nacional Volcán Irazú	Suelo y hojarasca	SVI
Cartago	Tomate enfermo por nemátodos	TC
Cartago, Alvarado, Capellades	Suelo y heces de potrero de vacas lecheras	VAI
Cartago Finca Cabeza Vaca	Suelo y heces de pvl	VCV
Cartago, Llano Grande Hacienda Retes	Suelo y heces de pvl	VELG

Cuadro 1. Continuación Origen de las muestras tomadas y código asignado.

Lugar de origen	Muestra	Código
Cartago, Oreamuno, Paso Ancho Finca La Cuesta	Suelo y heces de pvl	VO
Cartago, Alvarado, Pacayas	Suelo y heces de pvl	VPa
Cartago Finca Santa Rosa	Suelo y heces de pvl	VSR
Cartago, Turrialba, Santa Cruz	Suelo y heces de pvl	VT1
Cartago, Turrialba	Suelo y heces de pvl	VT2
Guanacaste, Cañas Finca Rio Lajas	Suelo y heces de potrero de ovinos y caprinos	OCC
Guanacaste, Cañas	Suelo y heces de potrero de ganado de engorde	VCa
Heredia, Barreal, UNA Escuela de Medicina Veterinaria	Suelo y heces de potrero de equinos y cabras	ECMV
Heredia, Barva, Santa Lucia Finca Experimental de la UNA	Lombricompost, suelo de morera y heces de pvl y ovejas	VOSL
Limón, Talamanca, Amubri	Suelo y heces de equinos	ET
Limón	Suelo de bananera	SBL1
Limón	Suelo de bananera	SBL2
Limón, Siquirres, Cimarrones	Suelo de finca sin manejo	SCiL
Limón, Siquirres, Cerro Siquirres	Suelo de finca sin manejo	SCS
Limón, Siquirres, La Francia	Suelo de finca sin manejo	SFL
Limón, Guápiles	Suelo de finca con manejo orgánico	SG
Puntarenas, Buenos Aires, Biolley Parque Internacional La Amistad	Suelo y hojarasca	SAPt
Puntarenas, Montes de Oro, Miramar	Suelo de finca sin manejo	SM
Puntarenas, Puerto Jimenez	Suelo de finca sin manejo	SZS
San José, Uruca, INA	Suelo y heces de potrero de cabras	CINA
San José, Zona de los Santos Parque Nacional Los Quetzales	Suelo y hojarasca de bosque de páramo	SPQ
San José, Dota, Santa María	Suelo de café	SD
San José, Tarbaca	Suelo de finca sin manejo	STa
San José, Sabanilla Instalaciones deportivas de la UCR	Suelo y hojarasca	SUCRD
San José, Zapote	Suelo de chayotera	SZa
San José, Coronado	Suelo y heces de pvl	VCo
San José, Rancho Redondo Finca La Socola	Suelo y heces de pvl	VSo

De éstas 51 fincas muestreadas: 17 se ubicaron entre los 0 y 500 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), 5 entre 501 y 1000 m.s.n.m., 10 entre 1001 y 1500 m.s.n.m., 12 entre 1501

y 2000 m.s.n.m., 3 entre 2001 y 2500 m.s.n.m., 1 entre 2501 y 3000 m.s.n.m. y 3 de suelos arriba de los 3000 m.s.n.m (Fig. 2).

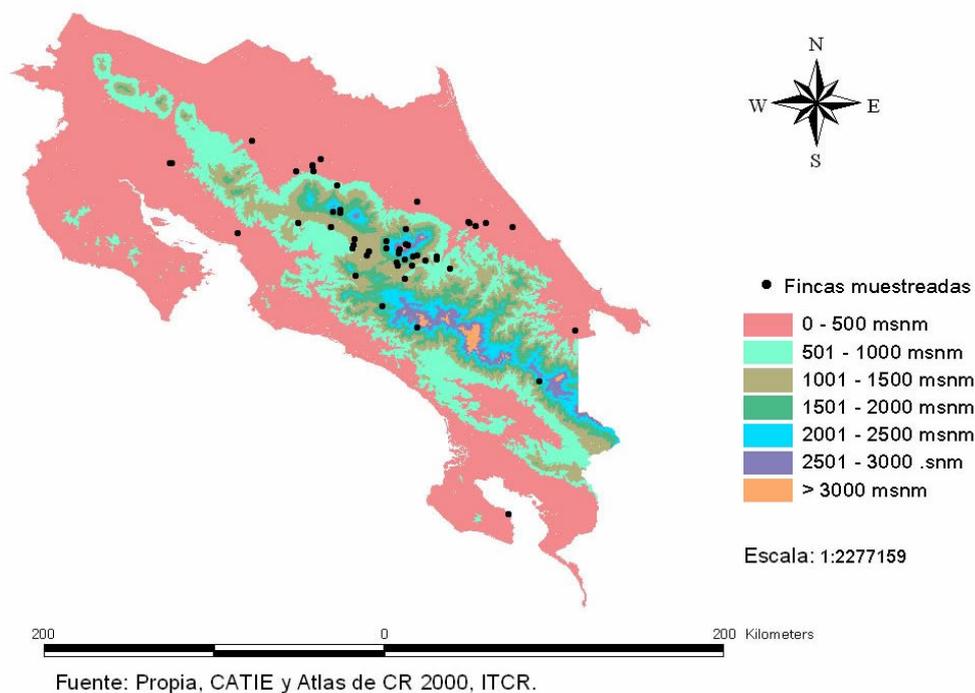
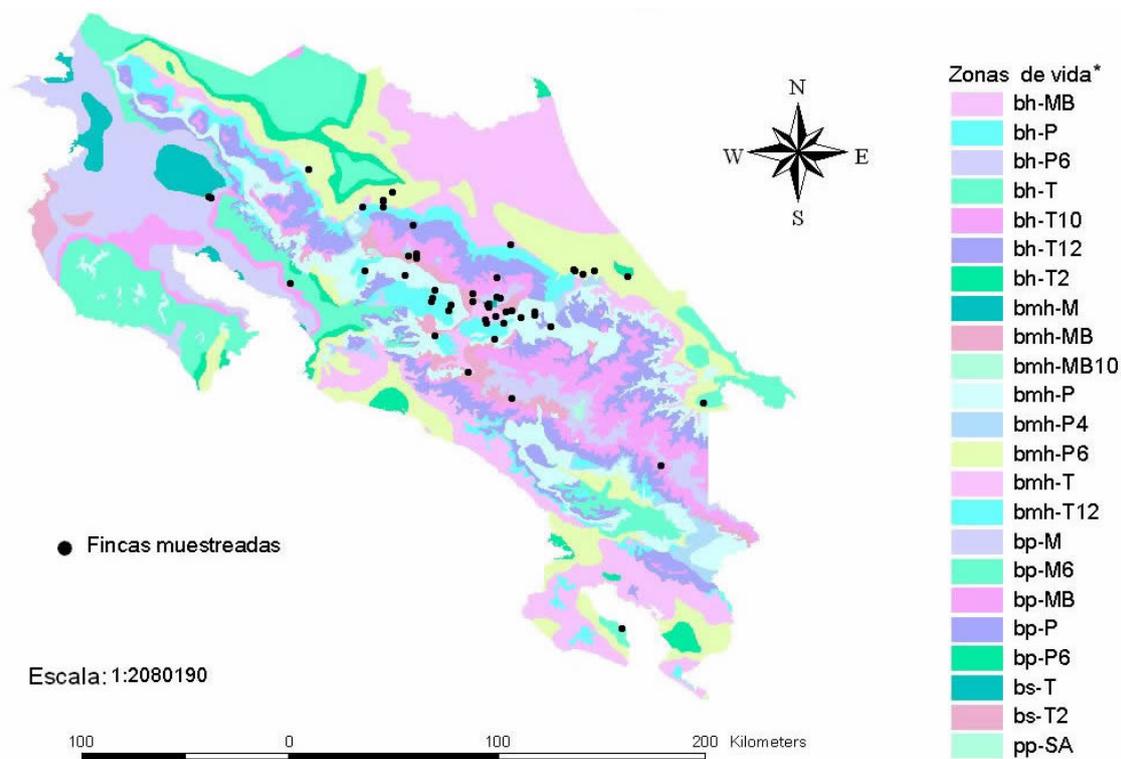


Figura 2. Distribución de fincas muestreadas según su altitud.

A su vez, las zonas de vida correspondientes a cada finca se distribuyeron de la siguiente forma: 1 muestra obtenida de bosque seco tropical, 7 de bosque húmedo premontano, 4 de bosque húmedo montano, 3 de bosque húmedo tropical, 1 de bosque húmedo premontano transición a basal, 1 de bosque húmedo tropical transición a premontano, 1 de bosque húmedo tropical transición a perhúmedo, 10 de bosque muy húmedo montano bajo, 7 de bosque muy húmedo premontano, 7 de bosque muy húmedo premontano transición a basal, 1 de bosque muy húmedo tropical, 1 de bosque muy húmedo premontano transición a pluvial, 1 de bosque muy húmedo montano, 1 de bosque muy húmedo tropical transición a premontano, 2 de

bosque pluvial montano, 2 de bosque pluvial montano bajo y 1 de bosque pluvial premontano (Fig. 3).



* bh-MB: bosque húmedo montano bajo, bh-P: bosque húmedo premontano, bh-P6: bosque húmedo premontano transición a basal, bh-T: bosque húmedo tropical, bh-T10: bosque húmedo tropical transición a seco, bh-T12: bosque húmedo tropical transición a premontano, bh-T2: bosque húmedo tropical transición a perhúmedo, bmh-M: bosque muy húmedo montano, bmh-MB: bosque muy húmedo montano bajo, bmh-MB10: bosque muy húmedo montano bajo transición a húmedo, bmh-P: bosque muy húmedo premontano, bmh-P4: bosque muy húmedo premontano transición a pluvial, bmh-P6: bosque muy húmedo premontano transición a basal, bmh-T: bosque muy húmedo tropical, bmh-T12: bosque muy húmedo tropical transición a premontano, bp-M: bosque pluvial montano, bp-M6: bosque pluvial montano transición a montano bajo, bp-MB: bosque pluvial montano bajo, bp-P: bosque pluvial premontano, bp-P6: bosque pluvial premontano transición a basal, bs-T: bosque seco tropical, bs-T2: bosque seco tropical transición a perhúmedo, pp-SA: páramo pluvial subalpino

Fuente: Propia, Centro Científico Tropical, MAG, Atlas de CR 2000, ITCR.

Figura 3. Distribución de fincas muestreadas según zona de vida.

Las muestras se pusieron en bolsas plásticas debidamente rotuladas con la fecha, altura y coordenadas geográficas suministradas por un sistema de posicionamiento global (GPSMAP® 76CS GARMIN) y posteriormente se trasladaron de las fincas al Laboratorio de Fitoprotección del Centro Nacional Especializado de Agricultura Orgánica (CNEAO) del

Instituto Nacional de Aprendizaje (INA) donde se almacenaron en refrigeración hasta el momento de ser procesadas.

2.2. Larvas de nemátodos

Para estimular la producción de trampas en los aislamientos, en los cultivos en lámina para la identificación taxonómica, en la prueba de depredación y en la prueba de viabilidad se utilizaron suspensiones de nemátodos.

Para aislar los nemátodos, se identificaron animales naturalmente infectados mediante un examen directo de heces, de las muestras positivas se aislaron las larvas siguiendo la técnica de coprocultivo descrita por Hernández-Gamboa (2007). Para cada prueba se utilizaron cultivos mixtos de larvas de NGI, las proporciones de cada género variaron durante las diferentes etapas del estudio.

2.3. Aislamiento

En el laboratorio, las muestras se procesaron mediante 3 técnicas diferentes para la extracción de hongos a partir del suelo: espolvoreado (Barron, 1977), dilución de suelos (Villalba-Velásquez, 2006) y cámara húmeda (Delgado-Avila et al., 2001).

La primera técnica (Fig. 4) se realizó colocando 1 g de suelo directamente en placas de Petri conteniendo agar agua (AA de Difco Bacto Agar). A estas placas se les adicionaron 2 ml de una suspensión cargada de nemátodos y fueron puestas en incubadora con temperatura promedio de 28°C, 80% de humedad y luz artificial. El material se revisó diariamente a partir de los 5 días mediante un estereoscopio. Una vez que se observó la presencia de nemátodos atrapados se procedió al aislamiento y purificación del hongo.

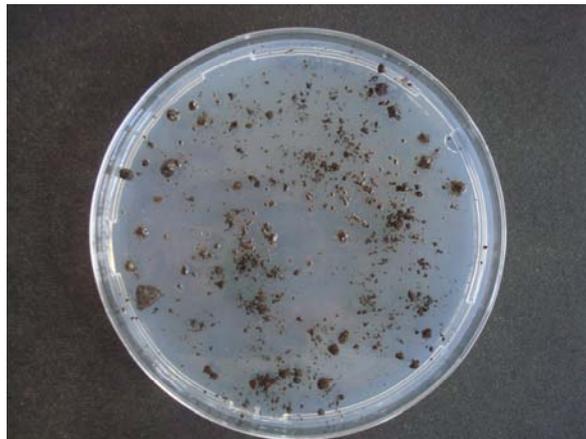


Figura 4. Espolvoreado de suelo en agar agua con nemátodos.

Para la dilución de suelos se preparó una solución madre, pesando 10 g de la muestra a procesar (suelo o heces) en una balanza y añadiéndole 90 ml de agua destilada. Esta solución se agitó durante 5 minutos. Una vez homogenizada se procedió a realizar las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 en tubos de ensayo de aproximadamente 15 ml de capacidad colocando 9 ml de agua destilada estéril y 1 ml de la solución madre para obtener la dilución 1:10; seguidamente se tomó 1 ml de ésta solución 1:10 y se transfirió a un tubo de ensayo de 15 ml, en donde previamente se habían colocado 9 ml de agua destilada y estéril, para así obtener la dilución 1:100. Por último se tomó 1 ml de la solución 1:100 y se colocó en otro tubo de ensayo de 15 ml en donde previamente se habían colocado 9 ml de agua destilada y estéril para obtener la dilución 1:1000.

Todas las diluciones se agitaron hasta homogenizarlas, luego con una pipeta se sembraron 0,5 ml de la solución de cada una de las diluciones realizadas sobre los medios selectivos colocados en placas de Petri con anterioridad: papa-dextrosa-agar (PDA Difco) con antibiótico (Oxoid Chloramphenicol selective supplement), PDA acidificado (1 ml de ácido

cítrico al 10% por cada 100 ml de medio de cultivo) y Rosa de Bengala (Oxoid Rose-Bengal Chloramphenicol Agar + Oxoid Chromamphenicol selective supplement).

Las placas se guardaron en una incubadora con temperatura promedio de 28°C, 80% de humedad y luz artificial. Los cultivos se revisaron a las 72 horas después de la siembra; las colonias que crecieron se revisaron al microscopio a 40X y las que presentaron conidios y micelio similar a los descritos para HND se purificaron.

Por otro lado, para las cámaras húmedas (Fig. 5) se siguió lo descrito por Delgado-Avila (2001) y Cabezas (2004). Se colocaron papeles filtro empapados con agua destilada en placas de Petri, dentro de los cuales se colocaron las muestras. Estos recipientes se mantuvieron durante 15 días en un cuarto entre 27-29°C, 75-80% de humedad y 12 horas de luz artificial. Las placas se revisaron diariamente en búsqueda de crecimiento micelial sobre las muestras. Los hongos que crecieron se revisaron al microscopio a 40X y los que presentaron conidios y micelio similar a los descritos para HND se intentaron purificar.



Figura 5. Cámara húmeda con suelo.

Para la purificación de los hongos aislados, se tomaron conidios con asa micológica y se pasaron a PDA con antibiotico (PDAatb) para eliminar bacterias. Luego, se tomaban conidios

y se pasaban a PDA acidificado (PDAac) para facilitar el crecimiento de hongos saprófitos contaminantes. Luego de lograr la limpieza del HND, éste se pasaba a PDA para su almacenamiento.

2.4. Identificación taxonómica

Para la identificación taxonómica se utilizó la técnica de cultivo en lámina (Orozco-Aceves, 2005).

Las láminas se observaron al microscopio para identificar, de acuerdo a la forma y disposición de las esporas, características de los conidios, las medidas de cada uno de éstos, llegando a la identificación del género y especie, utilizando claves taxonómicas (Delgado-Avila et al., 2001).

2.5. pH de muestras

En cada muestra de suelo se determinó el valor de pH con un pHmetro modelo UB-5, marca Denver Instruments.

2.6. Prueba de depredación

A todas las cepas aisladas se les realizó la prueba de porcentaje de captura. Se sembraron conidios tomados con asa micológica en platos de petri con AA a las cuales se les adicionó, 96 horas después de la siembra del hongo, una suspensión de aproximadamente 100 nemátodos (Park et al., 2002; Araújo et al., 2004; González-Garduño et al., 2005; Elósegui-Claro, 2006).

Luego de agregadas las larvas, se incubaron las placas a 28°C, 80% de humedad y luz artificial. Se revisaron las larvas de manera individual en todas las cajas a las 48 horas y por medio de un estereoscopio se contaron las larvas atrapadas (aquellas que fijas o en movimiento estaban en contacto con trampas), libres (aquellas que se desplacen por la caja comúnmente), enroscadas (las que se encontraron de esa forma e inmóviles) y muertas (aquellas que permanecían rígidas y en posición recta sin contacto con trampas). El porcentaje de larvas atrapadas con respecto al total de larvas contabilizadas se calculó mediante la siguiente fórmula (González-Garduño et al., 2005):

$$A = \left(\frac{x}{x + y + w + z} \right) * 100$$

A = porcentaje de captura

x = número de larvas atrapadas

y = número de larvas libres

w = número de larvas enroscadas

z = número de larvas muertas

2.7. Producción de clamidosporas

Con los hongos aislados se realizaron cultivos en cuatro medios: PDA, harina de maíz (HM), papa-zanahoria (PZ) y extracto de malta (EM). Estos cultivos se incubaron durante 7 días a 28°C, 50% de humedad y luz artificial. Luego se dejaron de 6 a 8 semanas a temperatura ambiente y oscuridad. De los positivos a la producción de clamidosporas se realizaron suspensiones siguiendo la técnica descrita por Ojeda-Robertos (2005).

Para la evaluación de la producción de clamidosporas de cada hongo aislado, se utilizó una metodología subjetiva en la cual se tomó del centro de los cultivos de 6 semanas una pequeña muestra con asa micológica para verla al microscopio y por medio de “+” se llenó una tabla utilizando los siguientes criterios:

- No se observaron clamidosporas.
- + Indicaba que había de 1 a 5 clamidosporas en la totalidad de la muestra tomada y costó encontrarlas.
- ++ Era fácil encontrar clamidosporas, sin embargo, éstas no eran muy abundantes.
- +++ Se observaban abundantes clamidosporas, algunas hasta formando cadenas.

2.8. Prueba de digestibilidad

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de bromatología del Centro de Investigación en Nutrición Animal (CINA) de la Universidad de Costa Rica (UCR), donde les realizó la prueba de digestibilidad *in vitro* con las debidas modificaciones en cuanto a la sustitución del forraje por clamidosporas (Anexo 1).

2.9. Prueba de viabilidad

Esta prueba se hizo para evaluar si las clamidosporas habían sobrevivido a la prueba de digestibilidad *in vitro*. Se realizó por medio de una prueba de germinación conidial, colocando la contramuestra de las clamidosporas sometidas al proceso digestivo artificial en placas de petri con AA a las cuales se les adicionó una suspensión cargada de nemátodos (Park et al., 2002; Araújo et al., 2004; González-Garduño et al., 2005; Elósegui-Claro, 2006).

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento

De las 51 fincas muestreadas se lograron aislar 24 HND ubicados en 2 géneros: *Arthrobotrys* y *Candelabrella*. Adicionalmente, se aislaron 1 cepa de *Beauveria* sp., 1 cepa de *Clonostachys* sp., 1 cepa de *Lecanicillium* sp. y 13 cepas de *Trichoderma* sp., géneros dentro de los cuales se han reportado algunas especies como controladoras de nemátodos, sin embargo, en el presente trabajo éstos hongos solo se pudieron determinar hasta el género (Anexo 2).

De los HND aislados, 20 fueron aislados mediante la técnica de espolvoreado, 2 mediante dilución de suelos (Fig. 6) y 2 por la técnica de cámara húmeda (Fig. 7, 8a y 8b).

Las cepas de *Beauveria* sp., *Clonostachys* sp., *Lecanicillium* sp., y *Trichoderma* sp., en su totalidad fueron aisladas mediante la técnica de dilución de suelos (Anexo 3).

El cuadro 2 relaciona los hongos encontrados en cada muestra y su técnica de aislamiento.



Figura 6. Crecimiento de dilución 1:10.



Figuras 7. Cámara húmeda con crecimiento de hongo en suelo.



8a



8b

Figuras 8a y 8b. Cámara húmeda con crecimiento de hongo en heces.

Cuadro 2. Hongos aislados y su técnica de aislamiento.

Muestra	Hongo	Técnica de aislamiento
ECe	Nematófago	Espolvoreado
SCaB	<i>Trichoderma</i> sp.	Dilución de suelos
SCh2	<i>Trichoderma</i> sp.	Dilución de suelos
VAZ	<i>Trichoderma</i> sp.	Dilución de suelos
VJ	<i>Trichoderma</i> sp.	Dilución de suelos
VLV	Nematófago	Espolvoreado
VPo2	<i>Trichoderma</i> sp.	Dilución de suelos
COr	Nematófago	Espolvoreado
PC	Nematófago	Cámara húmeda
SBI	Nematófago	Espolvoreado
	<i>Trichoderma</i> sp.	Dilución de suelos
SCT	Nematófago	Espolvoreado
TC	Nematófago	Cámara húmeda
VAI	Nematófago	Espolvoreado
	<i>Trichoderma</i> sp.	Dilución de suelos
VSR	Nematófago	Espolvoreado
VT1	<i>Trichoderma</i> sp.	Dilución de suelos
OCC	<i>Beauveria</i> sp.	Dilución de suelos
VOSL	Nematófago (1OSL)	Dilución de suelos
	Nematófago (2OSL)	Dilución de suelos
	Nematófago (3OSL)	Espolvoreado
	Nematófago (VSL)	Espolvoreado
	Nematófago (MSL)	Espolvoreado
ET	<i>Trichoderma</i> sp.	Dilución de suelos
	Nematófago	Espolvoreado

Cuadro 2. Continuación Hongos aislados y su técnica de aislamiento.

Muestra	Hongo	Técnica de aislamiento
SCL	Nematófago	Espolvoreado
SCS	Nematófago	Espolvoreado
SFL	Nematófago	Espolvoreado
SG	<i>Trichoderma sp.</i>	Dilución de suelos
SAPt	Nematófago	Espolvoreado
SM	Nematófago	Espolvoreado
	<i>Trichoderma sp.</i>	Dilución de suelos
CINA	Nematófago	Espolvoreado
SD	Nematófago (1SD)	Espolvoreado
	Nematófago (2SD)	Espolvoreado
	<i>Clonostachys sp.</i>	Dilución de suelos
	<i>Lecanicillium sp.</i>	Dilución de suelos
SZa	Nematófago	Espolvoreado
	<i>Trichoderma sp.</i>	Dilución de suelos
VCo	<i>Trichoderma sp.</i>	Dilución de suelos

3.2. Identificación taxonómica

De los HND aislados, 13 fueron identificados como *Arthrobotrys oligospora*, 1 como *A. conoides*, 1 como *A. dactyloides* y 9 como *Candelabrella musiformis*. En el cuadro 3 se detalla la especie de HND identificado en cada muestra.

Cuadro 3. Hongos nematófagos aislados según código de muestra.

Muestra	Hongo
ECe	<i>Candelabrella musiformis</i>
VLV	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
COr	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
PC	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
SBI	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
SCT	<i>Candelabrella musiformis</i>
TC	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
VAI	<i>Candelabrella musiformis</i>
VSR	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
1OSL	<i>Candelabrella musiformis</i>
2OSL	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
3OSL	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
VSL	<i>Arthrobotrys oligospora</i>

Cuadro 3. Continuación Hongos nematófagos aislados según código de muestra.

Muestra	Hongo
MSL	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
ET	<i>Candelabrella musiformis</i>
SCL	<i>Candelabrella musiformis</i>
SCS	<i>Candelabrella musiformis</i>
SFL	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
SAPt	<i>Candelabrella musiformis</i>
SM	<i>Candelabrella musiformis</i>
CINA	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
1SD	<i>Arthrobotrys oligospora</i>
2SD	<i>Arthrobotrys conoides</i>
SZa	<i>Arthrobotrys dactyloides</i>

En general, los cultivos en PDA resultaron en colonias blancas (Figs. 9-12), algunas cepas de *A. oligospora* y *C. musiformis* tiñeron de rosado pálido el medio de cultivo.

Los conidióforos de algunas cepas de *A. oligospora*, contrario a las demás especies aisladas, presentaban nódulos. Las conidias mostraron una forma obovoide (Fig. 13), con tamaños variables entre cada una de las cepas. Las conidias de *A. conoides* mostraron forma obovoide-elongada, uniseptadas y más estrechas en el centro (Fig. 14); mientras que, *A. dactyloides* y *C. musiformis*, presentaron conidias elipsoidales, un poco más estrechas y largas en la primera especie (Figs. 15 y 16).

Todas las cepas de *A. oligospora* y la única de *A. conoides* atrapaban nemátodos por medio de redes adhesivas tridimensionales (Fig. 17). Las cepas de *C. musiformis* presentaron algunas redes adhesivas bidimensionales únicamente (Fig. 18) y otras, éstas mismas trampas junto con anillos simples (Fig. 19), mientras que la cepa de *A. dactyloides* presentó anillos contráctiles como método para capturar larvas (Figs. 20 y 21).

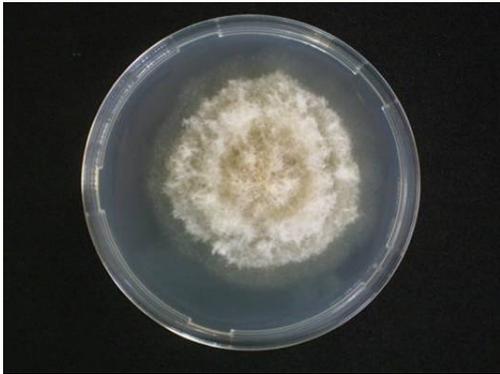


Figura 9. Morfología macroscópica *Arthrobotrys oligospora*.



Figura 10. Morfología macroscópica *Arthrobotrys conoides*.



Figura 11. Morfología macroscópica *Arthrobotrys dactyloides*.



Figura 12. Morfología macroscópica *Candelabrella musiformis*.

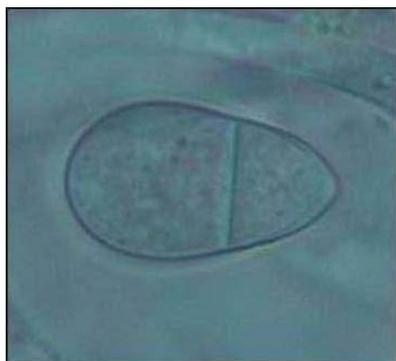


Figura 13. Conidia *Arthrobotrys oligospora*. 100x.



Figura 14. Conidia *Arthrobotrys conoides*. 100x.

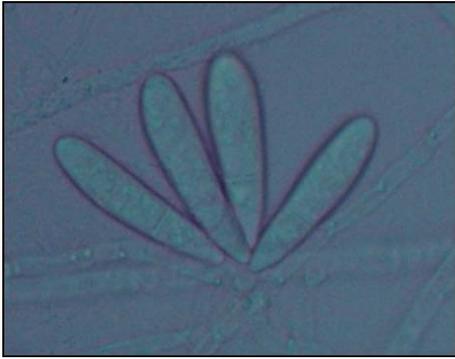


Figura 15. Conidias *Arthrobotrys dactyloides*. 40x



Figura 16. Conidias *Candelabrella musiformis*. 100x



Figura 17. Nemátodo atrapado por *Arthrobotrys oligospora*. Redes tridimensionales. 20x

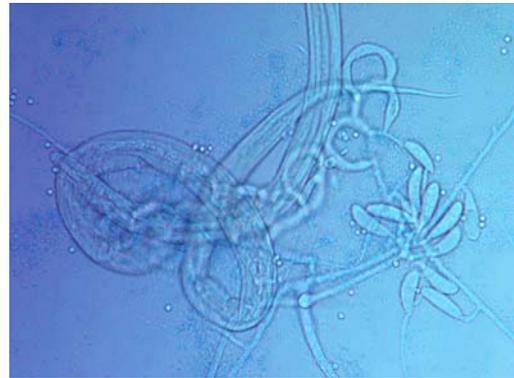


Figura 18. Nemátodo atrapado por *Candelabrella musiformis*. Redes bidimensionales. 20x

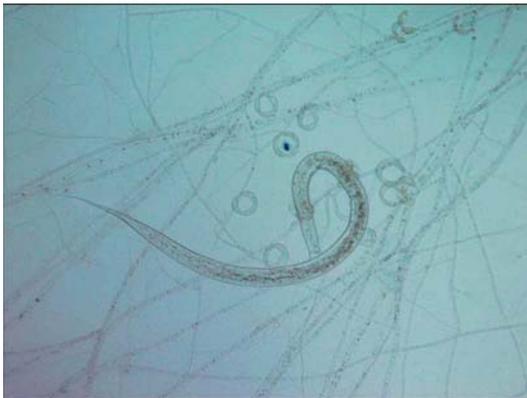


Figura 19. Nemátodo atrapado por *Candelabrella musiformis*. Anillos simples. 10x



Figura 20. Nemátodo atrapado por *Arthrobotrys dactyloides*. Anillo contráctil. 40x



Figura 21. Detalle de hifas de *Arthrobotrys dactyloides* dentro de nemátodo. 40x

De las 13 cepas de *A. oligospora* aisladas: 1 se aisló de la provincia de Alajuela, 5 de Cartago, 4 de Heredia, 1 de Limón y 2 de San José. En cuanto a la altitud: 1 se ubicó entre los 0 y 500 m.s.n.m., 1 entre 501 y 1000 m.s.n.m., 5 entre 1001 y 1500 m.s.n.m., 4 entre 1501 y 2000 m.s.n.m., 1 entre 2501 y 3000 m.s.n.m. y 1 de suelo arriba de los 3000 m.s.n.m. Con respecto a la zona de vida: 5 correspondían a bosque húmedo premontano, 2 a bosque húmedo montano bajo, 2 a bosque muy húmedo montano bajo, 1 a bosque muy húmedo montano, 1 a bosque muy húmedo premontano transición a basal, 1 a bosque pluvial montano y 1 a bosque pluvial montano bajo (Figs. 22-24).

La cepa de *A. conoides* fue obtenida de la provincia de San José, a una altitud específica de 1552 m.s.n.m. y dentro de una zona de vida de bosque muy húmedo montano bajo (Figs. 22-24).

A. dactyloides también fue aislado de la provincia de San José, a una altitud específica de 1196 m.s.n.m. y una zona de vida de bosque húmedo premontano (Figs. 22-24).

En cuanto a las 9 cepas de *C. musiformis* aisladas: 1 fue de la provincia de Alajuela, 2 de Cartago, 1 de Heredia, 3 de Limón y 2 de Puntarenas. En cuanto a la altitud: 5 se ubicaron entre los 0 y 500 m.s.n.m., 1 entre 501 y 1000 m.s.n.m., 1 entre 1001 y 1500 m.s.n.m., 1 entre 1501 y 2000 m.s.n.m. y 1 entre 2001 y 2500 m.s.n.m. Respecto a la zona de vida: 2 fueron obtenidas de bosque húmedo tropical, 1 de bosque húmedo premontano, 2 de bosque muy húmedo premontano transición a basal, 1 de bosque muy húmedo premontano transición a pluvial, 1 de bosque muy húmedo premontano, 1 de bosque muy húmedo montano bajo y 1 de bosque pluvial montano bajo (Figs. 22-24).

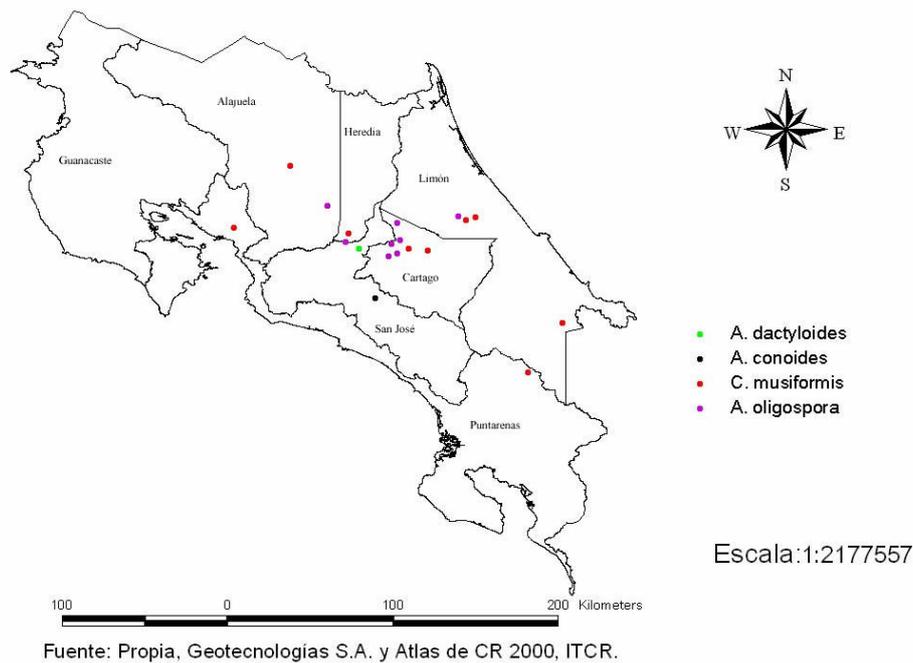


Figura 22. Hongos nematófagos aislados por provincia.

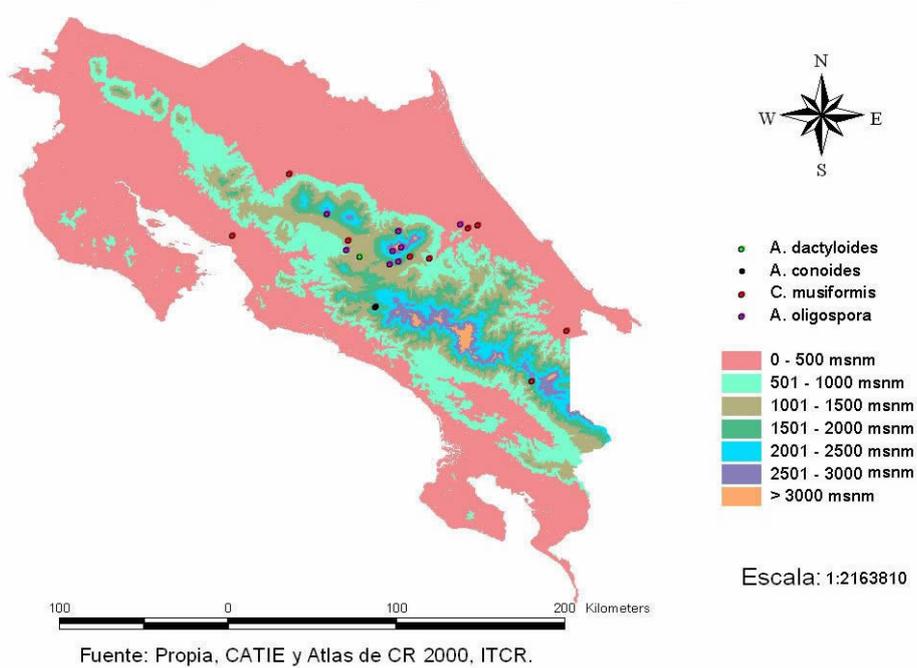
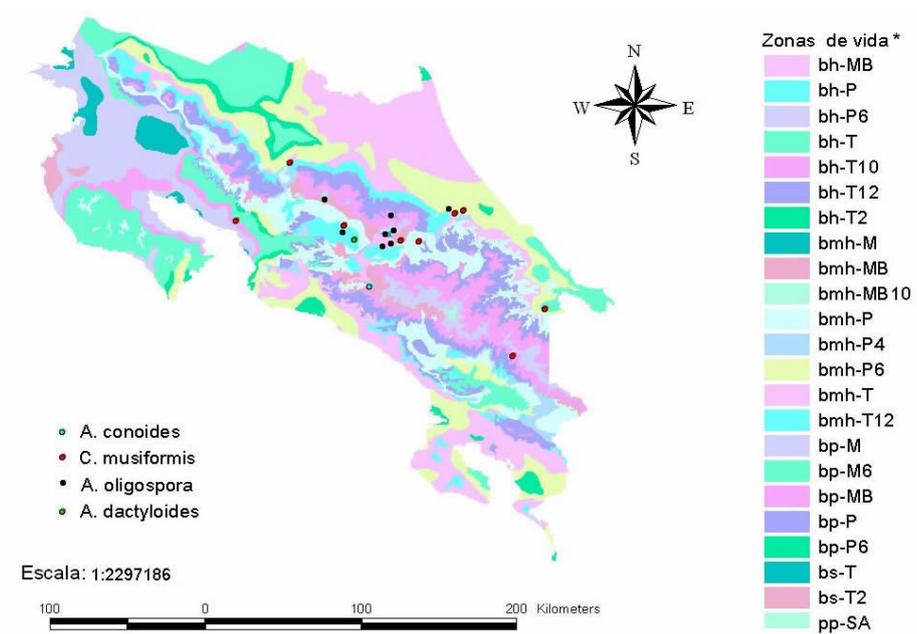


Figura 23. Hongos nematófagos aislados según altitud.



* bh-MB: bosque húmedo montano bajo, bh-P: bosque húmedo premontano, bh-P6: bosque húmedo premontano transición a basal, bh-T: bosque húmedo tropical, bh-T10: bosque húmedo tropical transición a seco, bh-T12: bosque húmedo tropical transición a premontano, bh-T2: bosque húmedo tropical transición a perhúmedo, bmh-M: bosque muy húmedo montano, bmh-MB: bosque muy húmedo montano bajo, bmh-MB10: bosque muy húmedo montano bajo transición a húmedo, bmh-P: bosque muy húmedo premontano, bmh-P4: bosque muy húmedo premontano transición a pluvial, bmh-P6: bosque muy húmedo premontano transición a basal, bmh-T: bosque muy húmedo tropical, bmh-T12: bosque muy húmedo tropical transición a premontano, bp-M: bosque pluvial montano, bp-M6: bosque pluvial montano transición a montano bajo, bp-MB: bosque pluvial montano bajo, bp-P: bosque pluvial premontano, bp-P6: bosque pluvial premontano transición a basal, bs-T: bosque seco tropical, bs-T2: bosque seco tropical transición a perhúmedo, pp-SA: páramo pluvial subalpino

Figura 24. Hongos nematófagos aislados según zona de vida.

3.3. pH de muestras

El rango de pH del total de las muestras fue muy amplio, la más ácida fue de 5.2 (SCh1), mientras que la más alcalina fue de 9.9 (VELG) con un promedio de 7.8 (Cuadro 4). De los suelos de donde se aislaron HND el menor fue 5.6 (SD) y el mayor 7.5 (SFL) (Fig. 25).

Con respecto a los suelos de donde se aisló *A. oligospora*, el rango fue de 5.6 (SD) hasta 7.5 (SFL), con promedio de un 6.6. A las muestras TC y PC no se les midió el pH por ser plantas.

En el caso de los suelos de donde se obtuvieron *C. musiformis*, el pH estuvo entre 5.9 (SCT) hasta 7.6 (SM), con un promedio de 6.7.

De *A. conoides* y *A. dactyloides* no se pudo sacar un promedio, ya que solo se obtuvo una cepa de cada uno, presentando un pH de 5.6 y 7.1, respectivamente.

Las cepas: SZa (*A. dactyloides*; pH 7.1), SM (*C. musiformis*; pH 7.6), SFL (*A. oligospora*; pH 7.5) y VLV (*A. oligospora*; pH 6.7) presentaron un crecimiento sumamente lento en PDAac.

Cuadro 4. pH de las muestras

Muestra	pH
ECe	7.4
SCaB	6.7
SCh1	5.2
SCh2	6.6
VAZ	6.0
VF	7.2
VJ	7.0
VLV	6.7
VM	6.2
VN	6.6
VPo1	8.8
VPo2	5.6

Cuadro 4. Continuación pH de las muestras

Muestra	pH
CF	6.0
CJV	5.3
COr	7.1
PC	-
SBI	6.6
SCT	6.0
SOC	6.2
SVI	6.6
TC	-
VAI	6.0
VCV	6.2
VELG	9.9
VO	8.0
VPa	8.8
VSR	6.5
VT1	6.0
VT2	7.8
OCC	6.8
VCa	7.5
ECMV	7.9
VOSL	6.3
ET	7.4
SBL1	7.8
SBL2	7.4
SCiL	6.6
SCS	6.1
SFL	7.5
SG	5.8
SAPt	6.8
SM	7.6
SZS	6.9
CINA	7.1
SPQ	5.6
SD	5.6
STa	6.5
SUCRD	7.9
SZa	7.1
VCo	6.0
VSo	6.2

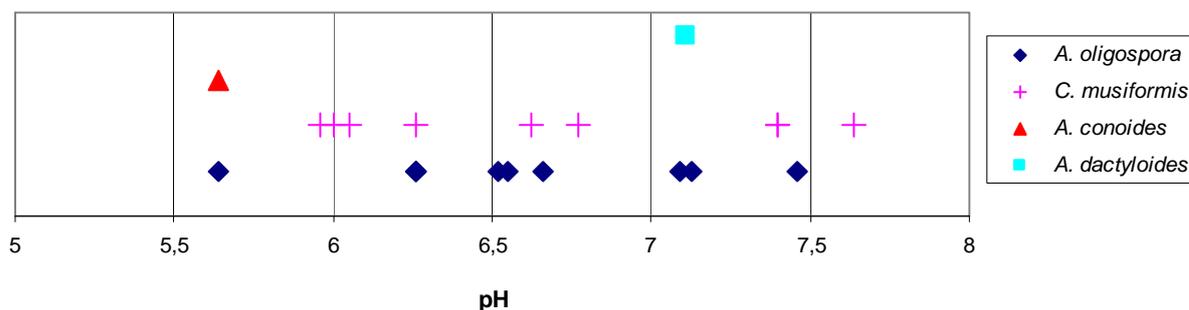


Figura 25. pH del suelo de los hongos nematófagos aislados.

3.4. Prueba de depredación

La cepa que presentó la mayor capacidad depredadora fue la SAPt (*C. musiformis*) con un 96.6% y la que presentó el menor porcentaje de captura fue la TC (*A. oligospora*) con un 9.1% (Fig. 26).

En general, el porcentaje de captura de las cepas de *A. oligospora* fue bastante heterogénea, presentando un rango muy amplio entre 9.1% de depredación por parte de la cepa TC y un 93.4% por parte de la cepa VSL, con un promedio de 68.7% de captura.

Por otra parte, la capacidad depredadora de las cepas de *C. musiformis* fue más homogénea, con un rango más estrecho que iba de un 70.8% de la cepa SCT a un 96.6% de la cepa SAPt, con un promedio de captura de 86.1%.

Como sólo se aisló una cepa de *A. conoides* y una de *A. dactyloides*, no fue posible realizar comparaciones, ni calcular un promedio de captura.

Los testigos conteniendo únicamente larvas, tuvieron un promedio de mortalidad del 1.6% y 4% de larvas enroscadas.

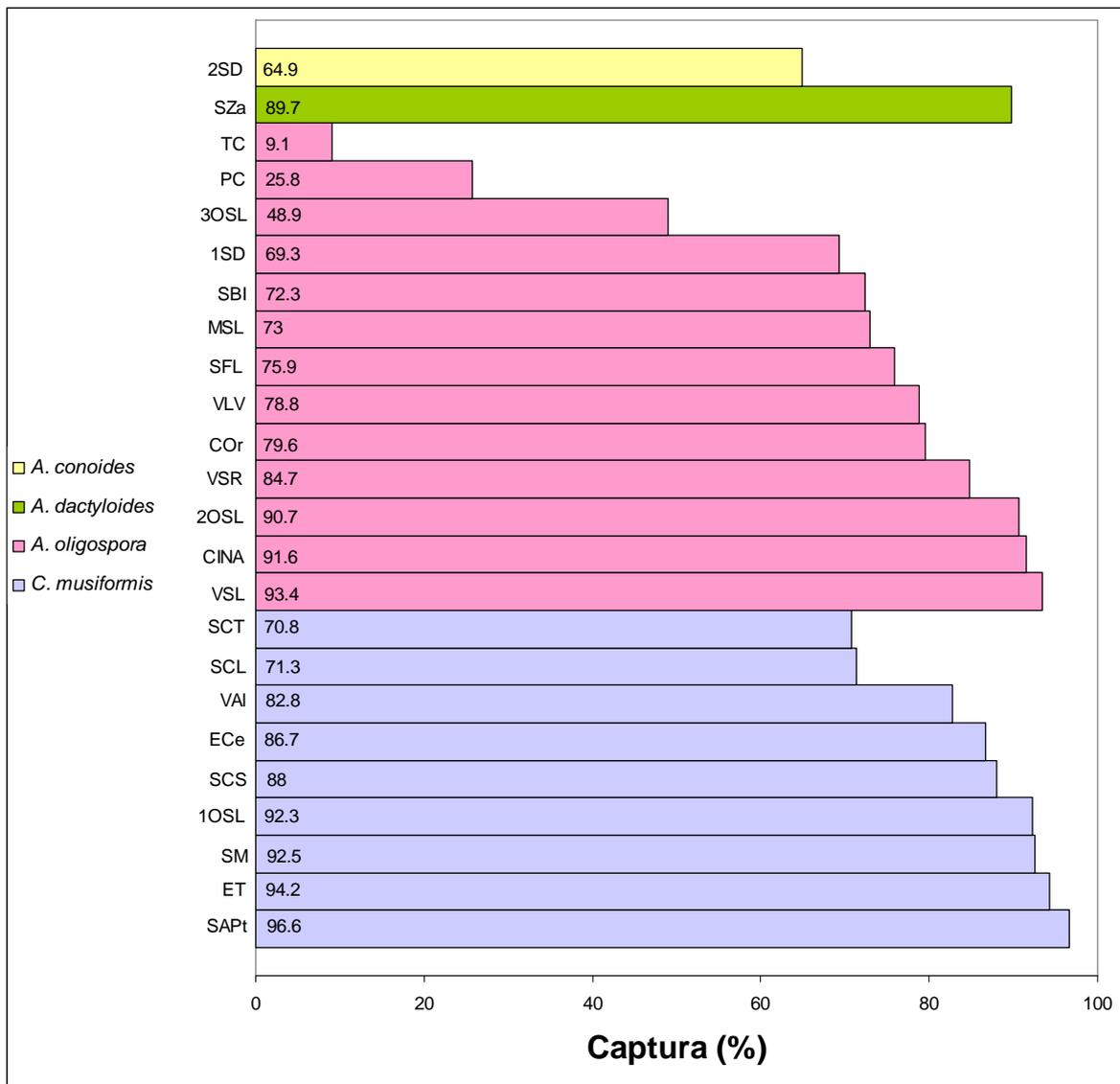


Figura 26. Porcentaje de depredación hacia larvas de NGI de ovinos.

3.5. Producción de clamidosporas

De los 24 HND aislados, 23 de resultaron positivos a la formación de estructuras de resistencia. Únicamente la cepa TC (*A. oligospora*) no formó clamidosporas.

En términos generales, las cepas de *C. musiformis* mostraron una mayor producción de clamidosporas que las cepas del género *Arthrobotrys* (Figs. 27 y 28).

En cuanto al medio de cultivo, PZ fue el más efectivo, seguido por PDA, HM (más efectivo para la formación de conidias) y por último EM. En este último los hongos presentaron un crecimiento micelial sumamente disperso y presentaron muy escasa formación tanto de clamidosporas como de conidias (Cuadro 5).

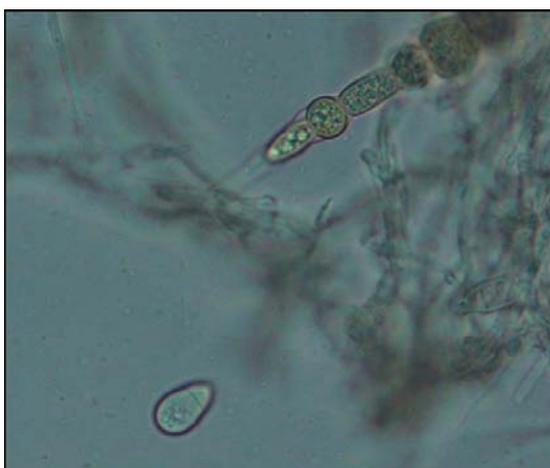


Figura 27. Cadena de clamidosporas de *Arthrobotrys oligospora*. 20x.



Figura 28. Clamidospora de *Candelabrella musiformis*. 40x.

Cuadro 5. Producción de clamidosporas de los hongos nematófagos aislados*.

Código	Hongo	HM	PDA	PZ	EM
ECe	<i>C. musiformis</i>	-	-	++	-
VLV	<i>A. oligospora</i>	++	++	+	++
COr	<i>A. oligospora</i>	+	++	+	++
PC	<i>A. oligospora</i>	++	++	++	+
SBI	<i>A. oligospora</i>	++	+++	+++	+
SCT	<i>C. musiformis</i>	-	++	-	-
TC	<i>A. oligospora</i>	-	-	-	-
VAI	<i>C. musiformis</i>	+++	+++	+++	-
VSR	<i>A. oligospora</i>	-	++	+++	++
1OSL	<i>C. musiformis</i>	+	++	+++	+
2OSL	<i>A. oligospora</i>	-	-	+	-
3OSL	<i>A. oligospora</i>	-	-	++	-
VSL	<i>A. oligospora</i>	+	+	+	-
MSL	<i>A. oligospora</i>	++	+	-	-
ET	<i>C. musiformis</i>	+	+++	+++	-
SCL	<i>C. musiformis</i>	+++	+++	+++	+

Cuadro 5. Continuación Producción de clamidosporas de los hongos nematófagos aislados.

Código	Hongo	HM	PDA	PZ	EM
SCS	<i>C. musiformis</i>	+++	+	++	+
SFL	<i>A. oligospora</i>	-	++	++	-
SAPt	<i>C. musiformis</i>	++	+	-	-
SM	<i>C. musiformis</i>	+++	+++	+++	+
CINA	<i>A. oligospora</i>	+	+	++	+
1SD	<i>A. oligospora</i>	-	-	+++	-
2SD	<i>A. conoides</i>	+	-	-	+
SZa	<i>A. dactyloides</i>	+	++	+++	+

* - : no se observaron clamidosporas, + : había de 1 a 5 clamidosporas en la totalidad de la muestra tomada y costó encontrarlas, ++ : era fácil encontrar clamidosporas, +++ : se observaban abundantes clamidosporas, algunas hasta formando cadenas.

3.6. Prueba de digestibilidad

Esta prueba se le realizó a las cepas de hongos que se consideraron como las que formaban mayor cantidad de clamidosporas según el cuadro anterior; adicionalmente se le realizó la prueba a la cepa de *A. conoides* ya que éste se ha reportado como un buen candidato de CB (Cuadro 6).

Cuadro 6. Hongos nematófagos, con su respectivo código, a los que se les realizó la prueba de digestibilidad.

Código	Hongo
VLV	<i>A. oligospora</i>
COr	<i>A. oligospora</i>
PC	<i>A. oligospora</i>
SBI	<i>A. oligospora</i>
VAI	<i>C. musiformis</i>
VSR	<i>A. oligospora</i>
1OSL	<i>C. musiformis</i>
ET	<i>C. musiformis</i>
SCL	<i>C. musiformis</i>
SCS	<i>C. musiformis</i>
SM	<i>C. musiformis</i>
CINA	<i>A. oligospora</i>
2SD	<i>A. conoides</i>
SZa	<i>A. dactyloides</i>

3.7. Prueba de viabilidad

De los 13 hongos sometidos a la prueba de digestibilidad *in vitro*, 6 resultaron positivos al crecimiento en placas de AA adicionadas con larvas. De estos hongos, 3 correspondían a la especie de *C. musiformis* (ET, SCS, SM) y 3 a *A. oligospora* (VLV, COr, SBI).

En el cuadro 7 se detallan los datos de donde fueron aisladas las cepas que resultaron viables, así como el pH y el porcentaje de captura de cada una.

Cuadro 7. Resumen de datos de los hongos nematófagos que resultaron positivos a la prueba de viabilidad.

Código	Hongo	Lugar de aislamiento	Altura (m.s.n.m.)	Zona de vida*	pH	Captura (%)
VLV	<i>A. oligospora</i>	Poás, Alajuela	2500	bmh-MB	6.7	78.8
COr	<i>A. oligospora</i>	Oreamuno, Cartago	1700	bh-MB	7.1	79.5
SBI	<i>A. oligospora</i>	La Chinchilla, Cartago	1453	bh-MB	6.6	72.3
ET	<i>C. musiformis</i>	Talamanca, Limón	90	bh-T	7.4	94.2
SCS	<i>C. musiformis</i>	Siquirres, Limón	358	bmh-P6	6.1	88
SM	<i>C. musiformis</i>	Miramar, Puntarenas	340	bh-T	7.6	92.5

*bh-T: bosque húmedo tropical, bh-MB: bosque húmedo montano bajo, bmh-MB: bosque muy húmedo montano bajo, bmh-P6: bosque muy húmedo premontano transición a basal.

4. DISCUSIÓN

4.1. Aislamientos e identificación taxonómica

Durante todas las pruebas se utilizaron animales naturalmente infectados para la extracción de larvas, debido a que las infecciones mixtas permiten conocer el comportamiento depredador de los hongos en infecciones de campo (González-Garduño et al., 2005).

Era de esperar que la mayoría de los HND fueran aislados mediante la técnica de espolvoreado en placa descrita por Barron (1977), ya que con las otras técnicas crecen hongos saprófitos como *Rhizopus*, *Fusarium*, *Phoma*, *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales son de crecimiento más acelerado por ser microorganismos saprófitos facultativos, además de que por espacio, impiden el crecimiento de los HND que son más lentos.

Mota et al. (2003) aseguran que algunas especies de HND desarrollan las trampas como resultado de estímulos externos (estrés fisiológico, presencia de nemátodos o excretas de éstos), mientras que otras las desarrollan espontáneamente, siendo éstas las más dependientes de nemátodos como fuente de nutrientes. De ahí se puede explicar por qué con la técnica de dilución de suelos se obtuvieron tan pocas cepas de HND, ya que con esa técnica en ningún momento se estresa a los hongos en cuanto al cultivo (nutrientes, humedad, tiempo, etc.), ni se les estimula con nemátodos.

En cuanto a los HN endoparásitos, estos son de crecimiento aún más lento que los depredadores y cuesta mucho aislarlos por medio de espolvoreado; ya que los HND son más agresivos y rápidos y acaban con la fuente de nutrientes (nemátodos), dejándolos sin medio para crecer y esporular (Larsen, 2000). De ahí se puede explicar el porqué no se aisló ninguno. Barron (1977) describe una técnica de embudo de Baermann para el aislamiento de éstos hongos, pero como el fin del estudio era trabajar con HND, no se utilizó en la metodología.

Por otro lado, con la técnica de cámara húmeda, únicamente se pudieron aislar HND de las plantas que tenían signos de enfermedad causada por nemátodos. Según Delgado-Ávila (2001) y Cabezas (2004), la cámara húmeda tiene el propósito de crear condiciones favorables de humedad para reactivar y acelerar el crecimiento de los hongos que se encuentren en la muestra; con eso se explica el porqué se pudo aislar HND únicamente de las plantas.

Con muestras de suelo y heces, hubo ciertos crecimientos, que al verlos al microscopio presentaban conidios semejantes a los de *A. oligospora*, pero a la hora de intentar su aislamiento crecían hongos saprófitos de más rápido crecimiento (*Fusarium* y *Aspergillus*, principalmente). Lo anterior ocurrió probablemente porque estaban presentes en mayor cantidad que los HND, contrario al caso de las plantas donde al haber una población de nemátodos ya establecida, los HND tienen una fuente extra de nutrimentos y colonizan más y con mayor rapidez que otros saprófitos.

La identificación taxonómica de los HN se realizó basándose en la observación de las características morfológicas presentadas por los hongos cuando atrapaban nemátodos y no en cultivo puro, ya que en cultivos puros las trampas se encuentran usualmente ausentes. Además, las dimensiones de los conidios y la morfología del conidióforo pueden alterarse considerablemente (Cooke y Godfrey, 1964; Haard, 1968; Van Oorschot, 1985). Ellos son clasificados en base a las dimensiones y forma de las conidias y los conidióforos, las ramificaciones y/o la proliferación de los conidióforos y los tipos de órganos de captura (trampas). La clasificación de HND, con base en características morfológicas, a veces, exige una decisión subjetiva del identificador. La forma y el color del micelio, entre otras, que no tienen límites bien definidos, requieren de amplia experiencia y mucha capacidad de discernimiento, principalmente cuando se tiene en las manos una cepa de hongo que no se

amolda al patrón típico de la especie. Además, las dimensiones de las conidias y la ramificación de los conidióforos, entre otros, pueden sufrir variaciones de acuerdo con las condiciones de cultivo, volviéndose, muchas veces, características insuficientes para una identificación precisa de especies taxonómicamente próximas (Cooke & Godfrey, 1964; Van Oorschot, 1985).

El hongo con mayor número de aislamientos fue *A. oligospora*, seguido por *C. musiformis*, lo cual era de esperar. Barron (1977) indica que los hongos formadores de redes adhesivas son ubicuos y muy agresivos, por lo que son predominantes en las muestras de suelo. Menciona también que *A. oligospora* es el HND más comúnmente aislado, lo que concuerda también con Orozco-Aceves (2005) quien en su estudio con HND costarricenses tuvo un resultado similar en los aislamientos de estas dos especies. En dicho estudio, fueron aislados *A. oligospora*, *C. musiformis* y *Dactyllela* sp. A diferencia de los resultados de Orozco-Aceves (2005), en el presente estudio *Dactyllela* sp. no fue aislado y únicamente una cepa de *A. conoides* y *A. dactyloides* fueron aisladas. Lo anterior puede deberse a dos situaciones: error humano, ya que los conidióforos de estos hongos son similares a los de otros hongos que crecen en los platos petri, por lo que pudieron pasar desapercibidos; y a que estas especies de *Arthrobotrys* así como *Dactyllela* sp., no sean tan abundantes en nuestro país, de ahí que sea difícil su aislamiento (Orozco-Aceves, 2005). Rubner (1996) establece que las especies formadoras de redes crecen mejor a 30°C; sin embargo, se aislaron únicamente 3 especies (*A. conoides*, *A. oligospora* y *C. musiformis*), por lo que se podría inferir que los climas tropicales no favorecen el crecimiento de estos hongos, contrario de lo esperado.

En cuanto a la altura y la zona de vida, no hay información similar en la literatura consultada para hacer comparaciones. Orozco-Aceves (2005) en su estudio, menciona la altura

y la zona de vida de las muestras tomadas, pero no detalla cada una de las muestras por lo que no es posible saber la información específica de cada uno de los HND aislados. Sin embargo, se puede concluir que hay presencia de HND en diversas alturas y zonas de vida, lo que revela la versatilidad de estos hongos.

En el presente trabajo solo se determinó el género de los hongos *Beauveria*, *Clonostachys*, *Lecanicillium* y *Trichoderma*. En estos géneros hay varias especies reportadas, tales como: *B. bassiana*, *C. rosea*, *L. lecanii*, *L. psalliotae*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. harzianum* y *T. pseudokoningii* (Li et al., 2006; Spiegel et al., 2007; Hajieghrari et al., 2008; Liu et al., 2008; Oyekanmi et al., 2008; Shinya et al., 2008). Estos hongos producen metabolitos tóxicos efectivos para el control de nemátodos parásitos de plantas, por lo que se recomienda realizar la identificación de las especies aisladas y estudios *in vitro* de éstas cepas con NGI de animales, para evaluar su posible utilización como controladores biológicos.

Durante más de una década ha venido aumentando la preocupación por desarrollar alternativas en el control de parásitos. La idea de la posible utilización de HND para el control de NGI surgió a finales de los años 30, pero por casi 50 años se hicieron únicamente estudios esporádicos. No fue hasta mediados de los años 80 que se retomaron de una forma más seria las investigaciones con hongos del género *Arthrobotrys*. Después de muchos años, en 1991, se enfocaron más las pesquisas en un HND llamado *Duddingtonia flagrans*, el cual, hasta el día de hoy es considerado el mejor candidato para CB, ya que sobrevive al paso por el tracto digestivo de bovinos, equinos, ovinos y cerdos (Larsen, 2000). Este hongo ha sido aislado en muchas partes de mundo; sin embargo, en Costa Rica y en el resto de Centroamérica no se ha podido encontrar. Se menciona de que las condiciones climáticas de nuestro país no le

favorecen, ya que se ha aislado principalmente de zonas con clima templado (Orozco-Aceves, 2005).

4.2. pH de suelos

pH y temperatura son dos parámetros claves para manipular el crecimiento, esporulación y habilidad saprofítica de los hongos (Hajieghrari, 2008). Madigan (2000) afirma que los hongos, como grupo, tienden a ser más tolerantes al ácido que las bacterias y que la mayoría de ellos crecen óptimamente a un pH de 5 o más bajo. Contrario a esto, los HND del presente estudio fueron aislados principalmente de suelos con pH entre 6 y 7.5. Cepas como SZa (*A. dactyloides*; pH 7.1), SM (*C. musiformis*; pH 7.6), SFL (*A. oligospora*; pH 7.5) y VLV (*A. oligospora*; pH 6.6) presentaron un crecimiento sumamente lento en PDAac. No obstante, HND como *A. oligospora*, *C. musiformis*, *A. oviformis*, *Monacrosporium megalosporum* y *Dactylaria parvispora* presentan una serin proteasa extracelular, similar a la subtilisina, encargada de inmovilizar a los nemátodos atrapados y degradar la cutícula de los mismos para introducir las hifas (Tunlid & Jansson, 1991; Minglian et al., 2004; Kanda et al., 2008; Nagee et al., 2008). El pH ácido afecta la transcripción de genes que codifican dicha enzima, ya que esta actividad ocurre a pH mayores a 5, siendo su actividad óptima a pH entre 6 y 8 (Tunlid & Jansson, 1991; Kanda et al., 2008). La expresión de esta serin proteasa está relacionada con la fisiología y la patogenicidad de los HND. Mientras esta enzima no sea producida, los hongos no pueden pasar de su fase saprófita a la depredadora y hasta pueden resultar no viables, ya que por la acción de la serin proteasa se libera un péptido de la cutícula de los nemátodos que estimula la formación de trampas (Åhman et al., 2002; Kanda et al., 2008).

4.3. Prueba de depredación

El cambio del estado saprófito al de depredadores de los HND está determinado por la presencia y la cantidad de nemátodos, además de las condiciones nutricionales del medio, afectándose negativamente la capacidad depredadora a medida que aumenta la cantidad de nutrientes. Debido a esto se decidió realizar la prueba en AA y, aunque la cantidad de nemátodos también afecta de una manera directamente proporcional, se consideró que 100 era un número relativamente bueno y facilitaba el conteo al final de la prueba. Esto explica el alto porcentaje de depredación en la mayoría de las cepas, ya que en un medio limitado de nutrientes, los nemátodos son una fuente importante de nitrógeno para el crecimiento; además de proveer sustancias esenciales como aminoácidos y vitaminas (González-Garduño et al., 2005; Migunova y Byzov, 2005).

Por otro lado, se notó que algunas cepas (TC, PC, 3OSL, 1SD, COr y VAl) presentaron un crecimiento lento, antes de agregar las larvas. Park (2002) da un lapso de 4 días de incubación para hongos de rápido crecimiento, mientras que espera 7 días para los de lento crecimiento. No obstante, no se tomó en cuenta esta metodología, lo cual puede haber influenciado en los bajos porcentajes de captura de esas cepas. En este caso, las larvas adicionales fueron extraídas de una muestra de ovino debido a la disponibilidad en el momento de un animal naturalmente infectado. Orozco-Aceves (2005) reportó que ciertas cepas costarricenses tanto de *A. oligospora* así como de *C. musiformis* presentaban diferencias en el porcentaje de captura de larvas dependiendo del origen de las mismas. Así, de acuerdo a Orozco-Aceves (2005), las cepas de *A. oligospora* presentaron una mayor tendencia a capturar larvas de nemátodos de ovinos y presentaban una capacidad depredadora homogénea, mientras que las cepas de *C. musiformis* preferían larvas de nemátodos de caprinos y su capacidad

depredadora fue muy heterogénea. Los resultados del presente estudio, difieren de los de Orozco-Aceves (2005), ya que los porcentajes de captura de larvas de nemátodos de ovinos por parte de las cepas de *C. musiformis* fueron superiores a los de las cepas de *A. oligospora*, siendo éstas últimas las que mostraron un porcentaje de captura más heterogéneo, lo que se asemeja a lo descrito por Park (2002).

Las diferencias reportadas por diversos investigadores, indican que las habilidades depredatorias de las especies de HND pueden variar de acuerdo a las regiones y los factores ambientales de donde son aisladas las cepas (Graminha et al., 2005a). Según González-Garduño (2005), la temperatura puede afectar el desarrollo de las trampas en *A. conoides* y *A. oligospora*, y por ende, el porcentaje de captura de los hongos. En el caso de las cepas de *A. oligospora*, se observó que tanto cepas provenientes de zonas frías, así como cepas de zonas calientes, presentaron porcentajes de captura muy diversos, por lo que no se podría decir que en esta especie el cambio de temperatura influyera en la prueba. Por otro lado, solo se contó con una cepa de *A. conoides* y por ende no se pudieron hacer comparaciones. Sí resulta de extrañar que esta especie sea reportada por muchos como una excelente depredadora, por lo que el cambio de temperatura entre su entorno natural y el del laboratorio podría haber afectado el desarrollo de sus trampas y evitó que se obtuvieran tan buenos resultados como los reportados por Graminha (2005a), de un 99.3% de captura de nemátodos.

En el caso de *A. dactyloides*, hay poca información acerca de la capacidad depredadora con respecto a nemátodos de animales, ya que este hongo según Núñez-Sánchez (2002), está estrechamente relacionado con raíces de plantas y, por lo tanto, se encuentran en una posición favorable para atrapar los nemátodos fitoparásitos. En estudios realizados con *Meloidogyne incognita* (nemátodo parásito de las raíces de varias especies vegetales), se reporta una captura

de hasta un 81.8% de juveniles (Kumar & Singh, 2006), lo cual no se aleja mucho del 89.7% obtenido en la prueba realizada con larvas de ovejas del presente estudio. Se observó que las 2 cepas con menor porcentaje de captura (TC y PC) fueron aisladas de plantas enfermas por nemátodos. Gomes (2000) afirma que las larvas de vida libre son preferidas por los HND ante los NGI de rumiantes.

El único hongo aislado de heces de ovinos (*C. musiformis* 1OSL) tuvo un buen porcentaje de captura; sin embargo, no fue el mejor, como se hubiera esperado. Las tres mejores cepas se aislaron de lugares donde no había presencia de ovinos: parque nacional, potrero de equinos y potrero de vacas lecheras. Por lo anterior, no se puede correlacionar el porcentaje de captura de un HND ante una determinada especie de nemátodos con el lugar de aislamiento del hongo y su previo estímulo con esa misma especie de larva. Araújo (2006) indica que los HND no son selectivos a un determinado género de nemátodos de una misma especie animal.

En el presente estudio, se lograron aislar varias cepas de una misma muestra de suelo: un *A. oligospora* (69.3%) y un *A. conoides* (64.9%) de la muestra SD y dos *A. oligospora* (90.7%; 48.9%) y una *C. musiformis* (92.3%) de la muestra OSL. Se podría pensar que por lo menos la muestra OSL tiene un control muy efectivo de nemátodos; sin embargo, Araújo (2004) menciona que en estudios realizados con asociaciones de HND, éstos bajan la eficiencia a medida que aumenta el número de cepas, probablemente por competencia entre ellos. Es importante recalcar que los resultados obtenidos con esta prueba pueden variar significativamente en un futuro, ya que Gomes (2000) y Graminha (2005a) indican que el permanecer mucho tiempo en condiciones de laboratorio, sin estímulo de larvas y el pasaje por el tracto gastrointestinal, hacen que algunas cepas disminuyan significativamente su capacidad

depredadora. Además, se debe tener en cuenta que muchas veces se sobrestima la acción de un microorganismo en pruebas *in vitro*, en este caso, porque no se reproducen las interferencias comunes en el ambiente y los nemátodos no pueden escapar (Gomes et al., 2000).

4.4. Producción de clamidosporas, prueba de digestibilidad y prueba de viabilidad

Para imitar las condiciones del sistema digestivo de un rumiante existen diferentes métodos, como lo son: digestibilidad *in vitro* o método de Tilley y Terry, método *in sacco*, sistema ANKOM[®] y método de producción de gas *in vitro* (Mabjeesh et al., 2000; Arce et al., 2003; Colombatto, 2003). En este experimento, se siguió la metodología de digestibilidad *in vitro*, debido a que éste es el más práctico y utiliza erlenmeyers y no bolsas de nylon, con las cuales se hubiera perdido la suspensión de clamidosporas que sustituyeron al forraje (Mabjeesh et al., 2000; Arce et al., 2003; Colombatto, 2003; Orozco-Aceves, 2005).

Un buen candidato para CB debe sobrevivir el pasaje por el tracto gastro-intestinal (TGI) debido a que la ingesta de biopreparados que contengan dichos hongos es la forma más fácil para lograr un mejor contacto entre los HND y los NGI de vida libre en las heces. Una vez que el hongo haya pasado exitosamente por el TGI del rumiante, el hongo germina, crece y coloniza la materia fecal produciendo trampas para capturar y destruir huevos de nemátodos recién eclosionados (Larsen, 2000; Flores-Crespo, 2003; Sanyal et al., 2008). Las clamidosporas, esporas de resistencia que permiten la sobrevivencia bajo condiciones ambientales adversas, se encuentran en muchos de los HND. La producción de las mismas se da por diferentes factores en el cultivo: tiempo de incubación, temperatura y medio utilizado (Park et al., 2002).

De los medios de cultivo utilizados en el presente estudio, el de PZ contenía la menor cantidad de carbohidratos digeribles (Carris, 2009). Esto explicaría el porqué se formó la mayor cantidad de clamidosporas en él. Por otro lado, según Carris (2009) la mayoría de los hongos crecen bastante bien en PDA, pero este medio puede resultar muy rico por lo que el crecimiento micelial excesivo puede afectar la esporulación. En este caso, el factor de estrés presente puede ser el espacio en el plato o la cantidad de nutrientes, ya que, aunque el medio es bastante rico, el crecimiento del hongo es sumamente acelerado. En el caso de HM y EM, éstos medios de cultivo se reportan como medios débiles (en comparación con el PDA) que se pueden utilizar para el cultivo de hongos del suelo y que presentan un balance entre el crecimiento micelial y la esporulación (Carris, 2009).

Durante esta investigación, la incubadora para el cultivo de hongos sufrió un daño con la pieza que introduce humedad a la cámara. Para no atrasar el proyecto se decidió introducir recipientes con agua destilada dentro de la misma para proporcionar humedad y así continuar con los cultivos. Con ayuda de un higrómetro se determinó que la humedad estaba a un 50%; sin embargo, no había más espacio en la incubadora para recipientes, por lo que se decidió trabajar con ese porcentaje de humedad. Esta variación en la humedad provocó que todos los hongos que se tenían en incubación en ese momento formaran clamidosporas, por lo que se aprovechó para realizar esta prueba en ese momento.

En el presente estudio, 95.8% de las cepas aisladas formaron clamidosporas (23 de 24), lo cual no se esperaba ya que, en la trabajo realizado por Orozco-Aceves (2005) con cepas costarricenses, únicamente las cepas de especie *C. musiformis* produjeron gran cantidad de clamidosporas, mientras que las cepas de la especie *A. oligospora* no. Park (2002) reporta esta última especie como formadora de estructuras de resistencia y menciona que hongos que

crecen bajo condiciones secas son más propensos a sobrevivir por la formación de clamidosporas. Al principio del estudio se tenía pensado realizarle la prueba de digestibilidad a todas aquellas cepas que fueran capaces de formar clamidosporas, pero no se tenía en cuenta que el daño en la incubadora fuera a dar tan buenos resultados en la formación de esporas de resistencia. Debido a esto, se estableció el conteo por medio de cruces (+) para así determinar las mejores cepas en cuanto a producción de clamidosporas se refiere.

De las 23 cepas formadoras de clamidosporas, 14 fueron sometidas a la prueba de digestibilidad. De estas 14 cepas, 13 fueron escogidas por su buen desempeño en cuanto a producción de esporas de resistencia se refiere y la cepa restante fue escogida por ser la única de *A. conoides*. A pesar de que Haard (1968) describe que en esta especie abundan las clamidosporas en cultivos viejos, esta cepa no resultó muy buena formadora de esporas de resistencia. Sin embargo, se escogió para la prueba de digestibilidad para ver los resultados en ella.

Las 6 cepas positivas en la prueba de viabilidad se repartieron entre las especies de *A. oligospora* y *C. musiformis*. Tres de ellas (VLV, ET y COr) fueron aisladas de potreros donde las heces son depositadas frecuentemente y los animales ingieren las esporas junto con el pasto, por lo que estas cepas podrían estar adaptadas a las condiciones adversas de TGI de animales, lo que se traduce en el resultado positivo de la prueba (Orozco-Aceves, 2005). *A. conoides* no sobrevivió a la prueba de digestibilidad, lo cual concuerda con Graminha (2005b) quien obtuvo los mismos resultados en su investigación con *A. conoides* y *C. musiformis*.

Con respecto a *A. dactyloides*, la cepa sometida a la prueba de digestibilidad no logró ser reaislada en la prueba de viabilidad. Desafortunadamente no existe información en la literatura consultada sobre la sobrevivencia de clamidosporas de esta especie de hongo en

pruebas similares para poder realizar algún tipo de comparación. Aún así, Graminha (2005b) indica que las clamidosporas que no sobreviven; es posible que sea porque fueron inactivadas por las condiciones adversas a las que fueron sometidas, tales como: ácidos, pH, temperatura o competencia con la microbiota.

En estudios *in vivo* realizados en Brasil por Graminha (2005b), se demostró que *C. musiformis* reduce hasta en un 50% el número de *Trichostrongylus colubriformis* y hasta un 95% la cantidad de larvas infectantes de *Haemonchus* en los grupos tratados con dicha especie. Por otro lado, Mota (2003) afirma que diversas especies de *Arthrobotrys* (incluyendo *A. conoides* y *A. oligospora*) son efectivas en la reducción de larvas infectantes de NGI, ya sea en administración oral o directa en las heces, tanto de ovinos y caprinos, como de bovinos y equinos.

A pesar del consenso que se ha creado en torno a la producción de clamidosporas como forma ideal de administración de HND en programas de CB, han habido fallas en el desarrollo de metodologías eficientes para la producción masiva de estas estructuras; así como para determinar si realmente son las clamidosporas las responsables de la capacidad de los hongos de diseminarse en las heces y en el ambiente después del paso por el TGI (Mota et al., 2003).

A falta de producción de esporas de resistencia por parte de *A. oligospora*, Orozco-Aceves (2005) realizó la prueba de digestibilidad a conidias; sin embargo, éstas no resultaron viables luego de la prueba. Mota (2003) menciona el éxito obtenido con conidias y micelio de las especies *A. robusta*, *A. conoides* y *Monacrosporium thaumasium* en bovinos, demostrando que estas estructuras fueron capaces de atravesar el TGI de los animales y mantuvieron su actividad predatoria sobre larvas de *Haemonchus placei*.

Independientemente de los resultados obtenidos, no se recomienda descartar las cepas que no sobrevivieron a la prueba de digestibilidad, ya que, Flores-Crespo (2003) asegura que en los animales, los hongos pueden ser protegidos en el contenido intestinal. Se debe recordar que el contenido intestinal de los rumiantes es rico en celulosa, compuesto que es resistente a la acción de los jugos gástricos, por lo que esta pudiera jugar un papel clave en la protección de las esporas, impidiendo que los jugos actúen directamente en ellas, degradándolas. En las pruebas *in vitro*, no existe este tipo de protección, así la mezcla de reacción esta en contacto directo con los hongos, propiciando su fácil degradación (Orozco-Aceves, 2005). Debido a esto, Araújo (2006) considera que la escogencia de un HND debería llevar en consideración no solo pruebas *in vitro*, sino también pruebas a campo, donde las especies de HND de los mismos lugares donde van a ser aplicados deberían ser las preferidas para se utilizadas en el CB de parásitos.

El desarrollo de formulaciones fúngicas para uso en CB es unos de los principales pasos para la producción comercial de estos microorganismos. Entre todo, no se puede dejar de lado el factor económico, pues las investigaciones están orientadas a producir material fúngico de manera económicamente viable (Mota et al., 2003).

5. CONCLUSIONES

- El espolvoreado en agar agua es el método más efectivo para el aislamiento de hongos nematófagos depredadores.
- Fueron aisladas cepas de *Arthrobotrys oligospora* y *Candelabrella musiformis*, especies ya descritas en el país.
- No obstante, por primera vez se reporta el aislamiento de una cepa de *A. conoides* y una de *A. dactyloides* en el país.
- Los hongos nematófagos depredadores están presentes en diferentes alturas y zonas de vida.
- Contrario a lo esperado, los hongos nematófagos depredadores fueron aislados de pH entre 5.6 y 7.5. La variación del pH en el medio de cultivo puede afectar la reproducción de estos hongos en laboratorio.
- A diferencia de las heces de animales, en la microfauna del suelo interaccionaron diferentes géneros y especies de HND.
- El porcentaje de captura de nemátodos fue muy variable y no se puede relacionar el lugar de aislamiento de las cepas con su capacidad de predadora.
- Se logró inducir clamidosporas en 95.8% de los hongos nematófagos depredadores aislados, probablemente debido al estrés producido por la variación del porcentaje de humedad en la incubadora. Es decir, los hongos nematófagos depredadores se estresan más por cuestiones de humedad, que por alimento para formar estructuras de resistencia.
- Papa-zanahoria es el medio más adecuado para la producción de clamidosporas, seguido por el de papa dextrosa agar, harina de maíz y extracto de malta.

- Seis (42.9%) de las 14 cepas sometidas a la prueba de digestibilidad resultaron viables.
- Los hongos nematófagos aislados en este estudio, tienen acción contra los nemátodos gastrointestinales de ovinos y caprinos y son promisorios candidatos para ser utilizados en control biológicos de estos organismos.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar la bioprospección de nuevas cepas de HND en diferentes sustratos de las principales regiones ganaderas del país, con el objetivo de identificar las especies potencialmente útiles dependiendo de cada zona.
- Se deben desarrollar metodologías capaces de preservar HND por periodos prolongados de tiempo, para mantener cultivos puros y evitar su contaminación; tanto para producción a gran escala como para investigación.
- Realizar pruebas *in vivo* en el país para determinar la efectividad de estos hongos en el CB de los NGI.
- Se necesita investigación adicional en la aplicación y adaptación de los métodos propuestos, épocas estratégicas de aplicación y dosificación de los microorganismos a utilizar y la medición del impacto provocado por la introducción de estos en el ambiente.
- Se deben realizar estudios con el fin de revelar si las posibles interacciones entre géneros y especies de diferentes HND podrían ser benéficas y optimizar la eficacia de alguno de ellos al trabajar en campo.
- Se hace necesario extender el estudio a los NGI de otras especies, tanto de producción como de compañía.
- La difusión de información con respecto a las nuevas opciones para combatir las parasitosis animales se hace necesaria con el fin de dar una adecuada enseñanza y poder implementar las medidas con un tiempo prudencial y no pretender utilizar métodos de CB en emergencias donde se ocupa ver resultados en horas y no en días.

- Estudios a campo combinando CB con otras estrategias, tales como tratamientos antihelmínticos y manejo de pastoreo, deben ser planeados y llevados a cabo dentro de diferentes sistemas/niveles de producción.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Åhman, J., T. Johansson, M. Olsson, P.J. Punt, C.A.M.J.J. van den Hondel & A. Tunlid. 2002. Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. *Appl. Environ. Microb.* 68: 3408-3415.
- Antonelli, A. I. 2003. Resistencia de los endoparásitos a la ivermectina [en línea]. <http://www.zoovet.com.ar/monografias/UNL-TP4.pdf> (Consulta: 14 set. 2008).
- Araújo, J.V., R.C.L. Assis, A.K. Campos & M.A. Mota. 2004. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parásitos gastrointestinais de bovinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13: 67-71.
- Araújo, J.V., R.C.L. Assis, A.K. Campos & M.A. Mota. 2006. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58: 373-380.
- Arce, C., T. Arbaiza, F. Carcelén & O. Lucas. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad de forrajes mediante dos métodos de laboratorio. *Rev. Inv. Vet. Perú* 14: 7-12.
- Barron, G.L. 1977. The nematode destroying fungi: topics in mycobiology, no. 1. Canadian Biological Publications, Ontario, Canada.
- Cabezas, O. 2004. Diagnostico de enfermedades en plantas [en línea]. http://www.senasa.gob.pe/servicios/intranet/capacitacion/cursos/curso_tingo_maria/diagnostico_enfermedades_plantas.pdf (Consulta: 16 oct. 2008).

- Carris, L. 2009. General mycology [en línea]. <http://classes.plantpath.wsu.edu/plp521/> (Consulta: 29 mayo 2009).
- Chandrawathani, P. 2004. Problems in the control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia: resistance to anthelmintics and the biological control alternative. Tesis de Doctorado. Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas. Uppsala, Suecia.
- Colombatto, D. 2003. Análisis de alimentos: aplicaciones prácticas [en línea]. http://www.agro.uba.ar/catedras/p_lechera/resumencolombatto.pdf (Consulta: 18 feb. 2008).
- Cooke, R.C. & B.E.S. Godfrey. 1964. A key to nematode-destroying fungi. T. Brit. Mycol. Soc. 47: 61-74.
- Cuellar-Ordaz, A. 2007. Control no farmacológico de parásitos en ovinos: nemátodos gastroentéricos. *In* V Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos (ALEPRyCS). Mayo. 2-4. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Mendoza, Argentina.
- Delgado-Avila, A.E., A.J. Piñeiro-Chávez & L.M. Urdaneta-García. 2001. Hongos coprofílicos mitosporicos del Estado Zulia, Venezuela [en línea]. <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61412202> (Consulta: 29 abr. 2009).
- Duddington, C.L. 1955. The friendly fungi: a new approach to the eelworm problem. Editorial Faber and faber, London, UK.
- Elósegui-Claro, O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas [en línea]. <http://www.inisav.cu/OtrasPub/METODOS%20ARTESANALES%20DE%20PRODUCCION%20DE%20BIOPLAGUICIDAS.pdf> (Consulta: 6 nov. 2007).

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), 2003. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. Dirección de Producción y Sanidad Animal de la FAO. Estudio FAO, Producción y Sanidad Animal 157, Roma.
- FDA (Food and Drug Administration), 2005. Code of Federal Regulations [en línea]. <http://www.fda.gov/cvm/Images/530.pdf> (Consulta: 15 set. 2008).
- Fleming, S.A., T. Craig, R.M. Kaplan, J.E. Miller, C. Navarre & M. Rings. 2006. Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. *J. Vet. Intern. Med.* 20:435-444.
- Flores-Crespo, J., D. Herrera-Rodríguez, P. Mendoza de Gives, E. Liébano-Hernández, V.M. Vázquez-Prats & M.E. López-Arellano. 2003. The predatory capability of three nematophagous fungi in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces. *J. Helminthol.* 77:297-303.
- Geerts, S. & B. Gryseels. 2000. Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:207-222.
- Gomes, A.P.S., M.L. Ramos, R.S. Vasconcellos, J.R. Jensen, M.C.R. Vieira-Bressan & J.V. Araujo. 2000. *In vitro* activity of brazilian strains of the predatory fungi *Arthrobotrys* spp. on free-living nematodes and infective larvae of *Haemonchus placei*. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 95: 873-876.
- González-Garduño, R., P. Mendoza de Gives, G. Torres-Hernández, C. Becerril-Pérez, E. Ortega-Jiménez & O. Hernández-Mendo. 2005. Estudio *in vitro* de la capacidad depredadora de *Duddintonia flagrans* contra larvas de nemátodos gastrointestinales de ovinos de pelo. *Téc. Pecu. Méx.* 43:405-414.

- Graminha, E.B.N., A.J. Costa, G.P. Oliveira, A.C. Monteiro & S.B.S. Palmeira. 2005a. Biological control of sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: *in vitro* activity and after passage through the gastrointestinal tract. *World J. Microb. Biot.* 21:717–722.
- Graminha, E.B.N., A.C. Monteiro, H.C. Silva, G. Pereira & A.J. Costa. 2005b. Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. *Pesq. agropec. bras.* 40:927-933.
- Hajieghrari, B., M. Torabi-Giglou, M. R. Mohammadi & M. Davari. 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 967-972.
- Haard, K. 1968. Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys* corda. *Mycologia* 60: 1140-1159.
- Hernández-Gamboa, J. 2007. Técnicas parasitológicas. Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Kahn, L.P., T.M. Norman, S.W. Walkden-Brown, A. Crampton & L.J. O'Connor. 2007. Trapping efficacy of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* at temperatures existing at lambing in Australia. *Vet. Parasitol.* 146:83–89.
- Kanda, S., T. Aimi, S. Kano, S. Ishihara, Y. Kitamoto & T. Morinaga. 2008. Ambient pH signaling regulates expression of the serine protease gene (*spr1*) in pine wilt nematode-trapping fungus, *Monacrosporium megalosporum*. *Microbiol. Res.* 163: 63- 72.
- Kumar, D. & K.P. Singh. 2006. Assessment of predacity and efficacy of *Arthrobotrys dactyloides* for biological control of root knot disease of tomato. *J. Phytopathol.* 154: 1- 5.

- Larsen, M. 2000. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology* 120: 121-131.
- Li, J., J. Yang, X. Huang & K.Q. Zhang. 2006. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochem.* 41: 925–929.
- Li, R.W., T.S. Sonstegard, C.P. Van-Tassell & L.C. Gasbarre. 2007. Local inflammation as a possible mechanism of resistance to gastrointestinal nematodes in Angus heifers. *Vet. Parasitol.* 145:100–107.
- Li, Y., K.D. Hyde, R. Jeewon, L. Cai, D. Vijaykrishna & K. Zhang. 2005. Phylogenetics and evolution of nematode-trapping fungi (Orbiliiales) estimated from nuclear and protein coding genes. *Mycologia* 97:1034–1046.
- Liu, T., L. Wang, Y.X. Duan & X. Wang. 2008. Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:113–118.
- Lozano, M.C. & D.C. Arias. 2008. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 21:121-135.
- Lumaret, J.P., M. Alvinerie, H. Hempel, H. J. Schallnaß, D. Claret & J. Römbke. 2007. New screening test to predict the potential impact of ivermectin-contaminated cattle dung on dung beetles. *Vet. Res.* 38:15–24.
- Lumaret, J.P. & I. Martinez. 2005. El impacto de productos veterinarios sobre insectos coprofagos: consecuencias sobre la degradacion del estiércol en pastizales. *Acta Zool. Mex.* 21:137-148.

- Mabjeesh, S.J., M. Cohen & A. Arieli. 2000. *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *J. Dairy Sci.* 83:2289–2294.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 2000. Brock: Biología de los Microorganismos. 8^{va} edición. Prentice Hall Iberia. Madrid, España.
- Mígunova, V.D & B. A. Byzov. 2005. Determinants of trophic modes of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* interacting with bacterivorous nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pedobiologia* 49:101- 108.
- Minglian, Z., M. Minghe & Z. Keqin. 2004. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycologia* 96:16–22.
- Mota, M.A., A.K. Campos & J.V. Araújo. 2003. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesq. Vet. Bras.* 23:93-100.
- Nagee, A., A. Acharya, A. Shete, P.N. Mukhopadhyaya & B.A. Aich. 2008. Molecular characterization of an expressed sequence tag representing the cuticle-degrading serine protease gene (PII) from the nematophagous fungus *Arthrobotrys oviformis* by differential display technology. *Genet. Mol. Res.* 7: 1200-1208.
- Núñez-Sánchez, A.E. 2002. Aislamiento y evaluación de hongos nematófagos asociados a quistes de *Globodera rostochiensis* (Woll.) en la región del Cofre de Perote. Tesis. Maestría en ciencias en el área de biotecnología. Universidad de Colima. Colima, México.
- Ojeda-Robertos, N.F., P. Mendoza-de Gives, J.F.J. Torres-Acosta, R.I. Rodríguez-Vivas & A.J. Aguilar-Caballero. 2005. Evaluating the effectiveness of a Mexican strain of *Duddingtonia flagrans* as a biological control agent against gastrointestinal nematodes in goat faeces. *J. Helminthol.* 79:151–157.

- Orozco-Aceves, M. 2005. Aislamiento y caracterización de hongos nematófagos como potenciales controladores biológicos de nemátodos gastrointestinales para la producción animal. Tesis. Posgrado en agricultura alternativa con mención en agricultura ecológica. Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Oyekanmi, E.O., D.L. Coyne & B. Fawole. 2008. Utilization of the potentials of selected microorganisms as biocontrol and biofertilizer for enhanced crop improvement. *J. Biol. Sci.* 8: 746-752.
- Park, J.-O., W. Gams, M. Scholler, E.L. Ghisalberti & K. Sivasithamparam. 2002. Orbiliaceous nematode-trapping fungi and related species in Western Australia and their biological activities. *Australasian Mycologist* 21: 45-52.
- Rojas-Martínez, J.L. & A. Castro. 2004. Algunas consideraciones generales sobre las Ivermectinas. *Boletín de Parasitología UNA-MAG* 5(1):1.
- Rubner, A. 1996. Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. *Stud. Mycol.* 39: 1-134.
- Sangster, N.C. & J. Gill. 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitol. Today* 15: 141-146.
- Sanyal, P.K., A.K. Sarkar, N.K. Patel, S.C. Mandal & S. Pal. 2008. Formulation of a strategy for the application of *Duddingtonia flagrans* to control caprine parasitic gastroenteritis. *J. Helminthol.* 82: 169-174.
- Saumell, C.A. & A.S. Feranández. 2000. Hongos nematófagos para el control biológico de nemátodos parásitos de rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria* 81:270-273.

- Schnyder, M., P.R. Torgerson, M. Schönmann, L. Kohler & H. Hertzberg. 2005. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Vet. Parasitol.* 128:285–290.
- Shinya, R., D. Aiuchi, A. Kushida, M. Tani, K. Kuramochi & M. Koike. 2008. Effects of fungal culture filtrates of *Verticillium lecanii* (*Lecanicillium* spp.) hybrid strains on *Heterodera glycines* eggs and juveniles. *J. Invertebr. Pathol.* 97: 291–297.
- Spiegel, Y., E. Sharon, M. Bar-Eyal, A. Maghodia, A. Vanachter, A. van Assche, S. van Kerckhove, A. Viterbo & I. Chet. 2007. Evaluation and mode of action of *Trichoderma* isolates as biocontrol agents against plant-parasitic nematodes. *IOBC WPRS Bulletin* 30: 129-134.
- Su, H., Y. Hao, M. Mo & K. Zhang. 2007. The ecology of nematode-trapping hyphomycetes in cattle dung from three plateau pastures. *Vet. Parasitol.* 144:293–298.
- Tunlid, A. & S. Jansson. 1991. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *App. Environ. Microb.* 57: 2868-2872.
- Van Oorschot, C.A.N. 1985. Taxonomy of the *Dactylaria* complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. *Stud. Mycol.* 26: 61-96.
- Várady, M., P. Čudeková & J. Čorba. 2007. *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: egg hatch test versus larval development test. *Vet. Parasitol.* 149:104–110.
- Vargas-Rodríguez, C.F. 2006. FAMACHA© Control de Haemonchosis en caprinos. *Agronomía Mesoamericana* 17: 79-88.

Villalba-Velásquez, V. 2006. Manual de laboratorio: Aspectos moleculares de la fitopatología. Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico, Cartago, C.R.

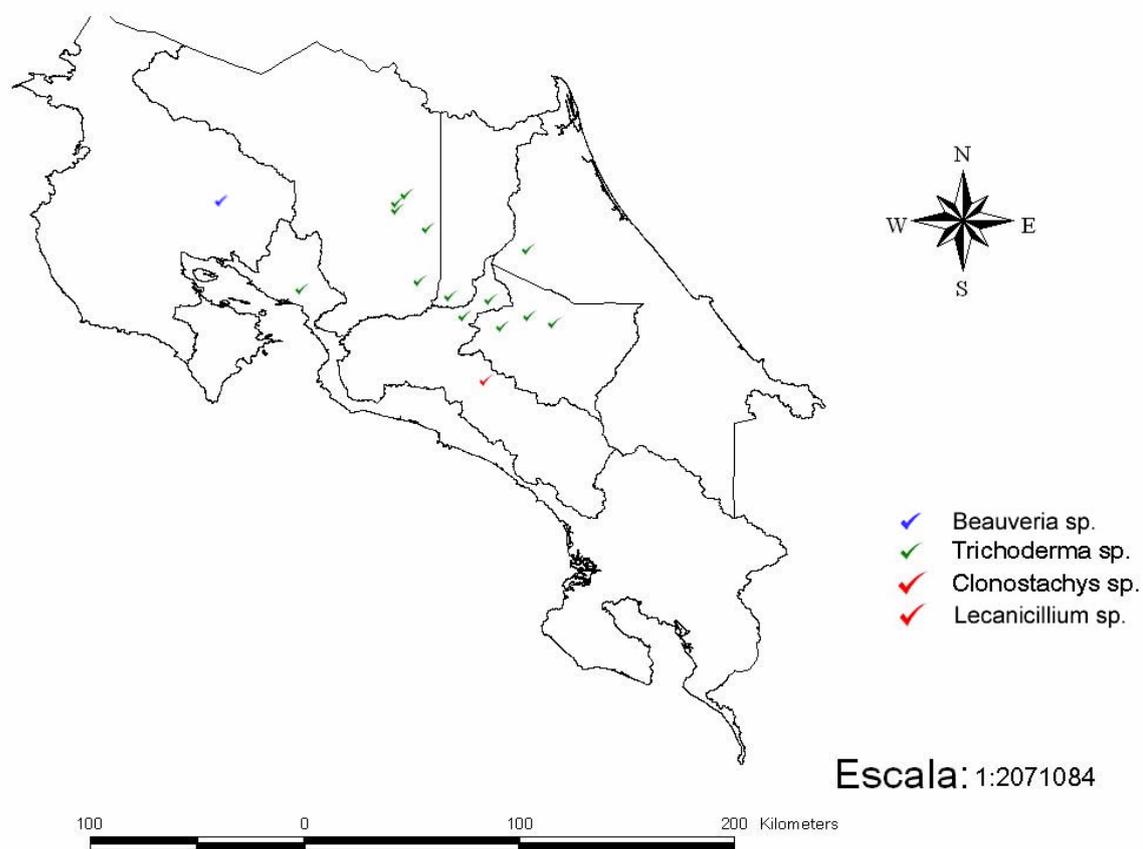
8. ANEXOS

Anexo 1

Cuadro 8. Pruebas de digestibilidad (Arce et al., 2003; Colombatto, 2003).

Nombre	Método	Ventajas	Desventajas
Digestibilidad <i>in vitro</i>	Fermentación <i>in vitro</i> de los forrajes mediante un inóculo de microorganismos ruminales. Involucra la incubación con licor ruminal y una solución de pepsina.	-Precisión para predecir la digestibilidad <i>in vivo</i> -Utiliza tubos de ensayo y no bolsas.	- Variabilidad en la calidad del fluido ruminal, relacionado con el tipo de procesado al que se lo somete, tipo y dieta del animal donante, momento de recolección, condiciones de anaerobiosis, pH y temperatura, etc. -No provee información sobre la cinética del proceso de degradación en el rumen.
Digestibilidad <i>in situ</i>	Consiste en introducir bolsas de nylon o poliéster, con un tamaño de poro determinado, llenas de partículas del forraje a determinar en el rumen de animales fistulados.	-Describe la cinética de degradación de los alimentos en el rumen. -Predice relativamente bien el consumo voluntario y la digestibilidad de un alimento	-Potencial de pérdida de partículas solubles o pequeñas - Resultados varían con el tipo de procesamiento de la muestra, el procedimiento usado para lavar y secar los residuos, cantidad de pérdida de partícula, sitio de incubación y secuencia, tipo y dieta de animal huésped, tipo de bolsa y tamaño de poro, extensión de la contaminación microbiana, etc
Sistema DAISY II ANKOM®	Consiste en digerir muestras de alimentos en bolsas dentro de frascos, los cuales rotan permanentemente dentro de una cámara aislada y mantenida a 39°C.	-Rápido. -Entrega predicciones relativamente precisas de digestibilidad aparente y verdadera.	-Potencial de pérdida de partículas solubles o pequeñas. -Efectos asociativos entre alimentos incubados en un mismo frasco de fermentación podrían influenciar los resultados.
Producción de gas <i>in vitro</i>	La técnica de producción de gas <i>in vitro</i> genera datos de cinética de digestión, pero midiendo la fermentación del alimento en lugar de su desaparición. Esta fermentación se mide a través de la producción de gases, principalmente metano, dióxido de carbono e hidrógeno.	-Tienen en cuenta los componentes solubles de los alimentos, que desaparecen y son Considerados como “degradados” en los métodos <i>in situ</i>	-Costoso - Asume que la producción de gas es directamente proporcional a la digestión del sustrato y entonces de su valor nutritivo. -Provee poca información aparte de la estimación de las tasas de fermentación, por lo que los datos obtenidos deberían ser complementados con datos de degradación de los sustratos, perfiles de ácidos grasos volátiles y crecimiento bacteriano.

Anexo 2: Distribución por provincia de *Beauveria* sp., *Clonostachys* sp., *Lecanicillium* sp. y *Trichoderma* sp.



Fuente: Propia, Geotecnologías S.A. y Atlas de CR 2000, ITCR.

Figura 29. Fincas positivas al aislamiento de *Beauveria* sp., *Clonostachys* sp., *Lecanicillium* sp. y *Trichoderma* sp.

Anexo 3: Fotos de *Beauveria* sp., *Clonostachys* sp., *Lecanicillium* sp. y *Trichoderma* sp.



Figura 30. Morfología macroscópica *Beauveria* sp.



Figura 31. Morfología macroscópica *Clonostachys* sp.



Figura 32. Morfología macroscópica *Lecanicillium* sp.



33a.



33b.



33c.

Figura 33a, 33b y 33c. Morfología macroscópica *Trichoderma* sp.