



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

“MICROORGANISMOS CON USO POTENCIAL CONTRA EL NEMATODO DE OVINOS *HAEMONCHUS CONTORTUS*”

LILIANA AGUILAR MARCELINO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2012

La presente tesis intitulada: “Microorganismos con uso potencial contra el nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*”, realizada por la alumna: **Liliana Aguilar Marcelino**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. GLAFIRO TORRES HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. PEDRO MENDOZA DE GIVES

ASESOR

DR. IGNACIO CID DEL PRADO VERA

ASESOR

DR. JUAN MANUEL GONZÁLEZ CAMACHO

ASESOR

DR. OMAR HERNÁNDEZ MENDO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril 2012

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por la formación académica.

A CONACYT por la beca (No. 211375) otorgada para la realización de los estudios doctorales.

Al proyecto SAGARPA-CONACYT No. 11990/2005 por el financiamiento recibido.

A mi Director de Tesis el Dr. Pedro Mendoza de Gives quien ha sido un excelente tutor por darme la confianza y oportunidad de trabajar en el maravilloso mundo de los diferentes microorganismos antagonistas naturales de nematodos.

A mi Consejero el Dr. Glafiro Torres Hernández por ser un guía excepcional en el ámbito académico y su invaluable apoyo durante los estudios de doctorado.

A los integrantes de mi consejo particular: Dr. Ignacio Cid del Prado Vera, Dr. Juan Manuel González Camacho, Dr. Omar Hernández Mendo, Dr. Efrén Ramírez Bribiesca, Dra. María Teresa Quintero Martínez.

Al CENID Parasitología-Veterinaria, INIFAP, por darme la facilidad para cursar los estudios de Doctorado y el apoyo recibido especialmente al Dr. Zeferino García Vázquez, Dra. María Eugenia López Arellano, Dr. Enrique Liébano Hernández, Dr. Ramón Bautista Garfias, MVZ. Rosalía Rodríguez Martínez, Biol. Gabriel Ramírez Vargas y la IB. Sarahí Castañeda Ramírez

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, salud y fortaleza para seguir adelante.

A mi Madre la Profesora Ma. Leonides Marcelino Contreras por todo el sacrificio, ausencias, cuidado y apoyo incondicional, te quiero mucho, admiró y respeto.

A mi hija Dana Helena Bahena Aguilar que es lo mejor que me ha sucedido en la vida y darme la oportunidad de vivir la grandiosa experiencia de ser madre.

A mi Esposo el Lic. Roberto Isaac Bahena González, por apoyarme siempre, te amo.

A mi Papá y Mamá: Pedro Marcelino Palma y Sofía Contreras Valencia, con cariño.

A mis hermanos y hermanas: Alex, Javier, José Luis, Raúl, Marcos, Pedro, Jesús, Estela, Lilia, Sol y especialmente a Alberto por su comprensión y apoyo.

A Jesús Adame Giles, por sus sabios consejos.

A Patricia Bahena González y Familia por todo el apoyo recibido.

A mis amigos y amigas: Dr. Roberto Lara Lemus, Dr. Gonzalo Silva Aguayo, Dr. Víctor López Martínez, Dr. Salvador Hernández Martínez, Jesica Cruz Pérez y Samantha Díaz Luna.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA	IV
CONTENIDO.....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	4
I.CONTEXTO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
1.1.LA OVINOCULTURA EN MÉXICO.....	7
1.2.DESARROLLO DE LA OVINOCULTURA EN MÉXICO.....	8
1.3.RAZA SANTA CRUZ.....	8
1.4.FACTORES QUE LIMITAN LA PRODUCCIÓN OVINA	9
1.5.LAS PARASITOSIS COMO UN PROBLEMA DE GRAN IMPORTANCIA EN SALUD ANIMAL.....	10
1.6.IMPACTO ECONÓMICO DE LAS PARASITOSIS GASTROINTESTINALES EN LA PRODUCCIÓN OVINA	11
1.7.MÉTODOS DE CONTROL DE LAS PARASITOSIS GASTROINTESTINALES	11
1.8.RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA	12
1.9.ALTERNATIVAS DE CONTROL DIFERENTES A LOS QUÍMICOS.....	12
1.10.RESISTENCIA GENÉTICA EN OVINOS HACIA LAS PARASITOSIS GASTROINTESTINALES	13
1.11.EFECTO DE LA NUTRICIÓN SOBRE LA RESISTENCIA A LAS PARASITOSIS EN OVINOS.....	14
1.12.CONTROL BIOLÓGICO.....	15
1.13.ENEMIGOS NATURALES	15
1.14.PROTOZOARIOS	15
1.15.BACTERIAS.....	16
1.16.ÁCAROS.....	20

1.17.TARDÍGRADOS.....	21
1.18.NEMATODOS DEPREDAORES.....	21
1.19.HONGOS	22
1.20.LITERATURA CITADA	24
II.OBJETIVO GENERAL	37
2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
III.HIPÓTESIS GENERAL.....	38
3.1.HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.....	38
IV.GENOTIPIFICACIÓN DE UNA BACTERIA <i>Pasteuria/Pasteuria-like</i> Y EVALUACIÓN DEL ADOSAMIENTO DE ESPORAS A <i>Haemonchus contortus</i> Y A OTROS NEMATODOS.....	39
4.1. RESUMEN.....	39
4.2. ABSTRACT	40
4.3. INTRODUCCIÓN.....	41
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
4.5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.6.CONCLUSIONES.....	67
4.7.LITERATURA CITADA	67
V.EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEPREDAORA DEL ÁCARO <i>Lasioseius penicilliger</i> SOBRE <i>Haemonchus contortus</i> (L₃) (Nematoda: Trichostrongylidae) Y NEMATODOS DE VIDA LIBRE	74
5.1. RESUMEN.....	74
5.2. ABSTRACT	75
5.3. INTRODUCCIÓN.....	76
5.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
5.6.CONCLUSIONES.....	86

5.7. LITERATURA CITADA	86
VI. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEPRDADOR DE NEMATODOS <i>Butlerius</i> sp. (NEMATODA:DIPLOGASTERIDAE) SOBRE TRES DIFERENTES NEMATODOS: <i>Haemonchus contortus</i> (L₃), <i>Panagrellus redivivus</i> Y <i>Rhabditis</i> sp.	93
6.1. RESUMEN.....	93
6.2. ABSTRACT	94
6.3. INTRODUCCIÓN.....	95
6.4.MATERIAL Y MÉTODOS.....	99
6.5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	105
6.6. CONCLUSIONES.....	112
6.7.LITERATURA CITADA	112
VII. EVALUACIÓN DEL HONGO NEMATÓFAGO <i>Duddingtonia flagrans</i> PARA EL CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS DE LA RAZA SANTA CRUZ.....	118
7.1. RESUMEN.....	118
7.2.ABSTRACT	119
7.3.INTRODUCCIÓN.....	120
7.4.MATERIALES Y MÉTODOS.....	122
7.5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	134
7.6.CONCLUSIONES.....	143
7.7.LITERATURA CITADA	1433
VIII.DISCUSIÓN GENERAL	1522
8.1.LITERATURA CITADA	1588
IX.CONCLUSIONES GENERALES.....	164

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 4	PÁGINA
Cuadro 1	Secuencia obtenida de la bacteria bajo estudio identificada a través de la base de datos de secuencia (NCBI-BLASTn). 53
Cuadro 2	Porcentajes de similitud de la región 16s rRNA de la secuencias de la bacteria bajo estudio y la secuencia de la bacteria <i>Comamonas aquatica</i> y <i>Pasteuria</i> sp. 57
Cuadro 3	Proporciones y porcentajes de nematodos que presentaron endosporas adheridas a su cutículas. 60
Cuadro 4	Resultados del número de especímenes de la mezcla de la población de <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> y <i>M. arenaria</i> positivos a la presencia de esporas de la bacteria <i>Pasteuria</i> -like adheridas a su cutícula a través de la prueba de adosamiento por centrifugación. 62
Cuadro 5	Resultados del número de especímenes del nematodo <i>Rhabditis</i> sp. positivos a la presencia de esporas de la bacteria <i>Pasteuria</i> -like adheridas a su cutícula a través de la prueba de adosamiento por centrifugación. 62
CAPÍTULO 5	PÁGINA
Cuadro 1	Promedios y porcentajes de reducción de tres diferentes géneros de nematodos recuperados después de 5 días de interacción <i>in vitro</i> con el ácaro <i>Lasioseius penicilliger</i> . 84
CAPÍTULO 6	
Cuadro 1	Promedio de nematodos en coprocultivo inoculados al inicio del experimento utilizando a <i>Rhabditis</i> sp., <i>H. contortus</i> (L ₃) y <i>P. redivivus</i> como presa. 104
Cuadro 2	Promedio de nematodos de los géneros <i>Haemonchus contortus</i> , <i>Panagrellus redivivus</i> y <i>Rhabditis</i> sp. recuperados después de 30 días en coprocultivos de ovinos en presencia del nematodo depredador <i>Butlerius</i> sp. 107
Cuadro 3	Promedio de nematodos recuperados (<i>H. contortus</i> L ₃ , <i>P. redivivus</i> y <i>Rhabditis</i> sp.) y porcentaje de reducción de larvas por acción de <i>Butlerius</i> sp. 108
Cuadro 4	Incremento de la población de <i>Butlerius</i> sp. en presencia de <i>H. contortus</i> (L ₃), <i>Rhabditis</i> sp. y <i>P. redivivus</i> en coprocultivo. 108

CAPÍTULO 7

Cuadro 1	Diseño experimental de la presente investigación.	127
Cuadro 2	Promedios de huevos por gramo en heces (HPG) sin transformar y transformados logarítmicamente.	136
Cuadro 3	Viabilidad de las esporas de <i>Duddigtonia flagrans</i> después de su paso a través de tracto digestivo de los ovinos tratados.	139

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I		PÁGINA
Figura 1	Ovino de la raza Santa Cruz.	9
Figura 2	Microfotografía mostrando el aspecto de una ameba de la especie <i>Theratomyxa weberi</i> , enquistando a un nematodo.	16
Figura 3	Microfotografía mostrando la parte anterior de dos nematodos de la especie <i>Caenorhabditis elegans</i> , infectados por la bacteria <i>Microbacterium nematophilum</i> .	17
Figura 4	Microfotografía tomada en un microscopio electrónico de transmisión, mostrando el cristal proteico romboide compuesto de toxinas Cry y una espora en proceso de formación en el interior de una célula vegetativa de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	18
Figura 5	Microfotografía tomada al microscopio de barrido mostrando una endospora de la bacteria <i>Pasteuria penetrans</i> adosada a la cutícula del nematodo <i>Meloidogyne incognita</i> (J ₂) y un orificio causado por otra endospora de esta especie.	19
Figura 6	Microfotografía mostrando la parte dorsal de un ácaro depredador del género <i>Lasioseius penicilliger</i> .	20
Figura 7	Microfotografías mostrando a un Tardígrado del género <i>Hypsibius</i> sp., alimentándose de un nematodo.	21
Figura 8	Aspecto de un nematodo depredador del género <i>Mononchus</i> sp. alimentándose de un nematodo fitopatógeno <i>Pratylenchus</i> sp.	22
Figura 9	Microfotografías mostrando a una larva infectante de <i>Haemonchus contortus</i> atrapada por los anillos tridimensionales del hongo nematófago (<i>Duddingtonia flagrans</i>) cepa mexicana (FTOH-8).	23
 CAPÍTULO IV		 PÁGINA
Figura 1	Terreno infestado por los nematodos <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> y <i>M. arenaria</i> .	43
Figura 2.	Representación de los iniciadores 27F, 1522R y la región 16S rRNA para la identificación de la bacteria <i>Pasteuria</i> sp.	46
Figura 3.	Visualización de ADN genómico de la bacteria bajo estudio.	51
Figura 4	Visualización del producto de PCR de la bacteria aislada en gel de agarosa al 4%, producto de PCR en gel de agarosa al 4% sin bromuro de etidio.	52

Figura 5	Secuencia obtenida de ADN genómico de la bacteria bajo estudio	52
Figura 6.	Secuencia de la bacteria bajo estudio, marcando la región amplificada por la técnica de PCR. En color amarillo se muestra la región 16s no reportada y en color azul la secuencia 16s reportada.	54
Figura 7.	Representación gráfica de la región 16S rRNA que presentó mayor similitud de las secuencias de la bacteria bajo estudio y la secuencia de la bacteria <i>Comamonas aquatica</i> y <i>Pasteuria</i> sp.	56
Figura 8.	Árbol filogenético mostrando la representación de la similitud entre la secuencia de bacteria en estudio (<i>Comamonas aquatica</i>) y <i>Pasteuria hartismeri</i> (Pasteuria H), <i>P. penetrans</i> (Pasteuria P) y <i>P. nishisague</i> (Pasteuria N).	57
Figura 9.	Microfotografías mostrando el aspecto de diversos estadios evolutivos (L ₁ , L ₂ , L ₃ , y L ₄) del nematodo <i>Haemonchus contortus</i> . Larvas del grupo testigo. Larvas del grupo tratado con esporas de la bacteria <i>Pasteuria</i> -like.	61
Figura 10.	Microfotografías mostrando el adosamiento de endosporas de la bacteria <i>Pasteuria</i> -like a la cutícula de nematodos juveniles del 2° estadio de la mezcla de la población de <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>M. javanica</i> y <i>M. arenaria</i> .	63
CAPÍTULO V		PÁGINA
Figura 1.	Fotografía de una caja tipo relojero (CPR).	80
Figura 2.	Aspecto de larvas de <i>P. redivivus</i> y 5 ácaros adultos de <i>L. penicilliger</i> , en cajas de relojero (CPR) vistos al microscopio estereoscópico.	81
Figura 3.	Fotografía mostrando la parte ventral del ácaro nematófago <i>L. penicilliger</i>	82
Figura 4	Actividad depredadora de <i>L. penicilliger</i> sobre larvas infectantes de <i>H. contortus</i> .	83
Figura 5	Actividad depredadora de <i>L. penicilliger</i> sobre larvas de <i>Panagrellus redivivus</i> .	83
CAPÍTULO VI		PÁGINA
Figura 1.	Esquema de <i>Butlerius butleri</i> (Goodey, 1929).	98
Figura 2.	Aspecto del ecosistema, tipo de suelo en Huitzilac, Morelos y colecta de muestras de suelo para el aislamiento de nematodos depredadores.	99

Figura 3.	Técnica de charola de Whitehead y Hemming.	100
Figura 4.	Microfotografía mostrando la cavidad bucal del nematodo <i>Butlerius</i> sp.	105
Figura 5	<i>Butlerius</i> sp. localizando a una larva de <i>H. contortus</i> del 3er. estadio. <i>Butlerius</i> sp. alimentándose de una larva infectante de <i>H. contortus</i> .	106
Figura 6.	Incremento de la población de <i>Butlerius</i> sp. en presencia de <i>H. contortus</i> (L ₃), <i>Rhabditis</i> sp. y <i>P. redivivus</i> en cultivos fecales estériles.	108

CAPÍTULO VII

PÁGINA

Figura 1	a) Fotografía mostrando el cultivo <i>in vitro</i> del hongo nematófago <i>Duddingtonia flagrans</i> en medio cema de trigo-agar. b) Fotografía mostrando la cosecha del hongo mediante la técnica de raspado de la superficie del cultivo.	124
Figura 2.	a, b) Fotografías mostrando el proceso de forma artesanal de la producción de comprimidos multinutricionales. c) Fotografía mostrando el aspecto de los comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo nematófago <i>Duddingtonia flagrans</i> .	126
Figura 3.	Fotografía mostrando el pesaje de los ovinos de la raza Santa Cruz, semanalmente.	128
Figura 4.	Fotografía mostrando la colecta de sangre a partir de la vena yugular de los ovinos experimentales.	128
Figura 5.	Aspecto de la palpación de la región lumbar de un ovino de la raza Santa Cruz para la determinación de la condición corporal.	129
Figura 6.	Aspecto de la elaboración de cultivos fecales. a) Coprocultivos incubados durante 15 días. b) Revisión de coprocultivos diariamente. c) Preparación de bultos con tela gasa para depositarlo en el embudo de Baermann para la recuperación de larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> .	131
Figura 7.	Número promedio de larvas recuperadas a partir de las heces de los animales de ambos grupos I (suplementados con comprimidos multinutricionales) y II (suplementados con alimento comercial para ovinos) durante las 11 semanas ($p \leq 0.05$).	135
Figura 8.	Conteo de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> (HPG) eliminados en heces de los ovinos de ambos grupos testigo y tratado. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p \geq 0.05$).	136

Figura 9. a) Promedio del peso de los animales experimentales de los grupos testigo y tratado ($p \geq 0.05$) b) Volumen celular aglomerado ($p \geq 0.05$). c) Parámetro de la condición corporal de los animales experimentales ($p \geq 0.05$). 142

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo general evaluar la actividad antagónica de microorganismos con uso potencial contra el parásito de ovinos *Haemonchus contortus*. Esta investigación constó de cuatro estudios. En el primer estudio se obtuvo e identificó morfológica y molecularmente el aislamiento de una bacteria a partir de nematodos fitopatógenos. Los resultados obtenidos del análisis molecular mostraron un 95% de similitud con la región 16S rRNA de la bacteria *Comamonas aquatica*. A pesar de que los iniciadores utilizados en el presente estudio fueron específicos para *Pasteuria*-like, los antecedentes de esta bacteria al parecer no tienen relación con ninguna actividad antagónica en contra de nematodos; y regularmente no produce esporas. Por lo que el hecho de que las esporas adheridas a la cutícula de los nematodos correspondan o no a *C. aquatica* queda sin aclarar. Los resultados son considerados como inconsistentes; por lo que estudios posteriores como por ejemplo clonación del cDNA de la bacteria *Pasteuria*-like y otras pruebas moleculares utilizando a la bacteria *Pasteuria*-like como control positivo; además de técnicas complementarias de microscopía electrónica de barrido y de transmisión deberán ser llevadas a cabo de manera complementaria para estar completamente seguros de la correcta identificación de este microorganismo. Por otra parte, se evaluó la actividad de adosamiento *in vitro* de esporas de la bacteria *Pasteuria*-like (*P-I*) en contra de diversos estadios de desarrollo de *Haemonchus contortus*; además de los nematodos *Meloidogyne* spp. (*J*₂) y *Rhabditis* sp. Los resultados mostraron los siguientes porcentajes de adhesión: para huevos de *H. contortus*=0%; L₁=12%; L₂=20%; L₃=4%, L₄=40%; para *Rhabditis* sp.=4% y *Meloidogyne* spp.=28%. Por primera vez se reporta el hallazgo de la presencia de esporas bacterianas adosadas a la pared cuticular del tercer estadio de desarrollo *H. contortus*. En el segundo estudio, se evaluó la actividad del ácaro *Lasioseius penicilliger* en contra de *H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. y *Panagrellus redivivus*. Los resultados mostraron porcentajes de

reducción de 79.5% para *H. contortus*, 64.3% para *P. redivivus* y 80.7% para *Rhabditis* sp. Este resultado podría tener una implicación potencial en el empleo de ácaros de esta especie en el control de nematodos parásitos de importancia pecuaria. Se reporta por primera vez la actividad depredadora del ácaro *L. penicilliger* en contra de un nematodo parásito de animales. En el tercer estudio se evaluó el efecto depredador *in vitro* del nematodo *Butlerius* sp. en contra de tres diferentes nematodos: *Haemonchus contortus* (L₃), *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis* sp. La interacción entre *Butlerius* y *H. contortus*; resultó en una reducción de 91.8% de la población del parásito; mientras que la población de *Butlerius* se incrementó 131.6 veces. Para el caso de la interacción entre *Butlerius* y *P. redivivus*; la población del nematodo de vida libre se redujo en 80.9%; mientras que el nematodo depredador se incrementó 268.3 veces. La reducción de *Rhabditis* por acción del nematodo depredador fue de 62.5%; mientras que, el nematodo *Butlerius* se incrementó 82.7 veces. El nematodo *Butlerius* sp. mostró ser un eficiente antagonista natural de larvas infectantes del nematodo *H. contortus*. En el cuarto estudio se evaluó el efecto de la suplementación de comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo *Duddingtonia flagrans* en ovinos de la raza Santa Cruz sobre la población de larvas de *H. contortus* en heces y sobre la ganancia de peso. Los resultados mostraron una reducción en la población de larvas infectantes de *H. contortus* en cultivos fecales de los ovinos suplementados con los comprimidos multinutricionales (CM) en un rango de 42.1-84.3% durante 11 semanas que duró el experimento, excepto en el 3^{er} y 4^{to} muestreo. La ganancia de peso diaria fue muy similar en ambos grupos de ovinos; siendo 136 g para el grupo suplementados con alimento comercial para ovinos y 163 g para el grupo suplementado con CM conteniendo clamidosporas del hongo *D. flagrans*. Con respecto al parámetro de volumen celular aglomerado, el grupo suplementado con CM mostró valores ligeramente más bajos que el grupo con alimento comercial para ovinos; sin embargo, la ganancia de peso no se vio afectada. El parámetro de

condición corporal fue muy similar en ambos grupos. Respecto a la viabilidad de las clamidosporas de *D. flagrans in vitro* después de su paso a través del tracto digestivo de los ovinos, se observó en las placas de agar adicionadas con heces de los animales la formación y presencia de redes tridimensionales del hongo mostrando la presencia de nematodos atrapados. En esta investigación se concluye que los microorganismos evaluados actúan como antagonistas de *H. contortus* y podrían ser utilizados en futuros estudios para determinar su potencial antagónico en contra de la hemoncosis y de otras enfermedades causadas por nematodos de importancia en la industria ovina.

Palabras clave: Control biológico, *Pasteuria-like*, *Lasioseius penicilliger*, *Butlerius* sp. *Duddingtonia flagrans*, *Haemonchus contortus*.

ABSTRACT

This research was aimed to evaluate the antagonistic activity of microorganisms with potential use against the sheep parasitic nematode *Haemonchus contortus*. The work was divided into four studies. In the first one, the isolation of a bacterium attached to phytopathogenic nematodes followed by its morphological and molecular identification was achieved. Results of the molecular analysis showed 95% alignment with the 16S rRNA region of the bacterium *Comamonas aquatica*. Although, the primers used in the present study were specific for *Pasteuria*-like bacteria, the background of this bacterium seems to have no relationship to any antagonistic activity against nematodes also; and no spores are regularly produced by this microorganism. So, it was unclear whether the spores attached to the nematode cuticle corresponded or not to *C. aquatica*. Such results are considered inconclusive and further studies *ie.*, cDNA cloning of the bacterium and molecular assays using DNA of *Pasteuria*-like as a positive control and also the use of scanning and transmission electronic microscopy complementary techniques should be performed to be completely sure about the identification of this microorganism. However, the *in vitro Pasteuria-like (P-l)* spore attachment was also evaluated against various developmental stages of *Haemonchus contortus*, *Meloidogyne* spp. (J₂) and *Rhabditis* sp. The results showed the following attachment percentages: *H. contortus* eggs=0%; L₁= 12%; L₂=20%; L₃=4%, L₄=40%; for *Rhabditis* sp. =4% and for *Meloidogyne* spp. =28%. For the first time, the presence of spores of a bacterium attached to the cuticle of the third larval stage of *H. contortus* has been recorded. In the second study, the predatory activity of the mite *Lasioseius penicilliger* against *H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. and *Panagrellus redivivus*, was evaluated. The results showed the following reduction percentages: 79.5% for *H. contortus*, 64.3% for *P. redivivus* and 80.7% for *Rhabditis* sp. This is the first record of the predatory activity of the mite *L. penicilliger* against a parasitic nematode of sheep. This result has potential

for exploitation of the use of mites of this species for the control of parasitic nematodes affecting sheep. In the third study, the *in vitro* predatory activity of the nematode *Butlerius* sp. against three different nematodes: *Haemonchus contortus* (L₃), *Panagrellus redivivus* and *Rhabditis* sp. was evaluated. The interaction between *Butlerius* sp. and *H. contortus* resulted in 91.8% reduction in the population of the parasite; meanwhile, the *Butlerius* sp. population increased by 131.6-folds. Regarding the interaction between *Butlerius* sp. and *P. redivivus*, the population of the free-living nematode was reduced to 80.9%; meanwhile the population of the predatory nematode was increased 268.3-folds. On the other hand, the *Rhabditis* sp. population was decreased to 62.5% and *Butlerius* sp. population increased 82.7-folds. *Butlerius* sp. proved to be an efficient natural antagonist of *H. contortus* infective larvae. In the fourth study, the effect of supplying multinutritional pellets (MP) containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospores on the reduction of the population of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* in feces of St. Croix sheep, and on the daily weight gaining, was evaluated. The results showed a significant reduction of the infective stages of the parasite in fecal cultures of MP-supplied sheep ranging from 42.1-84.3% during the whole experiment, with exception of the third and fourth sampling. Daily weight gain was very similar in both MP-supplied (136 g) and MP-non-supplied (164 g) groups of sheep. The cell blood package values in the MP-supplied group were slightly lower than values in the control group supplied with sheep commercial food. However, daily weight gain was not affected. Likewise, body condition parameter in the two groups of sheep was very similar. Regarding the *in vitro* viability of *D. flagrans* spores after passing through the digestive tract of the sheep, the presence of tri-dimensional traps and trapped nematodes on agar plates added with the animal feces were observed. The results obtained in the present research work lead to the conclusion that the assessed microorganisms act as efficient natural antagonists of *H. contortus* infective larvae

and that they could be used in further works to determine their antagonistic potential against sheep haemonchosis and other diseases caused by nematodes of importance in the sheep industry.

Key words: Biocontrol, *Pasteuria-like*, *Lasioseius penicilliger*, *Butlerius* sp. *Duddingtonia flagrans*, *Haemonchus contortus*.

I. CONTEXTO GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. La ovinocultura en México

La relación del hombre con el ovino surge por una exigencia, para obtener diversos productos que satisfagan sus necesidades, como animales de caza, proporcionándoles carne como alimento, pieles para vestimentas, a medida que se fueron domesticando se adicionó la leche y la lana como fibra textil (De Lucas y Arbiza-Aguirre, 2000). Los ovinos llegaron a territorio mexicano con los primeros españoles, los primeros ovinos de razas ibéricas como la Churra y la Manchega cubiertos con una lana gruesa y escasa producción cárnica, encontrando en los pastos mexicanos un excelente alimento y en su clima un ambiente muy propicio para el desarrollo de grandes poblaciones lanares (De la Cruz-Moreno, 2007). El ovino de pelo fue traído a América en la época de la colonia junto con los esclavos procedentes del África. En México el ovino de pelo ingresó a través de la Península de Yucatán, debido al comercio que esta parte del país sostenía con la Isla de Cuba (Lara-Pastor, 2007). El valor alimenticio de la carne ovina posee un alto contenido nutritivo: la humedad es 75%, proteína del 20%, grasa del 3% y con 105 kilocalorías. En relación a los minerales y vitaminas, es quizás uno de los proveedores más importantes de hierro (1.6 a 2.0 mg por 100 g de carne), de zinc, potasio y fosfatos de muy alta absorción. También muy rica en vitaminas hidrosolubles del grupo B (De Lucas, 2008). La carne ovina tiene características organolépticas particulares sobre todo en lo concerniente al sabor y olor, además proporciona aminoácidos y ácidos grasos esenciales en la dieta humana (De Lucas, 2008). Respecto a la producción anual de lana, ésta se estima para los últimos años en 4,170 toneladas (SAGARPA, 2002). El consumo de carne de ovino en México es principalmente en platillos típicos como la barbacoa, forma en que se consume más de 95% de la producción, el consumo per cápita de carne ovina para 2006 fue de alrededor de 800 gramos (Cuellar, 2007; Arteaga-Castelán, 2010).

1.2. Desarrollo de la ovinocultura en México

La producción ovina se ha desarrollado prácticamente en todo el mundo; no obstante los principales países productores y que son considerados potencias en producción ovina son China, Australia, España, India y Nueva Zelanda. En el año 2004, México ocupaba el lugar 37 (FAO, 2004). Esta actividad, se desarrolla principalmente bajo sistemas de pastoreo. La producción ovina en México está concentrada principalmente en el centro y sur del país y de acuerdo a los datos de la SAGARPA en el censo del año 2010, la producción alcanzó una cifra de 6.4 millones de cabezas distribuidas principalmente en la zona centro (55%), centro-norte (23%) y sur (16%) del país (Martínez *et al.*, 2010). En la zona centro norte predomina la raza Rambouillet; mientras que en la zona centro se encuentran principalmente las razas Hampshire, Suffolk y Dorset y en las zonas tropicales y subtropicales prevalecen principalmente los ovinos de pelo de las razas Pelibuey y Black Belly (SAGARPA, 2002). Recientemente se han introducido al país razas como: Katahdin, Dorper, Damara, Romanov, East Friesian, Ille de France, Corriedale, Charollais, Texel, entre otras (Arteaga, 2003). La producción ovina ha tenido un auge importante en los últimos años, registrándose un sustancial incremento que se aprecia al pasar de 29, 887 ton en 1995 a 51, 396 ton en 2008 (SIAP, 2008). Actualmente la producción ovina vislumbra un futuro promisorio ya que al mejorar las condiciones de alimentación a través de un manejo adecuado de praderas, la alimentación suplementaria, y al mejorar las condiciones sanitarias la actividad ovina se ha consolidado como una actividad económicamente importante (FAO, 2010).

1.3. Raza Santa Cruz

El ovino de la raza Santa Cruz es de color blanco sólido de conformación cárnica, no posee cuernos, de tamaño mediano, tiene una alta prolificidad, rusticidad y adaptabilidad a cualquier medio, soportan altas temperaturas y humedad (Godfrey y Weis, de la Isla de Saint Croix en las

Bahamas, esta variedad de ovinos de pelo ha tenido un especial crecimiento en las regiones norteñas de México, en los Estados de Nuevo León y Tamaulipas y recientemente en la zona del Bajío (Figura 1).



Figura 1. Ovino de la raza Santa Cruz. (Fuente: Vroegh, 1996).

Son animales de formas redondeadas, con buenas masas musculares y con un cierto crecimiento de “lanilla” en el lomo durante los meses de invierno, misma que desaparece al iniciarse la época de calor. El ovino de la raza Santa Cruz presenta una elevada tasa reproductiva y son buenas madres, su talla es media, siendo el peso promedio de las borregas adultas de unos 45 kg y de los sementales 67-75 kg (Lara-Pastor, 2007).

1.4. Factores que limitan la producción ovina

A pesar de que la ovinocultura nacional ha ganado terreno en la producción con respecto a otros años; existen factores que de alguna manera limitan su potencial y que necesitan ser enfrentados. Dentro de los principales problemas que afectan a la producción ovina nacional se encuentran en primer lugar los altos costos de los alimentos, seguidos de la falta de disponibilidad de pastos de

alta calidad nutricional y una mala calidad genética (Kunene *et al.*, 2011). Aunado a esto existen problemas de sanidad animal originados por agentes infecciosos que disminuyen de manera considerable el potencial zootécnico de los animales. Tal es el caso de las enfermedades parasitarias, causadas por un grupo de nematodos que provocan una gastroenteritis parasitaria y que pueden conducir a la muerte de los animales (Macedo-Barragán *et al.*, 2009).

1.5. Las parasitosis como un problema de gran importancia en salud animal

Las parasitosis es uno de los principales problemas que afectan la salud de los ovinos y esto se refleja en la productividad, estas infecciones son causadas principalmente por parásitos nematodos gastrointestinales (*ngi*) (Vázquez-Prats, 2004; Hoste *et al.*, 2011). Los *ngi* constituyen uno de los problemas sanitarios más frecuentes en las explotaciones ovinas de tipo extensivo, principalmente en las que el pastoreo y las praderas constituyen la base de la alimentación. Estas afecciones son más frecuentes durante la época de lluvia, en la pradera pastoreando durante las primeras horas de la mañana, con altas cargas de animales (Mederos *et al.*, 2010). Generalmente, el cuadro clínico incluye diarrea intermitente de color café oscuro, emaciación, mucosas pálidas y presencia de edema submaxilar (Macedo-Barragán *et al.*, 2009). En los sistemas de producción animal, el impacto económico causado por los *ngi* se refleja en los animales como retraso del crecimiento, desnutrición, baja conversión alimenticia, pérdida del apetito, llegando incluso a causar la muerte. La importancia del impacto económico causado por los *ngi* varía de acuerdo con las condiciones climatológicas en los diferentes sistemas de producción. Los *ngi* que afectan a los rumiantes pertenecen a la Familia Trichostrongylidae, dentro de los géneros importantes se encuentran: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus columbriformis* y *Oesophagostomum columbianum*, tienen un ciclo de vida directo (Khalafalla *et al.*, 2011).

1.6. Impacto económico de las parasitosis gastrointestinales en la producción ovina

Las pérdidas económicas debidas a las enfermedades parasitarias ocasionadas por *ngi*, pueden ser cuantiosas, no sólo por la mortalidad, sino por la disminución de la capacidad productiva de los animales, ya que en los animales productivos los *ngi* reducen la producción de carne, lana y otros productos para el consumo y uso humano. Las pérdidas en relación con la presencia de parásitos en los animales de interés zootécnico a nivel mundial fueron de 2.28 billones de dólares al año, lo que representa un 10% del valor de la producción (Orihuela y Vázquez-Prats, 2008).

En México, no se cuenta actualmente con un estudio preciso que haya estimado el impacto económico causado por las parasitosis gastrointestinales en ovinos. En el CONASA se está actualmente preparando una propuesta nacional para llevar a cabo un diagnóstico del impacto económico por concepto de las parasitosis internas del ganado (Torres Acosta y Mendoza de Gives, 2011, -Comunicación personal-*); no obstante debido a los estragos en la salud y el deterioro general de los animales, hace pensar en pérdidas de una gran magnitud económica en nuestro país. En otros países como en la Gran Bretaña se han estimado gastos importantes de más de 84 millones de dólares anuales por el uso de antihelmínticos (Nieuwhof y Bishop, 2005).

1.7. Métodos de control de las parasitosis gastrointestinales

1.7.1. Quimioterapia

Hasta ahora el principal método de control de los *ngi* es mediante la utilización de medicamentos de origen químico (antihelmínticos), el uso indiscriminado ha desencadenado a nivel mundial el fenómeno de la resistencia antihelmíntica (Molento, 2009; Glendinning *et al.*, 2011). Debido al creciente desarrollo de la resistencia antihelmíntica es necesario investigar nuevas estrategias alternativas al control químico de los *ngi*. Aunado a esto, en años recientes se ha puesto mucho

*Miembros del Comité de Parasitología del Comité Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA).

énfasis a nivel mundial en disminuir el uso de medicamentos de origen químico en los animales para consumo humano, ya que los productos y subproductos pueden contener residuos químicos contaminantes además de amenazar al ambiente ya que algunos medicamentos pueden ser eliminados en su forma activa junto con las heces poniendo en riesgo a organismos benéficos (Dobson *et al.*, 2011).

1.8. Resistencia antihelmíntica

La resistencia a los antihelmínticos es un fenómeno de selección genética, donde el, o los genes que le confieren resistencia a los nematodos se presentan en una población parasitaria para sobrevivir ante la acción letal de un compuesto químico antihelmíntico. Bajo estas circunstancias, la resistencia surge como una mutación resultado de la selección a través de una serie repetida de exposiciones de la población parasitaria a un antihelmíntico: esta resistencia se puede definir como una reducción heredable de la sensibilidad de una población de parásitos a la acción del fármaco (López-Arellano *et al.*, 2010). La resistencia antihelmíntica es un problema que debe ser diagnosticado a tiempo y buscar la manera de frenar la diseminación pues algunos países han experimentado brotes fatales de nematodiasis asociadas a la resistencia antihelmíntica (Molento *et al.*, 2011).

1.9. Alternativas de control diferentes a los químicos

Dentro de las alternativas que están siendo investigadas para el control de *ngi* se encuentra: a) La producción de vacunas contra helmintos (Zhao *et al.*, 2011; Knox, 2011); b) La inmunonutrición (Hoste *et al.*, 2008); c) La selección de animales genéticamente resistentes a los *ngi* (Díaz-Rivera *et al.*, 2000; Alba-Hurtado *et al.*, 2010); d) La suplementación proteica en la dieta (Cabrera-Núñez *et al.*, 2007; Chandrasekharaiah *et al.*, 2011); e) La utilización de partículas de cobre; f) el uso de taninos condensados (Galindo-Barboza *et al.*, 2011); g) El uso de extractos de plantas (De Jesús-

Gabino *et al.*, 2010; De Oliveira *et al.*, 2011) y h) El control biológico basado en el uso de enemigos naturales de las larvas en el medio ambiente, del cual se abordará ampliamente en el desarrollo de la presente investigación.

1.10. Resistencia genética en ovinos hacia las parasitosis gastrointestinales

Dentro de las diferentes razas ovinas en el mundo existen diferencias muy marcadas en sus comportamientos nutricionales, fisiológicos, metabólicos, reproductivos y de resistencia o rusticidad ante circunstancias adversas del ambiente (Zavala-Elizarraraz *et al.*, 2008; Vilaboa-Arroniz *et al.*, 2010). En ovinos se han encontrado diferencias entre razas en la resistencia a la hemoncosis, como por ejemplo en ovinos Florida Native (Radhakrishnan *et al.*, 1972; Díaz-Rivera *et al.*, 2000), en ovinos de la raza Scottish Blackface (Altaif y Dargie, 1978), Barbados Blackbelly (Courtney *et al.*, 1985), Saint Croix (Gamble y Zajac, 1992) y Red Maasai (Mugambi *et al.*, 1997). Los estudios sobre la selección de animales genéticamente resistentes a los *ngi* se han realizado principalmente en Australia y Nueva Zelanda con ovinos Romney Marsh (Baker *et al.*, 1991). En un estudio realizado por Courtney *et al.* (1985), se comparó la resistencia a una primera y segunda infección experimental con *H. contortus* en corderos Saint Croix, $\frac{3}{4}$ Saint Croix, Florida, Blackbelly y cruzados de razas domésticas, los parámetros evaluados fueron número de parásitos adultos, huevos por gramo en heces y volumen celular aglomerado (hematocrito). Los resultados que encontraron fueron que los corderos de la raza Saint Croix y $\frac{3}{4}$ Saint Croix fueron más resistentes en la segunda infección, los Florida y Blackbelly fueron intermedios y los corderos domésticos los menos resistentes. Los ovinos y caprinos nativos del África son más resistentes que los introducidos y que los animales cruzados son los mejores que las razas puras. Esto ocurre como resultado de la adaptación y el desarrollo de mecanismos de inmunidad que resultan de la infección continua y prolongada a la que han expuesto a los

animales nativos por años en su lugar de origen (Baker, 1994). Otros ovinos considerados resistentes a la enfermedad han sido los pertenecientes a la raza Santa cruz, quienes mostraron en varios estudios realizados tanto con infestaciones naturales, como con infecciones experimentales menores cargas parasitarias (Gamble y Zajac, 1992). Algunas poblaciones de corderos de la raza Santa Cruz han sido reportadas como resistentes a infecciones naturales e inducidas por *H. contortus* manifestando hasta un 99% menos de parásitos adultos en abomaso en comparación con corderos Dorset (Courtney *et al.*, 1985; Zajac *et al.*, 1990; Gamble y Zajac, 1992).

1.11. Efecto de la nutrición sobre la resistencia a las parasitosis en ovinos

Los pequeños rumiantes poseen mecanismos de defensa en contra de una gran variedad de patógenos, incluyendo a los parásitos. El sistema inmunológico de los animales es el encargado de generar respuestas de defensa ante una invasión parasitaria mediante la producción de linfocitos y una variedad de células y sustancias conocidas como leucinas producidas por estas células, una vez que se han detectado antígenos eliminados por los parásitos. Dichas células conforman un complejo de defensa en contra de los parásitos (Aguilar-Caballero *et al.*, 2008; Bautista-Garfias, 2009). Para la formación de las moléculas encargadas de generar una respuesta inmune protectora, se requiere de proteínas que dan origen a las células de defensa del organismo; por tal motivo, existe una importante correlación directa entre la calidad y cantidad de nutrientes en la dieta de los animales y la respuesta inmunológica protectora en contra de una gran variedad de parásitos incluyendo a los *ngi* (Hoste *et al.*, 2005, 2008). Por tal motivo, dentro de las medidas que han sido consideradas como cruciales para minimizar los estragos causados por los nematodos parásitos en el rebaño, se menciona una buena nutrición basada principalmente en un balance de proteína y energía metabolizable que ayuda considerablemente a mejorar la

inmunidad de los animales y que se manifiesta como una reducción en la cuenta de huevos de nematodos eliminados por gramo de heces (Aguilar-Caballero *et al.*, 2008).

1.12. Control biológico

Grønvold *et al.* (1996) definen al control biológico como un método ecológico diseñado por el hombre para disminuir las poblaciones parasitarias a un nivel subclínico aceptable, conservando estas poblaciones en un nivel no perjudicial gracias a organismos antagonistas o enemigos vivos naturales. Resulta fundamental entender que el control biológico como una medida reguladora cuyo objetivo no es acabar con el organismo blanco, sino controlar su población para reducir sus efectos nocivos (Larsen, 2000), diferenciándose de los compuestos antihelmínticos, que fueron elaborados con el propósito de eliminar la totalidad de los parásitos (*ngi*) del animal.

1.13. Enemigos naturales

El suelo es un hábitat donde diversos grupos taxonómicos de organismos comparten un mismo espacio estableciéndose entre ellos diferentes asociaciones biológicas (Mendoza de Gives *et al.*, 1999). Los nematodos en el suelo tienen varios enemigos naturales, dentro de los principales enemigos de los nematodos en el suelo se encuentran diversos grupos de organismos incluyendo: protozoarios, virus, turbelarios, insectos, ácaros, tardígrados, nematodos depredadores de otros nematodos, bacterias y hongos nematófagos (Duddington, 1955; Mendoza de Gives *et al.*, 1999; Palizi *et al.*, 2009).

1.14. Protozoarios

Dentro de los protozoarios se encuentra una ameba llamada *Theratromyxa weberi*, que fue descrita por Weber y Paramonov en 1954 y que pertenece al Orden Proteomayxida. La Familia Vampyrellidae, fue aislada a partir de muestras de suelo. La ameba *T. weberi* se ha evaluado en

contra de nematodos fitopatógenos como *Meloidogyne incognita* y *Aphelenchoides rutgersi* y se ha considerado como un posible agente de control biológico (Sayre, 1973; Sayre y Wergin, 1989) (Figura 2).

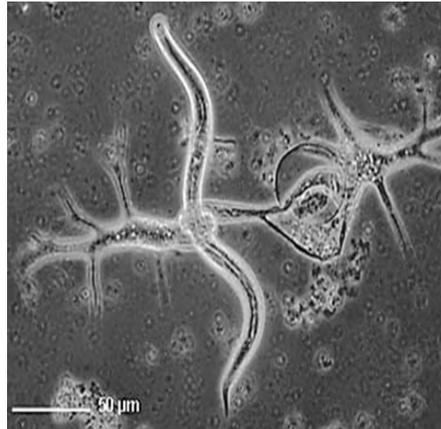


Figura 2. Microfotografía mostrando el aspecto de una ameba de la especie *Theratromyxa weberi*, enquistando a un nematodo (Fuente: Sayre y Wergin, 1989).

1.15. Bacterias

Existe un grupo de bacterias consideradas como enemigos naturales de nematodos parásitos de animales, plantas y de importancia en salud pública, se encuentran abundantemente en el suelo y presentan diferentes mecanismos de acción como la producción de toxinas, antibióticos y enzimas, compiten por nutrientes e inducen resistencia sistémica promoviendo la salud en las plantas (Baoyu *et al.*, 2007). Algunas bacterias han exhibido una actividad letal para nematodos de diferentes grupos taxonómicos, dentro estas bacterias se han identificado a *Microbacterium nematophilum* (Hodgkin *et al.*, 2000), *Bacillus thuringiensis* (Vázquez-Pineda *et al.*, 2011) y *Pasteuria penetrans* (Mendoza de Gives *et al.*, 1999).

1.15.1. *Microbacterium nematophilum*

La bacteria *Microbacterium nematophilum* fue observada inicialmente como un contaminante en cultivos del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*. Los nematodos infectados con esta

bacteria presentaban la parte posterior inflamada con una tensión variable en la que el crecimiento bacteriano había formado un tapón en el intestino. Posteriormente identificaron a la bacteria como *M. nematophilum*, el mecanismo de infección por *M. nematophilum* inicia con la adherencia a la cutícula rectal y post-anal de nematodos susceptibles y posteriormente inducen la inflamación local del tejido hipodermal subyacente. La inflamación local, lleva al estreñimiento y al crecimiento retardado en nematodos de *C. elegans* infectados (Hodgkin *et al.*, 2000) (Figura 3).

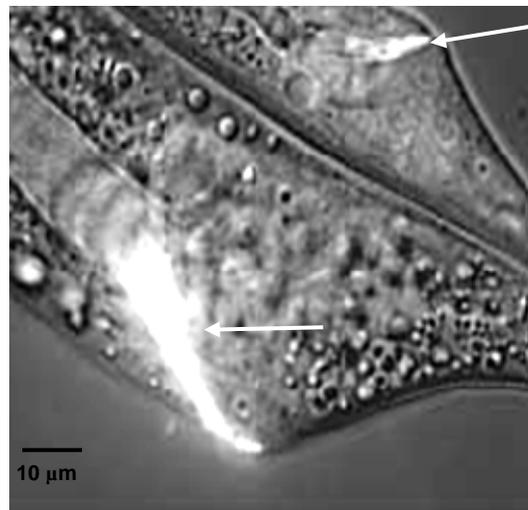


Figura 3. Microfotografía mostrando la parte anterior de dos nematodos de la especie *Caenorhabditis elegans*, infectados por la bacteria *Microbacterium nematophilum*. En la parte superior se encuentra una larva del 4º estadio de desarrollo y en la parte inferior se aprecia un espécimen adulto del nematodo. En ambos casos se aprecia un tapón bacteriano luminoso a través de epifluorescencia (Fuente: Hodgkin *et al.*, 2000).

1.15.2. *Bacillus thuringiensis*

Dentro del grupo de bacterias antagónicas de nematodos se encuentra *Bacillus thuringiensis* (Bt) que es una bacteria Gram-positiva, aerobia estricta, que durante su ciclo de vida presenta dos fases principales de desarrollo: 1) crecimiento vegetativo, donde las bacterias se duplican por bipartición, y 2) esporulación, un programa de diferenciación de bacteria a espora. Bt es

considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas, como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos y telarañas (Soberón y Bravo, 2008) (Figura 4).

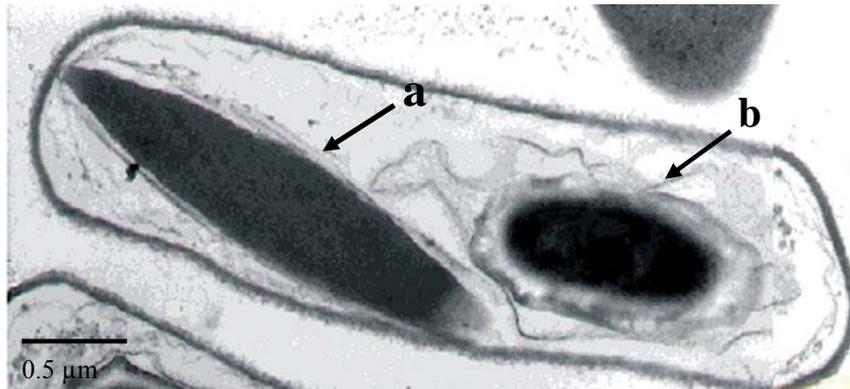


Figura 4. Microfotografía tomada en un microscopio electrónico de transmisión, mostrando el cristal proteico romboide compuesto de toxinas Cry (a) y una espora en proceso de formación en el interior de una célula vegetativa de *Bacillus thuringiensis* (b) (Fuente: Soberón y Bravo, 2008).

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* se caracterizan por producir un cuerpo para-esporal conocido como cristal durante su fase de esporulación, el cual es de naturaleza proteica y tiene propiedades insecticidas.

El cristal proteico está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry ó Cyt. Se han encontrado δ -endotoxinas activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y también contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Soberón y Bravo, 2008). Del mismo modo se han encontrado algunas cepas de esta bacteria que ejercen un efecto letal en contra de diversos estadios de desarrollo de algunos nematodos parásitos de animales (Vázquez-Pineda *et al.*, 2011).

1.15.3. *Pasteuria penetrans*

La bacteria *Pasteuria penetrans* es una bacteria endoparásita no móvil, obligada, Gram-positiva de nematodos parásitos de plantas y pulgas de agua (*Daphnia* spp.; Cladocera: Anomopoda). Esta bacteria produce endosporas que miden entre 1.0-3.0 μm , son de forma obleada, esferoide y elipsoidal (Charles *et al.*, 2005). Las especies del género *Pasteuria* son: *P. penetrans*, *P. thornei*, *P. nishizawae*, *P. usgae*, *P. hartismeri* y estudios recientes se han encontrado dos especies más *Pasteuria ramosa* que infecta a *Daphnia* spp. (Ebert *et al.*, 1996) y *Pasteuria penetrans* que infecta nematodos parásitos de plantas, como *Meloidogyne* spp. que es un fitoparásito que forma agallas en la raíz de diferentes plantas como jitomate, pepino y chile (Davies, 2009). Todas se encuentran distribuidas a nivel mundial. Se ha observado que *Pasteuria*-like infecta a algunos parásitos de plantas, a nematodos de vida libre y a nematodos entomopatógenos (El-Boray, 2002). Esta bacteria produce endosporas que se adosan en la pared cuticular de algunas especies de nematodos, penetrando su pared cuticular y causan diversos estragos en los nematodos que conducen a disminuir su poder infectivo y su patogenicidad en los nematodos parasitados (Davies, 2009) (Figura 5).

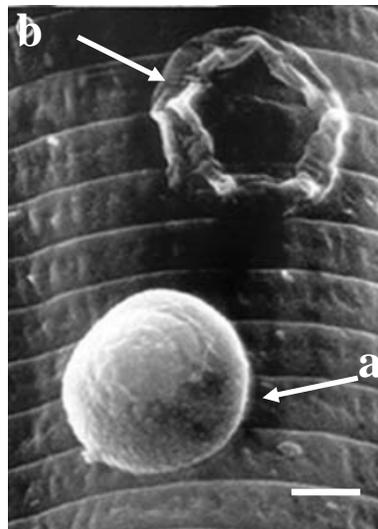


Figura 5. Microfotografía tomada al microscopio de barrido mostrando una endospora de la bacteria *Pasteuria penetrans* adosada a la cutícula del nematodo *Meloidogyne incognita* (J₂) (a) y un orificio causado por otra endospora de esta especie (barra=1 μm) (b) (Fuente: Davies, 2009).

1.16. Ácaros

Los ácaros nematófagos han sido considerados como enemigos naturales de los nematodos (Bilgrami, 1994). En la naturaleza existen diversos ácaros nematófagos los que se les encuentra viviendo en el suelo en forma libre y dentro de su dieta normal requieren alimentarse de diversos organismos entre los que se encuentran los nematodos. Con la finalidad de alimentar a los ácaros y mantener colonias de manera abundante, se han utilizado con éxito nematodos del tipo rhabdítidos ó tylénquidos (Singh y Rodríguez, 1966).

Entre los ácaros que se han utilizado con éxito en el control biológico de nematodos parásitos de plantas, se ha mencionado a algunos miembros de la familia Macrochelidae (Quintero-Martínez, 1996; Krantz, 1998). También se ha identificado al género *Lasioseius* como una especie depredadora (Christian y Karg, 2006). Imbriani y Mankau en 1983, reportaron que esta especie se alimenta de nematodos del suelo (Figura 6).

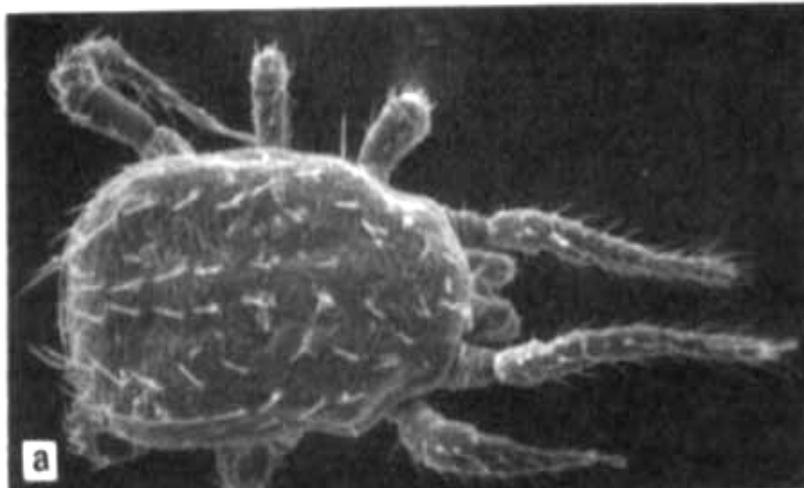


Figura 6. Microfotografía mostrando la parte dorsal de un ácaro depredador del género *Lasioseius* sp. (X150) (Fuente: Sayre y Walter, 1991).

1.17. Tardígrados

Los tardígrados constituyen un Phylum de invertebrados protóstomos segmentados microscópicos (Beltrán-Pardo y Bernal-Villegas, 2009) que en condiciones normales se alimentan de plantas y han sido reportados como antagonistas naturales de nematodos parásitos de plantas, como *Meloidogyne incognita*, *Ditylenchus dipsaci* y *Panagrellus redivivus* (Sayre, 1969). Asimismo, se ha identificado al tardígrado *Hypsibius myrops* du Bois Reymond Marcus, 1944 (Sayre y Walter, 1991). Existe la hipótesis de que estos organismos utilizan a los nematodos para obtener sus nutrientes (Figura 7).

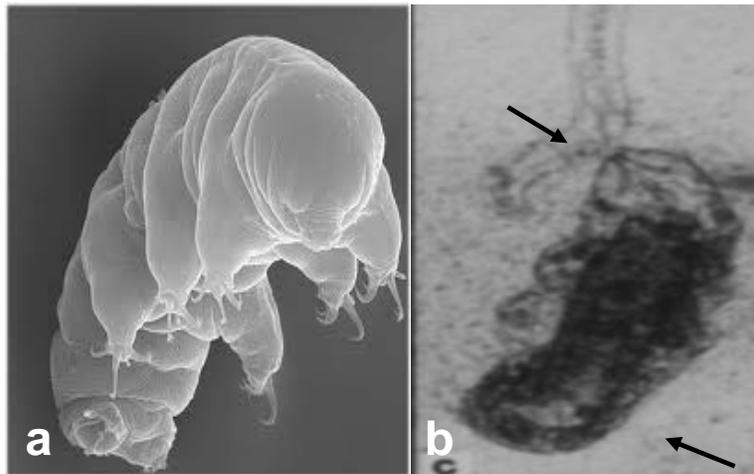


Figura 7. Microfotografías mostrando a un Tardígrado del género *Hypsibius* sp. (a), alimentándose de un nematodo (b) (X375). (Fuente: Sayre y Walter, 1991).

1.18. Nematodos depredadores

Existe un grupo de nematodos depredadores que presentan diferentes mecanismos de acción para depredar a nematodos presa y utilizarlos como principal fuente de alimentación (Bilgrami y Brey, 2008) (Figura 8).

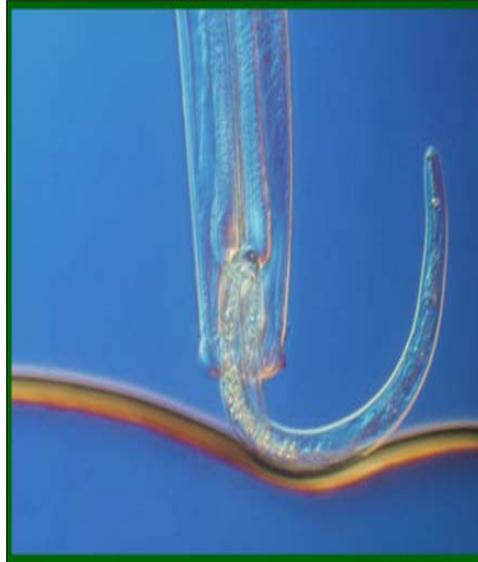


Figura 8. Aspecto de un nematodo depredador del género *Mononchus* sp. alimentándose de un nematodo fitopatógeno *Pratylenchus* sp. (10X) (Foto proporcionada por el Dr. Anwar Bilgrami).

Dentro de este grupo de nematodos se encuentran a los Dorylaimidos, a los Mononquidos y a los Diplogastéridos que en trabajos recientes han demostrado poseer un importante potencial para destruir nematodos parásitos de animales y podría llegar a tener un impacto en el control de las enfermedades parasitarias del ganado causadas por nematodos del tracto digestivo de los rumiantes (Rodríguez-Esparza *et al.*, 2007; Vázquez de Jesús, 2009).

1.19. Hongos

Los hongos nematófagos han sido considerados dentro de los principales enemigos naturales de los nematodos. Se conocen aproximadamente 150 especies de hongos que se alimentan de nematodos en la naturaleza (Barron, 1977). Estos microorganismos, poseen la capacidad para desarrollar órganos especializados para capturar y destruir a los nematodos (Duddington, 1955). Dentro de estos órganos se encuentran anillos, ramas, conidios y esporas adhesivas, que sirven para capturar y posteriormente, digerir al parásito (Barron, 1977).

Algunas especies de hongos nematófagos como *Duddingtonia flagrans* son capaces de producir espontáneamente en gran cantidad estructuras llamadas clamidosporas que son estadios de resistencia de estos hongos y les confieren una mayor capacidad de sobrevivir después de su paso a través del tracto gastrointestinal de rumiantes, sin perder su actividad depredadora contra nematodos (Llerandi-Juárez y Mendoza de Gives, 1998; Ojeda-Robertos *et al.*, 2009) (Figura 9).

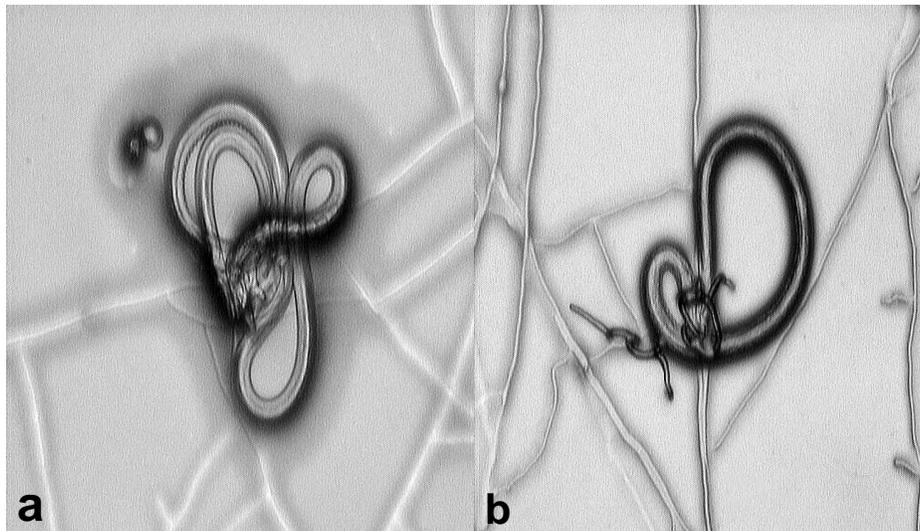


Figura 9. (a-b) Microfotografías mostrando a una larva infectante de *Haemonchus contortus* atrapada por los anillos tridimensionales del hongo nematófago (*Duddingtonia flagrans*) cepa mexicana (FTOH-8) (X10) (Fotografías originales tomadas por la autora de la presente Tesis).

Se han reportado resultados exitosos en el uso de hongos nematófagos en el control de parásitos de ovinos. El tratamiento oral con clamidosporas del hongo *D. flagrans* en ovinos ha dado como resultado una sustancial reducción en el número de larvas de los nematodos gastrointestinales en las heces (Mendoza de Gives, 1998; Arroyo-Balán *et al.*, 2008). Esta metodología sirve como un método de control biológico indirecto, ya que rompe el ciclo biológico de los parásitos a nivel de heces e impide la diseminación de la infección al resto del pastizal (Mendoza de Gives *et al.*, 2006; Casillas-Aguilar *et al.*, 2008). El estudio de los enemigos naturales de nematodos puede llegar a tener un importante uso potencial y ser considerados como una herramienta útil en el

control de las nematodiasis causadas por los *ngi* en rebaños ovinos del país; sin embargo, hasta ahora se desconocen diversos aspectos sobre su interacción con nematodos de importancia en la industria ovina. Por lo expuesto anteriormente, resulta necesario profundizar el estudio de estos aspectos considerando, no sólo el efecto de los agentes de control biológico sobre los parásitos; sino también tomar en cuenta la respuesta en los animales de producción.

1.20. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Caballero, A.J., Torres-Acosta, J.F.J., Cámara, Sarmiento, R., Hoste, H., Sandoval-Castro, C.A. 2008. Immunity against gastrointestinal nematode: the goat history. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.9:73-82.
- Alba-Hurtado, F., Romero-Escobedo, E., Muñoz-Guzmán, M.A., Torres-Hernández, G., Becerril-Pérez, C.M. 2010. Comparison of parasitological and productive traits of Criollo lambs native to the central Mexican Plateau and Suffolk lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 172:277-282.
- Altaif, K.I., Dargie, J.D. 1978. Genetic resistance to helminths: the influence of breed and haemoglobin type on the response of sheep to re-infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 77:177-187.
- Arroyo-Balán, L.F., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, Ma. E., Liébano-Hernández, E. Vázquez-Prats, V.M., Miranda-Miranda, E., Ortiz de Montellano-Nolasco, A.M. 2008. Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina bajo condiciones controladas. *Técnica Pecuaria en México*. 46(2):217-223.

- Arteaga, C.J.D. 2003. La industria ovina en México. *In: Memorias del primer Simposio Internacional de ovinos de carne. Desafíos y oportunidad para la ovinocultura en México ante los nuevos esquemas de mercado abierto.* Pachuca Hidalgo.pp: 1-7.
- Arteaga-Castelán, J.D. 2010. Diagnóstico actual de la situación de los ovinos en México. *Revista del borrego*.pp:46-48.
- Baker, R.L., Lahlou-Kassi, A., Rege, J.E.O., Reynolds, L., Bekele, T., Mukassa-Mugerwa, E., Rey, B. 1991. A review of genetic resistance to endoparasites in small ruminants and an outline of ILCA's research programme in this area. *In: Proceedings of the Tenth Scientific Workshop of the Small Ruminant Collaborative Research Support Program (SR-CRSP), Nairobi, Kenya.* SR-CRSP, Nairobi, Kenya.pp:79-104.
- Baker, R.L., Mwamachi, D.M., Audho, J.O., Thorpe, W. 1994. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Red Maasai sheep in Kenya. *In: Smith C., Gavora J. S., Benkel B., Chesmais J., Fairfull W., Gibson J.P., Kennedy B.W., Burnside E.B. (Eds.), Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph, Canada, 7-12 August 1994.* Volume 20. International Committee for World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph, Ontario, Canada. pp: 277-280.
- Baoyu, T., Yang, J., Zhang, K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of actions and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*.61:197-213.

- Barron, G.L. 1977. The nematode-destroying fungi. Topics in Mycobiology, No 1, Canadian Biological Publications, LTD., Guelph, Canada. pp: 140.
- Bautista-Garfias, C.R. 2009. Helminths parasites of veterinary importance: regulation of the immune response of the carrier and its potential use for the treatment of inflammatory diseases. *Veterinaria México*. 40(3):283-291.
- Beltrán-Pardo, E., Beltrán-Villegas, J. Acercamiento a los estudios actuales sobre el Filo Tardigrada y su importancia en la medicina. Universidad Médica Bogotá (Colombia). 50(3):380-403.
- Bilgrami, A.L., Brey, C. 2008. Potential of predatory nematodes to control plant parasitic nematodes. In: Nematodes as biocontrol agents. Grewal PS, Ehlers RU, Shapiro-Ilan DI. (Eds.). Cab Publishing, Cambridge Editorial. UK. p: 590.
- Bilgrami, A.L. 1994. Predatory behavior of a nematode feeding mite *Tyrophagus putrescentiae* (Sarcoptiformes: Acaridae). *Fundamental and Applied Nematology*. 17 (4):293-297.
- Cabrera-Núñez, A., Rojas-Mencio, P., Daniel-Renteria, I., Serrano-Solís, A., López-Ortega, M. 2007. Influencia de la suplementación sobre la ganancia de peso y calidad de la canal en borregos Dorper/Katahdin. *UDO Agrícola*. 7(1):245-251.
- Casillas-Aguilar, J.A., Mendoza de Gives P., López-Arellano, Ma. E., Liébano-Hernández, E. 2008. Evaluation of Multi-nutritional Bio-pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Annals of the New York Academy of Science*. 1149:161-163.

- Chandrasekharaiah, M., Thulasi, A., Sampath, K.T., Chandrasekharaiah, M., Thulasi, A., Sampath, K.T. 2011. Microbial protein synthesis, nitrogen capture efficiency and nutrient utilization in sheep fed on finger millet straw (*Eleusine coracana*)-based diet with different rumen-degradable nitrogen levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(8):1505-1510.
- Charles, L., Carbone, I., Davies, K.G., Bird, D., Burke, M., Kerry, B.R. 2005. Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by use of multiple genetic loci. *Journal of Bacteriology*. 187:5700-5708.
- Christian, A., Karg, W. 2006. The predatory mite *Lasioseius* Berlese, 1916 (Acari, Gamasina). *Abhandlungen Berichte Naturkundemus Görlitz*. Görlitz, Germany. pp: 99-25.
- Courtney, C.H., Parker, C.F., McClure, K.E., Herd, R.P. 1985. Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 15(9):101-109.
- Cuellar, O.F.2007. Control no farmacológico de parásitos en ovinos. Nematodos gastroentéricos. *In:Memorias V Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*, Mendoza, Argentina. pp: 13-33.
- Davies, K.G.2009. Understanding the interaction between an obligate hyperparasitic bacterium. *Pasteuria penetrans* and its obligate plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne* spp. *In: Advances in Parasitology. Plant Pathology and Microbiology*, Rothamsted Research, Harpenden, United Kingdom. Elsevier Ltd. pp: 211-245.

- De Jesús-Gabino, A.F., Mendoza de Gives, P., Salinas-Sánchez, D.O., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E., Hernández-Velázquez, V.M., Valladares-Cisneros, G. 2010. Anthelmintic effects of *Prosopis laevigata*-hexanic extract against *Haemonchus contortus* in artificially infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Helminthology*. 84:71-75.
- De la Cruz-Moreno. 2007. Razas lanares en el centro de la República. *Revista del Borrego*.p: 46.
- De Lucas, T.J., Arbiza-Aguirre, S.I. 2000. Producción ovina en el mundo y México. (Eds.) Mexicanos Unidos. 1ª Edición. pp: 11-12.
- De Lucas, T.J. 2008. Factores que determinan el consumo humano de carne ovina en México. *Revista del Borrego*. 50:5-8.
- De Oliveira, L.M., Bevilaqua, C.M., Macedo, I.T., De Moraes, S.M., Machado, L.K., Campello, C.C., De Aquino-Mesquita, M. 2011. Effects of *Myracrodruon urundeuva* extracts on egg hatching and larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*. 109(3):893-8.
- Díaz-Rivera, P., Torres-Hernández, G., Osorio-Arce, M., Pérez-Hernández, P., Pulido-Albores, A.R., Becerril-Pérez, C.M., Herrera-Haro, J.G. 2000. Resistencia a parásitos gastrointestinales en ovinos Florida, Pelibuey y sus cruzas en el Trópico Mexicano. *Agrociencia*. 34:13-20.
- Dobson, R., Hosking, B., Besier, R., Love, S., Larsen, J., Rolfe, P., Bailey, J. 2011. Minimizing the development of anthelmintic resistance, and optimizing the use of the novel

anthelmintic monepantel, for the sustainable control of nematode parasites in Australian sheep grazing systems. *Australian Veterinary Journal*. 89(5):160-6.

Duddington, C.L. 1955. Fungi that attack microscopic animals. *Botanical Review*. 21:377-439.

Ebert, D., Rainey, P., Embley, T.M., Scholz, D. 1996. Development life cycle, ultrastructure and phylogenetic position of *Pasteuria ramose* Metchnikoff 1888: rediscovery of an obligate endoparasite of *Daphnia magna* Straus. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*. 351:1689-1701.

El-Borai, F.E., Duncan, L.W., Dunn, D. A *Pasteuria*-like organism on an entomopathogenic nematode parasite of *Diaprepes abbreviatus*. In: Fourth International Congress of Nematology. 8-13 June 2002. Editors: Brill, Leiden, Boston, Koln. City Tenbel-La Galletas, Arona, Tenerife, Canary Islands, Spain.

FAO, 2010. Potential integration of small ruminants with tree-cropping systems in Asia and the South Pacific. *FAO Animal Productions and Health Paper*. Asia and the South Pacific. <http://www.fao.org/docrep/T8600T/t8600T0a.htm>.

FAO, 2004. Carne y productos cárnicos. Roma, Italia. <http://www.fao.org/docrep/007/j3877s/j3877s08.htm>

Galindo-Barboza, A.J., Torres-Acosta, J.F., Cámara-Sarmiento, R., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Ojeda-Robertos, N.F., Reyes-Ramírez, R., España-España, E. 2011. Persistence of the efficacy of copper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 176(2-3): 201-7.

Gamble, H.R., Zajac, A.M. *Veterinary Parasitology*. 41:211-225.

- Glendinning, S.K., Buckingham, S.D., Sattelle, D.B., Wonnacott, S., Wolstenholme, A.J. 2011. Glutamate-Gated Chloride Channels of *Haemonchus contortus* Restore Drug Sensitivity to Ivermectin Resistant *Caenorhabditis elegans*. PLoS One. 7:155-76.
- Godfrey, R.W. Weis, A.J. 2005. Post-destete el crecimiento y características de la canal de Santa Cruz Blanca y Dorper x San Croix corderos alimentados con una dieta blanca se concentran en las Islas Vírgenes de los EE. UU. Oveja Cabra Research Journal. 20:32-36.
- Grønvold, J., Nansen, P., Henriksen, S.A., Larsen, M., Wolstrup, J., Bresciani, J. 1996. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamyospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. Journal of Helminthology. 70:291-297.
- Hodgkin, J., Kuwabera, P.E., Corneliussen, B. 2000. A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*. Current Biology. 10(24):1615-1618.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F., Paolini, V., Aguilar-Caballero, A., Etter, E., Lefrileux, Y., Chartier, C., Broqua, C. 2005. Interaction between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. Small Ruminant Research. 60:141-151.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J. 2008. Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? Parasite Immunology. 30(2):79-88.
- Hoste, H., Sotiraki, S., Torres-Acosta, J.F. 2011. Control of endoparasitic nematode infections in goats. Veterinary Clinic North America Food Animal Practice. 27(1):163-73.

- Imbriani, J.L., Mankau, R. 1983. Studies on *Lasioseius scapulatus*, a mesostigmatid mite predaceous on nematodes. *Journal of Nematology*. 15(4):523-528.
- Khalafalla, R.E., Mahmoud, A.E., Nasr, M.E. 2011. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematode parasites of sheep in Northern region of Nile Delta, Egypt. *Parasitology Research*. 108(2):337-340.
- Krantz, G.W. 1998. Reflections on the biology, morphology and ecology of the Macrochelidae. *Experimental and Acarology*. 22:125-137.
- Knox, D. 2011. Proteases in blood-feeding nematodes and their potential as vaccine candidates. *Advances in Experimental Medicine Biology*. 712:155-76.
- Kunene, N.W., Bezuidenhout, C.C., Nsahlai, I.V., Nesamvuni, E.A. 2011. A review of some characteristics, socio-economic aspects and utilization of Zulu sheep: implications for conservation. *Tropical Animal Health and Production*. 43:1075-1079.
- Lara-Pastor, S.J. 2007. Producción de Ovinos de Pelo en el país. *La revista del borrego*. p: 46.
- Larsen, M. 2000. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*. 120:121-31.
- Llerandi-Juárez, JRD., Mendoza de Gives, P. 1998. Resistance of nematophagous fungi chlamydospores to the digestive processes of sheep in Mexico. *Journal of Helminthology*. 72:155-158.
- López Arellano, M.E., Mendoza de Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., Liébano-Hernández, E. 2010. Buenas prácticas en el manejo de antihelmínticos para el control de parásitos en

rumiantes. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Folleto Técnico No. 8. pp: 1-38.

Macedo-Barragán, R., Arredondo-Ruiz, V., Ramírez-Rodríguez, J., García-Márquez, L.J. 2009. ¿Envenenamiento por consumo de *Asclepias curassavica* o nematodiasis gastrointestinal en ovinos de pastoreo? Hallazgos de un estudio de caso. *Veterinaria México*. 40(3): 271-281.

Martínez, G.S., Aguirre, O.J., Jaramillo, L.E., Macías, C.H., Carrillo, D.F., Herrera, G.M.T., Pérez, E.E. 2010. Alternativas para la producción de carne ovina en Nayarit, México. *Fuente*. 1(2):12-16.

Mederos, A., Fernández, S., Van-Leeuwen, J., Peregrine, A.S., Kelton, D., Menzies, P., LeBoeuf, A., Martin, R. 2010. Prevalence and distribution of gastrointestinal nematodes on 32 organic and conventional commercial sheep farms in Ontario and Quebec, Canada (2006-2008). *Veterinary Parasitology*. 170(3-4):244-52.

Mendoza de Gives, P. 1998. Perspectives of the use of nematode-trapping fungi in the livestock industry in Mexico. *In: International Workshop on Biological Control of Gastro-intestinal nematodes of ruminant using predacious fungi*. Veterinary Research Institute, Ipoh, Malaysia. 5-12 October 1997. Published by FAO. FAO Animal Production and Health Paper.141: 82-85.

Mendoza de Gives, P., Davies, K.G., Morgan, M., Behnke, J.M. 1999. Attachment test of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of plant and animal parasitic nematodes, free living nematodes and *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Helminthology*. 73:67-71.

- Mendoza de Gives, P, Zapata-Nieto, C., Liébano-Hernández, E., López-Arellano, E., Herrera-Rodríguez, D., González-Garduño, R. 2006. Biological control of gastrointestinal parasite nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of New York Academy of Science*. 1081: 355-359.
- Molento, M.B. 2009. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Veterinary Parasitology*. 163:229-234.
- Molento, M.B., Fortes, F.S., Pondelek, D.A., Borges, F.A., Chagas AC, Torres-Acosta JF, Geldhof P. 2011. Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*. 180(1-2):126-132.
- Mugambi, M.A., Bain, R.K.A., Wanyangu, S.B.A., Ihiga, M.A.A., Duncan, J.L.B., Murray, M.B., Stear, M.J. 1997. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*. 69:265-273.
- Nieuwhof, G.J., Bishop, S.C. 2005. Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and potential benefits of reduction in disease impact. *Animal Science*. 81:23-29.
- Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F., Ayala-Burgos, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Valero-Coss, R. O., Mendoza-de-Gives, P. 2009. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Veterinary Research*. 5:46-52.
- Orihuela, A., Vázquez-Prats, V. 2008. Estrategias conductuales en la relación parásito-hospedero. *Técnica Pecuaria en México*. 46:259-285.

- Palizi, P., Goltapeh, M.E., Pourjam, E., Safaie, N. 2009. Potential of Oyster Mushrooms for the Biocontrol of Sugarbeet nematode (*Heterodera Schantii*). Journal of Plant Protection Research. 49(1):27-34.
- Quintero-Martinez, M.T. Uso de los ácaros en el control de helmintos y viceversa. 1996. Área de Artropodología. Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. C.P. 04510. pp: 198-200.
- Radhakrishnan, C.V., Bradley, R.E., Loggins, M.S. 1972. Host responses of worm-free Florida Native and Rambouillet lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Annual Report. Florida University. Agricultural Experiment Station. 3930:817-823.
- Rodríguez-Esparza, J.R., Mendoza-de Gives, P., Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Cid-del Prado, I.V., Franco, F., López-Mayagoitia, V. 2007. *In vitro* predatory activity of “Cannibal” nematodes against *Haemonchus contortus* and *Rhabditis* sp. Abstracts of the Proceedings of the WAAVP 21st International Conference Reference 282, Edited by E Claerebout and J Verrecruysse 19th-23rd August Gent, Belgium. p 273.
- Sayre, R.M., Wergin, W. 1989. Morphology and fine structure of the trophozoites of *Theratromyxa weberi* (Protozoa: Vampyrellidae) predacious on soil nematodes Canadian. Journal of Microbiology. 35(5):589-602.
- Sayre, R.M. 1973. *Theratromyxa weberi*, An amoeba predatory on plant-parasitic nematodes. Journal of Nematology. 5(4):258-264.
- Sayre, R.M. 1969. A method for culturing a predaceous tardigrade on the nematode *Panagrellus redivivus*. Transactions of the American Microscopical Society. 88(2):266-274.

- Sayre, R.M., Walter, D.E. 1991. Factors affecting the efficiency of natural enemies of nematodes. *Annual Reviews Phytopathology*. 29:149-156.
- SIAP. 2008. Servicios de Información y Estadísticas Agroalimentarias y Pesquera .Resumen pecuario por Estado-región. SAGARPA. México.
- SAGARPA. 2002. Sistema integral de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_compec_pobgan.html.
- Singh, P., Rodríguez, J.G. 1966. Food for Macrochelid mites (Acarina) by an improved method for mass rearing of a nematode, *Rhabditella leptura*. *Acarologia*. VIII: 4.
- Soberón, M., Bravo de la Parra, A. 2008. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM, 25 aniversario. pp. 303-313.
- Vázquez de Jesús, E. 2009. Evaluación de Cuatro Métodos de Cultivo *in vitro* para la Reproducción de Nematodos Depredadores para el Control de Nematodos Parásitos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. pp: 1-32.
- Vázquez, Prats, V.M., Flores, C.J., Santiago, V.C., Herrera, R.D., Palacios, F.A., Liébano, H.E. 2004. Frecuencia de nematodos gastroentéricos en bovinos de tres áreas de clima subtropical húmedo de México. *Tecnica Pecuaria en México*. 42:237-245.
- Vázquez-Pineda, A., Bravo-de-la-Parra, A., Mendoza-de-Gives, P., Liébano-Hernández, E., Hernández-Linares, I., Yáñez-Pérez, N., Aguilar-Marcelino, L., Ramírez-Vargas, G., Hernández-Castro, E., Gutiérrez-Segura, I., López-Arellano, M.E. 2011. Uso de Productos

derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en Nematodos de Importancia Veterinaria. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 3(1):77-88.

Vilaboa-Arroniz, J., Díaz-Rivera, P., Platas-Rosado, D.E., Ruíz-Rosado, O., González-Muñoz S.S., Juárez-Lagunes, F. 2010. Fallas de mercado y márgenes de comercialización en bovinos destinados al abasto de carne en la región del Papaloapan, Veracruz. El Colegio Mexiquense, A.C. 34:813-833.

Vroegh, G. 1996. Dutch Heritage Farm. http://en.wikipedia.org/wiki/St._Croix_sheep.

Zajac, A.M., Krakowka, S., Herd, R.P., McClure, K.E. 1990. Experimental *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. Veterinary Parasitology. 36:221-235.

Zavala, Elizarraraz, R., Ortiz, O.R., Ugalde, R.P.J., Montalvo, M.P., Vázquez, A.S., Sanginés, G.J.R. 2008. Pubertad en hembras de cinco razas de pelo en condiciones de trópico seco. Zootécnica Tropical. 26(4):465-473.

Zhao, G., Yan, R., Muleke, C.I., Sun, Y., Xu, L., Li, X. 2011. Vaccination of goats with DNA vaccines encoding H11 and IL-2 induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. The Veterinary Journal. 15:34-29.

II. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antagónica de microorganismos con uso potencial contra el nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1. Genotipificación de una bacteria *Pasteuria/Pasteuria-like* y evaluación del adosamiento de esporas a *Haemonchus contortus* y a otros nematodos, incluyendo al género *Rhabditis* sp. (nematodo de vida libre, no parásito) y a especies del nematodo fitopatógeno *Meloidogyne* spp.

2.1.2. Evaluar la actividad depredadora *in vitro* del ácaro *Lasioseius penicilliger* sobre larvas infectantes (L₃) de *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) y nematodos de vida libre.

2.1.3. Comparar el efecto depredador *in vitro* del nematodo *Butlerius* sp., en contra de tres diferentes nematodos: *Haemonchus contortus* (L₃), *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis* sp.

2.1.4. Evaluar el efecto de la suplementación de ovinos de la raza Santa Cruz con comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo *Duddingtonia flagrans* (cepa mexicana: FTOH-8) sobre la población de larvas de *Haemonchus contortus* en heces y sobre la ganancia de peso.

III. HIPÓTESIS GENERAL

Los microorganismos evaluados en la presente investigación ejercen una elevada actividad antagónica en contra de nematodos de importancia en la ovinocultura; afectando a más de 90% de la población parasitaria.

3.1. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

3.1.1. Las endosporas de la bacteria *Pasteuria/Pasteuria-like* tienen la capacidad de adosamiento a la cutícula de diferentes estadios evolutivos de *Haemonchus contortus* y a otros nematodos.

3.1.2. El ácaro *Lasioseius penicilliger* ejerce un 90% de actividad de depredación sobre larvas infectantes (L₃) de *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) y nematodos de vida libre.

3.1.3. El nematodo depredador *Butleriussp.* ejerce un 90% de actividad de depredación sobre tres diferentes nematodos: *Haemonchus contortus* (L₃), *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis sp.*

3.1.4. La suplementación de ovinos de la raza Santa Cruz con comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo *Duddingtonia flagrans* (cepa mexicana: FTOH-8) reduce la población de larvas de *Haemonchus contortus* en heces y promueve una importante ganancia de peso.

IV.GENOTIPIFICACIÓN DE UNA BACTERIA *Pasteuria/Pasteuria-like* Y EVALUACIÓN DEL ADOSAMIENTO DE ESPORAS A *Haemonchus contortus* Y A OTROS NEMATODOS

4.1. RESUMEN

En el presente estudio, se identificó la presencia de esporas bacterianas adheridas a la cutícula de nematodos fitopatógenos en raíces de jitomate en Santa Catarina, Morelos, México. Muestras de suelo y raíces conteniendo nematodos infectados fueron recolectadas, trituradas y pulverizadas para llevar a cabo un análisis molecular con la finalidad de identificar bacterias pertenecientes al género *Pasteuria* sp. o bacterias relacionadas con este género *Pasteuria-like* (*Pl*). Los resultados mostraron la presencia de una bacteria con un 95% de similitud con la región 16S rRNA de la bacteria *Comamonas aquatica*. A pesar de que los iniciadores utilizados en el presente estudio fueron específicos para *Pl*, los antecedentes de esta bacteria al parecer no tienen relación con ninguna actividad antagónica en contra de nematodos; y regularmente no produce esporas. Por lo que el hecho de que las esporas adheridas a la cutícula de los nematodos correspondan o no a *C.aquatica* queda sin aclarar. Los resultados son considerados como inconsistentes; por lo que estudios posteriores como por ejemplo clonación del cDNA de la bacteria *Pl* y otras pruebas moleculares utilizando a la bacteria *Pl* como control positivo; además de técnicas complementarias de microscopía electrónica de barrido y de transmisión deberán ser llevadas a cabo de manera complementaria para estar completamente seguros de la correcta identificación de este microorganismo. Adicionalmente, se llevó a cabo la evaluación de la actividad de adosamiento *in vitro* de esporas de la bacteria *Pl* en contra de diversos estadios de desarrollo de *Haemonchus contortus*; además de los nematodos *Meloidogyne* spp. (J₂) y *Rhabditis* sp. Los resultados mostraron los siguientes porcentajes de adhesión: para huevos de *H. contortus*=0%; L₁=12%; L₂=20%; L₃=4%, L₄=40%; para *Rhabditis* sp.=4% y *Meloidogyne* spp.=28%. Por

primera vez se reporta el hallazgo de la presencia de esporas bacterianas adosadas a la pared cuticular del tercer estadio de desarrollo *H. contortus*.

Palabras clave: Control biológico, *Pasteuria*-like, *Comamonas aquatica*, *Haemonchus contortus*, *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita*.

4.2. ABSTRACT

In the present study, bacteria spores attached to the cuticle of phytopathogenic nematodes were identified in tomato roots from Santa Catarina, Morelos, Mexico. Soil samples and roots containing infected nematodes were collected, grinded and pulverized to perform a molecular analysis searching for the presence of *Pasteuria* sp. or bacteria related to this genus *Pasteuria*-like (*P-l*). Results showed 95% alignment with the 16S rRNA region of the bacterium *Comamonas aquatica*. Although, the primers used in the present study were specific for *P-l*, the background of this bacterium seems to have no relationship to any antagonistic activity against nematodes; and no spores are regularly produced by this microorganism. So, there was unclear if the spores attached to the nematode cuticle corresponded or not to *C. aquatica*. Such results are considered as non-consisting and further studies *ie.*, cDNA cloning of the bacterium and molecular assays using DNA of *P-l* as a positive control and also the use of screening and transmission electronic microscopy complementary techniques should be performed to be completely sure about the identification of this microorganism. Additionally, the *in vitro* *P-l* spore attachment was evaluated against various developmental stages of *Haemonchus contortus* and *Meloidogyne* spp. (J₂) and *Rhabditis* sp. The results showed the following attachment percentages: *H. contortus* eggs=0%; L₁= 12%; L₂=20%; L₃=4%, L₄=40%; for *Rhabditis* sp. =4% and for *Meloidogyne* spp. =28%. For the first time the presence of spores of a bacterium attached to the cuticle of the third larval stage of *H. contortus* is being recorded.

Key words: Biocontrol, *Pasteuria*-like, *Comamonas aquatica*, *Haemonchus contortus*, *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita*.

4.3. INTRODUCCIÓN

Los nematodos parásitos gastrointestinales son considerados como uno de los principales problemas de salud, que afectan seriamente la economía de la industria ovina; especialmente en áreas tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Molento *et al.*, 2011). Existe el método de control químico de tales enfermedades parasitarias; sin embargo, el problema de la resistencia de los parásitos contra tales drogas se ha incrementado dramáticamente cada año (Maroto *et al.*, 2011; Patten *et al.*, 2011). De tal manera que, las nuevas tecnologías de control anti-parasitario se han considerado necesarias para disminuir el uso de antihelmínticos (López-Arellano *et al.*, 2010). En el suelo los nematodos tienen numerosos antagonistas naturales y se establece una lucha intensa entre tales organismos como reguladora natural de las poblaciones biológicas. Los principales organismos identificados como enemigos naturales de los nematodos incluyen otros nematodos (nematodos depredadores), ácaros, virus, hongos, bacterias y sustancias nematocidas producidas por algunas plantas (Tribe, 1980; Sayre y Walter, 1991; Davies, 2009; Ojeda-Robertos *et al.*, 2009; Mendoza de Gives *et al.*, 2012). El grupo de antagonistas de nematodos que ha sido más ampliamente estudiado a la fecha corresponde a los hongos nematófagos, particularmente *Duddingtonia flagrans* (Mendoza de Gives *et al.*, 1998, Ojeda-Robertos *et al.*, 2005; Mendoza de Gives, 2011, Mendoza de Gives y Torres Acosta, 2012). También algunas bacterias como *Bacillus thuringiensis* (López-Arellano *et al.*, 2006, Vázquez-Pineda *et al.*, 2010) y *Pasteuria penetrans* (Mendoza de Gives *et al.*, 1999) están siendo analizadas como posibles antagonistas de nematodos parásitos de rumiantes. *Pasteuria penetrans* es una bacteria Gram (+) formadora de endosporas que ha sido identificada como una bacteria hiperparásita, cuyas

endosporas se encuentran adheridas a la cutícula del nematodo parásito de plantas *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Heteroderidae) (Davies, 2009) y también a una gran lista de hospederos nematodos: se estima que los hospederos de *Pasteuria* son más de 300 géneros de nematodos (Chen y Dickson, 1998), incluyendo principalmente a otros grupos de nematodos parásitos de plantas tales como Tylenchida y en algunos Dorylaimida (Sturhan, 1996; Sturhan *et al.*, 2005). No obstante, el amplio rango de nematodos hospederos afectados por *Pasteuria penetrans*; también se ha informado una alta especificidad de especie en aislados de *P. penetrans* de diferentes orígenes y nematodos. Algunos aislamientos bacterianos que a pesar de su gran similitud morfológica con el género *Pasteuria*, pero que al ser analizados para determinar su clasificación taxonómica a través de métodos moleculares no logra una similitud contundente con la información registrada para este género, se le ha denominado como “*Pasteuria-like*” (El-Borai *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2011). La identificación taxonómica de los microorganismos se realiza y clasifica por su aspecto al microscopio, por el tipo de colonias al crecer en medios de cultivo, por los nutrientes que utilizan o por su tinción con colorantes (reactivos como el Gram). Sin embargo la identificación fenotípica mencionada no permite determinar con certeza el parentesco entre microorganismos (Martínez-Romero, 2010). En el caso de las bacterias, para una identificación más precisas en la actualidad existen diversas técnicas de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite multiplicar (“amplificar” es, en realidad, el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces (Cortazar-Martínez y Silva-Rincón, 2004). Identificando los genes codificantes para la región conservada, se puede identificar de manera rápida y confiable la cepa de la bacteria de la que se trata, además de obtener su relación filogenética comparada con las cepas ya identificadas a través de esta región (Martínez-Romero, 2010). Así, el análisis y comparación de secuencias nucleotídicas de genes permiten no sólo identificar, sino clasificar y establecer las

relaciones filogenéticas entre organismos o microorganismos (Fox *et al.*, 1980). No existe evidencia documentada de la interacción entre las endosporas de *Pasteuria* sp. y un nematodo parásito de animales. El objetivo de la presente investigación fue genotipificar una bacteria *Pasteuria/Pasteuria-like* y evaluación del adosamiento de esporas a *Haemonchus contortus* y a otros nematodos, incluyendo al género *Rhabditis* sp. (nematodo de vida libre, no parásito) y a especies del nematodo fitopatógeno *Meloidoyne* spp.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1. Localización

Esta investigación se llevó a cabo en el Departamento de Helmintología, del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET, INIFAP), Jiutepec, Estado de Morelos, México.

4.4.2. Zona de Muestreo

Se utilizaron muestras de raíces de una población de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Figura 1a-d), colectadas en áreas infestadas en cultivos de Jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) producidos en condiciones de campo abierto en el pueblo de Santa Catarina, Estado de Morelos, México.



Figura 1. a) Terreno infestado por los nematodos *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*. b) Aspecto de las plantas de jitomate infestadas con *Meloidoyne* sp.



Figura 1. c,d,e) Selección de plantas infestadas, raíces con suelo para evitar pérdida de masa de huevos del nematodo.

4.4.3. Aislamiento de las endosporas de la bacteria *Pasteuria/Pasteuria-like*

Se obtuvo una población de endosporas de una bacteria *Pasteuria-like*, a partir de una población mixta de los nematodos *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (J₂), tanto de raíces con agallas como de suelo de un cultivo de jitomates. Las raíces agalladas y el suelo fueron colectados y transportados en bolsas de plástico al Laboratorio de Helmintología del CENID-Parasitología Veterinaria del INIFAP en Jiutepec, Estado de Morelos, México. Las raíces fueron lavadas con agua de la llave y cortadas en pequeñas fragmentos (1-2 cm) (Figura 1 d-e). Posteriormente, las raíces fueron secadas a temperatura ambiente por 24 h. Las agallas secas fueron molidas utilizando un pistilo y un mortero para obtener un polvo fino que se mantuvo en tubos Eppendorf siliconizados de 1.5 mL a 4 °C bajo condiciones de oscuridad hasta su uso (Stirling y Watchel, 1980; Mendoza de Gives *et al.*, 1999). Se revisó la cutícula de los nematodos de las raíces agalladas y los nematodos de las muestras de suelo, bajo un microscopio estereoscópico (4X) y un microscopio óptico (100X) para identificar la presencia de endosporas de *Pasteuriasp.* o de la bacteria *Pasteuria-like*. Para contar las endosporas referidas, se prepararon suspensiones acuosas del material vegetal obtenido a partir de raíces agalladas pulverizadas conteniendo las esporas.

Las esporas fueron cuantificadas utilizando una cámara de Neubauer. Una parte de la suspensión de esporas fue almacenada a 4 °C, como reserva (Mendoza de Gives *et al.*, 1999).

4.4.4. Extracción de DNA (Método tradicional)

Para la extracción de DNA de las bacterias contenidas en las muestras se realizó siguiendo la metodología descrita por Reyes-Ramírez e Ibarra (2005). Inicialmente se pesaron 500 mg de la muestra y esta fue resuspendida en 4 mL de Solución Amortiguadora “J” y se centrifugó 5 minutos a 3,000 rpm. Posteriormente, se adicionaron 400 µL de lisozima a una concentración final de 40 mg/mL y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se agregaron 400 µL de SDS al 20% y se incubó por 20 minutos a 70 °C, se adicionaron 50 µL de RNasa a una concentración de 10 mg/mL y se incubó por 30 minutos a 50 °C. Posteriormente, se agregaron 120 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó a 55 °C por 12 horas, se adicionaron 1.15 mL de NaCl (5 M) y se incubó por 15 minutos (durante este proceso la muestra que se encontraba en un tubo de plástico de 15 mL se colocó en hielo) y se centrifugó a 3900 rpm por 20 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se precipitó la muestra con Isopropanol en una relación 1:1, posteriormente, el pellet fue resuspendido en etanol al 70% y el sobrenadante fue decantado y la muestra se dejó secar a temperatura ambiente (formando un sedimento o una pastilla, en el fondo del tubo de plástico). Finalmente, el sedimento fue resuspendido en agua libre de nucleasas para cuantificar la concentración de DNA, utilizando el equipo de Nanodrop (Thermo Scientific). Por último, las muestras fueron mantenidas a -20 °C para llevar a cabo la técnica de PCR.

4.4.5. Oligonucleótidos y condiciones de la PCR

La amplificación del DNA se obtuvo mediante la técnica de PCR de punto final. Los iniciadores que se utilizaron fueron los siguientes: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1522R (5'- AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3'), los cuales se utilizaron para amplificar la región 16S rRNA (Sturhan *et al.*, 2005) Figura 2.

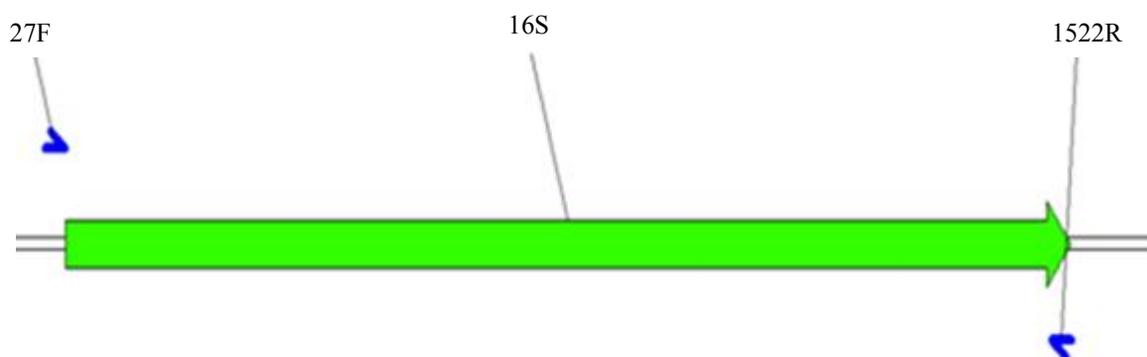


Figura 2. Representación de los iniciadores 27F, 1522R y la región 16S rRNA para la identificación de la bacteria *Pasteuria* sp. (Diseño de la autora del presente estudio).

La mezcla de reacción para la obtención de los amplicones de la muestra fue la siguiente: DNA 74.7 ng (2 μ L), oligonucleótidos 27F y 1522R (100 ng/ μ L) de cada uno, Mezcla SYBR Green Master® (Roche) 10 μ L, a un volumen final de 25 μ L de la mezcla de reacción. El PCR se optimizó partiendo de las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, alineamiento 62 °C por 30 s y extensión a 80 °C por 7 min.

4.4.6. Electroforesis

El producto de PCR (16S rRNA) fue visualizado en un gel de agarosa al 4% utilizando TAE 1X como amortiguador de corrida a 100 volts durante 1 h. Posteriormente, se realizaron dos limpiezas del producto de PCR con el kit Gel and PCR clean-Up System (PROMEGA) siguiendo

el procedimiento especificado por el fabricante y se confirmó la limpieza del producto de PCR (16S rRNA) por electroforesis sin bromuro de etidio con la finalidad de confirmar que no llevara residuos contaminantes de algún fluoróforo, para poder secuenciar el producto de PCR.

4.4.7. Análisis de Secuencias por GenBank

La secuenciación del fragmento amplificado de la muestra bajo estudio, se llevó a cabo utilizando como iniciador a 27F. La secuenciación se realizó en un secuenciador de Applied Biosystems modelo 7,700 en el Instituto de Biotecnología (UNAM) ubicado en la Ciudad de Cuernavaca, Morelos. Con objeto de analizar si el fragmento amplificado por PCR pertenece a la bacteria *Pasteuria* sp., la secuencia obtenida se comparó con el banco de secuencias del BLASTn del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Asimismo, se obtuvo el porcentaje de similitud con objeto de verificar si se trataba del género *Pasteuria* spp. o de alguna bacteria relacionada.

4.4.8. Producción de especies de nematodos fitopatógenos *Meloidogyne incognita*, *M.*

***javanica* y *M. arenaria* (J₂) en macetas de jitomate**

Semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) fueron sembradas y cultivadas en macetas. Posteriormente, fueron infectaron con 500 nematodos *Meloidogyne* sp. (J₂) y se mantuvieron al aire libre (10-28 °C), desde el mes de febrero hasta mayo de 2009. Un mes después de la infección de las plantas, las raíces con agallas fueron colectadas y procesadas para obtener especímenes del género *Meloidogyne* sp. (J₂). Las masas de huevos fueron removidas de las raíces agalladas utilizando agujas de disección y fueron transferidas a placas de Petri con agua destilada estéril, e incubadas a 30 °C durante 72 h, para inducir la eclosión de los juveniles (J₂).

4.4.9. Producción de diferentes estadios evolutivos de *Haemonchus contortus*

Se utilizó un ovino macho de seis meses de edad como donador de huevos de *H. contortus*. El ovino fue previamente desparasitado y posteriormente infectado oralmente con 350 larvas infectantes de *H. contortus* (L₃) por kg de peso vivo. Después de 21 días de periodo pre-patente, se colectaron muestras fecales directamente del recto, se disgregaron mezclando con hule espuma en recipientes de plástico; asimismo, se les adicionó agua de la llave para mantener la humedad. Los cultivos fecales fueron cubiertos con una tapa de aluminio y se incubaron a temperatura ambiente (25-30 °C). Los coprocultivos en palangana se removieron diariamente utilizando una cuchara de madera para oxigenar el desarrollo de las larvas (González-Cruz *et al.*, 1998). La obtención de los diferentes estadios evolutivos de *H. contortus* se realizaron en el siguiente orden: para obtener los huevos de *H. contortus*, las heces frescas del ovino infectado fueron maceradas y coladas a través de una malla de 400 aberturas y lavadas con agua de la llave posteriormente transferidos a placas de Petri de vidrio. Las placas de Petri de vidrio, conteniendo los huevos de nematodos fueron colocadas en una caja con hielo, para detener el desarrollo hasta su uso. El primero, segundo y tercer estadios evolutivos fueron obtenidos siguiendo el mismo método; las placas de Petri conteniendo huevos fueron incubados a temperatura ambiente (25-30 °C) por 1, 3 y 7 días, respectivamente (Liébano-Hernández, 2004). El cuarto estadio evolutivo se obtuvo bajo una atmósfera de CO₂ controlada, usando larvas infectantes desenvainadas (Ramírez *et al.*, 2006). Las larvas infectantes desenvainadas fueron tratadas con una mezcla de antibiótico-antimicótico e incubadas a 37 °C en una solución salina amortiguadora de fosfatos (pH 4) en un agitador mecánico por 2 h. Las larvas fueron incubadas en medio Hank's conteniendo una mezcla de antibiótico-antimicótico, y eritrocitos de ovino a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ y 95% aire por 21 días, siguiendo la técnica descrita por Ramírez *et al.* (2006).

4.4.10. Producción de *Rhabditis* sp.

Los especímenes de *Rhabditis* fueron obtenidos de muestras de suelo de Jiutepec, Morelos, México. Los nematodos fueron extraídos usando la técnica del embudo de Baermann por 12 h. La producción masiva de nematodos se llevó a cabo transfiriendo nematodos a placas de Petri conteniendo agua-agar al 2% suplementadas con 0.5 g de crema de cacahuete comercial e incubados a temperatura ambiente (25-30 °C) durante cinco días.

4.4.11. Bioensayos

La evaluación de la capacidad de adosamiento *in vitro* de esporas de un aislamiento de la bacteria *Pasteuria* (*Pasteuria*-like) a la cutícula de diferentes estadios evolutivos de *Haemonchus contortus* y a otros nematodos. Se realizó colocando los diferentes grupos taxonómicos de los nematodos con las endosporas de la bacteria *Pasteuria*-like en tubos Eppendorf siliconizados, como se describe a continuación: Para *H. contortus*, se formaron cinco grupos de 5 tubos Eppendorf, cada uno, conteniendo los siguientes estadios (huevos, L₁, L₂, L₃) y larvas histotrópicas (L₄). Se depositaron 500 µL de agua destilada conteniendo 500 especímenes/estadio del nematodo correspondiente a evaluar y fueron depositados en tubos Eppendorf siliconizados. Se adicionaron a cada tubo Eppendorf. 1×10^6 endosporas de la bacteria *Pasteuria*-like (contenidas en 0.1 g de raíces pulverizadas). Este mismo procedimiento se llevó a cabo con los nematodos *Meloidogyne* sp. (J₂) y *Rhabditis* sp. (Mezcla de estadios). En todos los casos, los tres tubos Eppendorf siliconizados fueron considerados como tres réplicas. Los tubos fueron centrifugados a 10,000 g por 5 minutos. Para la obtención de resultados de este experimento, se llevó a cabo la técnica descrita por Hewlett y Dickinson. (1993) y Mendoza de Gives *et al.* (1999), en la que de cada tubo Eppendorf se colectaron de 19 a 25 especímenes de cada población de nematodos mismos que fueron revisados usando un microscopio compuesto con los aumentos 4X, 10X, 40X

y 100X para identificar la presencia de endosporas de *Pasteuria*-like adheridas a la cutícula del nematodo observado. Finalmente se llevó a cabo una categorización semi-cuantitativa del número de esporas adheridas a la cutícula de los diferentes nematodos, otorgando valores a cada grupo con base en el siguiente criterio: (0=0) ninguna espора por nematodo; (+=1-10) esporas por nematodo; (+=1-40) esporas por nematodo (Mendoza de Gives *et al.*, 1999). Debido a que los resultados fueron considerados con base en una categorización semi-cuantitativa, al igual que en los trabajos publicados por Fargette *et al.* (1994) no se llevó a cabo un análisis estadístico.

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Identificación morfológica de nematodos fitopatógenos

Inicialmente, las lesiones causadas por los nematodos en el sistema radicular del jitomate concordaron con la formación de agallas típicas inducidas por el género *Meloidogyne* en la raíz de la planta (Sánchez-Portillo, 2010). Adicionalmente, la identificación de especies de este género se basó en los detalles morfológicos característicos a nivel de la región perineal que correspondió a las especies *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria*.

4.5.2. Genotipificación de una bacteria *Pasteuria/Pasteuria like*

4.5.2.1. Fragmento de ADN y Productos de PCR

La figura 3, muestra la banda de ADN de la muestra. En esta figura se observan dos fragmentos de la extracción de DNA genómico de la muestra de la bacteria. Cabe mencionar que en la columna de la izquierda se aprecia el marcador molecular utilizado (50 a 1,000 pb, BIOLABS).

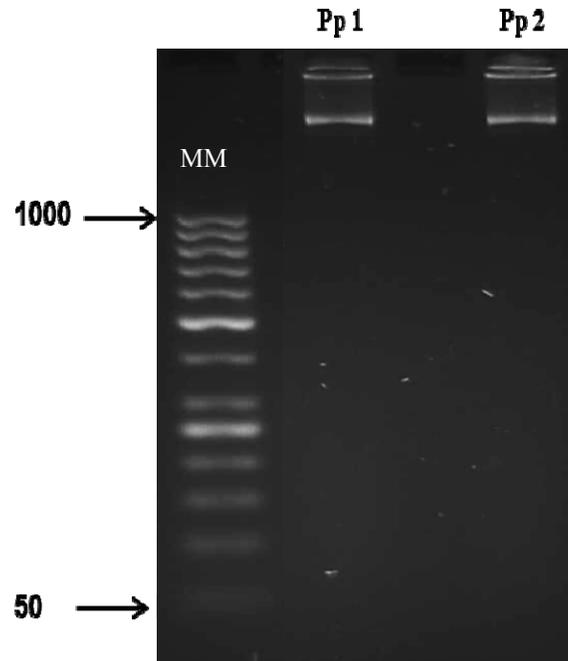


Figura 3. Visualización de ADN genómico de la bacteria bajo estudio. Gel de agarosa al 4%. MM= Marcador molecular. Pp1=Muestra de la bacteria, Pp2= Muestra de la bacteria.

La figura 4, muestra la amplificación de la región 16S rRNA, utilizando los oligonucleótidos generales 27F y 1522F de la bacteria *Pasteuria* sp. El marcador molecular que se utilizó fue O' GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas). En esta figura se puede observar un fragmento situado en 1500 pb para la muestra aislada. Con objeto de secuenciar el fragmento observado en el gel de agarosa (4%), la muestra fue procesada en un kit comercial para su limpieza como producto finales (PROMEGA), la cual se confirmó en un segundo gel sin bromuro de etidio. Asimismo, se estimó la concentración del producto de PCR obtenido y fue de 78.3 ng/ μ L, finalmente se llevó a cabo la secuenciación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Figura 6 a, b).

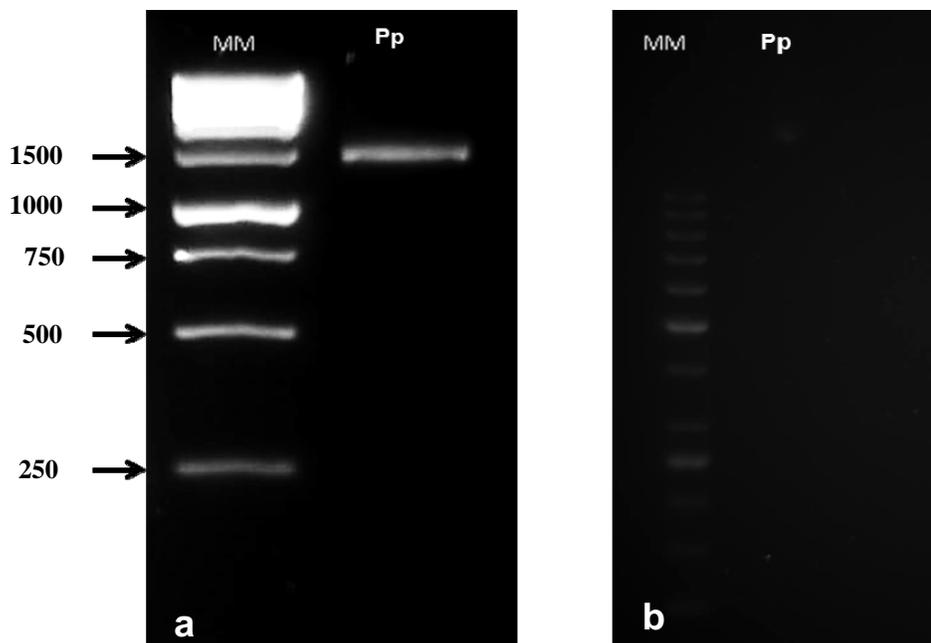


Figura 4 (a, b). a) Visualización del producto de PCR de la bacteria aislada en gel de agarosa al 4 %, b) Producto de PCR en gel de agarosa al 4% sin bromuro de etidio. MM=Marcador molecular. Pp=Muestra de la bacteria.

4.5.2.2. Secuenciación

El resultado de la secuencia obtenida de ADN genómico de la bacteria bajo estudio, realizada por la técnica de secuenciación automatizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM se muestra en la figura 5.

```
GCAGAATTTAACTTTCACTTCCCCAGTCACGAACCCCGCGTGAGCGCCCTCCTTGCGGTAGGCTA
CCTACTTATGGCGAGACCCGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTC
ACCGTGACATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCA CGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATC
CGGACTACGACTGGCTTTATGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTTTGTACCAGCCATTG
TATGACGTGTGTAGCCCCA CCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCACCTTCTCCGGTTTG
TCACCGGCAGTCCCATTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAATGGCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA
CTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTACGGCTCTCTTTCT
AGCACTCCTCTATCTCTAAAGGATTCGGTACATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGA
ATTAAACCACATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCCGT
ACTCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGTTAAGACCCAACAACCAGTTG
ACATCGTTTTAGGGCGTGGACTAC CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCACGCTTTTCGTGCATGAGC
GTCAGTACAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTA
CACGCGGAATTCATCCCCCTCTGCCGTA CTAGCCTTGCAAGGTCACAAAGGCAGGTCCCAGGTTGA
GCGCGGGGAGTCATCTCTGTCTACAAAAACGACTGCGCACGCTTACGTCCAGCCAATCCGATTAA
CGCATTGCACCCTACGTATTAAGTGC GGCTGGCTGGCAGTAGTAAGACAGGTGGCTTATTCTACTGTA
ACGTATGATCCCACGGGAATAAAATCAACGGGCTGTTCTGTTCTGTTCTCACGCAGGTTATATTCAA
GAGAACGGTGTGAGTTCTGCAGCCAGTCTGGATCAGCGGTGTTTCATCGCCTGA
```

Figura 5. Secuencia obtenida de ADN genómico de la bacteria bajo estudio.

4.5.2.3. Alineación

Los resultados obtenidos de la muestra aislada, previamente citada se presentan a continuación con base en su homología (NCBI-BLASTn). La homología de la secuencia bajo estudio presentó el 95% de similitud con la región 16S rRNA de la bacteria *Comamonas aquatica* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Secuencia obtenida de la bacteria bajo estudio identificada a través de la base de datos de secuencia (NCBI-BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Identificación por Blast						Homología
<i>Comamonas aquatica</i>						
Accession	Description	Max score	Total score	E value	Max ident	La homología de la secuencia bajo estudio presentó el 95% de similitud con la región 16S rRNA de la bacteria <i>Comamonas aquatica</i> .
FJ493173.1	Comamonas aquatica strain F-1 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1535	1535	0.0	95%	
EU841529.1	Comamonas aquatica strain 617 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1535	1535	0.0	95%	
EU841528.1	Comamonas aquatica strain 532 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1535	1535	0.0	95%	
EU841522.1	Comamonas aquatica strain 434 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1535	1535	0.0	95%	
EU841521.1	Comamonas aquatica strain 431 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1535	1535	0.0	95%	
EU841520.1	Comamonas aquatica strain 429 16S ribosomal RNA gene, partial seq	1535	1535	0.0	95%	

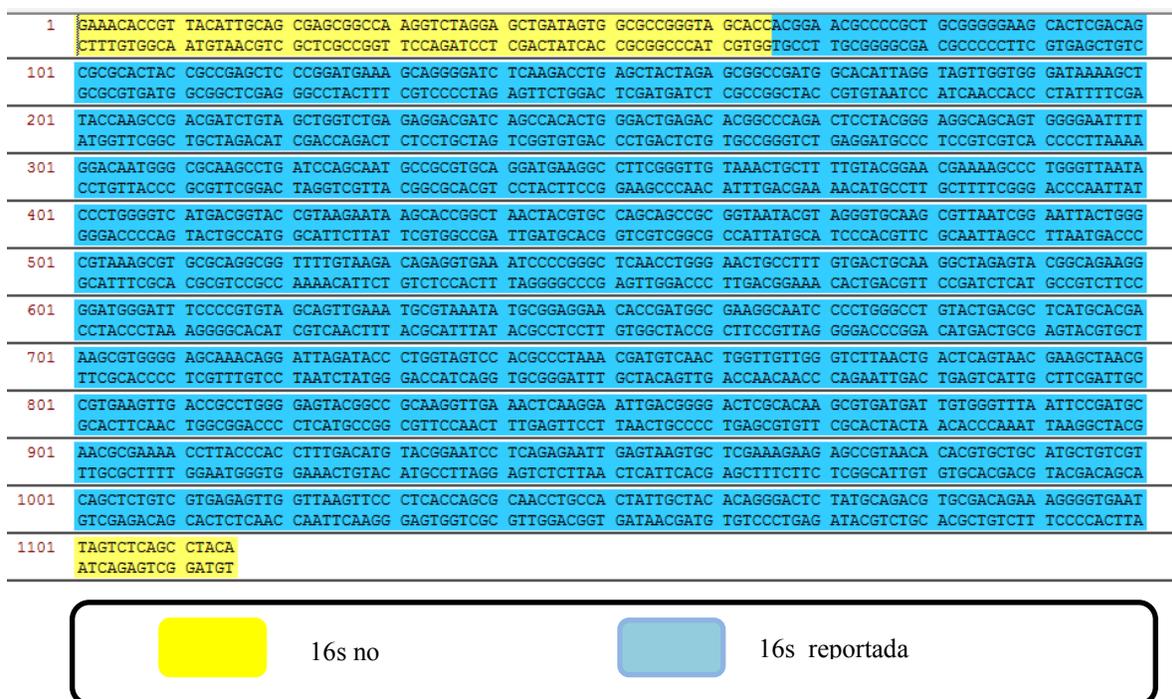
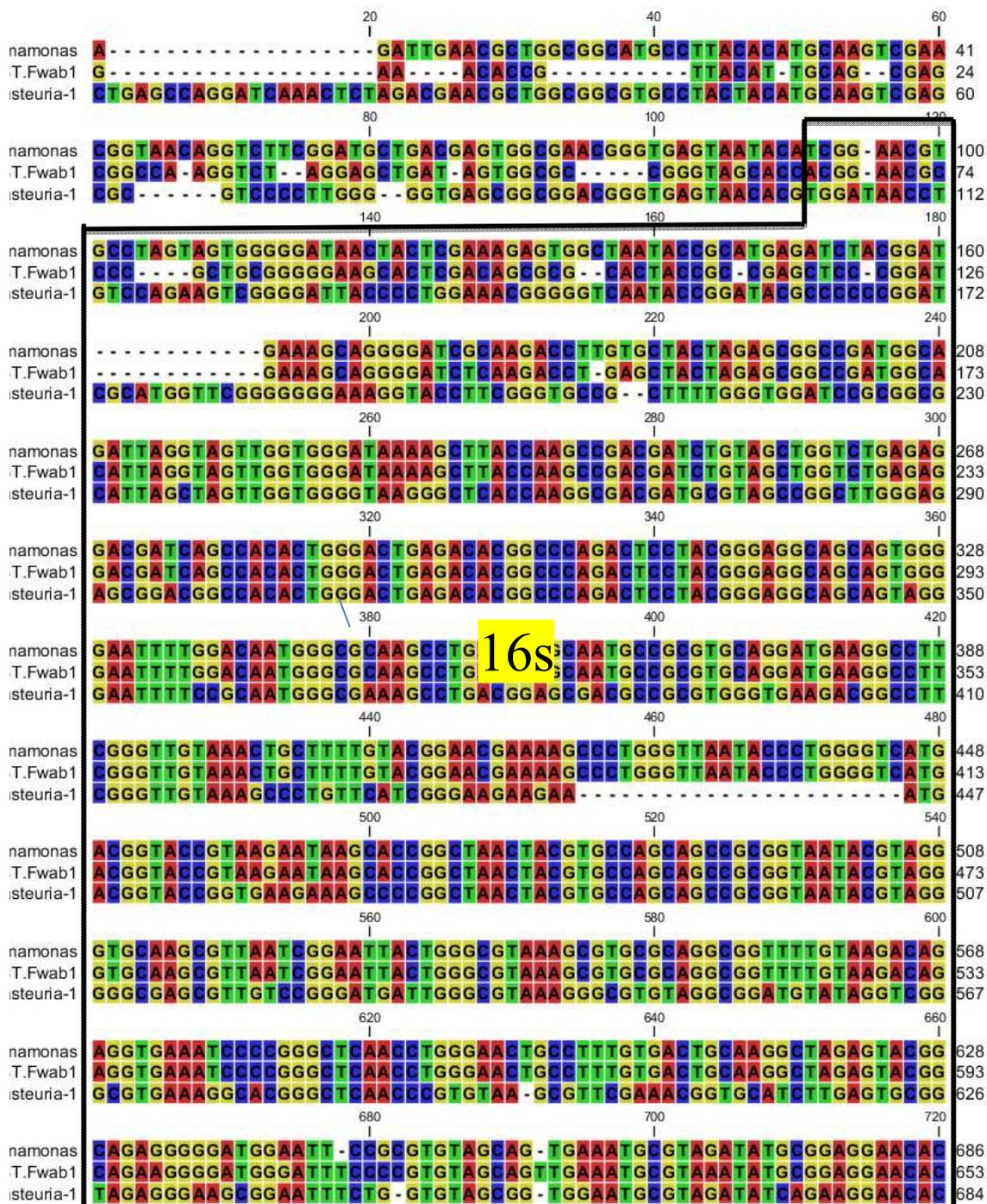


Figura 6. Secuencia de la bacteria bajo estudio, marcando la región amplificada por la técnica de PCR. En color amarillo se muestra la región 16s no reportada y en color azul la secuencia 16s reportada.

En el programa bioinformático Vector NTI Advance™ 10 (Invitrogen), se analizó la secuencia problema verificando de esta secuencia perteneciera a la región 16s rRNA esperada del producto de PCR (Figura 6).

4.5.2.4. Alineamiento Múltiple

Se realizó un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustalw2 Multiple Sequence Aligment EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y CLC Sequence Viewer, Versión 6.3., de la secuencia de la bacteria bajo estudio con la secuencia que arrojo un 95% de similitud en el NCBI-BLAST y la secuencia parcial 16s de la bacteria *Pasteuria* spp (Figura 7).



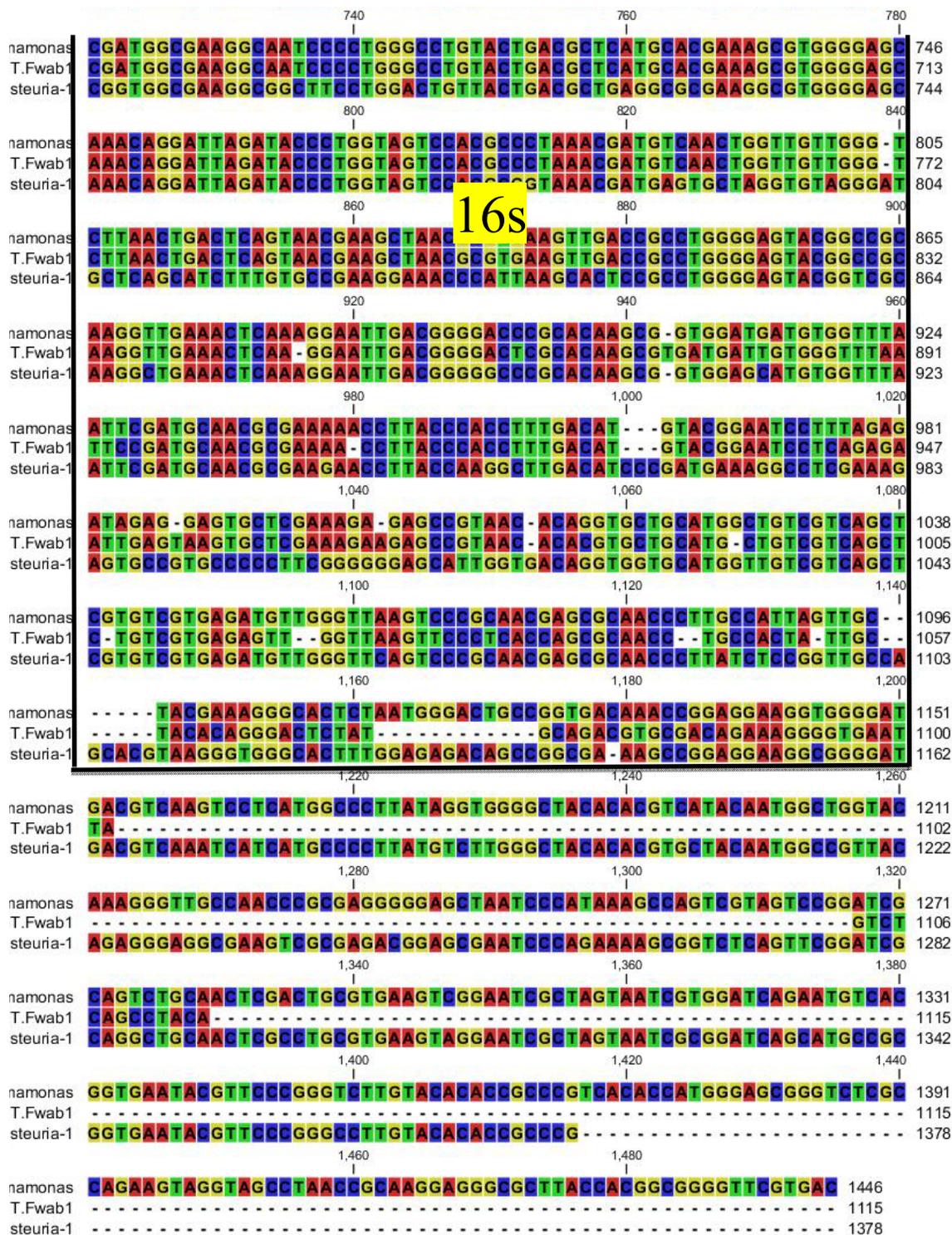


Figura 7. Representación gráfica de la región 16s rRNA que presento mayor similitud de las secuencias de la bacteria bajo estudio y la secuencia de la bacteria *Comamonas aquatica* y *Pasteuria* sp.

Cuadro 2. Porcentajes de similitud de la región 16s rRNA de las secuencias de la bacteria bajo estudio y la secuencia de la bacteria *Comamonas aquatica* y *Pasteuria* sp.

SeqA	Name	Length	Name	Length	Score
1	Secuencia de la bacteria bajo estudio	1115	<i>Comamonas</i>	1446	94.0
2	Secuencia de la bacteria bajo estudio	1115	<i>Pasteuria</i> sp.	1378	74.0
3	<i>Comamonas aquatica</i>	1446	<i>Pasteuria</i> sp.	1378	77.0

El porcentaje de similitud entre la secuencia de la bacteria bajo estudio y la secuencia de la bacteria *Pasteuria* sp. reportada fue de 74%, y para la secuencia de la bacteria bajo estudio y la secuencia de la bacteria *Comamonas aquatica* reportada fue de 94%.

4.5.2.5. Árbol Filogenético

Una vez realizado el alineamiento múltiple entre las bacterias bajo estudio, *Comamonas aquatica* y *Pasteuria* sp., se procedió a generar un árbol filogenético de la bacteria bajo estudio, utilizando el programa CLC Sequence Viewer, Versión 6.3. La bacteria *Comamonas aquatica* y la bacteria bajo estudio presentaron una alta similitud debido a que las dos pertenecen al mismo phylum. No obstante, la relación evolutiva entre la bacteria *Comamonas aquatica* y la bacteria bajo estudio es diferente de la bacteria *Pasteuria* sp. (Figura 8).



Figura 8. Árbol filogenético mostrando la representación de la similitud entre la secuencia de bacteria en estudio (*Comamonas aquatica*) y *Pasteuria hartismeri* (Pasteuria H), *P. penetrans* (Pasteuria P) y *P. nishisague* (Pasteuria N).

Los resultados del análisis de genotipificación de la bacteria bajo estudio, mostraron una alta similitud con la especie *Comamonas aquatica* que es una bacteria Gram + que ha sido asociada a actividades biológicas como antifungal, en la degradación de aguas residuales y en sistemas de biodegradación (Sasikala *et al.*, 2011). A este respecto, cabe mencionar que cuando se llevó a cabo la extracción del ADN genómico en las muestras (conteniendo raíces agalladas de jitomate, nematodos y suelo circundante a las plantas), se llevó a cabo la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (Punto Final), en la que se utilizaron iniciadores generales para la bacteria *Pasteuria* con la finalidad de amplificar la región conservada 16s rRNA. Una vez que el método de Alineamiento Blast mostró la elevada similitud con la bacteria *C. aquatica* se procedió a realizar la técnica de Alineamiento Múltiple para comparar la secuencias entre las bacterias relacionadas entre si. Los resultados de este alineamiento también dieron una similitud elevada con *C. aquatica* (94%); mientras que se encontró una similitud de solamente 74% con *Pasteuria* spp. Estos resultados fueron contrarios a los esperados, ya que los iniciadores utilizados han sido reportados como específicos para la bacteria *Pasteuria* en nematodos de la familia Plectidae (Sturhan *et al.*, 2005). La bacteria *C. aquaticus* ha sido reportada con actividad antagónica contra patógenos de plantas, tales como la antibiosis a través de la producción de altos niveles de ácido cianhídrico (HCN) que es tóxico para hongos patógenos de plantas, por lo que esta bacteria ha sido considerada como posible agente de control biológico de patógenos de plantas (El-Banna, 2007). Sin embargo, hasta ahora no existe ningún antecedente que indique que esta bacteria está asociada a la producción de endosporas con actividad en contra de nematodos. El hecho de que en el análisis de alineamiento (Blast) se haya mostrado la alta similitud con la bacteria *C. aquaticus* en vez de *Pasteuria*, causa

incertidumbre y confusión. Una probable explicación a este hecho es que quizá la cantidad de material genómico de *C. aquaticus* se encontraba en mucho mayor cantidad que el de *Pasteuria* en las muestras utilizadas y como los iniciadores a pesar de que eran específicos para *Pasteuria* están diseñados para reconocer la región 16s (Maucline *et al.*, 2010) y al haber una mayor cantidad de rARN de *C. aquaticus* estos iniciadores pudieron haber reconocido la región 16s de esta bacteria. Los resultados de genotipificación de la bacteria bajo estudio no son contundentes y un estudio molecular adicional tendrá que ser llevado a cabo para dilucidar esta interrogante. La clonación de rARN utilizando plásmidos para generar ADN y la utilización de ADN puro de *Pasteuria* como control positivo arrojaría resultados fidedignos en futuras pruebas para determinar con precisión la identidad de la bacteria bajo estudio. Debido a que la presente investigación aún se requiere más estudios para confirmar con precisión la especie de la bacteria aislada, para referir a este organismo en el presente estudio se decidió continuar denominándola como *Pasteuria-like*.

4.5.3. Evaluación del adosamiento de esporas de *Pasteuria-like* a *Haemonchus contortus* y a otros nematodos

Los resultados mostraron ausencia de adhesión de las esporas de la bacteria *Pasteuria-like* sobre los huevos de *H. contortus*. En general, los nematodos infectados mostraron una tasa muy baja de adhesión a sus cutículas que osciló entre 1 a 10 esporas por nematodo. Las proporciones y porcentajes de los diferentes estadios de *H. contortus* infectados con esporas de la bacteria relacionada taxonómicamente con el género *Pasteuria* sp. se muestran en el Cuadro 3. Los porcentajes de adhesión en los grupos 1 y 2 (Esporas de la bacteria *Pasteuria-like* contra los estadios L₁ y L₂ de *H. contortus* fueron de 20 y 38.9%, respectivamente. En contraste, la adhesión contra las larvas infectivas (L₃) fue solamente de 3.1% (Figura 9g). El porcentaje de

infección para el cuarto estadio del parásito fue de 48.4% (Figura 9h). Las proporciones y porcentajes de esporas de la bacteria *Pasteuria*-like adheridas a los otros nematodos fueron de 36.8% para la mezcla de la población de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Cuadro 4) (Figura 10a, b) y de 7% para *Rhabditis* sp. (Cuadro 5).

Cuadro 3. Proporciones y porcentajes de nematodos que presentaron endosporas adheridas a su cutícula.

Estadio	Réplica	Proporciones de <i>Pasteuria</i> -like adheridas a <i>H. contortus</i>	Nematodos Infectados
L ₁	1	3/19	15.7%
	2	4/19	21.0%
	3	2/19	10.5%
	4	6/19	31.5%
	5	4/19	21.0%
			Media=19.9±7
L ₂	1	10/25	40 %
	2	9/25	36 %
	3	8/25	32 %
	4	5/25	20 %
	5	5/25	20 %
			Media=29.6±9.2%
L ₃	1	0/25	0 %
	2	1/25	4 %
	3	1/25	4 %
	4	0/25	0%
	5	1/25	4 %
			Media=2.4 ± 2.1%
L ₄	1	10/25	40 %
	2	9/25	36 %
	3	8/25	32 %
	4	9/25	36 %
	5	10/25	40 %
			Media=36.8±3.3%

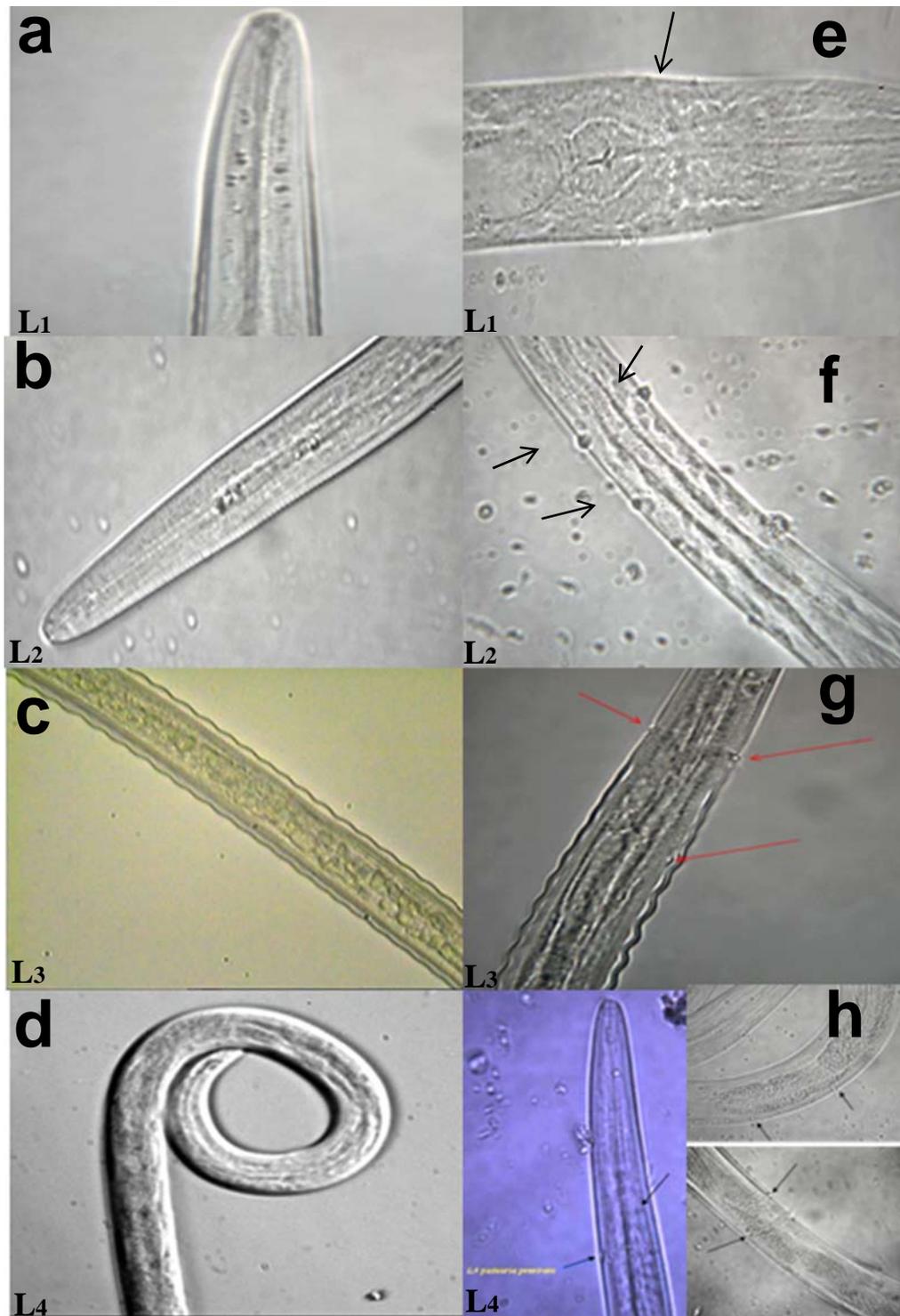


Figura 9. Microfotografías mostrando el aspecto de diversos estadios evolutivos (L₁, L₂, L₃, y L₄) del nematodo *Haemonchus contortus*. (a-d) Larvas del grupo testigo. (e-h) Larvas del grupo tratado con esporas de la bacteria *Pasteuria*-like. Nota: Las esporas adheridas a la cutícula de los nematodos se indican con flechas.

Cuadro 4. Resultados del número de especímenes de la mezcla de la población de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* positivos a la presencia de esporas de la bacteria *Pasteuria*-like adheridas a su cutícula a través de la prueba de adosamiento por centrifugación.

Grupo	Réplica	Proporción de la mezcla de la población de <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> y <i>M. arenaria</i> (J ₂) Infectados con <i>Pasteuria</i> -like	Nematodos infectados
1	1	7/25	28 %
	2	8/25	32 %
	3	6/25	24 %
Media=			28±4

* Se utilizó una población mixta con diversos estadios evolutivos del nematodo.

Cuadro 5. Resultados del número de especímenes del nematodo *Rhabditis* sp. positivos a la presencia de esporas de la bacteria *Pasteuria*-like adheridas a su cutícula a través de la prueba de adosamiento por centrifugación.

Grupo	Réplica	Proporción de <i>Rhabditis</i> sp.* Infectados con <i>Pasteuria</i> -like	Nematodos infectados
2		2/25	8 %
		1/25	4 %
		1/25	4 %
Media=			5.3±2.3

* Se utilizó una población mixta de estadios evolutivos del nematodo.

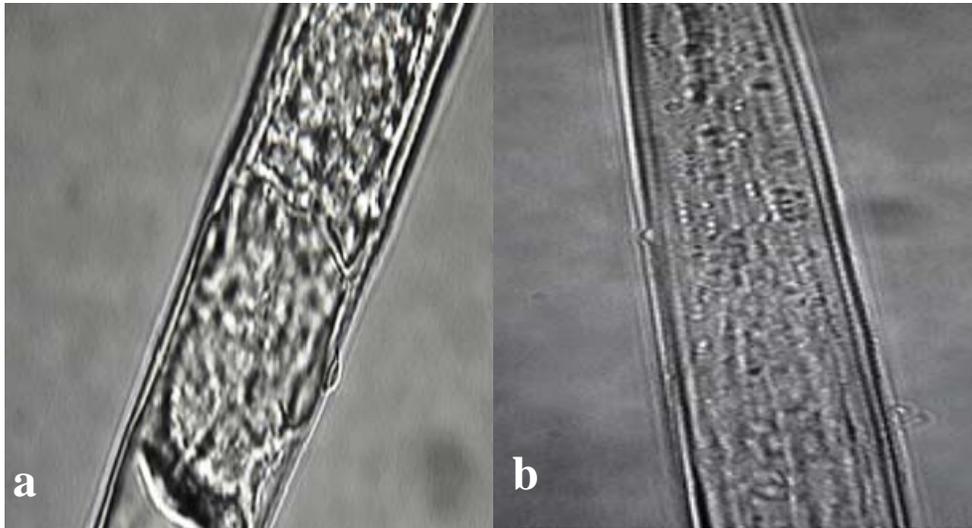


Figura 10. (a, b) Microfotografías mostrando el adosamiento de endosporas de la bacteria *Pasteuria*-like a la cutícula de nematodos juveniles del 2° estadio de la mezcla de la población de *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (100X).

Por otro lado, se sabe que algunas bacterias son consideradas como enemigos naturales de los nematodos con una potencial implicación en el control de nematodos parásitos de plantas. Se ha encontrado que *Pasteuria penetrans* infecta un amplio rango de hospederos susceptibles (más de 300 géneros/especies) de diferentes grupos taxonómicos incluyendo nematodos de vida libre, depredadores, parásitos de plantas y nematodos entomopatógenos (Cheng y Dickson, 1998). También, se ha informado que las endosporas de la bacteria *Pasteuria*-like se adhieren a nematodos parásitos de plantas incluyendo *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*, *Pratylenchus* spp. (Ko *et al.*, 1995) y *Rotylenchulus reniformis* (Hewlet *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta la fecha no hay reportes de endosporas de ninguna clase de bacteria adheridas a nematodos parásitos de animales. En la presente investigación, las endosporas de *Pasteuria*-like mostraron un comportamiento de adhesión muy interesante contra los diferentes grupos de nematodos evaluados. Los resultados mostraron evidencia de que las esporas de la bacteria *Pasteuria*-like no tuvieron afinidad para adherirse a los huevos de *H. contortus*.

Sin embargo, se observó que algunas endosporas de dicha bacteria estaban adheridas a la cutícula de cada uno de los estadios evolutivos del parásito. Aunque la tasa de adhesión fue muy baja, este es el primer informe a nivel mundial sobre la adhesión de las endosporas de la bacteria *Pasteuria-like* a la cutícula de un nematodo parásito de animales. El promedio de adhesión más alto de las endosporas fue observado en la larva histotrópica (L₄) del nematodo parásito de animales *H. contortus*, ya que casi la mitad de los especímenes probados mostraron endosporas adheridas. El promedio de adhesión más bajo (aparte de los huevos del parásito) se observó en las larvas infectivas (L₃). En un ensayo *in vitro* publicado por Mendoza de Gives *et al.* (1999), ninguna endospora de *Pasteuria* spp. se observó adherida a la cutícula de larvas pertenecientes a un grupo de nematodos parásitos de animales incluyendo *H. contortus*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Ostertagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei*, y *Ancylostoma ceylanicum*. Aunque existen diversos trabajos de investigación publicados acerca del amplio rango de nematodos hospederos susceptibles de ser infectados por endosporas la bacteria *Pasteuria-like*, en la literatura disponible no existe información sobre algún estudio enfocado a evaluar la posible infección de nematodos parásitos de animales con esporas de *Pasteuria* o de la bacteria *Pasteuria-like*. En el proceso de infección por endosporas de *Pasteuria* a la cutícula de hospederos nematodos susceptibles, la capa externa tiene un papel importante en la adhesión de las endosporas a la cutícula de los nematodos; ya que ésta contiene cuticlinas, lípidos, proteínas asociadas a la superficie y carbohidratos (Davies, 2009). En el desarrollo de los diferentes estadios evolutivos de los nematodos parásitos de animales, su cubierta superficial cambia rápidamente; por ejemplo, la eclosión de los huevos de *H. contortus* ocurre aproximadamente en un día en el cual el primer estadio larval (L₁) emerge del huevo y está listo para evolucionar al segundo estadio (L₂) y dependiendo de las condiciones micro-ambientales, principalmente temperatura y humedad, se pueden transformar hasta larvas infectivas (L₃) en aproximadamente seis días (Olsen, 1974). Esos

cambios abruptos en la cubierta superficial antigénica podrían actuar como barrera contra enemigos naturales de los nematodos usando una molécula glicoproteica de reconocimiento de los sistemas presentes en la cubierta superficial de los nematodos y evitar su actividad patogénica (Garet-Jones, 1994). En el presente estudio, las endosporas de la bacteria *Pasteuria*-like se encontraron adheridas a la cutícula de diferentes estadios evolutivos del nematodo parásito de animales; aunque esta característica se presentó en un bajo porcentaje. Estos resultados, muestran evidencia, de que no solamente los nematodos parásitos de plantas, sino también los nematodos parásitos de animales pueden ser infectados por esta clase de bacteria. Este hallazgo sugiere que los estadios de vida libre de los nematodos parásitos de animales en el suelo no escapan a la acción de los enemigos naturales de nematodos y deben ser explorados a profundidad para investigar su posible uso como herramientas para el control de dichos parásitos económicamente importantes para la ganadería. Por otro lado, aunque se ha informado que un amplio rango de nematodos hospederos es susceptible de ser infectado con *P. penetrans*, este género está siendo asociado comúnmente al nematodo agallador *Meloidogyne* spp. y hay numerosos trabajos publicados que investigan la actividad biológica entre estos dos organismos (Chen y Dickson, 1998). El promedio de adhesión de endosporas de la bacteria a la cutícula de los nematodos puede variar no solo entre un aislamiento y otro de la bacteria; sino entre los diferentes aislamientos de nematodos (Davies, 2009). Resultados prometedores se están logrando con *Pasteuria* spp. en el control de nematodos parásitos de plantas (Gowen *et al.*, 2008). Se han publicado varios trabajos experimentales desde la década de los 80's sobre el uso de la bacteria *Pasteuria* spp. contra nematodos que afectan a diferentes cultivos. La adición de J₂ de *Meloidogyne incognita* infectados con endosporas de *Pasteuria* sp. al suelo de plantas de jitomate, resultó en una reducción significativa (86%) en la invasión de raíces de tomate por la segunda generación de nematodos (Davies, 1988). También se ha reportado que *P. penetrans*

actúa como agente de control biológico contra *Heterodera cajani*, ya que redujo la población del número de juveniles del parásito en un 99%; mientras que la población de quistes del parásito en el suelo se redujo en un 87% (Sing y Dhawan, 1994). En un reciente estudio, se estableció la infección y propagación *in vitro* de endosporas de *Pasteuria* spp. a través de cadáveres del nematodo reniforme *Rotylenchulus reniformes* infectados con la bacteria (Hewlett *et al.*, 2009); lo cual podría tener una implicación importante en la reducción de las infecciones por nematodos. Otras especies de bacterias también se encuentran afectando la cutícula de diferentes nematodos; por ejemplo, *Microbacterium nematophilum*, organismo coryneforme Gram +, que fue accidentalmente encontrado en cultivos contaminados de *Caenorhabditis elegans* en el laboratorio (Hodking *et al.*, 2000). Esta bacteria se adhiere a la cutícula de la región perianal de los nematodos, afectando su fertilidad. La cutícula de los nematodos también se ha reportado como susceptible de ser infectada por otros organismos como el hongo *Drechmeria coniospora* que produce esporas adhesivas a la cutícula de nematodos (Jansson, 1994). La actividad biológica de estos microorganismos está siendo evaluada solo contra un reducido rango de géneros/especies de nematodos. A la fecha no se encontró ningún trabajo publicado sobre su posible actividad contra nematodos parásitos de animales. La única especie de bacteria cuya actividad letal para nematodos parásitos de animales que está siendo estudiada es *Bacillus thuringiensis* y que ha generado información con resultados promisorios en el control de esos parásitos (López-Arellano *et al.*, 2006; Vázquez-Pineda *et al.*, 2010). Se ha descubriendo que las bacterias son importantes enemigos naturales de los nematodos en diferentes sistemas de cultivos agrícolas (Gómez *et al.*, 2010). Los nematodos parásitos de animales comparten el mismo hábitat con los antagonistas de nematodos de plagas agrícolas. La supervivencia de los organismos en la naturaleza requiere de un estrecho y continuo proceso de coevolución entre ellos. Las bacterias que producen endosporas tales como las del género *Pasteuria* sp. y otros microorganismos

podrían tener un uso potencial en el control de nematodos parásitos de animales; sin embargo, los estudios sobre las interacciones entre nematodos y sus organismos patógenos necesitan ser explorados a profundidad para entender el funcionamiento de estos sistemas biológicos y su posible aplicación biotecnológica en el campo.

4.6. CONCLUSIONES

La identificación molecular a través de la secuencia nucleotídica 16s rRNA de la bacteria *Pasteuria* (*Pasteuria*-like) muestra un 94% de similitud con la bacteria *Comamonas aquatica*. La bacteria *Pasteuria* (*Pasteuria*-like) aislada en el presente estudio, posee la capacidad de adosamiento *in vitro* a la cutícula de diferentes estadios evolutivos de *Haemonchus contortus*; así como a los nematodos *Rhabditis* sp., *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita*.

4.7. LITERATURA CITADA

- Chen, X.Z., Dickson, D.W. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology and Biological Control Potential. *Journal of Nematologists*. 30(3):313-340.
- Cortazar-Martínez, E., Silva-Rincón, E.P. 2004. Métodos físico-químicos en biotecnología, PCR. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. pp: 1-40
- Davies, K., Rowe, J., Manzanilla-López, R., Opperman, C.H. 2011. Re-evaluation of the life-cycle of the nematode-parasitic bacterium *Pasteuria penetrans* in root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Nematology*. 13(7):825-835.
- Davies, K.G. 2009. Understanding the interaction between an obligate hyperparasitic bacterium, *Pasteuria penetrans* and its obligate plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne* spp. *In: Advances in Parasitology. Plant Pathology and Microbiology*, Rothamsted Research, Harpenden, United Kingdom. Elsevier Ltd. pp: 211-245

- Davies, K.G., Kerry, B.R., Flynn, C.A. 1988. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology*. 112:491-501.
- El-Banna, N.M. 2007. Antifungal activity of *Comamonas acidovorans* isolated from water pond in South Jordan. *African Journal of Biotechnology*. 6(19): 2216-2219.
- El-Borai, F.E., Duncan, L.W., Dunn, D. A *Pasteuria*-like organism on an entomopathogenic nematode parasite of *Diaprepes abbreviatus*. In: *Memories Fourth International Congress of Nematology*. 8-13 June, 2002. Tenbel, La Galletas, Arona, Tenerife, Canary Islands, Spain. (Eds.). Brill Leiden, Boston Koln. p 94
- Fargette, M., Davies, K.G., Robinson, M.P., Trudgill, D.L. 1994. Characterization of resistance breaking *Meloidogyne incognita*-like populations using lectins, monoclonal antibodies and spores of *Pasteuria penetrans*. *Fundamental Applied Nematology*. 17(6):537-542.
- Fox, G.E., E. Stackebrandt, R.B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T.A. Dyer, R.S. Wolfe. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 209:457-463.
- Gareth-Jones, E.B. 1994. Fungal adhesion. *Mycological Research*. 98:961-981.
- Gómez, L., Gandarilla, H., Rodríguez, M.G. 2010. The identification of *Pasteuria penetrans* como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. *Revista de Protección Vegetal*. 25:137-149.
- González-Cruz, M.E., Mendoza de Gives, P., Quiroz-Romero, H. 1998. Comparison of the trapping ability of *Arthrobotrys robusta* and *Strongyloides papillosus*. *Journal of Helminthology*. 72:209-213.
- Gowen, S., Davies, K.G., Pembroke, B. 2008. Potential use of *Pasteuria* spp. In the management of plant parasitic nematodes. *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*. Ciancio A, Mukerji GK. (Eds.). Springer. pp: 205-219

- Hewlett, T.E., Dickson, D.W. 1993. A centrifugation method for attaching endospores of *Pasteuria* spp. to nematodes. *Journal of Nematology*. 25:785-788
- Hewlett, T., Stetina, S., Schmidt, L., Waters, J., Lee, S., Rich, J. 2009. Identification of *Pasteuria* spp. That parasitizes *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology*. 41(4):338.
- Hodgkin, J., Kuwabara, P.E., Corneliussen, B. 2000. A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nemato de *C. elegans*. *Current of Biology*. 10:1615-1618.
- Jansson, H.B. 1994. Adhesion of conidia of *Drechmeria coniospora* to *Caenorhabditis elegans* wild type and mutants. *Journal of Nematology*. 26:430-435.
- Ko, M.P., Bernard, E.C., Schmitt, D.P., Sipes, B.S. 1995. Ocurrance of *Pasteuria*-like organism on selected plant-parasitic nematodes of pineapple in the Hawaiian Islands. *Journal of Nematology*. 27(3):395-408.
- Liébano, H.E. 2004. Identificación morfométrica de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales y pulmonares en rumiantes domésticos de México. *En: Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes de México*. Vázquez V. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. México. pp. 26-77.
- López-Arellano, M.E., Mendoza de Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., Liébano-Hernández, E. 2010. Buenas prácticas en el manejo de antihelmínticos para el control de parásitos en rumiantes. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Folleto Técnico No. pp: 8.1-38
- López, M.E., Flores, J., Mendoza, P., Vázquez, V., Liébano, E., Bravo, A., Herrera, D., Godínez, E., Vargas, P., Zamudio, F. 2006. Use of *Bacillus thuringiensis* Toxin as an Alternative Method of Control against *Haemonchus contortus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1081:347-354.

- Maroto, R., Jiménez, A.E., Romero, J.J., Álvarez, V., De Oliveira, J.B., Hernández, J. 2011. First report of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep from Costa Rica. *Veterinary Medicinal International*. (In Press).
- Martínez-Romero, E. 2010. Microbiología General. *En: Microbios*. Editores. Esperanza
- Martínez-Romero, E., Martínez-Romero, J.C. (Eds.) Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno. pp: 24-45
- Mauchline, T.H., Mohan, S., Davies, K.G., Schaff, J.E., Opperman, C.H., Kerry, B.R., Hirsch, P.R. 2010. Method for release and multiple strand amplification of small quantities of DNA from endospores of the fastidious bacterium *Pasteuria penetrans*. *Letters in Applied Microbiology*. 50(5):515-21.
- Mendoza de Gives, P. 2011. Hongos que capturan, matan y se alimentan de nematodos parásitos del ganado. *En: "Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos"*. Quiroz- Romero H, Figueroa-Castillo A, Ibarra-Velarde F, López-Arellano ME. 1 (Eds.). Ciudad de México, DF. pp: 345-352
- Mendoza de Gives, P., Davies, K.G., Morgan, M., Behnke, J.M. 1999. Attachment test of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of plant and animal parasitic nematodes, free living nematodes and *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Helminthology*. 73:67-71.
- Mendoza de Gives, P., Flores-Crespo, J., Herrera, R.D., Vázquez, P.V., Liébano, H.E., Ontiveros, F.G.E., Vázquez, P.C. 1998. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae on ovine faeces using an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores. *Journal of Helminthology*. 72:343-347.
- Mendoza de Gives, P., López-Arellano, Ma. E., Liébano-Hernández, E., Aguilar-Marcelino, L. 2012. Plant Extracts: A potential tool for controlling animal parasitic nematodes. *In: Biosphere* (Ivona Lovric Editor) *In: Tech inc. Slavka Krautzeka Rijeka, Croatia*. (In Press).

- Mendoza de Gives, P., Torres-Acosta, J.F.J. 2012. Biotechnological Use of Fungi in the Control of Ruminant Parasitic Nematodes. *In*: “Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Diseases”, Adolfo Paz and María Sol Árias Vázquez. Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, New York. (In Press).
- Molento, M.B., Fortes, F.S., Pondelek, D.A., Borges, F.A., Chagas, A.C., Torres-Acosta, J.F., Geldhof, P. 2011. Challenges of nematode control in ruminants: focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*. 180(1-2):126-132.
- Ojeda-Robertos, N.F., Mendoza de Gives, P., Torres-Acosta, J.F., Rodríguez-Vivas, R.I., Aguilar-Caballero, R. J. 2005. Evaluating the effectiveness of a Mexican strain of *Duddingtonia flagrans* as a biological control agent against gastrointestinal nematodes in goat faeces. *Journal of Helminthology*.79:1-8.
- Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F., Ayala-Burgos, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Valero-Coss, R.O., Mendoza-de-Gives, P. 2009. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Veterinary Research*.5:46-50.
- Olsen, W. 1974. Animal parasites. Their life cycles and ecology. University Park Press, Baltimore. pp: 430-434
- Patten, T., Good, B., Hanrahan, J.P., Mulcahy, G., De-Waal, T. 2011. Gastrointestinal nematode control practices on lowland sheep farms in Ireland with reference to selection for anthelmintic resistance. *Irish Veterinary Journal*. 64(1):4.

- Ramírez, V.G., López, A.M.E., Mendoza de G, P., Liébano, H.E., Vázquez, P.M. 2006. Desarrollo de nematodos endoparásitos de *Haemonchus contortus* *in vitro* como modelo biológico de estudio. *En: Memorias en el VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria*. Acapulco, Guerrero, México. p 24.
- Sánchez-Portillo, J.F. 2010. Efecto de quitina y quitosano sobre huevos y juveniles de nematodos formadores de nodulos radiculares, *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita*. Bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. pp. 20-36.
- Sasikala, C., Jiwal, S., Rout, P., Ramya, M. 2011. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated. *World Journal Microbiology Biotechnology*. (In press).
- Sayre, R.M., Walter, D.E. 1991. Factors affecting the efficiency of natural enemies of nematodes. *Annual Review Phytopathology*. 29:149-156.
- Sing, B., Dhawan, S.C. 1994. Effect of *Pasteuria penetrans* on the penetration and multiplication of *Heterodera cajani* in *Vigna unguiculata* roots. *Nematologia Mediterranean*. 22:159-161.
- Stirling, G.R., Watchel, M.F. 1980. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica*. 26:308-312.
- Sturhan, D. 1996. Diversity and host specificity in *Pasteuria* bacteria. *Nematropica* 26:222-226.
- Sturhan, D., Shutova, T.S., Akimov, N.V., Subbotin, A.S. 2005. Occurrence, host, morphology, and molecular characterization of *Pasteuria* bacteria parasitic in nematodes of the family Plectidae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 88:17-26.
- Tribe, H.T. 1980. Prospects for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Parasitology*. 81:619-639.

Vázquez de Jesús, E. 2009. Evaluación de cuatro métodos de cultivo *in vitro* para la reproducción de nematodos depredadores para el control de nematodos parásitos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.pp: 1-32

Vázquez-Pineda, A., Yáñez-Pérez, G.N., López-Arellano, M.E., Mendoza de Gives, P., Liébano-Hernández, E., Bravo de la Parra, A. 2010. Biochemical characterization of two purified proteins of the IB-16 *Bacillus thuringiensis* strains and their toxicity against the sheep nematode *Haemonchus contortus in vitro*. Transboundary and Emerging Diseases. 1(2):111-114.

V. **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEPRADADORA DEL ÁCARO *Lasioseius penicilliger* SOBRE *Haemonchus contortus* (L₃) (Nematoda: Trichostrongylidae) Y NEMATODOS DE VIDA LIBRE**

5.1. RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad depredadora *in vitro* del ácaro *Lasioseius penicilliger* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (L₃) (Nematoda: Trichostrongylidae) y nematodos de vida libre. La cepa del ácaro depredador de nematodos *Lasioseius penicilliger* fue aislada a partir de suelo proveniente de una muestra de Martínez de la Torre, Veracruz, depositada en placas de Petri con medio agua-agar para la obtención de hongos nematófagos. La confrontación ácaros/nematodos fue llevada a cabo en cajas de Petri de plástico tipo relojero (CPR) con agua agar y duró 5 días. Se conformaron tres series de CPR con 10 repeticiones cada una. En la serie 1, se adicionaron 1500 larvas de *Haemonchus contortus*. En la serie 2, se adicionaron 1000 larvas de *Panagrellus redivivus*. En la serie 3, se agregaron 1000 larvas de *Rhabditis* sp. En cada una de las cajas de de las series 1, 2 y 3 se depositaron 5 ácaros adultos de *L. penicilliger* y se incubaron a temperatura ambiente. Las observaciones fueron llevadas a cabo diariamente durante 5 días, utilizando un microscopio estereoscopio (4X). La viabilidad y la alimentación de *L. penicilliger* sobre los nematodos, fue revisada y se llevó a cabo un registro de los datos diariamente. Los resultados mostraron un porcentaje de reducción de 79.5% para *H. contortus*, 64.3% para *P. redivivus* y 80.7% para *Rhabditis* sp. con relación a sus propios controles. Este es el primer registro de un ácaro depredador de nematodos alimentándose de un nematodo parásito de animales.

Palabras clave: Control biológico, *Haemonchus contortus*, *Lasioseius penicilliger*, ácaro depredador de nematodos.

5.2. ABSTRACT

The aim of the present study was to assess the *in vitro* predatory activity of *Lasioseius penicilliger* mite on *Haemonchus contortus* (L₃) (Nematoda: Trichostrongylidae) and free living nematodes. The population of the mite *Lasioseius penicilliger* was casually isolated as a contaminant from corn meal agar plates added with a soil sample from Martinez de la Torre municipality, Veracruz State, prepared to obtain nematophagous fungi. The confrontation between mites and nematodes was carried out in water agar watchmaker plastic Petri dishes (WPD) for five days. Three series of WPD were established. Everyone of WPD from series 1 was added with 1500 *Haemonchus contortus* infective larvae. In Series 2, 1000 *Panagrellus redivivus* (a mixed stage population) were added. Series 3, received 1000 *Rhabditis* sp. larvae per WPD. Everyone of the experimental WPD from series (1, 2, and 3) was added with five adult specimens of *L. penicilliger* mites. Each series considered 10 replicates. The interaction between mites/nematodes was daily observed using a stereomicroscope. Results were obtained by quantifying the number of nematodes recovered from WPD after 5 days interaction. The results showed the following reduction percentages with respect to their own control group: 79.5% for *H. contortus*, 64.3% for *P. redivivus* and 80.7% for *Rhabditis* sp. This is the first report of a predator mite feeding on a ruminant parasitic nematode.

Key words: Biological control, *Haemonchus contortus*, *Lasioseius penicilliger*, mite predator of nematodes.

5.3. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existe una amplia variedad de antagonistas que habitan el suelo y forman parte del ecosistema y que han despertado un gran interés en los sistemas de producción orgánica como herramientas útiles en el control de plagas agrícolas (Tribe, 1980; Small, 1987). Dentro de los antagonistas naturales de nematodos se incluyen hongos como *Duddingtonia flagrans* (Mendoza de Gives *et al.*, 2011; Mendoza de Gives y Torres Acosta, 2012), bacterias como *Bacillus thuringiensis* (López-Arellano *et al.*, 2006) y *Pasteuria penetrans* (Mendoza de Gives *et al.*, 1999), nematodos depredadores de nematodos (nematodos caníbales) (Rodríguez-Esparza *et al.*, 2007; Bilgrami *et al.*, 2008; Vázquez de Jesús, 2009) y ácaros nematófagos (Bilgrami, 1994). Los ácaros Mesostigmata del género *Lasioseius* (Berlese, 1916) pertenecen a la Familia Podocinidae (Berlese) y consiste de 5 subgéneros: *Lasioseius* s. str., *Borinquolaeps* Fox, 1946 n. comb., *Crinidens* Karg, 1980 n. comb., *Cuspiacus* n. subgen., y *Endopodalius* n. subgen. El género *Lasioseius* tiene una distribución mundial y también se ha encontrado que habitan nidos de roedores y aves. Las especies de este género se consideran depredadores (Christian y Karg, 2006) y pueden encontrarse en una diversidad de sustratos, como en suelos, hojarasca y en asociación con insectos y vertebrados (Hughes, 1976; Walter y Lindquist, 1997). *Lasioseius* es considerado como uno de los grupos de ácaros más abundantes y representativos de la mesofauna (Christian y Karg, 2006). *L. penicilliger* es identificado como una especie depredadora. Imbriani y Mankau en 1983, reportaron que esta especie se alimenta de nematodos del suelo. Este comportamiento de alimentación también fue reportado por Sharma (1971). El ciclo biológico de *Lasioseius* sp., comprende distintas etapas de desarrollo desde huevo, protoninfa, deuto-ninfa y adulto, el desarrollo de cada estadio depende principalmente de la temperatura y requiere de 9 a 19 días para completar el ciclo (Christian y Karg, 2006). Por otro lado, los nematodos son unos de los grupos más representativos de la fauna del suelo y su población puede contener hasta 20 millones

de individuos por metro cuadrado de suelo (Barron, 1977). Durante el proceso evolutivo de millones de años los nematodos se han adaptado y desarrollado la capacidad de establecerse en hábitats biológicos y ecológicos distintos que incluyen plantas, animales y seres humanos (Lee y Atkinson, 1977). Uno de los nematodos parásitos de rumiantes más importantes a nivel mundial es *Haemonchus contortus* (Khalafalla *et al.*, 2011). Este nematodo causa un importante impacto económico principalmente en rebaños de ovinos y caprinos. El principal cambio patogénico que provoca este parásito a los animales infectados es gastritis con edema de la submucosa del abomaso debido a la presencia del parásito, principalmente por los hábitos de hematofagia de la etapa histotrópica y adulta (Hidalgo-Arguello y Cordero del Campillo, 1999). Estos cambios patológicos provocan en los animales pérdida de apetito, crecimiento lento, malnutrición (Holmes y Coop, 1994) y el ataque masivos de *H. contortus* puede ocasionar la muerte de animales jóvenes (Macedo-Barragán *et al.*, 2009). Hasta ahora, el único método empleado para controlar poblaciones de parásitos es la quimioterapia. Este método consiste en el tratamiento periódico y regular de los animales con el uso de compuestos químicos antihelmínticos, para reducir la población de nematodos parásitos en los rebaños (Mendoza de Gives y Herrera-Rodríguez, 2004). Sin embargo, la inminente presencia de resistencia antihelmíntica en los parásitos a la mayoría de las drogas químicas comercialmente disponibles, amenazan de manera seria la eficacia de tales compuestos (Encalada-Mena *et al.*, 2008; Sager *et al.*, 2010). Los antagonistas naturales de los nematodos están considerados como herramientas potenciales y como agentes de control biológico de varias enfermedades. Los ácaros nematófagos han demostrado un hábito alimenticio voraz contra nematodos fitopatógenos. Aunque existen algunos trabajos científicos acerca de la actividad depredadora de *Lasioseius* contra nematodos; no existe hasta el momento evidencia de la actividad depredadora de esta especie contra nematodos parásitos de animales. En la presente investigación, se evaluó la actividad depredadora del ácaro *L. penicilliger* sobre larvas

del 3er. estadio de desarrollo de *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) y nematodos de vida libre.

5.4. MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.1. Localización

Esta investigación se llevó a cabo en el Departamento de Helmintología, del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET, INIFAP), Jiutepec, Estado de Morelos, México y la Sección de Artropodología, Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), Coyoacán, Distrito Federal, México.

5.4.2. Material Biológico

5.4.2.1. Ácaros

Los ácaros fueron aislados a partir de una caja de Petri con agar conteniendo una muestra de suelo proveniente de Martínez de la Torre, Veracruz, preparada para la obtención de hongos nematófagos. Los ácaros fueron transferidos a placas de Petri con medio agua-agar al 2%, posteriormente se adicionó un número indeterminado de individuos de vida libre de nematodos *Rhabditis* sp. como fuente principal de alimento para facilitar su reproducción e incrementar la población. Se realizaron pases periódicos de ácaros (cada 5 días) a cajas con agar estéril con la finalidad de obtener una colonia pura de ácaros. Algunos individuos fueron transferidos a portaobjetos para su montaje con el uso del medio de Hoyer (Faraji y Karg, 2006) para su identificación. Los ácaros fueron examinados bajo un microscopio (4X). Las características morfológicas se observaron con un microscopio de contraste de fases (10X, 40X, y 100X). La identificación taxonómica de los ácaros fue realizada utilizando las claves de Hughes (1976). Los cultivos de ácaros fueron mantenidos a temperatura ambiente bajo condiciones de oscuridad (Bilgrami, 1994).

5.4.2.2. Nematodos

5.4.2.2.1. Larvas de *Haemonchus contortus* (L₃)

Se empleó la cepa “Hueytamalco” de *H. contortus* perteneciente al Departamento de Helminología, Centro Nacional de Investigación Disciplinario en Parasitología Veterinaria, INIFAP, México. La cepa fue originalmente aislada de un ovino infectado naturalmente en el municipio de Hueytamalco, Estado de Puebla, México y mantenido bajo condiciones de criopreservación y con reinfección periódica en ovinos (Liébano-Hernández *et al.*, 1996). La producción de larvas infectantes se realizó inoculando por vía oral a un ovino, utilizando una dosis de 350 larvas por kg de peso corporal. Después de un período pre-patente de 21 días, las heces fueron colectadas directamente del recto de animales infectados. Se empleó la técnica de McMaster para observar la presencia de huevos de nematodos y para estimar el número de huevos eliminados por gramo de heces. Posteriormente, los cultivos fecales fueron colocados en recipientes plásticos y mezclados con partículas de poliestireno. El material fecal fue macerado y mezclado con una cuchara de madera y se incorporó agua con la finalidad de mantener la oxigenación y humedad adecuada de los cultivos y de esta manera promover la óptima eclosión de los huevos (Liébano, 2004). Seis días después las larvas fueron recuperadas de los cultivos fecales utilizando la técnica del embudo Baermann por un período de 12 h (Valcárcel-Sancho *et al.*, 2009).

5.4.2.2.2. *Panagrellus redivivus*

Se empleó una cepa del nematodo de vida libre *P. redivivus*, proporcionada por el Dr. Roberto de Lara de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM, Xochimilco, México). Los nematodos fueron cultivados en recipientes de plástico empleando hojuelas de avena comercial y agua como sustrato. Las hojuelas de avena y el agua se mezclaron y se esterilizaron en un horno de microondas (De Lara *et al.*, 2007). Algunos nematodos fueron transferidos al sustrato. Los

recipientes fueron cubiertos con una tapa de aluminio con una ventana de malla de tela fina para permitir la oxigenación. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (25-30 °C). Después de una semana la población de nematodos se incrementó de manera considerable.

5.4.2.2.3. *Rhabditis* sp.

Se empleó una cepa del nematodo de vida libre *Rhabditis* sp. aislada a partir de una muestra de suelo en el municipio de Jiutepec, Estado de Morelos, México. Esta cepa fue mantenida mediante pases periódicos a placas de Petri que contenían agua-agar. Se colocaron 0.05 g de crema de cacahuete en el centro de cada placa Petri, como una fuente de energía para promover un crecimiento importante de la población de nematodos. Después de cinco días, la población de nematodos se incrementó considerablemente.

5.4.3. Diseño experimental

La confrontación ácaros/nematodos fue realizada en cajas de plástico de 2 cm de diámetro y 1 cm de alto, tipo relojero (CPR) (Figura 1). Las CPR contenían medio agua-agar al 2%.

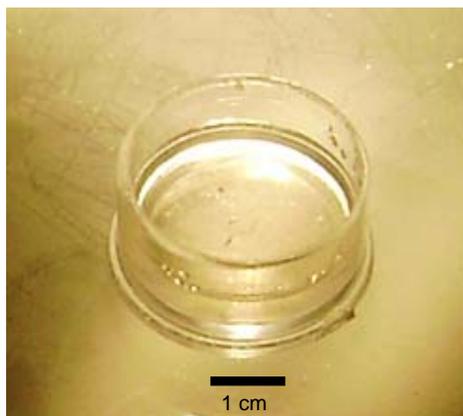


Figura 1. Fotografía de una caja tipo relojero (CPR).

Se conformaron tres series de CPR. En la serie 1, se adicionaron 1500 larvas de *H. contortus*. En la serie 2, se adicionaron 1000 larvas de *P. redivivus*. En la serie 3 se agregaron 1000 larvas de *Rhabditis* sp. A las series 1, 2 y 3 se agregaron 5 ácaros adultos de *L. penicilliger* (Figura 2).

Cada serie tuvo 10 repeticiones. Diariamente se llevaron a cabo observaciones de las CPR, utilizando un microscopio estereoscópico (4X). La confrontación entre ácaros y nematodos duró 5 días. Transcurridos los 5 días se retiraron los ácaros de cada CPR de la serie, y 2 y 3. Los nematodos se recuperaron lavando cada CPR con agua destilada, el líquido se almacenó en tubos Eppendorf de plástico de 1.5 mL.

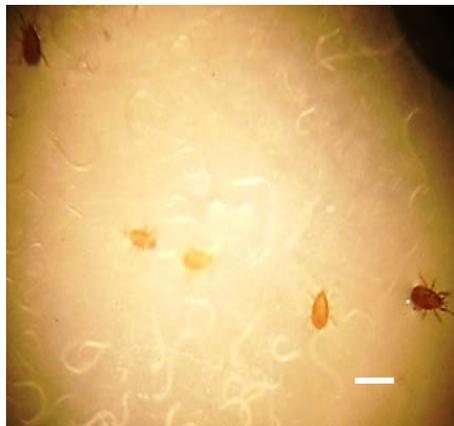


Figura 2. Aspecto de larvas de *P. redivivus* y 5 ácaros adultos de *L. penicilliger*, en cajas de relojero (CPR) vistos al microscopio estereoscópico (4X). Barra escala=500µm.

La cuantificación de los nematodos se realizó tomando 10 alícuotas de 5 µL cada una y se colocaron en un portaobjetos de vidrio para observarse en un microscopio óptico (10X). Los hábitos alimenticios del ácaro contra nematodos de las tres especies fueron observados y registrados.

El porcentaje de reducción de la población de nematodos por la acción de *L. penicilliger* fue estimada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de reducción de nematodos} = \frac{\bar{X} \text{ testigo} - \bar{X} \text{ tratado}}{\bar{X} \text{ testigo}} \times 100$$

Dónde:

Grupo testigo=Media de grupo control de nematodos recuperados;

Grupo tratado = Media del grupo tratado de nematodos recuperados;

(Casillas-Aguilar *et al.*, 2008).

5.4.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el software Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998). Se usó un análisis ANOVA con un diseño completamente al azar, considerando el valor promedio de los nematodos recuperados en cada grupo de la variable/respuesta, posteriormente se realizó una comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey. El análisis consideró un valor de $\alpha=0.05$.

5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características morfológicas del ácaro aislado, concuerdan con la descripción de *Lasioseius penicilliger* descrita por Christian y Karg, en el 2006 (Figura 3).

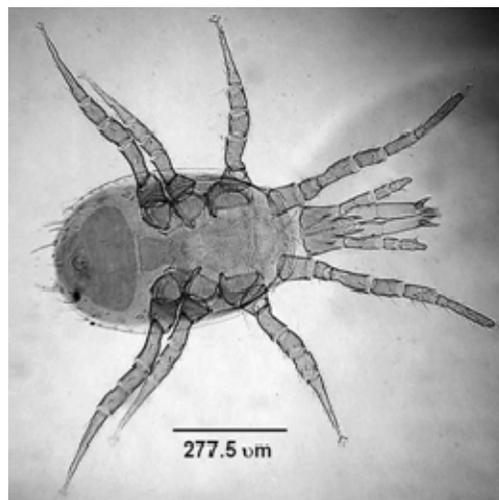


Figura 3. Fotografía mostrando la parte ventral del ácaro nematófago *L. penicilliger*.

La Figura 4 muestra una secuencia fotográfica sobre la actividad depredadora del ácaro *L. penicilliger* en contra de larvas infectantes de *H. contortus*.

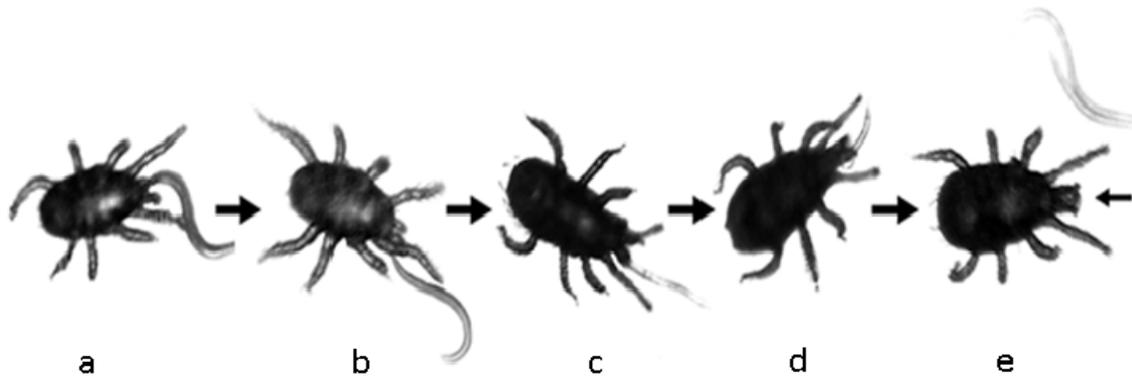


Figura 4 (a-e). Actividad depredadora de *L. penicilliger* sobre larvas infectantes de *H. contortus*.

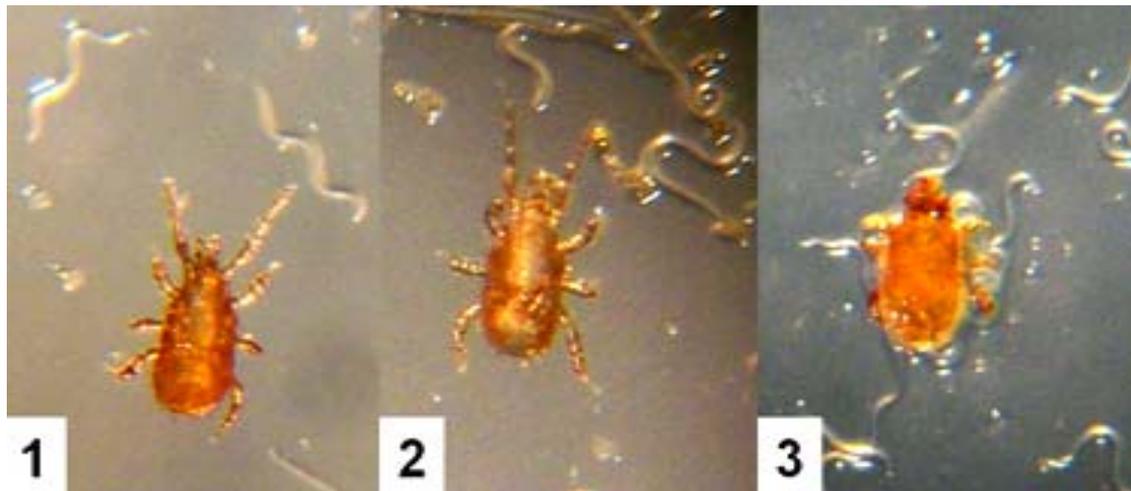


Figura 5 (1-3). Actividad depredadora de *L. penicilliger* sobre larvas de *Panagrellus redivivus*.

El promedio de nematodos recuperados y los porcentajes de reducción del número de nematodos por el efecto depredador de *L. penicilliger*, se muestra en el cuadro 1. Los resultados muestran las medias de los porcentajes de reducción de la población de nematodos de 79.5, 64.3 y 80.7% para las especies *H. contortus*, *P. redivivus* y *Rhabditis* sp., respectivamente.

Cuadro 1. Promedios y porcentajes de reducción de tres diferentes géneros de nematodos recuperados después de 5 días de interacción *in vitro* con el ácaro *Lasioseius penicilliger*.

Nematodo	Grupo testigo	Grupo tratado	% de reducción
	$\bar{X}(\pm DE)$	$\bar{X}(\pm DE)$	
<i>H. contortus</i>	895.2 \pm (209.5)	183 \pm (195.7) CV=170%	79.5 % ^a
<i>P. redivivus</i>	1779.6 \pm (931.8)	634 \pm (482.9) CV=138%	64.3% ^a
<i>Rhabditis</i> sp.	959.2 \pm (471.7)	184.8 \pm (254.5) CV=76%	80.7% ^a

CV=Coefficiente de variación

^a Letras distintas en cada media de columna indica diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$).

Número de repeticiones=10

DE=Desviación estándar

El uso de antagonistas naturales de nematodos está ganando interés en el control de plagas agrícolas y de enfermedades parasitarias en la ganadería debido al uso indiscriminado de plaguicidas y drogas de origen químico para el control de los nematodos parásitos (Márquez-Lara, 2008). La utilización de estos productos es un riesgo de contaminación ambiental, principalmente cuando los animales tratados con estos productos químicos, eliminan a través de las heces u orina algunos compuestos bio-activos al suelo dejando residuos tóxicos, exponiendo a organismos benéficos a un riesgo letal; además de quedar como residuos tóxicos en productos de origen animal para el consumo humano (Martínez y Cruz, 2009). En la presente investigación, se evaluó la actividad depredadora del ácaro *L. penicilliger* sobre larvas del 3er. estadio de desarrollo de *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) y nematodos de vida libre. El primer registro de un ácaro alimentándose de nematodos fue reportado por Linford y Oliviera

en 1938. Estos autores encontraron una actividad depredadora de *Tyrophagus putrescentiae* (Sarcoptiformis: Acaridae) sobre nematodos fitopatógenos agalladores. Rodríguez *et al.* (1962), observaron que el ácaro depredador *Macrocheles muscadomestica* mostraba una clara preferencia por alimentarse de nematodos del género *Rhabditis* sp. que por huevos de la mosca del cuerno *Haematobia irritans*. Posteriormente, se registró el comportamiento depredador de un ácaro oribátido *Pergalumna* sp. que se observó alimentándose de los nematodos fitoparásitos *Pelodera lambdiense* y *Tylenchorhynchus martini* (Rockett y Woodring, 1966). Otros géneros y especies de ácaros, como *T. putrescentiae*, han sido reportados como importantes depredadores utilizando una amplia variedad de nematodos como presa, incluyendo nematodos saprófagos, fitopatógenos y nematodos depredadores (Bilgrami, 1994). Por otro lado, el género *Lasioseius* también ha sido registrado como miembro del grupo de ácaros nematófagos. Imbriani y Mankau. (1983), reportaron la actividad depredadora de *L. sculpatus* sobre el nematodo fitopatógeno *Aphelenchus avenae* y del nematodo muscícola *Cephalobus* sp.; en este estudio los autores también reportaron un incremento en la población de ácaros y un significativo descenso de la población depredada. La presente investigación reporta por primera vez evidencia de la actividad depredadora *in vitro* de *L. penicilliger* sobre larvas infectantes del nematodo parásito de ovinos *H. contortus*. El ácaro *L. penicilliger* presenta algunas ventajas en sus características biológicas como un posible agente potencial de control de nematodos parásitos de animales; por ejemplo, un ciclo de vida corto (19 días) y una reproducción partenogenética, estas características biológicas permiten incrementar su población a mediano plazo. La principal característica de esta especie depredadora es su comportamiento agresivo contra las larvas infectantes de *H. contortus*, tal como lo reportan los autores de la presente investigación. Por otro lado, el hecho de que *L. penicilliger* mostrara una actividad depredadora contra los nematodos de vida libre puede ser una característica indeseable; ya que estos nematodos juegan un papel biológico y ecológico importante en el suelo; más aún,

estos ácaros son controladores naturales de los nematodos de vida libre en el suelo; la actividad depredadora de los ácaros de los nematodos de vida libre es una actividad regular que ocurre en el suelo para establecer el equilibrio entre las diferentes poblaciones de nematodos en la naturaleza (Hyvönen y Persson, 1996). Los ácaros nematófagos son organismos interesantes, ya que es factible incrementar substancialmente el número de individuos de su población (Wallwork, 1967) para utilizarse como agentes potenciales de control biológico y de esta manera reducir las poblaciones de nematodos parásitos de plantas y animales. Sin embargo, no existen registros disponibles acerca de la actividad nematófaga de algún ácaro contra un nematodo parásito de animales. Este descubrimiento es considerado como el primer registro en este sentido y aunque sólo es un trabajo inicial, puede tener una implicación en futuros trabajos de investigación para establecer el uso de estos organismos en el control de nematodos parásitos de animales.

5.6. CONCLUSIONES

El ácaro *Lasioseius penicilliger* muestra un comportamiento depredador, con porcentajes de reducción de la población de nematodos de 79.5, 64.3 y 80.7% para las especies *H. contortus* (L₃), *P. redivivus* y *Rhabditis* sp., respectivamente.

5.7. LITERATURA CITADA

Barron, G.L. 1977. The Nematode-destroying Fungi.1st Guelph, Ontario, Canada Canadian Biological Publications Ltd. pp: 1-16.

Berlese, A. 1916. Centuria prima di Acari nuovi. Redia 12:19-67.

Bilgrami, A.L. 1994. Predatory behavior of a nematode feeding mite *Tyrophagus putrescentiae* (Sarcoptiformes: Acaridae). Fundamental and Applied Nematology. 17(4):293-297.

- Bilgrami, A.L., Brey, C., Gaugler, R. 2008. First field release of a predatory nematode, *Mononchoides gaugleri* (Nematoda: Diplogasterida), to control plant-parasitic nematodes. *Nematology*.10:143-146.
- Casillas-Aguilar, J.A., Mendoza-de Gives, P., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E. 2008. Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine Haemonchosis. *Animal Biodiversity and emerging diseases: Annals of New York Academy of Sciences*. 1149:161-163.
- Christian, A., Karg, W. 2006. The predatory mite *Lasioseius* Berlese, 1916 (Acari, Gamasina). *Abhandlungen Berichte Naturkundemus Görlitz*. Görlitz, Germany. pp: 99-25.
- De Lara, R., Castro, T., Castro, J., Castro, G. 2007. Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Espirulina* sp. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 42(1):29-36.
- Encalada-Mena, L.A., López-Arellano, M.E., Mendoza-de Gives, P., Liébano-Hernández, E., Vázquez-Prats, V., Vera-Ycuspinera, G. 2008. Primer informe en México sobre la presencia de resistencia a ivermectina en bovinos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales. *Veterinaria México*. 39(4):423-428.
- Faraji, F., Karg, W. 2006. A new species of *Lasioseius* Berlese from Spain (Acari: Podocinidae). *Mitteilungen aus dem. Museum für Naturkunde in Berlin*. 82(2):239-242.
- Hidalgo-Arguello, M.R., Cordero del Campillo, M. 1999. Parasitosis del aparato digestivo. En: Cordero-del Campillo, M, Rojo Vázquez, F.A. (Eds.)*Parasitología Veterinaria*. *Parasitología Veterinaria*. Madrid, España, McGraw-Hill Interamericana. . pp 196-212

- Holmes, P.H., Coop, R.L. 1994. Pathophysiology of gastrointestinal parasites. *Veterinary Parasitology*. 54:299-304.
- Hughes, A.M. 1976. The mites of Stored Food and Houses. (Eds.) London. Her Majesty's Stationery Office. London. England. pp: 334-335.
- Hyvönen, R., Persson, T. 1996. Effects of fungivorous and predatory arthropods on nematodes and tardigrades in microcosms with coniferous forest soil. *Biology and Fertility of Soils*. 21:121-127.
- Imbriani, J.L., Mankau, R. 1983. Studies on *Lasioseius scapulatus*, a mesostigmatid mite predaceous on nematodes. *Journal of Nematology*. 15(4):523-528.
- Khalafalla, R.E., Elseify, M.A., Elbahy, N.M. 2011. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematode parasites of sheep in Northern region of Nile Delta, Egypt. *Parasitology Research*. 108(2):337-340.
- Lee, D.L., Atkinson, H.J. 1977. *Physiology of nematodes*. 2nd. Columbia University Press, New York, USA. pp: 1-2.
- Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Vázquez-Prats, V.M., Mendoza de Gives, P. 1996. Criopreservación de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 38:111-114.
- Liébano, H.E. 2004. Identificación morfométrica de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales y pulmonares en rumiantes domésticos de México. *In: Vázquez VP. (Eds.) Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes de*

México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. México. pp: 26-77.

Linford, M.B., Oliviera, J.M. 1938. Potential agent of biological control of plant parasitic nematodes. *Phytopathology*. 28:14.

López-Arellano, ME., Flores, J., Mendoza-de Gives, P., Vázquez-Prats, V., Liébano-Hernández, E., Bravo de la Parra, A., Herrera, D., Godínes, E., Vargas-Urióstegui, P., Zamudio, F. 2006. Use of *Bacillus thuringiensis* toxin as an alternative method of control against *Haemonchus contortus*. *Animal Biodiversity and emerging diseases: Annals of New York Academy of Science*. 1081:347-354.

Macedo-Barragán, R., Arredondo-Ruiz, V., Ramirez-Rodríguez, J., García-Marquez, L. J. 2009. Grazing sheep poisoned by milkweed *Asclepias curassavica* or gastrointestinal nematosis? A case report finding. *Veterinary Parasitology*. 40 (3):275-281.

Márquez-Lara, D. 2008. Residuos químicos en alimentos de origen animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 9(1):124-135.

Martínez, M. I., Cruz, R.M. 2009. The use of agricultural and livestock chemical products in the cattle-ranching area of Xico, central Veracruz, Mexico, and their possible environmental impact. *Acta Zoológica Mexicana* 25(3):637-681.

Mendoza de Gives, P., Davies, K.G., Morgan, M., Behnke, J.M. 1999. Attachment test of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of plant and animal parasitic nematodes, free living nematodes and *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Helminthology*. 73:67-71.

- Mendoza de Gives, P., Herrera-Rodríguez, D. 2004. Terapia antihelmíntica contra las nematodiasis gastrointestinales en rumiantes. 115-128 pp. *In*: Herrera-Rodríguez, D., Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Mendoza de Gives, P., Vázquez-Prats, V. (Eds.) Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México. Libro Técnico No. 1. Publicado por el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, del INIFAP, Morelos, México.
- Mendoza de Gives, P. 2011. Hongos que capturan, matan y se alimentan de nematodos parásitos del ganado. En: Epidemiología de Enfermedades Parasitarias en Animales Domésticos. (1^{ra} Edición (Editores: Héctor Quiroz-Romero, Juan Antonio Figueroa Castillo, Froylán Ibarra Velarde y María Eugenia López Arellano). Editado por UNAM. Cd. de México, México.
- Mendoza de Gives, P., Torres-Acosta, J.F.J. 2012. Biotechnological Use of Fungi in the Control of Ruminant Parasitic Nematodes. *In*: “Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Diseases”, Adolfo Paz and María Sol Árias Vázquez. Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, New York, 11788-3619 (In Press).
- Rockett, C.L., Woodring, J.P. 1966. Oribatid mites as predators of soil nematodes. *Annals of the Entomological Society of America*.59: 669-671.
- Rodríguez-Esparza, J.R., Mendoza-de Gives, P., Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Cid del Prado, I.V., Franco, F., López-Mayagoitia, V. 2007. *In vitro* predatory activity of “Cannibal” nematodes against *Haemonchus contortus* and *Rhabditis* sp. Abstracts of the Proceedings of the WAAVP 21st International Conference Reference 282, Edited by E Claerebout and J Vercruyse 19th-23rd August Gent, Belgium. p 273.

- Rodríguez, T.G., Wade, C.F., Wells, C.N. 1962. Nematodes as natural food for *Macrocheles muscaedomesticae* (Acarina: Macrochelidae) a predator of the house fly egg. *Annals of the Entomological Society of America*.55:507-511.
- Sager, H., Rolfe, P., Strehlau, G., Allan, B., Kaminsky, R., Hosking, B. 2010. Quarantine treatment of sheep with monepantel-Rapidity of fecal egg count reduction. *Veterinary Parasitology*.170:336-339.
- SAS, Institute. (1998) Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute. Cary. North Carolina, USA. 1028.
- Sharma, R.D. 1971. Studies on the plant parasite nematode *Tylenchorynchus dubius*, Meded. Landbouwhogeschool wageningen. 71:98-104.
- Small, R.W. 1987. A review of the prey of predatory soil nematodes.*Pedobiology* 30:179-206.
- Tribe, H.T. 1980. Prospects for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Parasitology*.81:619-639.
- Valcárcel-Sancho, F., Rojo-Vázquez, F.A., Olmeda-García, A.S., Arribas-Novillo, B., Márquez-Sopeña, L.F. Pat. N. 2009. Atlas de Parasitología Ovina. Editorial Servet. Zaragoza, España. p 137.
- Vázquez de Jesús, E. 2009. Evaluación de cuatro métodos de cultivo *in vitro* para la reproducción de nematodos depredadores para el control de nematodos parásitos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. pp: 1-32.

Wallwork, J.A. 1967. Acari. *In*: "Soil Biology". Ed. by Burges, A. and F. Raweds. Academic Press London, England. pp: 363-395.

Walter, D.E., Lindquist, E.E. 1997. Australian species of *Lasioseius* (Acari: Mesostigmata: Ascidae): the porulosus-group and other species from rainforest canopies. *Invertebrate taxonomy*. 11:525-547.

VI. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEPREDADOR DE NEMATODOS *Butlerius* sp.

(NEMATODA: DIPLOGASTERIDAE) SOBRE TRES DIFERENTES NEMATODOS:

Haemonchus contortus (L₃), *Panagrellus redivivus* Y *Rhabditis* sp.

6.1. RESUMEN

Este trabajo evaluó el efecto depredador *in vitro* de nematodos *Butlerius* sp. sobre tres diferentes nematodos: *Haemonchus contortus* (L₃), *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis* sp. El nematodo depredador fue aislado a partir de una muestra de suelo de un jardín del poblado de Tres Marías, Municipio de Huitzilac, del Estado de Morelos. La confrontación entre el depredador *Butlerius* sp. y los diferentes nematodos presas se llevó a cabo en coprocultivos de ovinos incubados durante 30 días. Se conformaron siete series de cultivos fecales (n=9). Las series 1, 2 y 3, contenían 20 ejemplares del nematodo *Butlerius* sp. y 2000 especímenes del nematodo correspondiente (*H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. y *Panagrellus redivivus*), respectivamente. Por otra parte, las series 4, 5 y 6 contenían solamente 2000 especímenes de *H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. o *P. redivivus*, de forma independiente, respectivamente y fungieron como grupos testigo. La serie 7 contenía 20 ejemplares del género *Butlerius* sp. para fungir como testigo. Se llevó a cabo la recuperación de los nematodos de cada cultivo después de 12 horas de haberse colocado en el aparato de Baermann y se obtuvieron los promedios del número de nematodos recuperados de cada serie para su comparación y estimación de una tasa de reducción con respecto a su correspondiente control. Los datos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar utilizando el programa SAS, y una comparación de medias Tukey ($\alpha=0.05$). La interacción entre *Butlerius* sp. y *H. contortus*; registró una reducción de la población del parásito en 91.8%; mientras que la población de *Butlerius* se incrementó 131.6 veces. Para el caso de la interacción entre *Butlerius* y *P. redivivus*; la población del nematodo de vida libre se redujo en 80.9%; mientras que el nematodo depredador se incrementó en 268.3 veces. Los

valores de reducción de *Rhabditis* sp. por acción del nematodo depredador fueron de 62.5%; mientras que el nematodo *Butlerius* sp. se incrementó 82.7 veces. Estos resultados contribuyen a sentar las bases para el posible uso potencial de *Butlerius* sp. como una posible herramienta de control de parásitos del ganado.

Palabras clave: Control biológico, nematodo depredador, *Butlerius* sp., *Haemonchus contortus*.

6.2. ABSTRACT

The *in vitro* predatory effect of the nematode *Butlerius* sp. on three different nematodes: *Haemonchus contortus* (L₃), *Panagrellus redivivus* and *Rhabditis* sp. was assessed. The predatory nematode was isolated from a garden soil sample obtained at Tres Marias village, Huitzilac municipality, Morelos state. Interaction between the predatory nematode *Butlerius* sp. and the different target nematodes was carried out in sheep fecal cultures; then were incubated during 30 days. Seven series of fecal cultures (n=9) were set up. Series 1, 2 and 3 contained 20 specimens of *Butlerius* sp. and 2000 specimens of the corresponding nematode (*H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. and *Panagrellus redivivus*), respectively. On the other hand, series 4, 5 and 6 contained only 2000 specimens of *H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. or *P. redivivus*, in an independent manner, respectively and served as control groups. Series 7 contained 20 specimens of *Butlerius* sp. as control. After wards the nematodes were collected from the cultures to compare and to obtain the average number of nematodes recovered from each series and to estimate the reduction rate with respect to their corresponding control. Data were analyzed using a completely randomized design in the SAS program and a comparison of means by the Tukey test ($\alpha=0.05$) was used. The interaction between *Butlerius* sp. and *H. contortus* showed a reduction of 91.8% in the parasite population whereas the *Butlerius* sp. population increased 131.6 times. In the interaction between *Butlerius* sp. and *P. redivivus*, the population of the free living nematode was reduced in 80.9%; while the predatory nematode population increased 268.3 times. The reduction of the *Rhabditis*

population as a consequence of the predatory nematode action was 62.5%; while *Butlerius* sp. increased 82.7 times. These results contribute to set up the basis for the potential use of *Butlerius* sp. as a tool for the control of livestock parasites.

Key words: Biologic control, predatory nematode, *Butlerius* sp., *Haemonchus contortus*.

6.3. INTRODUCCIÓN

Los nematodos son un grupo de metazoarios pseudocelomados capaces de habitar casi cualquier nicho sobre la Tierra (Maggenti, 1981). Entre las aproximadamente 15,000 especies de nematodos hasta hoy reconocidas, se encuentran aquéllas que son de vida libre y los que habitan en mares, aguas continentales o en ambientes edáficos, además de las que son parásitas, tanto de plantas como de animales, incluyendo al hombre. Los hábitats ocupados por los nematodos son más variados que otros grupos de organismos, excepto por los artrópodos (Jairajpuri y Ahmad, 1992). Existen diversas clasificaciones de los nematodos dependiendo de sus hábitats, pudiendo encontrarse poblaciones que a través del proceso adaptativo de millones de años han logrado desarrollarse en la naturaleza en diversos sustratos. Algunos nematodos permanecen en el suelo de donde obtienen sus nutrientes; tal es el caso de los nematodos de vida libre como *Rhabditis* sp. y *Panagrellus redivivus* quienes generalmente se alimentan de bacterias, levaduras, hifas de hongos y de algas (De Lara *et al.*, 2003). El nematodo *P. redivivus* es dioico y ovivíparo y tiene un ciclo de vida corto, el primer estadio de desarrollo ocurre en el útero de la hembra y es denominado J₁ con una duración aproximada de 20 h, cuando el estadio J₁ muda da lugar a los juveniles (J₂), que emergen del huevo y son expulsados por la vulva de la hembra. Los J₂ continúan su crecimiento pasando por otros dos estadios juveniles J₃ y J₄, hasta alcanzar el estado adulto en 96 horas de su nacimiento. Cada estadio se caracteriza por la morfología externa como la forma del cuerpo que es cilíndrico y no segmentado, presentan un color que es blanco transparente, el tamaño del cuerpo oscila de 0.5 a 2 mm de largo y 0.05 mm de diámetro

(adultos), presenta un sistema muscular longitudinal que le permite desplazarse con movimientos de adelante hacia atrás. Se encuentra recubierto por una cutícula que inicia desde la parte anterior y termina en la parte posterior, esta estructura los protege de la deshidratación y de condiciones adversas del ambiente (Burke y Samoiloff, 1980). Los nematodos de vida libre son organismos que en los últimos años han cobrado importancia para la investigación científica mundial, debido a la facilidad de cultivo y su ciclo de vida corto, así como su tolerancia a variaciones del ambiente (De Lara *et al.*, 2003). Su importancia ecológica es de gran relevancia ya que intervienen en la degradación de la materia orgánica para el cumplimiento de los ciclos biogeoquímicos (Rupert y Barnes, 1996). De manera similar otros nematodos han evolucionado adaptándose a otros hábitats, incluyendo a otros organismos como plantas y animales estableciéndose asociaciones biológicas de tipo parasitismo. *Haemonchus contortus* es un nematodo gastroentérico que se localiza en abomaso y afecta a los rumiantes, por su característica reproductiva, es considerado uno de los nematodos de mayor diseminación en los potreros debido a su gran prolificidad, ya que una hembra adulta y madura sexualmente llega a ovopositar de 5,000 a 10,000 huevos por día. Debido a sus hábitos hematófagos éste nematodo es considerado como altamente patógeno ya que ha observado que un parásito adulto es capaz de producir una pérdida de 500 μ L diarios de sangre en los animales produciéndoles anemia y finalmente la muerte, en caso de una infección aguda (Vázquez-Prats, 2004). Existen otros grupos de nematodos que han sido clasificados como nematodos “depredadores” y son los nematodos que se alimentan de otros nematodos (Bilgrami, 2008). Los nematodos depredadores se clasifican en los siguientes grupos taxonómicos: Mononchida (Bilgrami, 1992), Dorylaimida (Bilgrami, 1993), Diplogasterida (Bilgrami y Jairajpuri, 1989), Aphelenchida (Hechler, 1963), Enoplida, Actinolaimoidea y Thalassogeneridae (Bilgrami, 1997). Cada grupo posee un aparato bucal diferente y esto depende de los mecanismos y preferencias alimenticias. Dentro de organismos

que incluyen sus preferencias alimenticias a nematodos se encuentran los siguientes organismos: bacterias, rotíferos, tardígrados, anélidos y nematodos, por lo que desempeñan un papel muy importante en el equilibrio poblacional de especies de nematodos presentes en el suelo (Bilgrami *et al.*, 2008; Eisenhauer *et al.*, 2011). Las especies del orden Mononchida se caracterizan por tener una cavidad bucal desarrollada, armada por dientes y dentículos y con una fuerte musculatura como ejemplo se encuentran los géneros *Mononchus*, *Myonchulus*, *Iotonchus* (Bilgrami *et al.*, 1986; Jairajpuri y Bilgrami, 1990). Existe estudios de 39 nematodos depredadores del orden Mononchida que se han propuesto como candidatos y utilizarse como enemigos naturales de nematodos fitopatógenos (Khan y Kim, 2006;) como *Meloidogyne hapla* (Bilgrami, 2008), *Rotylenchus reniformis* (Choudhary y Sivakumar, 2000), *Tylenchus*, *Xiphinema* (Coomans y Lima, 1965) y *Radopholus similis* (Mankau, 1980). Las especies del orden Dorylaimida, se caracterizan por tener una estructura llamada odontoestilete, que introduce a su presa depositando una sustancia que secreta y la paraliza, posteriormente succiona los fluidos corporales (Bilgrami, 1990). La mayoría de estos nematodos son considerados omnívoros y han sido poco estudiados. Los nematodos depredadores, que pertenecen al orden Diplogasterida, poseen una cavidad bucal pequeña, en comparación con el orden Mononchida, armada con dientes de diferente tamaño que se encuentran en diferentes posiciones del estoma, además poseen un diente dorsal móvil desarrollado, que le permite cortar, aspirar y posteriormente succionar a su presa como ejemplo se encuentra el género *Mononchoides* (Bilgrami, 2008). Dentro de la alimentación de los nematodos depredadores se basa en el consumo de microorganismos que habitan en el suelo y bacterias. El ciclo de vida se encuentra en un rango de 8 a 15 días, poseen una alta capacidad reproductiva, además de tener una resistencia a condiciones adversas del medio ambiente (Vázquez de Jesús, 2009). Los Diplogasteridos han sido considerados como posibles agentes de control biológico (Khan y Kim, 2006; Bilgrami,

2008). En el orden Diplogasterida se encuentran el género *Butlerius* sp. (Figura 1), que se aisló de muestras de un jardín en la localidad de Tres Marías, Municipio de Huitzilac, del Estado de Morelos, México (Vázquez de Jesús, 2009). *Butlerius* sp. se ha reproducido exitosamente utilizando el método de coprocultivo *in vitro* (Vázquez de Jesús, 2009). En la presente investigación se llevó a cabo la evaluación del efecto depredador del nematodo *Butlerius* sp. sobre tres diferentes nematodos: *Haemonchus contortus* (L₃), *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis* sp.

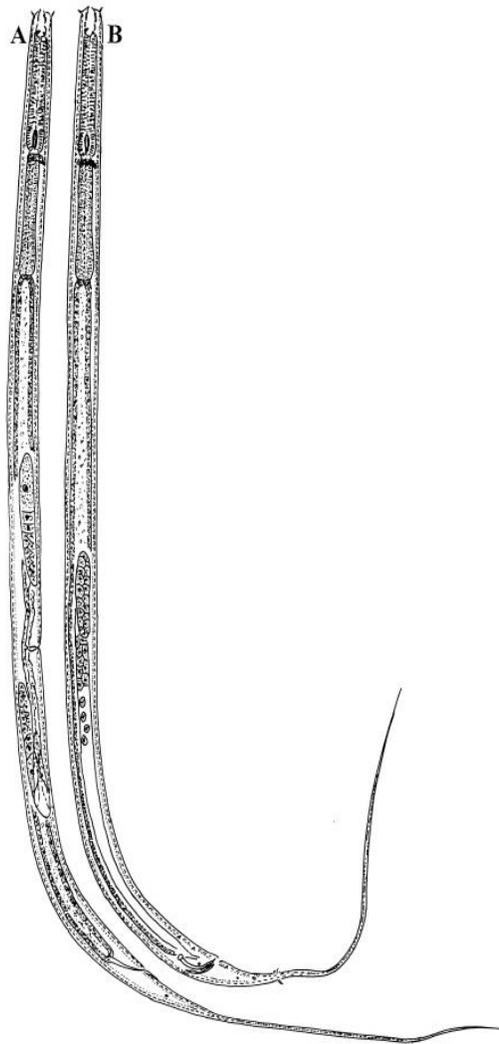


Figura 1. Esquema de *Butlerius butleri* Goodey 1929. A) Hembra B) Macho (Ahmad *et al.*, 2009).

6.4. MATERIAL Y MÉTODOS

6.4.1. Localización

Esta investigación fue llevada a cabo en el Departamento de Helmintología, del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET, INIFAP), Jiutepec, Estado de Morelos, México.

6.4.2. Material Biológico

6.4.2.1. Obtención del nematodo depredador *Butlerius* sp.

La cepa del nematodo depredador *Butlerius* sp. fue originalmente aislada a partir de suelo de un jardín en el poblado de Tres Marías, Municipio de Huitzilac, del Estado de Morelos. El suelo estaba compuesto por una mezcla de material de tipo arcilloso, pasto nativo y composta orgánica elaborada con desechos de cocina (Vázquez de Jesús, 2009) (Figura 2).



Figura 2. Aspecto del ecosistema en Huitzilac, Morelos y colecta de muestras de suelo para el aislamiento de nematodos depredadores.

Para la obtención de los nematodos a partir de muestras de suelo, se llevó a cabo la técnica de charola de Whitehead y Hemming (Hooper, 1986). Cada muestra colectada (400 g), se pasó a través de una charola de plástico (30x22x5 cm) cuya parte interior estuvo cubierta con tela tipo peyón. Posteriormente, la muestra fue colocada dentro de una charola de plástico (51x35x3 cm).

Posteriormente se adicionó agua de llave hasta cubrir la superficie, y se dejó reposar durante 24 horas (Hooper, 1986) (Figura 3).



Figura 3. Técnica de charola de Whitehead y Hemming

La recuperación de los nematodos se realizó retirando el agua y depositándola en un vaso de precipitados de vidrio, después se pasó a través de un tamiz de 400 mallas (con una abertura de 37 micras), con la finalidad de reducir el volumen hasta 40 mL, para finalmente obtener los nematodos. La muestra que contenía los nematodos fue limpiada mediante la técnica de separación por gradientes de densidad (Ramírez-Vargas *et al.*, 2006). La suspensión de larvas fue depositada en tubos Falcon de plástico de 50 mL, para ser centrifugada a 2,500 rpm (1,048 g) durante 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado, y se volvió a centrifugar utilizando una solución de sacarosa al 46%, para permitir que se formara el gradiente que contenía los nematodos limpios y flotaran en el sobrenadante, quedando los detritus junto con el sedimento en el fondo de los tubos Falcon. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua de la llave, con la finalidad de eliminar los residuos de la sacarosa. Una vez que los nematodos fueron obtenidos libres de detritus y residuos de sacarosa, se depositaron en placas de Petri de 8 cm de

diámetro con agua simple, para llevar a cabo las pruebas de depredación (Vázquez de Jesús, 2009).

6.4.2.2. Identificación taxonómica de *Butlerius* sp.

Para la identificación taxonómica de los especímenes de nematodos depredadores obtenidos, se usaron las claves taxonómicas de Hunt (1980), Bilgrami (1990) y Ahmad *et al.* (2009).

6.4.2.3. Producción *in vitro* de *Butlerius* sp.

Para obtener una población abundante del nematodo depredador *Butlerius* sp. se llevó a cabo la metodología descrita por Vázquez de Jesús. (2009). Se elaboraron cultivos fecales con 20 gramos de heces de ovino esterilizadas en frascos de 10 cm de diámetro por 15 cm de altura (tipo “Gerber”) (Liébano, 2004). En cada frasco, se adicionaron 20 especímenes del nematodo depredador (*Butlerius* sp.) y 100 larvas (L₃) de *H. contortus* como presa, con la finalidad de que el nematodo depredador los utilizara como fuente de alimentación y de esta manera incrementara su población. Los frascos fueron cubiertos con una malla de gasa a presión, utilizando una liga de hule para evitar la entrada de insectos y permitir el intercambio gaseoso. Los frascos se mantuvieron a temperatura de laboratorio (25-29 °C) con una humedad de 40 a 50 % aproximadamente, durante 20 días. Posteriormente, se observó el número de nematodos depredadores presentes con la ayuda de un estereomicroscopio (4X) (Vázquez de Jesús, 2009).

6.4.2.4. Larvas de *H. contortus* (L₃)

Se empleó la cepa “Hueytamalco” de *H. contortus*, perteneciente al Departamento de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP, México. La cepa fue originalmente aislada a partir de un ovino infectado de manera natural en el municipio de Hueytamalco, Estado de Puebla, México y mantenido a través de pases periódicos en ovinos. Las larvas obtenidas son sometidas al proceso de criopreservación para

mantenerlas disponibles hasta el momento de su utilización. Para activar la población de larvas criopreservadas, un ovino fue inoculado oralmente con estas larvas para lograr el establecimiento de la infección y de esta manera contar con heces conteniendo huevos del parásito para continuar nuevamente con el proceso (Liébano-Hernández *et al.*, 1996). Para lograr la infección de los ovinos, se utilizó una dosis oral de 350 larvas infectantes por kg de peso corporal. Después de un período pre-patente de 21 días, las heces fueron colectadas directamente del recto de animales infectados y la técnica McMaster fue realizada para observar la presencia de huevos de nematodos y para estimar el número de huevos por g de heces. Posteriormente, las heces fueron maceradas y mezcladas con una cuchara de madera y se agregó agua simple para mantener una oxigenación y humedad adecuadas para promover una mejor eclosión de los huevos del parásito (Liébano, 2004). Cinco días después de elaborados los cultivos las larvas infectantes fueron recuperadas de los cultivos utilizando la técnica del embudo Baermann por un período de 12 h (Valcárcel-Sancho *et al.*, 2009).

6.4.2.5. *Panagrellus redivivus*

Se empleó una cepa del nematodo de vida libre *P. redivivus*, proporcionada por el Dr. Roberto de Lara de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM, Xochimilco, México). Los nematodos fueron cultivados en recipientes de plástico, empleando hojuelas de avena y agua como sustrato. Las hojuelas y el agua fueron previamente mezcladas y esterilizadas en un horno de microondas (De Lara *et al.*, 2007). Algunos nematodos fueron transferidos al sustrato para su reproducción. Los recipientes fueron cubiertos con una tapa de papel aluminio con una ventana de malla fina para permitir la ventilación. Los cultivos se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente (25-30 °C). Con la realización de esta metodología se esperaba que después de una semana, la población de nematodos se incrementara de manera considerable.

6.4.2.6. *Rhabditis* sp.

Se empleó una cepa de una especie de *Rhabditis* aislada de una muestra de suelo en el municipio de Jiutepec, Estado de Morelos, México. Esta cepa fue mantenida con pases periódicos a placas de agua agar. Se colocó crema de cacahuete (0.5 g) al centro de cada placa como una fuente de energía para promover un crecimiento importante de la población de nematodos. Después de cinco días, la población de nematodos se incrementó considerablemente.

6.4.3. Diseño experimental

La confrontación entre los nematodos “depredadores” y los nematodos “presa” se realizó utilizando la técnica de coprocultivo en recipientes de 12 cm de diámetro por 9 cm de altura (Liéban, 2004). En cada palangana, se depositaron 20 gramos de heces estériles (esterilizadas a 125 °C/20 minutos) y se mezclaron con hule espuma limpio. El tiempo de confrontación entre el nematodo depredador *Butlerius* sp. y las larvas infectantes del nematodo *H. contortus* fue de 30 días. Se conformaron siete series de cultivos fecales con heces de ovinos en recipientes de plástico de la siguiente manera. Las series 1, 2 y 3, contenían 20 ejemplares del nematodo *Butlerius* sp. y 2000 especímenes del nematodo correspondiente (*H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. y *Panagrellus redivivus*), respectivamente. Posteriormente a las series 1, 2 y 3 se les agregaron 20 nematodos depredadores del género *Butlerius* sp. La serie 4, 5 y 6 fungieron como los grupos testigos de cada serie y contenían 2000 larvas de *H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. y *Panagrellus redivivus*, de forma independiente. La serie 7 contenía 20 nematodos depredadores del género *Butlerius* sp. cada serie estuvo formada de 9 coprocultivos en palangana (n=9) (Cuadro 1).

Los coprocultivos en palangana se cubrieron con tapa de papel aluminio con un espacio en el centro cubierta con tela de gasa, para evitar la entrada de insectos y permitir el intercambio gaseoso. Los coprocultivos se mantuvieron a temperatura de laboratorio (25-29 °C) con una humedad de 40 a 50%. Diariamente se revisaron los coprocultivos removiéndolos con el objetivo

de evitar la deshidratación. La estimación de los nematodos se realizó tomando diez alícuotas de 5 μ L por cada tubo. Las alícuotas fueron depositadas en laminillas y fueron analizadas bajo un microscopio (10X).

Cuadro 1. Promedio de nematodos en coprocultivo inoculados al inicio del experimento utilizando a *Rhabditis* sp., *H. contortus* (L₃) y *P. redivivus* como presa.

Grupo	Inoculo inicial	
	<i>Butlerius</i> sp.*	<i>Rhabditis</i> sp. **
Coprocultivo		
Tratado	20	2,000
Testigo	20	
Testigo		2,000
	<i>Butlerius</i> sp.*	<i>H. contortus</i> **
Tratado	20	2,000
Testigo	20	
Testigo		2,000
	<i>Butlerius</i> sp.*	<i>P. redivivus</i> **
Tratado	20	2,000
Testigo	20	
Testigo		2,000

Nota:

* Se agregaron 20 nematodos depredadores del género *Butlerius* sp en cada repetición.

** Se agregaron 2,000 especímenes de los géneros *Rhabditis* sp., *H. contortus* y *P. redivivus* en promedio por cada repetición. (n=9).

El porcentaje de reducción de la población de nematodos por la acción del nematodo *Butlerius* sp. fue estimada con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de reducción de nematodos} = \frac{\bar{X} \text{ testigo} - \bar{X} \text{ tratado}}{\bar{X} \text{ testigo}} \times 100$$

Donde:

Grupo testigo = Media de grupo control de nematodos recuperados.

Grupo tratado=Media de grupo tratado de nematodos recuperados.

(Alfaro-Gutierrez *et al.*, 2011).

6.4.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el software Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998). Se usó un análisis ANOVA con un diseño completamente al azar, considerando el valor medio de los nematodos recuperados en cada grupo de la variable/respuesta, posteriormente se realizó una comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey. El análisis consideró un valor de significancia estadística $\alpha=0.05$.

6.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características morfológicas del nematodo depredador obtenido en el presente estudio fueron similares a las descritas por Bilgrami. (1990); Ahamad *et al.* (2009) y Liébano Hernández *et al.* (2009) para el género *Butlerius* sp. (Figura 4).



Figura 4. Microfotografía mostrando la cavidad bucal del nematodo *Butlerius* sp. (100X). (Fotografía tomada por la autora de la tesis).

La Figura 5, muestra un par de fotografías secuenciales en donde se aprecia a un espécimen del género *Butlerius* sp. en busca de su presa que es una larva infectante del nematodo parásito de

ovinos *Haemonchus contortus* (Figura 5-a). En la figura 5-b se aprecia como el nematodo depredador hace contacto con su presa para alimentarse de ella.



Figura 5. (a, b). a) *Butlerius* sp. localizando a una larva de *H. contortus* del 3er. estadio. b) *Butlerius* sp. alimentándose de una larva infectante de *H. contortus* (X10). (Fotografía tomada por la autora de la tesis).

Los resultados del número promedio de nematodos de los géneros *Haemonchus contortus*, *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis* sp. recuperados después de 30 días en los coprocultivos en presencia del nematodo depredador *Butlerius* sp. se muestran en el Cuadro 2. Los promedios de los nematodos “presa” recuperados de los cultivos fecales y los porcentajes de reducción de su población por efecto depredador del nematodo *Butlerius* sp. se muestran en el Cuadro 3. En el Cuadro 2, se aprecia que de 2,000 larvas infectantes de *H. contortus* inoculadas inicialmente se recuperaron solamente 111.1 (± 56.6) lo que significa una reducción del 91.8% (Cuadro 3). Para el caso de los nematodos de vida libre, se recuperaron 788.8 (± 73.7) ejemplares de *P. redivivus*, dando una reducción del 80.9% y 1,522.2 (± 193.0) de *Rhabditis* sp. lo que significa una reducción del 62.5% para este nematodo (cuadro 3). En lo que respecta a *Butlerius* sp. en presencia de *H. contortus* de un total de 20 ejemplares inoculados inicialmente, se recuperaron

2,633.3 (± 918.9) ejemplares (Cuadro 2; Figura 7). Este incremento es equivalente a 131.6 veces el número inicial (Cuadro 4). Para el caso de la interacción entre *Butlerius* sp. y los nematodos de vida libre *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis* sp. la población de *Butlerius* sp. se incrementó a 5,366.7 (± 509.9) y 1,655.5 (± 194.9), respectivamente.

Estos valores significan un incremento de 82.7 veces para *Rhabditis* sp. y 268.3 veces para *P. redivivus* (Cuadro 4). El análisis estadístico indicó que las diferencias observadas en las distintas interacciones entre nematodos depredadores y nematodos “presa”, fueron significativas ($p \leq 0.05$).

Cuadro 2. Promedio de nematodos de los géneros *Haemonchus contortus*, *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis* sp. recuperados después de 30 días en coprocultivos de ovinos en presencia del nematodo depredador *Butlerius* sp.

Promedio de Nematodos recuperados después de 30 días				
Grupo	Inoculo inicial		Promedio(\pm)⁺	Promedio(\pm)⁺
	<i>Butlerius</i> sp.	<i>H.</i>	<i>H. contortus</i> **	<i>Butlerius</i> sp.
Tratado	20	2,000	111.11 \pm (56.65)	2633.33 \pm (918.93)
Testigo	20			
Testigo		2,000	1361.11 \pm (336.13)	
	<i>Butlerius</i> sp.	<i>P. redivivus</i>	<i>P. redivivus</i>	<i>Butlerius</i> sp.
Tratado	20	2,000	788.88 \pm (73.70)	5366.66 \pm (509.90)
Testigo	20			
Testigo		2,000	4133.33 \pm (568.81)	
	<i>Butlerius</i> sp.	<i>Rhabditis</i>	<i>Rhabditis</i> sp.	<i>Butlerius</i> sp.
Tratado	20	2,000	1522.22 \pm (193.0)	1655.55 \pm (194.9)
Testigo	20			
Testigo		2,000	4066.66 \pm (537.4)	

n=9

\pm DE =Desviación estándar.

Cuadro. 3 Promedio de nematodos recuperados (*H. contortus* L₃, *P. redivivus* y *Rhabditis* sp.) y porcentaje de reducción de larvas por acción de *Butlerius* sp.

Nematodo	*Grupo testigo	*Grupo tratado	% de reducción
<i>H. contortus</i>	1361.1 ± 336.1	111.1 ± (56.6) c*	91.8%
<i>P. redivivus</i>	4133.3 ± 568.8	788.8 ± (73.7) b*	80.9%
<i>Rhabditis</i> sp.	4066.6 ± 537.4	1522.2 ± (193.0) a*	62.5%

n=9

± DE =Desviación estándar

*Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la pruebas de Tukey ($\alpha=0.05$).

Cuadro 4. Incremento de la población de *Butlerius* sp. en presencia de *H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. y *P. redivivus* en coprocultivo.

Nematodo	Incremento poblacional de <i>Butlerius</i> sp. (Expresado en número de veces)	Reducción de la población de <i>H. contortus</i>
<i>H. contortus</i>	131.6	91.8 % c*
<i>Rhabditis</i> sp.	82.7	62.5 % a*
<i>P. redivivus</i>	268.3	80.9 % b*

*Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la pruebas de Tukey ($\alpha=0.05$).

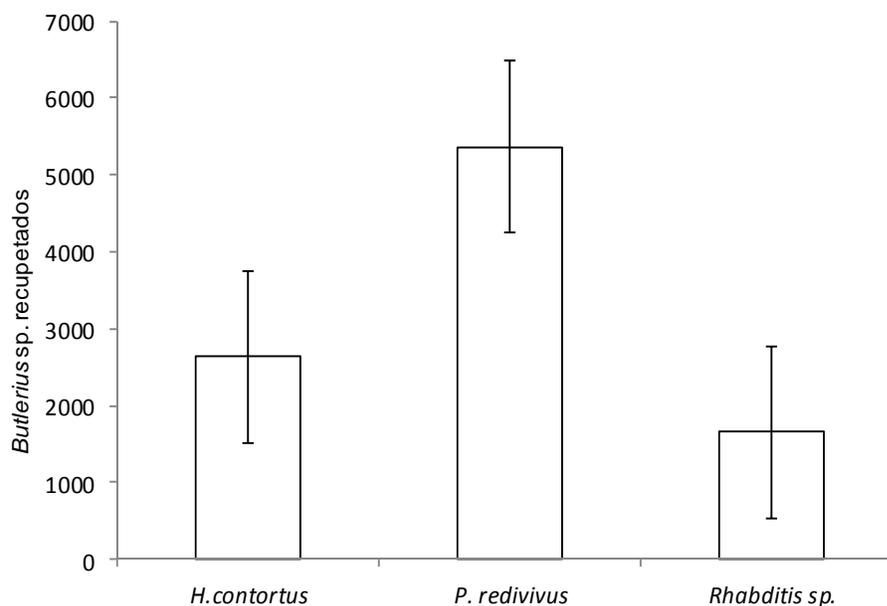


Figura 6. Incremento de la población de *Butlerius* sp. en presencia de *H. contortus* (L₃), *Rhabditis* sp. y *P. redivivus* en cultivos fecales estériles.

Nota: Las barras representan la desviación estándar.

El estudio de antagonistas de nematodos parásitos causantes de enfermedad en plantas ha mostrado resultados alentadores en el uso de nematodos depredadores “nematodos caníbales” como posibles agentes potenciales de control de parásitos de importancia en plantas. Particularmente, los nematodos clasificados dentro del grupo de los Diplogastéridos han sido ampliamente evaluados en contra de una gran variedad de nematodos fitopatógenos con resultados alentadores y se han estudiado aspectos relacionados con adaptación a condiciones de aislamiento, la selección de presas; así como el efecto depredador denso-dependiente de la población de nematodos “presa” (Bilgrami *et al.*, 2005). El género *Butlerius* sp. fue evaluado en contra de un grupo de nematodos ecto y endoparásitos de plantas y se observó gran variabilidad en la selección de presas; siendo los ectoparásitos atacados en pocas ocasiones por el nematodo *Butlerius* sp. no obstante, en el caso de especies de nematodos endoparásitos incluyendo *Aphelenchoides fragariae* y juveniles de *Pratylenchus* sp. fueron fácilmente atacados y devorados por el depredador (Grootaert *et al.*, 1977). Sorprendentemente, juveniles del nematodo *Meloidogyne naasi* fueron atacados por el depredador; sin embargo, no fueron devorados (Grootaert *et al.*, 1977). La actividad depredadora de nematodos responde a estímulos químicos producidos por los nematodos “presa” de diferentes grupos tróficos y que se han denominado “Kairomonas” (Pervez y Bilgrami, 2000). Estas sustancias definen la atracción y comportamiento diferencial de los nematodos depredadores sobre sus “presas”. Diversos factores tales como la densidad de las presas, el período de incubación de la presa y el período de ayuno, temperatura, respuestas quimiosensoras de los nematodos depredadores y distancia de los depredadores hacia sus presas; así como la habilidad de los nematodos depredadores para atacar a sus presas y la habilidad de las presas para evitar ser depredadas han sido documentadas en diversos estudios (Pervez y Bilgrami, 2000). En algunos estudios se ha documentado el número de presas que es capaz de devorar un nematodo depredador en función del tiempo. Por ejemplo, las especies

Mononchoides longicaudatus y *M. fortidens* son capaces de consumir 10 especímenes del género *Rhabditis* sp. en un período de 24 horas (Bilgrami *et al.*, 2005). En la presente investigación no se determinó este valor; la reducción de la población de los nematodos “presa” evaluados, se determinó después de un periodo de 30 días de interacción en los cultivos fecales. Diversos estudios se han llevado a cabo para evaluar la actividad depredadora de nematodos en contra de nematodos fitopatógenos. En un trabajo publicado por Bilgrami, (2008), se hace mención a una lista de trabajos que se han llevado a cabo con nematodos depredadores pertenecientes al grupo Diplogastérida, incluyendo a *Butlerius* sp.; además de evaluar nematodos pertenecientes a las familias Mononchidae y Dorilaimidae, y que han sido evaluados en contra de diversos géneros y especies de nematodos patógenos para diversos cultivos. Fauzia *et al.* (1998) demostraron en una prueba en maceta que otro miembro del grupo de los Diplogastéridos (al igual que *Butlerius* sp.), el nematodo *Mononchoides* sp. posee una gran actividad en contra de nematodos agalladores, reduciendo el índice de agallamiento y permitiendo una mejora en el crecimiento vegetativo e incrementando la masa radicular. Los trabajos publicados sobre la actividad depredadora de *Butlerius* sp. y otros nematodos depredadores ha sido enfocada exclusivamente en contra de nematodos fitopatógenos y algunos nematodos de vida libre como especies del género *Rhabditis* sp. En una extensa revisión de la literatura disponible, salvo los trabajos publicados por Rodríguez-Esparza *et al.* (2007) y el trabajo de tesis de licenciatura de Vázquez de Jesús, 2009; no se encontró ningún otro trabajo que haya evaluado la actividad de algún nematodo depredador en contra de nematodos parásitos de animales. El presente estudio es una continuación de estos trabajos en donde se reportó por primera vez la actividad de un nematodo depredador en contra de *H. contortus*. En este trabajo se logró reproducir en grandes cantidades al nematodo *Butlerius* sp. utilizando para su producción *in vitro*, el método de cultivos fecales (Vázquez de Jesús, 2009). Los resultados de la presente investigación muestran clara evidencia de que el nematodo

Butlerius sp. es un excelente depredador de larvas infectantes del nematodo parásito de ovinos *H. contortus*, logrando reducir de manera sustancial (más del 90%) la población de larvas de este nematodo en cultivos fecales. Estos resultados apuntan hacia buenas perspectivas en el estudio de *Butlerius* sp. como una posible herramienta de control de parásitos del ganado. No obstante, este trabajo es apenas una breve aportación al estudio de *Butlerius* sp. y se requerirá intensificar la investigación con este nematodo para poder establecer a futuro las bases para ser utilizado como una posible herramienta de control de nematodos parásitos de animales. Por otra parte, el hecho de que este nematodo haya demostrado una excelente actividad depredadora de larvas infectantes de *H. contortus* en cultivos fecales es una característica deseable, ya que probablemente se pudiera establecer su uso a nivel de praderas, justo donde se encuentran las heces del rebaño en pastoreo conteniendo los huevos de los parásitos. Hasta ahora la información generada en el presente estudio es muy limitada a este respecto y un proyecto encaminado a la búsqueda de un método práctico de aplicación de estos nematodos tendrá que ser diseñado para poder determinar el posible uso potencial en el control de parásitos de importancia pecuaria. Las características deseables que debe tener un agente de control biológico son fácil cultivo *in vitro*, un ciclo de vida corto, alta tasa de reproducción, fácil aplicación, seguridad para los organismos no blanco, capacidad de búsqueda de las presas, compatibilidad ecológica, adaptabilidad al medio ambiente, capacidad de persistencia, potencial de dispersión, competitividad biológica y amplio espectro de eficiencia (Bilgrami, 2008). Algunas características de esta lista han sido observadas en el presente estudio con el género *Butlerius* sp. Por ejemplo, su fácil adaptación a cultivo *in vitro* (en cultivos fecales), alta tasa de reproducción (con incrementos poblacionales de hasta 268.33 veces en un mes). El hecho de que *Butlerius* sp. haya mostrado actividad depredadora en contra de los nematodos de vida libre evaluados, confirma que los nematodos depredadores actúan como reguladores biológicos de diversas poblaciones de nematodos en la naturaleza; no obstante, esta

característica tendrá que ser analizada para determinar el impacto causado por el nematodo depredador, ya que los nematodos de vida libre como *Rhabditis* sp. y *P. redivivus* son considerados como organismos benéficos de gran importancia en el reciclaje de nitrógeno en el suelo y de actuar como alimento para otros organismos como parte de la cadena alimentaria en poblaciones de microorganismos del suelo (De Lara *et al.*, 2003; 2007).

6.6. CONCLUSIONES

El nematodo depredador *Butlerius* sp. se alimentó de los tres distintos nematodos *Haemonchus contortus* (L₃), *P. redivivus* y *Rhabditis* sp. Sin embargo, este nematodo muestra cierta preferencia o selectividad por *H. contortus* y *P. redivivus*, reduciendo sus poblaciones en 92% y 81%; respectivamente. Mientras que *Rhabditis* sp. fue el nematodo menos depredado y su población solamente se redujo en un 62%. Asimismo, la población del nematodo depredador *Butlerius* sp. se incrementó de manera diferente al alimentarse de los distintos nematodos presa. La población de *Butlerius* sp. se incrementó 132 y 268 veces cuando se utilizaron *H. contortus* (L₃) y *P. redivivus*; respectivamente. Mientras que cuando este nematodo se alimentó de *Rhabditis* sp. su población se incrementó solamente 83 veces.

6.7. LITERATURA CITADA

- Ahmad, I., Singh, G.K., Yeon, I., Choi, C. 2009. Redescription of *Butlerius butleri* Goodey, 1929 (Nematoda: Diplogastridae) from South Korea. *Nematology*. 11(2):161-169.
- Alfaro-Gutiérrez, I.C., Mendoza de Gives, P., Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Valero-Coss, R.O., Hernández-Velázquez, V.M. 2011. Nematophagous fungi (Orbiliales) capturing destroying and feeding on the histotrophic larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Revista Mexicana de Micología*. 33:29-35.

- Bilgrami, A.L., Ahmad, I., Jairajpuri, S.M. 1986. A Study of the intestinal contents of some Mononchs. Section of Nematology, Department of Zoology, Aligarh Muslim University, Aligarh, 202001, India. 9(2):191-194.
- Bilgrami, A.L. 1990. Predaceous Dorylaims. Department of Zoology, Aligarh Muslim University, Aligarh 202002, India. pp: 143-148.
- Bilgrami, A.L. 1992. Resistance and susceptibility of prey nematodes to predation and strike rate of the predators *Mononchus aquaticus*, *Dorylaimus stagnalis* and *Aquatides thornei*. Fundamental and Applied Nematology. 15:265-270.
- Bilgrami, A.L. 1993. Analyses of relationships between predation by *Aporcelaimellus nivalis* and different prey trophic categories. Nematologica.39:356-365.
- Bilgrami, A.L. 1997. Nematode Biospesticides. Aligarh Muslim University Press, Aligarh. p 262
- Bilgrami, A.L., Jairajpuri, M.S. 1989. Predatory abilities of *Mononchoides longicaudatus* and *M. fortidens* (Nematoda: Diplogasterida) and factors influencing predation. Nematologica. 35:475-488.
- Bilgrami, L.A., Gaugler, R. 2005. Feeding behaviour of the predatory nematodes *Laimydorus baldus* and *Discolaimus major* (Nematodes: Dorylaimida). Koninklijke Brill NV, Leiden. 7(1):11-20.
- Bilgrami, A.L., Gaugler, R., Brey, C. 2005. Prey preference and feeding behaviour of the diplogastrid predator *Mononchoides gaugleri* (Nematoda: Diplogastrida). Nematology. 7(3):333-342.
- Bilgrami, A.L. 2008. Biological control potentials of predatory nematodes. In: A. Ciancio., K.G. Mukerji. (Eds.) Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes, Springer. pp: 3-28.

- Burke, D.J., Samoiloff, M.R. 1980. Studies on the X-chromosome of the nematode *Panagrellus redivivus*: EMS induced visible mutations. Canadian Journal of Genetics and Cytology. 22: 295-302.
- Choudhury, B.N., Sivakumar, C.V. 2000. Biocontrol potential of *Mylonchulus minor* against some plant-parasitic nematodes. Annals of Plant Protection Sciences. 8: 53-57.
- Coomans, A., Lima, B. 1965. Description of *Anatonchus amiciae* n. sp. (Nematoda: Mononchida) with observations on its juvenile stages and anatomy. Nematologica. 11: 413-431.
- Hechler, H.C. 1963. Description, developmental biology and feeding habits of *Seinura tenuicaudata* (de Man) J.B. Goodey, 1960 (Nematoda: Aphelenchida), a nematode predator. Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 30: 182-195.
- Hunt, J.D. 1980. *Butlerius macrospiculum* n. sp. and *Cylindrocorpus walkerii* n. sp. (Nematoda: Diplogastroidea) from St. Lucia, West Indies. Revue de Nematologie. 3(2):155-160.
- De Lara, R. A.T., Castro, B.G., Castro, M.J., Castro, M.A., Malpica, S. 2003. La importancia de los nematodos de vida libre. Departamento. El Hombre y su Ambiente. División de CBS UAM-Xochicalco. pp: 43-46
- De Lara, R., Castro, T., Castro, J., Castro, G. 2007. Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Espirulina* sp. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 42(1): 29-36.
- Eisenhauer, N., Varvara, D.M., Ackermann-Ruess, L., Scheu, S. 2011. Changes in plant species richness induce functional shifts in soil nematodes communities in experimental grassland. PLoS ONE. 6: 1-9.
- Fauzia, M., Jairajpuri, M.S., Khan, Z. 1998. Biocontrol potential of *Mononchoides longicaudatus* on *Meloidogyne incognita* on tomato plants. International Journal of Nematology. 8: 89-01.

- Grootaert, P., Jaques, A., Small, R.W., 1977. Prey selection in *Butlerius* sp. (Rhabditida: Diplogasteridae). Mededelingen van de faculteit landbouwwetenschappen rijksuniversiteitgent. 42(2): 1559-1563.
- Hooper, D.J. 1986. Extraction of Free-living Nematodes stages of Soil. In Southey, JF, Ed. Laboratory Methods for work with Plant and Soil Nematodes. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Reference Book 402. London, UK. pp: 5-30
- Jairajpuri, M.S., Bilgrami, A.L. 1990. Predatory nematodes. In: M.S. Jairajpuri, MM Alam y I. Ahmad (Eds.) Nematode Bio-control: Aspect and Prospects. New Delhi: CBS Publishers and Distributors Pvtm, Ltd. pp: 95-125.
- Jairajpuri, M. S., Ahmad, W. 1992. Dorylaimida. Free-living, predaceous and plant-parasitic nematodes. E. J. Brill, Leiden. p 458.
- Khan, Z., Kim, H.Y. 2006. A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes. Department of Agricultural Biotechnology, Center for Plant Molecular Genetics and Breeding Research, Seoul National University, Republic of Korea. pp: 151-921.
- Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Vázquez-Prats, V., Mendoza de Gives, P. 1996. Cryopreservation of infective larvae of *Haemonchus contortus*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 38:111-114.
- Liébano, H.E. 2004. Identificación morfométrica de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales y pulmonares en rumiantes domésticos de México. En: Diagnóstico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México. Libro Técnico No.1. INIFAP. pp: 8-29.

- Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Vázquez de Jesús, E., Mendoza de Gives, P. 2009. Caracterización morfométrica del estadio adulto del nematodo depredador *Butlerius* sp. un enemigo natural de nematodos parásitos de ovinos. Congreso Nacional de Sanidad Animal, 2009.
- Maggenti, A. 1981. General Nematology. Springer-Verlag. New York, USA.p 372.
- Mankau, R. 1980. Natural enemies of natural. California Agriculture. p 24 .
- Pérvez, P., Bilgrami, A.L. 2000. Chemosensory responses of predatory nematodes towards kairomones emitted by prey nematodes belonging to different trophic groups. Nematology. 28: 267-277.
- Ramírez, V.G., López, A.M.E., Mendoza de G.P., Liébano, H.E., Vázquez, P.M. 2006. Desarrollo de nematodos endoparásitos de *Haemonchus contortus*, *in vitro* como modelo biológico de estudio. In: Memorias en el VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Acapulco, Guerrero, México.p 24.
- Rodríguez-Esparza, J.R., Mendoza, G.P., Liébano, H.E., López, M.E., Cid del Prado, V.I., Franco, N.F., López, M.V. 2007. *In vitro* predatory activity of “Cannibal” nematodes against *Haemonchus contortus* and *Rhabditis* sp. Proceedings of the WAAVP 21st International Conference, Reference. 282, Edited by E. Claerebout and J. Vercruyse. 19th 23rd. August Gent, Belgium. p.273.
- Rupert, E.E., Barnes, R.D. 1996. Zoología de los Invertebrados. Eds. Mc Graw-Hill Interamericana. 6 Edición. México DF. pp: 208-304.
- SAS, Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute. Cary. North Carolina. USA. 1028.

- Valcárcel-Sancho, F., Rojo-Vázquez, F.A., Olmeda-García, A.S., Arribas-Novillo, B., Márquez-Sopeña, L.F. Pat. N. 2009. Atlas de Parasitología Ovina. Editorial Servet. Zaragoza, España. p 137.
- Vázquez de Jesús, E. 2009. Evaluación de Cuatro Métodos de Cultivo *in vitro* para la Reproducción de Nematodos Depredadores para el Control de Nematodos Parásitos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.pp: 1-32.
- Vázquez-Prats M.V., Flores, J.C., Santiago, C.V., Herrera, D.R., Palacios, A.R., Liéban, E.H., Pelcastre, A.O. 2004. Frecuencia de nematodos gastroentéricos en bovinos de tres áreas de clima subtropical húmedo de México. *Tecnica Pecuaria en México*. 42(2): 237-245.

VII. EVALUACIÓN DEL HONGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia flagrans* PARA EL CONTROL DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN OVINOS DE LA RAZA SANTA CRUZ

7.1. RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto de la suplementación de comprimidos multinutricionales (CM) conteniendo clamidosporas del hongo *Duddingtonia flagrans* en ovinos de la raza Santa Cruz sobre la población de larvas de *Haemonchus contortus* en heces y sobre la ganancia de peso. Se formaron 2 grupos de seis ovinos cada uno y se infectaron vía oral con *H. contortus* (L₃). El grupo 1 (Testigo), se suplementó diariamente por 11 semanas, con alimento comercial, melaza y alfalfa achicalada molida; el grupo 2 (Tratado), recibió una alimentación que consistía en 10 CM que contenían, sorgo 7%, pastas de soya 51%, salvado de trigo 20%, melaza 18%, sales minerales 2% y cal 2% y una dosis de 2×10^6 clamidosporas de *D. flagrans*, según el peso vivo de cada uno de los animales experimentales. Las muestras fecales fueron recogidas directamente del recto de cada animal una vez por semana para estimar el número de huevos eliminados por g de las heces (HPG) con la técnica de McMaster. Se realizaron tres cultivos fecales por animal en placas de Petri. Se muestreó el peso vivo, sangre (volumen celular aglomerado) y condición corporal de ovinos y se registró cada semana. La viabilidad de las clamidosporas de *D. flagrans* se evaluó durante todo el experimento, agregando 1 pellet fecal en una placa de Petri conteniendo agua-agar al 2%. Los datos fueron analizados mediante una prueba de *t* de Student, utilizando el programa SAS. Los resultados mostraron una reducción en la población de larvas infectantes de *H. contortus* en cultivos fecales de los ovinos suplementados con los CM en un 42.1-84.3% durante el todo el experimento, excepto en el 3^{er} y 4^{to} muestreo. La ganancia de peso diaria fue muy similar en los ambos grupos de ovinos; siendo 136 g para el grupo Testigo y 163 g para el grupo Tratado. Respecto al volumen celular aglomerado (VCA), el

grupo tratado mostró valores ligeramente más bajos que el grupo Testigo; sin embargo, la ganancia de peso no mostró diferencias estadísticas significativas. El parámetro de condición corporal fue muy similar en ambos grupos. Respecto a la viabilidad de las clamidosporas de *D. flagrans in vitro*, se observó la formación y presencia de redes tridimensionales con nematodos atrapados. El uso de *D. flagrans* utilizando como vehículo de administración los CM es un indicador claro sobre la eficacia de los hongos nematófagos que actúan como agentes de control biológico.

Palabras clave: Control biológico, hongos nematófagos, *Duddingtonia flagrans*, comprimidos multinutricionales, *Haemonchus contortus*.

7.2. ABSTRACT

In the present assay, the effect of supplementing multinutritional pellets (MP), containing *Duddingtonia flagrans* chlamidospores, to Santa Cruz breed sheep on a population of *Haemonchus contortus* larvae in feces and on weight gain, was evaluated. Two groups of six sheep each were randomly allocated and they were infected by oral route with *H. contortus* (L₃). Group 1 (Control) was daily supplied for 11 weeks with commercial food, molasses and grinded alfalfa; group 2 (Treated) received 10 MP containing 7% sorgum, 51% soya paste, 20% coat weath, 18% molasses, 2% mineral salts and 2% calcium. Multinutritional pellets containing a dose of 2×10^6 *D. flagrans* chlamyospores per kg of body weight of every animal. Fecal samples were daily collected from the rectum of each animal once a week to estimate the number of eggs per gram of feces eliminated (EPG) using the McMaster technique. Three fecal cultures in Petri dishes were carried out per each animal. Every week the following parameters were recorded: live weight, packed cell volume (PCV) and body condition. The viability of *D. flagrans* chlamidospores was assessed during all the study by adding 1 fecal pellet in a Petri dish containing 2% agar-water. Data were analyzed by a Student *t* test, using the SAS software. The

results showed a reduction which oscillated between 42.1-84.3% in the population of infective *H. contortus* larvae in fecal cultures from the sheep supplemented with 10 MP except in the third and fourth sampling. The daily weight gain was similar in both sheep groups: 136 g for the control and 163 g for the treated. The treated group showed average PCV values slightly lower than the control group; however, weight gain was not affected. The body condition was very similar in both groups. With respect to the viability of *D. flagrans* chlamidospores, it was observed the development and presence of tridimensional nets on trapped nematodes. The use of *D. flagrans* using 10 MP as administration vehicle is a clear sign on the efficiency of the nematophagous fungi which act as biologic control agents.

Key words: Biologic control, nematophagous fungi, *Duddingtonia flagrans*, multinutritional pellets, *Haemonchus contortus*.

7.3. INTRODUCCIÓN

Los nematodos gastrointestinales (*ngi*) representan un grave problema económico en la industria ganadera nacional y mundial (FAO, 2001), provocando un severo impacto negativo principalmente en zonas tropicales donde las condiciones de temperatura y humedad favorecen la presencia de una variedad de parásitos (Poglavén y Batelli, 2006). Dentro del grupo de los *ngi* se encuentra *Haemonchus contortus*, quien se caracteriza por ser un nematodo hematófago y altamente patógeno (González-Garduño *et al.*, 2011). El control de *ngi* principalmente se basa en el uso de fármacos de origen químico convencionales como: los benzimidazoles, lactonas macrocíclicas e imidazotiazoles (Wolstenholme y Kaplan, 2011). El uso constante e indiscriminado de estos productos antihelmínticos en el ganado, ha generado el fenómeno de resistencia antihelmíntica (López-Arellano *et al.*, 2010; Sadiqqi *et al.*, 2011). La otra desventaja en el empleo de los antihelmínticos es el riesgo de toxicidad (organofosforados) y la eliminación

de compuestos por los animales a través de las heces en su forma activa y pueden llegar a causar un efecto nocivo en contra de organismos benéficos en la naturaleza (Martínez y Cruz, 2009).

En este contexto, es evidente la necesidad de métodos alternos y complementarios (Torres-Acosta *et al.*, 2011). Entre los métodos alternos de control que están siendo estudiadas se dividen en dos: 1) Los métodos dirigidos a controlar a los nematodos en la fase parasítica, dentro de los animales y que incluye a: a) vacunación (Knox, 2011), b) genética de animales naturalmente resistentes a los nematodos (Torres-Hernández y González-Garduño, 2005), c) manipulación de la dieta (Torres-Acosta *et al.*, 2004) y c) la utilización de plantas con propiedades antihelmínticas (Mendoza de Gives *et al.*, 2011) y 2) Los métodos de control indirectos, que son dirigidos al control de las fases libres o no parásitas que se encuentran en el medio ambiente (Mendoza de Gives, 2011) y que involucra: a) el manejo de praderas, entre las que se encuentran los métodos preventivos y b) el control biológico a través hongos nematófagos (Mendoza de Gives y Torres-Acosta, 2011; Sagüés *et al.*, 2011). Los hongos nematófagos son organismos del suelo que producen trampas para capturar, matar y alimentarse de nematodos del suelo (Alfaro-Gutiérrez *et al.*, 2011). La especie *Duddingtonia flagrans* ha sido estudiada y su actividad antagónica de nematodos parásitos de animales ha sido demostrada en pruebas *in vitro* como *in vivo*, pudiendo ser una herramienta biológica en el control de parásitos del ganado (Mendoza de Gives, 2011; Paraud *et al.*, 2011). La forma de aplicación de *D. flagrans* para el control de parásitos del ganado es mediante la administración de clamidosporas del hongo incorporadas en comprimidos multinutricionales (CM) adicionándoles melaza para hacerlos más palatables para los ovinos (Casillas-Aguilar *et al.*, 2008). Además, en la formulación para la elaboración de los (CM) se ha adicionado una cantidad de proteína y energía óptima (Fitz-Aranda, 2010). Una vez que los comprimidos son ingeridos por los ovinos, las clamidosporas en pasan a través del tracto gastrointestinal de los animales y son eliminados junto con las heces al medio ambiente en donde

germinan y forman sus trampas con las que capturan y matan a los estadios larvarios de los parásitos para finalmente nutrirse de sus tejidos (Llerandi- Juárez y Mendoza de Gives, 1998; Arroyo-Balán *et al.*, 2008). La presente tecnología es una manera indirecta de control de los parásitos del ganado, ya que va dirigida a destruir a las fases libres de parásitos en las heces, con lo que el ciclo biológico de los parásitos queda interrumpido, evitando la contaminación de la pradera y disminuyendo las reinfecciones del ganado que consume estos pastos. En la presente investigación se evaluó el efecto de la suplementación de comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo *D. flagrans* en ovinos de la raza Santa Cruz sobre la población de larvas de *H. contortus* en heces y sobre la ganancia de peso.

7.4. MATERIALES Y MÉTODOS

7.4.1. Localización

El trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Helminología de Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Jiutepec, Morelos, México.

7.4.2. Animales experimentales

Se utilizaron 12 ovinos machos de la raza Santa Cruz de una edad entre 2 y 4 meses; con un peso promedio de 23.5 (± 4.0) kg., los animales recibieron una dieta de mantenimiento a base de alfalfa achicalada y agua *ad libitum*.

Los ovinos se mantuvieron bajo confinamiento durante la fase experimental. Antes de realizar el experimento se realizó un examen coproparasitológico utilizando la técnica de McMaster en el Laboratorio de Helminología con la finalidad de verificar que los animales estuvieran libres de parásitos.

7.4.3. Material biológico

7.4.3.1 *Duddingtonia flagrans*

La producción de clamidosporas se realizó a partir de una cepa Mexicana denominada FTTHO-8 de *D. flagrans* perteneciente al CENID-PAVET, INIFAP del Laboratorio de Helmintología, la cual fue obtenida en muestras de suelo en Fierro del Toro, Huitzilac; Morelos, México (Llerandi-Juárez y Mendoza de Gives, 1998).

La producción del hongo se realizó a partir de siembras de material fungal en placas de Petri (100x15 cm) con medio de cultivo a base de cema de trigo, bajo condiciones de esterilidad; para posteriormente sellar e incubar las placas de Petri en la oscuridad a temperatura ambiente (25-30 °C) por un periodo de 21 días.

Posteriormente bajo condiciones de esterilidad con una espátula de borde plano mediante la técnica de raspado se recolectó todo el hongo producido de las cajas de Petri (Mendoza de Gives y Valero Coss, 2009) (Figura 1a, b) para ser depositado y diluido en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL agregando agua destilada esterilizada con antibiótico (Cloranfenicol 500 mg/L, SIGMA) el cual fue sellado y mantenido a 4 °C, durante 24 horas; promoviendo la sedimentación de las clamidosporas, para descartar el sobrenadante y repetir el proceso hasta obtener una suspensión de clamidosporas libres de restos fungales, medio de cultivo y partículas de gran tamaño. Para el conteo de clamidosporas, se empleó una cámara de Neubauer, siguiendo el procedimiento descrito en el Catálogo General Brand 2005 (Paz Silva *et al.*, 2011).

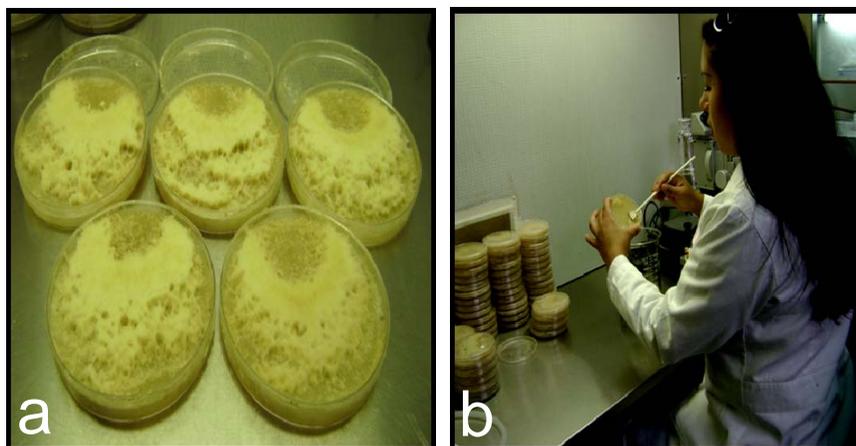


Figura 1. a) Fotografía mostrando el cultivo *in vitro* del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* en medio cema de trigo-agar. b) Fotografía mostrando la cosecha del hongo mediante la técnica de raspado de la superficie del cultivo.

7.4.4. Producción de larvas L₃ de *H. contortus*

La cepa de *H. contortus* fue originalmente obtenida a partir de un ovino infectado naturalmente en el Rancho “Las Margaritas” del INIFAP en el municipio de Hueytamalco, Estado de Puebla, México y mantenido en pases periódicos en ovinos experimentales en el CENID-Parasitología Veterinaria en Jiutepec, Morelos (De Jesús-Gabino *et al.*, 2010). La obtención de larvas infectantes (L₃) de *H. contortus*, se realizó a través de un ovino donador de huevos, para lo cual se utilizó un cordero (sin previa exposición al parásito), que fue mantenido bajo condiciones controladas de alojamiento y alimentación. Este ovino fue infectado artificialmente con larvas del tercer estadio del parásito a una dosis de 350 larvas infectantes por kg de peso vivo, vía oral. Después de un período pre-patente de 21 días, las heces fueron colectadas directamente del recto de animales infectados. Se empleó la técnica de McMaster para observar la presencia de huevos de nematodos y para estimar el número de huevos eliminados por gramo de heces. Posteriormente, los cultivos fecales fueron colocados en recipientes plásticos y mezclados con partículas de poliestireno. El material fecal fue macerado y mezclado con una cuchara de madera

y se incorporó agua con la finalidad de mantener la oxigenación y humedad adecuada de los cultivos y de esta manera promover la eclosión de los huevos (Liébano-Hernández *et al.*, 2011). Seis días después se recuperaron las larvas de los cultivos fecales utilizando la técnica del embudo Baermann por un período de 12 h (Valcárcel-Sancho *et al.*, 2009). Para corroborar la presencia de la infección en los animales experimentales, se realizó un monitoreo de heces tomadas directamente del recto de cada animal a los 21 días, para verificar la aparición de huevos del parásito, utilizando la técnica McMaster (Método Coprológico Cuantitativo) con lo que se determinó además de la presencia del parásito el número de huevos por gramo de heces (HPG) (Liébano-Hernández *et al.*, 2011).

7.4.5. Producción de comprimidos nutricionales

Para la elaboración de comprimidos nutricionales se utilizó la tecnología empleada para la elaboración de comprimidos multinutricionales (Rubio y Vidal, 2000; Casillas-Aguilar *et al.*, 2008) se utilizaron los siguientes ingredientes con su respectivo porcentaje de inclusión: sorgo 7%, pasta de soya 51%, salvado de trigo 20%, melaza 18%, sales minerales 2% y cal 2%, los CM se elaboraron con y sin clamidosporas de *D. flagrans*, posteriormente se dejaron secar por 24 h a temperatura ambiente, la selección de los ingredientes se basó en distintas formulaciones y en las necesidades de los ovinos para dar un aporte de energía de 2.59 Mcal y 27% (P.C) de proteína (Fitz-Aranda, 2010). Los comprimidos multinutricionales se formularon para ovinos de dos a tres meses de edad con un peso corporal promedio de 20-25 kg, el tamaño de los comprimido multinutricionales fue de 3.5x2 cm de diámetro y el peso promedio de 11 gramos cada comprimido, la cantidad de clamidosporas a agregar a cada CM dependió del peso corporal de cada ovino y la cantidad de CM a consumir, con un mínimo de 28×10^6 y un máximo de 58×10^6 clamidosporas de *D. flagrans* (Figura 2 a, b, y c).

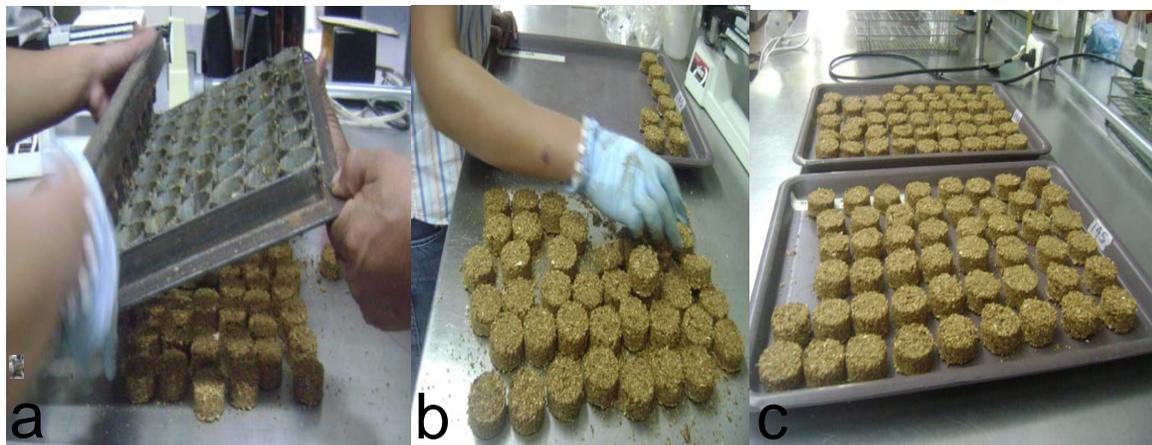


Figura 2. a, b) Fotografías mostrando el proceso de forma artesanal de la producción de comprimidos multinutricionales. c) Fotografía mostrando el aspecto de los comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans*.

7.4.6. Condiciones experimentales

Se utilizaron 12 ovinos machos de la raza Santa cruz, se formaron dos grupos de 6 animales cada uno. Todos los animales fueron infectados vía oral con *H. contortus* a una dosis de 350 L₃/kg de peso vivo. Los 12 ovinos estuvieron sujetos a una dieta de mantenimiento a base de alfalfa achicalada y agua *ad libitum*.

El grupo I, recibió adicionalmente una dieta a base de 10 comprimidos multinutricionales conteniendo 2×10^6 clamidosporas del hongo *D. flagrans* y sorgo, el grupo II recibió adicionalmente una dieta a base de alimento comercial para borrego en crecimiento y engorda (Marca: Nü-3, alimentos balanceados) y melaza, las dietas se administraron diariamente para el grupo I y II. Las dietas se elaboraron y pesaron de acuerdo al peso de los ovinos semanalmente. Los animales se pesaron semanalmente desde el inicio y hasta el término del experimento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental de la presente investigación.

Grupo	Tratamiento	Dosis/Periodicidad
I*	Suplementación con comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas de <i>D. flagrans</i> ** y alfalfa acicalada	10 comprimidos multinutricionales Diariamente por 11 semanas
II*	Suplementación con Alimento comercial, melaza y alfalfa achicalada	Diariamente por 11 semanas

Nota:

*= Ovinos de la raza Santa Cruz infectados con *H. contortus* dosis 350 L₃/kg

**=Se utilizó una dosis de 2x10⁶ clamidosporas/kg de peso corporal, distribuidas en 10 comprimidos multinutricionales.

n= 6 ovinos machos

7.4.7. Aplicación de los tratamientos

Los tratamientos se aplicaron cuando se verificó que todos los animales se encontraban positivos a la hemoncosis; esto se comprobó realizando exámenes coproparasitoscópicos por la técnica de McMaster. A partir de que los animales se encontraban con cargas parasitarias con un promedio entre 50 y 7,250 huevos por g de heces (HPG), esto fue a la 4^a semana post-infección. Se realizaron muestreos fecales para determinar semanalmente el número HPG, se recolectaron heces directamente del recto de los animales y se elaboraron cultivos fecales para obtener y comparar el número promedio de larvas de *H. contortus* recuperadas de los cultivos. El grupo I recibió una dieta a base de 10 CM conteniendo una dosis de 2x10⁶ clamidosporas de *D. flagrans* por kilogramo de peso corporal y sorgo, el grupo II recibió una dieta a base de alimento comercial, melaza, las dietas para el grupo I y II se administraron diariamente por 11 semanas. Las dietas se elaboraron de acuerdo al peso semanal de los ovinos. Los animales fueron pesados semanalmente desde el inicio y hasta el término del experimento utilizando una báscula tipo “Romana” (Figura 3).



Figura 3. Fotografía mostrando el pesaje de los ovinos de la raza Santa Cruz, semanalmente.

7.4.8. Muestreos

Los muestreos se iniciaron a partir de la infección de los ovinos recolectando muestras de heces directamente del recto, para determinar los valores de HPG y para la realización de cultivos fecales que se incubaron durante 15 días para obtener y cuantificar el número de larvas obtenidas en los diferentes tratamientos. Asimismo, se realizaron muestreos sanguíneos, para determinar el volumen celular aglomerado (VCA) ya que el nematodo en estudio es hematófago y se comparó el grado de anemia causado por el parásito a los ovinos infectados artificialmente, estos valores fueron registrados semanalmente (Figura 4).



Figura 4. Fotografía mostrando la colecta de sangre a partir de la vena yugular de los ovinos experimentales.

7.4.9. Muestras de heces

Los resultados de la presente investigación fueron considerados de acuerdo al número promedio de larvas recuperadas de los coprocultivos en los diferentes grupos durante todo el experimento, para obtener el porcentaje de reducción del número de larvas por efecto de los tratamientos, de igual forma las variables a evaluar fueron en primer lugar el número de huevos por gramo en heces (HPG) y en segundo lugar el número de larvas recuperadas a partir de la elaboración de cultivos fecales para hacer una comparación en la dinámica poblacional de larvas entre ambos grupos.

7.4.10. Determinación de la condición corporal

La determinación de la condición corporal de los ovinos que conformaron los tratamientos I y II se realizó por palpación de la región lumbar y la grupa, con las dos manos del evaluador se estableció en forma aproximada la cantidad de músculo y grasa subcutánea entre la parte espinosa y transversa de las vértebras (Figura 5).

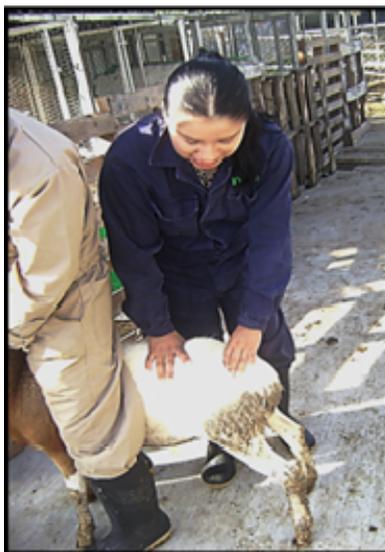


Figura 5. Aspecto de la palpación de la región lumbar de un ovino de la raza Santa Cruz para la determinación de la condición corporal.

El parámetro que se otorgó para calificar la condición corporal del animal fue de una escala de 1 a 5 (Lucas-Tron, 2010). Las características morfológicas evaluadas de los animales fueron las siguientes:

1. Animales emaciados. Están extremadamente delgados y se encuentran bajo riesgo de morir de inanición. Características: Las vértebras (apófisis espinosa y apófisis transversa) se presenta con flacidez a la palpación, debido a la escasez de tejido muscular y grasa.
2. Condición corporal Regular. Generalmente se presentan medianamente delgados. Características: Las vértebras en sus apófisis espinosas y transversas se palpan con facilidad; no obstante a la palpación se percibe la presencia de una mayor cantidad de músculo y grasa que el anterior.
3. Animales en buena condición corporal. Características: Ovinos con la presencia moderada de tejido muscular y grasa que a la palpación se percibe entre las apófisis espinosa y transversa es moderada. Las vértebras ya no se sienten tan fácilmente y requieren de una ligera presión debido a que ya hay grasa entre la piel y el músculo.
4. Animales ligeramente cebados. Características: Estos animales están ligeramente grasos y se percibe una capa sobre el músculo que se aprecia como una consistencia grasa. Las apófisis de las vértebras se pueden sentir al hacer presión sobre ellas.
5. Animales cebados: Características: Estos animales presentan un cuerpo francamente graso. Al momento de la palpación se perciben las vértebras, aun sin ejercer presión sobre ellas. El animal se encuentra totalmente cubierto de grasa.

7.4.11. Coprocultivos para la recuperación de larvas infectantes de

Haemonchus contortus

Para la recuperación de larvas infectantes de *H. contortus* se utilizaron 7 g de heces de ovino para la elaboración de coprocultivos en cajas de Petri (60x15 cm) (n=3). Las heces fueron depositadas

en las cajas de Petri y maceradas con una cuchara metálica y adicionadas con 0.1 mL de agua destilada estéril hasta conseguir una pasta homogénea y húmeda. Los cultivos fecales fueron incubados durante 15 días a temperatura del laboratorio (25-30 °C) con la finalidad de permitir que las larvas eclosionaran y el hongo *D. flagrans* ejerciera su actividad depredadora sobre ellas. Los cultivos fecales fueron mezclados diariamente con una cuchara metálica para promover la oxigenación y con esto una mejor eclosión y sobrevivencia de las larvas. Posteriormente al periodo de incubación, se prepararon pequeños bultos con gaza utilizando heces de los cultivos de manera individual. Los bultos se amarraron y se depositaron en el embudo de Baermann con agua corriente, en donde permanecieron durante 24 h para finalmente obtener las larvas sedimentadas en el fondo de los tubos de ensaye. El número de larvas recuperadas a partir de coprocultivos se determinó mediante la cuantificación del número de larvas en 10 alícuotas de 5 μ L cada una (Arroyo-Balan *et al.*, 2008; Fitz-Aranda, 2010) (Figura 6).

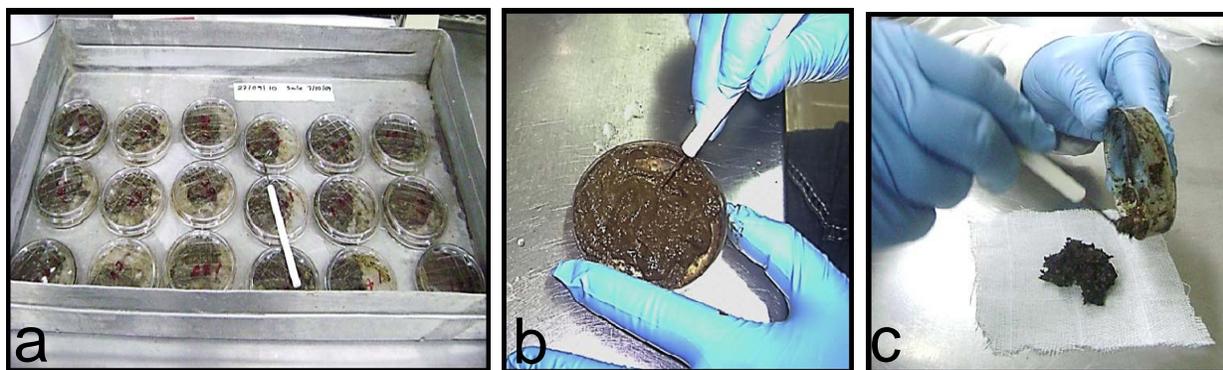


Figura 6. Aspecto de la elaboración de cultivos fecales. a) Coprocultivos incubados durante 15 días. b) Revisión de coprocultivos diariamente. c) Preparación de bultos con tela gaza para depositarlo en el embudo de Baermann para la recuperación de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

7.4.12. Viabilidad de las clamidosporas en las heces

Para determinar la presencia de clamidosporas viables del hongo *D. flagrans* en las heces, se realizó una prueba de germinación *in vitro*. Durante toda la fase experimental se verificó la

presencia de clamidosporas viables en las heces. Se colocó 1 pellet fecal de cada uno de los ovinos que conformaban el grupo I en placas de Petri (100x15 cm) conteniendo agar bacteriológico al 2%. Las placas de Petri con el pellet fecal se dejaron incubar por 10 días y posteriormente se observó la presencia o ausencia de larvas libres, larvas atrapadas, redes tridimensionales con ayuda de un estereoscopio (4X). Las placas de Petri en los que se encontraba el pellet fecal que presentaron estructuras atrapadoras (trampas) o nematodos atrapados fueron consideradas como positivas y aquellas que no presentarán las evidencias antes mencionadas se consideraron como negativas (Fitz, 2010; Ojeda Robertos *et al.*, 2008).

7.4.13. Determinación de la reducción de larvas

El porcentaje de reducción de la población de larvas infectantes de *H. contortus* por acción del hongo nematófago *D. flagrans* fue estimada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de reducción de nematodos} = \frac{\bar{X} \text{ testigo} - \bar{X} \text{ tratado}}{\bar{X} \text{ testigo}} \times 100$$

Dónde:

Grupo testigo = Media de grupo control de nematodos recuperados;

Grupo tratado = Media del grupo tratado de nematodos recuperados;

(Fitz-Aranda, 2010).

7.4.14. Conteo de huevos de *H. contortus* por gramo de heces

El conteo de huevos por gramo en heces, se realizó a través de la técnica de McMaster. Este método se utiliza regularmente para detectar y cuantificar huevos de nematodos gastrointestinales. El procedimiento consistió en llenar la probeta con solución salina saturada hasta 28 mL y se agregan 2 g de heces, medidos por desplazamiento de 2 mL. Se tapa la probeta y se homogeniza el contenido. Después de llenar la cámara, se deja reposar durante 5 minutos

con la finalidad de permitir el ascenso de los huevos. Posteriormente, se toma con un gotero la cantidad suficiente de suspensión para llenar los compartimentos de la cámara de McMaster, evitando formar burbujas de aire. Es recomendable antes de obtener la muestra con el gotero, colocar en la boca de la probeta un pequeño trozo de gasa a fin de detener los residuos de detritos o restos vegetales. Después de llenar la cámara, se deja reposar durante 5 minutos con la finalidad de permitir el ascenso de los huevos. Se observa al microscopio con el objetivo (10X). Este volumen expresado en porcentaje significa que cada lado de 0.15 mL es el 0.5% del volumen total de la probeta y 0.30 corresponde al 0.1% de la muestra; el número obtenido se multiplica por 100 y puesto que en la muestra se utilizaron 2 g de heces, el valor se divide entre 2 y el resultado se expresa como número de huevos por gramo de heces (Liébano-Hernández *et al.*, 2011).

7.4.15. Prueba hemática (Volumen Celular Aglomerado)

Para la prueba hemática, se tomaron muestras de sangre de cada ovino directamente de la yugular con tubos y agujas estériles vacutainer, los tubos contenían heparina. Se tomaron muestreos a partir de la infección experimental y hasta que terminó la aplicación de los tratamientos con diferencia de 7 días entre una y otra. El parámetro hematológico medido fue el volumen celular aglomerado (VCA) también denominado hematocrito, se utilizaron capilares de vidrio para micro-hematocrito, microcentrífuga estándar de laboratorio marca (M-600: SOLBAT), plastilina y lector de micro-hematocrito. El procedimiento fue el siguiente: los capilares de vidrio para micro-hematocrito fueron llenados con las muestras de sangre hasta tres cuartas partes de su capacidad y se sellaron con plastilina, posteriormente se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm. Concluido este período, se procedió a la lectura utilizando un lector de microhematocrito y el resultado fue expresado en porcentajes (Arroyo-Balán *et al.*, 2008).

7.4.16. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados usando el software Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 1998). Se utilizó el análisis de la Prueba de t de Student para las variables, promedio de larvas recuperadas, volumen celular aglomerado (VCA), peso, condición corporal y huevos por gramo en heces (HPG). Para la comparación de esta última variable se utilizaron los datos transformados logarítmicamente para homogeneizar las varianzas y mejorar la distribución de los datos.

7.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados sobre la reducción de la población de larvas de *H. contortus* en heces por acción del consumo de los CM conteniendo clamidosporas del hongo, se muestran en la Figura 7. En esta figura, se aprecia que durante todo el experimento a excepción de las semanas 2, 3 y 4 hubo una reducción de la población larvaria en las heces del grupo que ingirió las clamidosporas en los comprimidos en un rango entre 57.8 y 78.7%. En la 2ª semana la reducción registrada fue de solamente 30.5% y en las semanas 3 y 4 no se observó ninguna reducción de la población larvaria. Los resultados estadísticos utilizando la prueba de t de Student, indicaron que hubo diferencias entre ambos grupos (testigo y tratado) ($p \leq 0.05$). El hecho de que en la mayoría de las semanas se haya obtenido una reducción promedio cercana al 70% es un resultado muy alentador pues indica que el método evaluado consistente en la utilización de los comprimidos multinutricionales como un vehículo para la administración de las clamidosporas del hongo *D. flagrans* es exitoso. Estos resultados son similares con los reportados por De Almeida *et al.* (2011), en donde encontraron una reducción de larvas de *Strongyloides* sp. en campo en un 73.5% utilizando una concentración 1×10^6 de clamidosporas de *D. flagrans*/por kilogramo de peso vivo mezcladas con alimento concentrado comercial durante 5 meses en la región sureste de Brasil.

Los comprimidos multinutricionales en el presente estudio se utilizaron como suplemento para los ovinos, la forma sólida y compacta facilitó el suministro de nutrientes, energía, proteína y la adición de las clamidosporas del hongo nematófago *D.flagrans*, además de cubrir las necesidades y proporciones adecuadas de proteína y energía (Ruíz-Rodríguez, 2005).

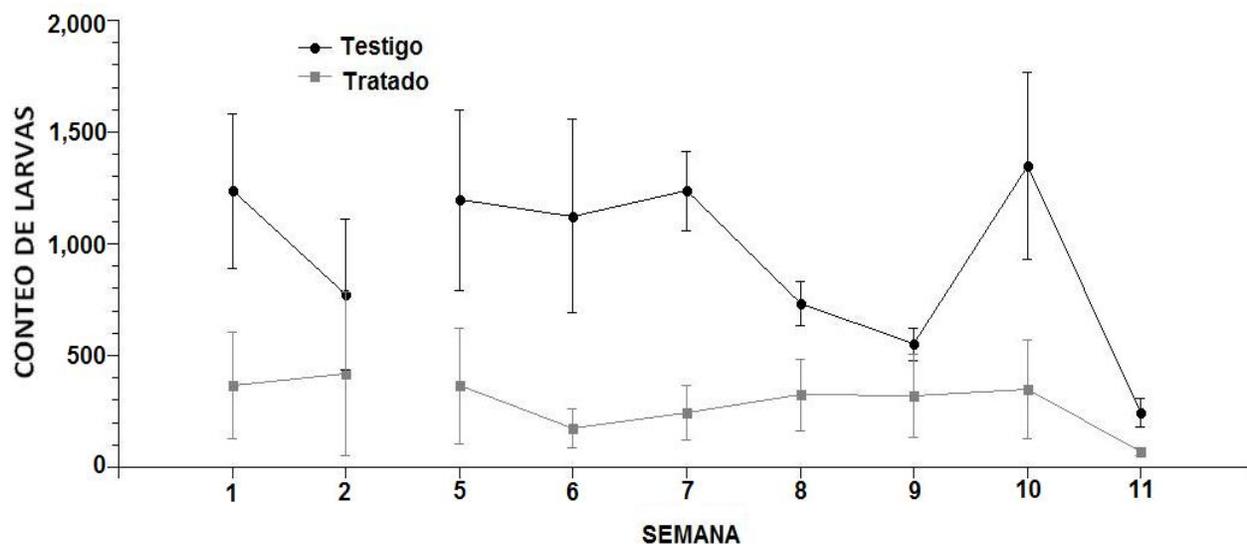


Figura 7. Número promedio de larvas recuperadas a partir de las heces de los animales de ambos grupos I (suplementados con comprimidos multinutricionales) y II (Suplementados con alimento comercial para ovinos) durante las 11 semanas ($p \leq 0.05$).

El conteo de huevos de *H. contortus* eliminados en las heces de los animales experimentales en ambos grupos de ovinos se muestra en la figura 8, en el grupo testigo y tratado a la semana 5 los valores estuvieron en un rango de 2,000 a 5,000 HPG y posterior a la semana 6 el rango del grupo testigo disminuyó a 50 HPG, sin embargo a la semana 6 el rango de HPG estuvo entre 1000 y 4000 HPG. Estos rangos de valores se mantuvieron de forma similar hasta el final del experimento. En el cuadro 2 se muestran los promedios de los grupos testigo y tratado sin transformar y transformados logarítmicamente.

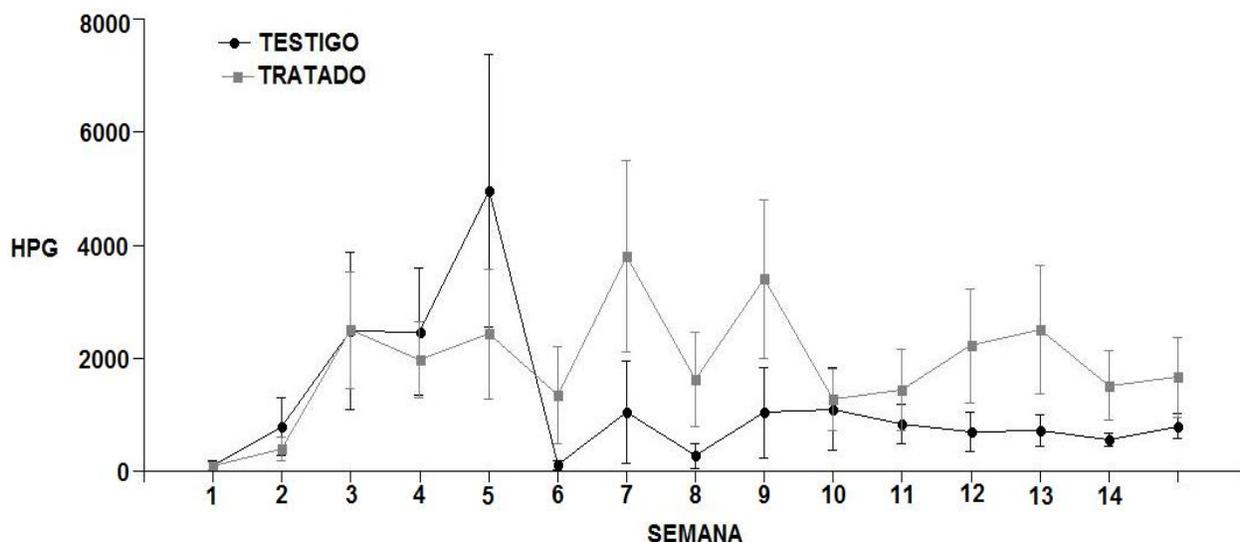


Figura 8. Conteo de huevos de *Haemonchus contortus* (HPG) eliminados en heces de los ovinos de ambos grupos testigo y tratado. Nota: El conglomerado de los valores promedio de hpg registrados durante todo el experimento mostró que no hubo diferencias significativas entre ambos grupos ($p \geq 0.05$).

Cuadro 2. Promedios de huevos por gramo en heces (HPG) sin transformar y transformados logarítmicamente.

Grupos	Promedios de HPG sin transformar	Promedios de HPG transformados logarítmicamente
Testigo	1196.1 \pm (1215.5)	6.6 \pm (1.0)
Tratado	1877.2 \pm (956.0)	7.2 \pm (0.9)

n=15

Respecto a los valores de HPG que se aprecian durante las 11 semanas que duró el experimento se encontró una gran variabilidad en ambos grupos. La variabilidad en la eliminación de los huevos fecales en ovinos es una característica observada regularmente y puede estar influenciada por diversos factores como: 1) el sexo, ya que los ovinos machos son más sensibles a la infección con *ngi*, esto como resultado del efecto negativo que tiene la testosterona sobre la inmunidad de los animales (Klein, 2000; Torres-Acosta y Aguilar-Caballero, 2005).

Estudios sobre la prevalencia de las infecciones con *ngi* en caprinos en Nigeria a nivel de rastro no mostraron efecto alguno del sexo sobre la prevalencia y la cantidad de HPG ($P \geq 0.05$) (Behneke *et al.*, 2006), 2) edad y peso de los animales, los corderos jóvenes son más susceptibles a la infección de los *ngi* que los adultos; en un estudio realizado por Schalling en el 2000, se encontró que los corderos menores de 6 meses de edad fueron más susceptibles a los *ngi* que los ovinos adultos. Se ha reportado que la susceptibilidad a la infección por *ngi* en los corderos está relacionada con la deficiencia de la respuesta inmune tipo Th2 (Kosi y Scott, 2001; Bautista-Garfias, 2009). En relación al peso se ha mostrado que los ovinos y caprinos menores de 7 kg de peso vivo al destete son más sensibles a las infecciones con *ngi* y sus efectos patológicos (Santamaría-Colonia *et al.*, 1995), 3) La raza de los animales, 4) La habilidad de desarrollar la resistencia genética en las diferentes razas de ovinos es diferente, como ejemplo se encuentran la raza Florida (Courtney *et al.*, 1985; Amarante *et al.*, 1999; Diaz-Rivera *et al.*, 2000), St. Croix (Zajac *et al.*, 1990; Gamble y Zajac, 1992); y Red Maasai (Mugambi *et al.*, 1997), 5) Aspecto nutricional, 6) El desarrollo de la inmunidad es un factor dependiente de una alta disponibilidad de nutrientes de naturaleza proteica (Colditz, 2002). 7) El uso de suplementos se ha convertido en una alternativa para contribuir en la adecuada alimentación de los ovinos (Burke, 2009). En un estudio realizado por Torres-Acosta *et al.* (2004), se demostró que ofrecer una alimentación con suplementos (nitrógeno proteico), se puede desarrollar el fenómeno de la resiliencia (habilidad que posee el hospedero para soportar altas cargas parasitarias) y resistencia en cabritos criollos en el trópico Mexicano, 8) Estado inmunológico, los ovinos adquieren la inmunidad contra los *ngi* como resultado de la exposición repetida a los antígenos de referencia, los mecanismos de la inmunidad contra los diferentes *ngi* son únicos y adaptados a los diferentes estadios del ciclo biológico (Andronicos *et al.*, 2010; Bautista-Garfias, 2010). Las razas de animales con resistencia genética muestran una inmunidad innata a través de mecanismos humorales y celulares (Miller y Horohov, 2006), 9) Idiosincrasia de cada individuo. Cabe mencionar que la variable de HPG se

ha aceptado como una variable para medir la resistencia o susceptibilidad ya que es una variable altamente repetible y medianamente heredable (Torres-Hernández y González-Garduño, 2005). Por otro lado, la viabilidad de las clamidosporas de *D. flagrans* que lograron pasar el tracto digestivo de los ovinos y que fueron eliminadas en las heces se muestra en el Cuadro 2; en donde se aprecia la presencia o ausencia de larvas infectantes de *H. contortus* atrapadas por el hongo; así como la presencia de redes tridimensionales de captura o la formación de micelio del hongo. Los resultados de este experimento demuestran que las clamidosporas del hongo contenidas en los CM fueron capaces de germinar en las heces una vez que pasaron a través del tracto digestivo de los animales. La presencia de larvas infectantes de *H. contortus* capturadas en las redes tridimensionales del hongo demuestra que el hongo a pesar de las condiciones adversas del tracto digestivo conservaron su actividad depredadora. Estas estructuras se observaron en las placas de Petri sembradas con las heces colectadas semanalmente durante las 11 semanas que duró el experimento. Este resultado, indica que los animales que recibieron los CM siempre estuvieron eliminando clamidosporas viables durante todo el experimento. La viabilidad de las clamidosporas del hongo *D. flagrans* una vez que ha sido administrado en ovinos ha sido recientemente evaluada por Ojeda Robertos *et al.* (2010) y se comprobó que la gran mayoría de esporas es degradada y digerida en el tubo digestivo de ovinos. Esta situación ha sido motivo de una gran discusión en la búsqueda de la aplicación práctica de esta metodología para el control de las nematodiasis utilizando hongos nematófagos; no obstante, debido a que los hongos nematófagos tienen un desarrollo exponencial se sabe que una pequeña cantidad de esporas viables en las heces es suficiente para obtener resultados promisorios en la reducción de la población de larvas infectantes en las heces y en el pasto. No obstante, los resultados reportados por diversos autores han mostrado resultados muy variables en la eficiencia en la reducción de la carga parasitaria en el ganado utilizando distintas dosis de clamidosporas de *D. flagrans*.

Cuadro 3. Viabilidad de las esporas de *Duddigtonia flagrans* después de su paso a través de tracto digestivo de los ovinos tratados.

No. ovino	Semanas									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
140	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
143	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
145	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
146	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
150	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
148	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+

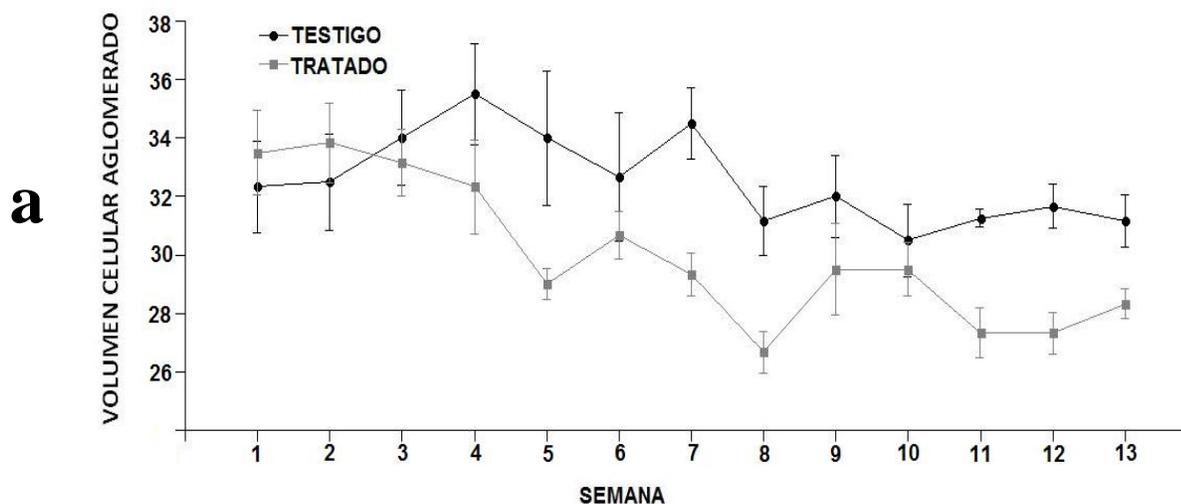
Nota: (-) ausencia de redes o formación de micelio, (+) presencia de redes tridimensionales y/o larvas de *H. contortus* atrapadas.

La administración oral de 3.5×10^6 millones de clamidosporas en suspensión acuosa por kilogramo de peso en cabras infectadas con *H. contortus* produjo resultados muy variables registrándose valores máximos de eficiencia contra larvas del parásito en heces de 36% a los 7 días y a los 14 días la reducción máxima fue de 52.8% (Ojeda Robertos *et al.*, 2005). En un estudio administrando diariamente 1×10^6 de clamidosporas del hongo por kilogramo de peso en ovinos resultó en una reducción de la carga parasitaria de 51.1% para *H. contortus* y 100% para *Cooperia* sp. en ovinos rastreadores después de 5 meses de pastoreo (Mendoza de Gives *et al.*, 2006). Asimismo, el suministro de pellets multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo en ovinos a dosis de 2×10^6 clamidosporas redujo en 82% la población de larvas de *H. contortus* en heces (Casillas-Aguilar *et al.*, 2008). En otro estudio utilizando también una dosis de 1×10^6 clamidosporas de *D. flagrans* por kg de peso combinando con un tratamiento químico antihelmíntico (Albendazol) se observaron reducciones de la población larvaria en cultivos fecales del 79% (Arroyo-Balán *et al.*, 2008). En un trabajo reciente, se administraron dosis diarias de 200, 000 clamidosporas de un aislamiento aislado en Argentina del hongo *D. flagrans* por kg de peso vivo, los resultados mostraron 100% de reducción de la carga parasitaria contra *H. contortus*; 89.9% contra *Teladorsagia circumcincta* y 87.5% contra *Trichostrongylus colubriformis*; 90% contra *Cooperia oncophora* y no se observó actividad contra *T. axei* (Sagués *et al.*, 2011). Los valores del Volumen Celular Aglomerado (VCA), peso y condición corporal se muestran en las figura 9 a, b y c. Los valores del VCA presentaron valores que oscilaron entre 30.5 y 35.5%, en el grupo testigo para el grupo tratado entre 26.67 y 33.83%. Los valores del VCA del grupo tratado fueron ligeramente más bajos que el grupo testigo ($p \geq 0.05$); sin embargo este parámetro no afectó el peso de los animales experimentales. Los resultados estadísticos utilizando la prueba de *t* de Student, indicaron que no hubo diferencias entre ambos grupos (testigo y tratado), cabe mencionar que los niveles normales de VCA oscilan en un rango entre 27

y 45% para ovinos (Rincon-Delgado *et al.*, 2011). Respecto a los valores del peso corporal, como se observa en la figura 9b, se encuentran en un rango de 23.33 y 34.58 kilogramos para el grupo testigo y 23 y 36.08% para el grupo tratado, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (testigo y tratado).

La ganancia de peso diario fue muy similar en los dos grupos de ovinos; siendo 136 g para el grupo testigo y 163 g para el grupo tratado ($p \geq 0.05$). Respecto a los valores de la condición corporal se encuentran en un rango de 3 a 5, en ambos grupos.

El parámetro que se otorgó para calificar la condición corporal del animal fue de una escala de 1 a 5 (Lucas-Tron, 2010). El análisis estadístico utilizando la prueba de t , no mostró diferencias significativas en ambos grupos, testigo y tratado. La condición corporal se aplica como un indicador subjetivo de fácil aplicación para establecer las relaciones entre alimentación y producción (Molina y Gallego, 1993)



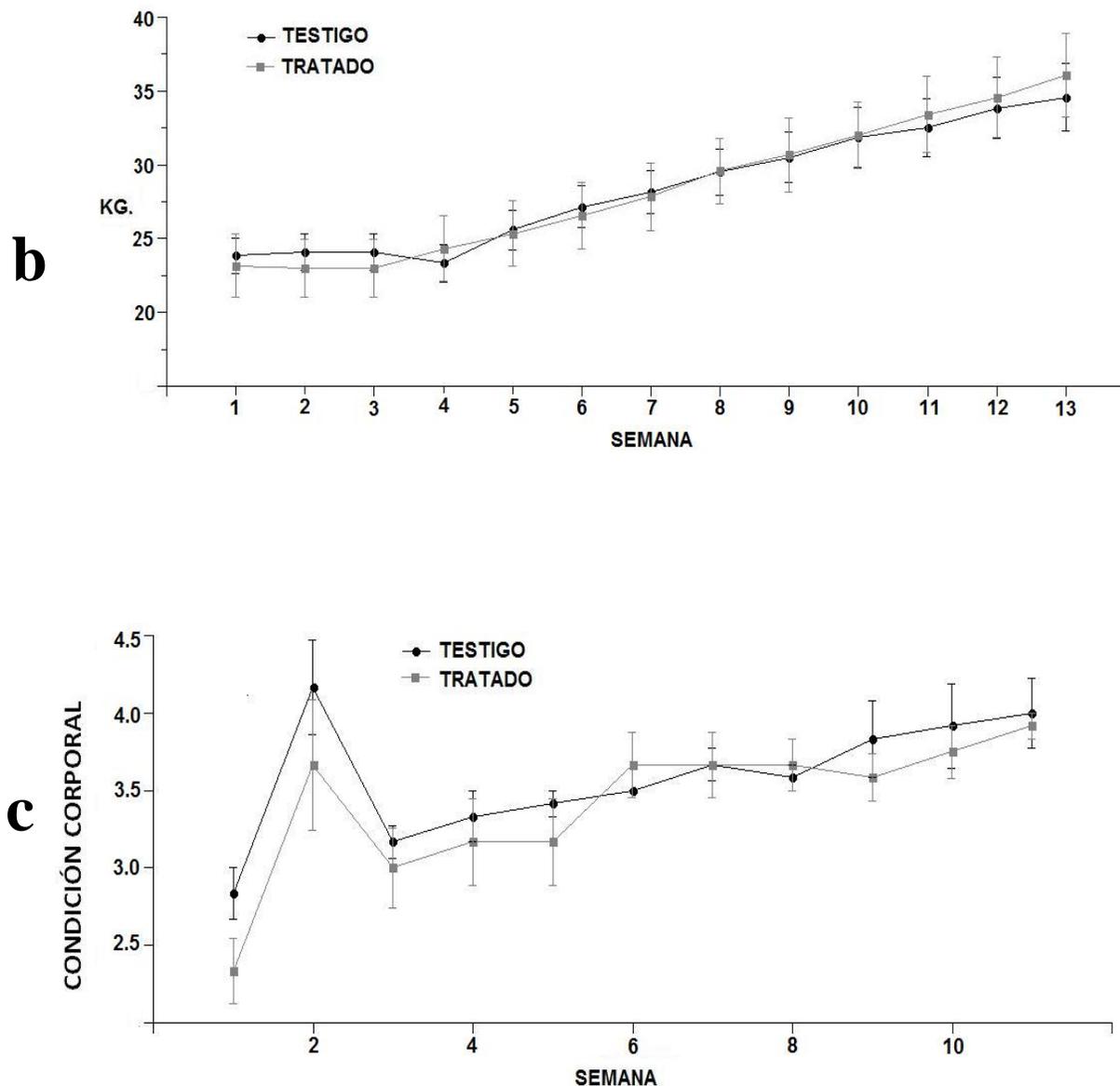


Figura 9. a) Promedio del peso de los animales experimentales de los grupos testigo y tratado ($p \geq 0.05$) b) Volumen celular aglomerado ($p \geq 0.05$). c) Parámetro de la condición corporal de los animales experimentales ($p \geq 0.05$).

Los resultados de la presente investigación muestran que la utilización de *D. flagrans* utilizando como vehículo de administración los CM, puede contribuir de forma importante en la aportación de requerimiento nutricional y también por ende fortalecer el sistema inmunológico de los ovinos de la raza Santa Cruz y las clamidosporas de *D. flagrans* ayudarán a mantener la contaminación en las praderas por *ngi* a niveles bajos que no represente un riesgo de salud para los animales. Es

importante destacar que la presente investigación se llevó a cabo en condiciones controladas y de confinamiento, a futuro se deberá desarrollar esta investigación en condiciones de campo. La utilización y aplicación de los CM se deberá considerar como una alternativa adicional, junto con otras estrategias con la finalidad de controlar las parasitosis generadas por los *ngi*. Aunado a estas perspectivas de la presente investigación es necesario generar y desarrollar estudios sobre los hongos nematófagos como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos; la dualidad entre interacción-atracción de los nematodos por los hongos nematófagos, utilizando los avances de la biología moderna y en especial las aplicaciones de la biología molecular en el estudio de la patogénesis fúngica.

7.6. CONCLUSIONES

La suplementación de ovinos de la raza Santa Cruz con comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo *Duddingtonia flagrans* (cepa mexicana: FTOH-8) reducen la población de larvas de *Haemonchus contortus* (L₃) en un rango cercano al 70%. La ganancia diaria de peso en los animales que consumen alimento comercial concentrado y en animales que son suplementados con comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo *D. flagrans* es muy similar (cerca al 150 g/día), no existiendo diferencia estadística significativa entre ambos grupos. Este resultado conduce a concluir que el aporte nutricional de los comprimidos conteniendo clamidosporas del hongo *D. flagrans* es tan eficiente como un alimento comercial; además de fungir como un excelente vehículo para suministrar los hongos nematófagos.

7.7. LITERATURA CITADA

Alfaro-Gutiérrez, I.C., Mendoza de Gives, P., Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Valero-Coss, R.O., Hernández-Velázquez, V.M. 2011. Nematophagous fungi (Orbiliales)

capturing destroying and feeding on the histotrophic larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Revista Mexicana de Micología*. 33: 29-35.

Amarante, A.F.T., Craig T.M., El-Sayed, N. M. Desouki, A.Y., Ramsey, W.S. Bazer F.W. 1999. Comparison of naturally acquired parasite burdens among Florida Native, Rambouillet and crossbreed ewes. *Veterinary Parasitology*. 85: 61-69.

Andronicos, N., Hunt, P., Windon, R. 2010. Expression of genes in gastrointestinal and lymphatic tissues during parasite infection in sheep genetically resistant or susceptible to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 40: 417-129.

Arroyo-Balán, L.F., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, Ma. E., Liébano-Hernández, E. Vázquez-Prats, V.M., Miranda-Miranda, E., Ortiz de Montellano-Nolasco, A.M. 2008. Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina bajo condiciones controladas. *Técnica Pecuaria en México*.46 (2): 217-223.

Bautista-Garfías, C.R. 2009. Parasitic helminths of veterinary concern: host immune response regulation and potential use for the treatment of inflammatory diseases. *Veterinaria México*. 40 (3): 283-291.

Bautista-Garfías, C.R. 2010. Respuesta inmune contra parásitos. In: *Inmunología Veterinaria*. Editor: Gutiérrez-Pabello, J.A. (Eds). *El Manual Moderno*.pp.195-203.

Behnke, J.M. Chiejina, S.N. Musongong, G.A. Faka, B.B. Ezeokonkwo, R.C. Nnadi, P.A. Ngongeh, L.A. Jean, E.N., Wakeling, D. 2006. Naturally occurring variability in some phenotypic markers and correlates of haemonchotolerance in West African Dwarf goats in subhumid zone of Nigeria. *Veterinary Parasitology*. 141: 107-121.

- Burke, J.M., Miller J.E. Terril, T.H. 2009. Impact of rotational grazing on management of gastrointestinal nematodes in weaned lambs. *Veterinary Parasitology*. 163: 67-72.
- Casillas-Aguilar, J.A., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E. 2008. Evaluation of multinutritional biopellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine *Haemonchus contortus*. *Annals New York Academy of Sciences*.1318: 1-3.
- Catálogo General Brand. 2005. Cámaras de Recuento. pp: 140-143.
- Colditz, I.G. 2002. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. *Livestock Production Science*. 75: 257-268.
- Courtney, C.H., Parker, C.F., McClure, K.E., Herd, R.P. 1985. Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 15(9): 101-109.
- De Almeida, G.L., Santurio, JM., Filho, J.O., Zanette, R.A., Camillo, G., Flores, A.G., Da Silva, J.H., De la Rueda, M.L.2011. Predatory activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* in equine strongyle infective larvae on natural pasture in the Southert Region of Brazil. *Parasitology Research*. (In Press).
- De Jesús-Gabino, A.F., Mendoza de Gives, P., Salinas-Sánchez, D.O., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E., Hernández-Velázquez, V.M., Valladares-Cisneros, G. 2010. Anthelmintic effects of *Prosopis laevigatan*-hexanic extract against *Haemonchus contortus* in artificially infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Helminthology*. 84: 71-75.

- Díaz-Rivera, P., Torres-Hernández, G., Osorio-Arce, M., Pérez-Hernández, P., Pulido-Albores, A.R., Becerril-Pérez, C.M., Herrera-Haro, J.G. 2000. Resistencia a parásitos gastrointestinales en ovinos Florida, Pelibuey y sus cruzas en el Trópico Mexicano. *Agrociencia*.34: 13-20.
- FAO. 2001. Sustainable approaches for managing haemonchosis in sheep and goats. FAO Animal Production and Health Paper. Final Report of a FAO Technical Co-operation Project in South África.
- Fitz-Aranda, A., 2010. “Evaluación de comprimidos nutricionales como vehículos para la administración de clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* en ovinos”. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- Gamble, H.R., Zajac, A, M. 1992. Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired. *Veterinary Parasitology*.
- González-Garduño, R., Cordova-Pérez, C., Torres-Hernández, G., Mendoza de Gives, P., Arece-García, J. 2011. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *Veterinaria México*. 42(2): 125-135.
- Klein S.L. 2000. Hormones and mating system effect sex and species differences in immune function among vertebrates. *Behavioural Processes*.5: 149-166.
- Knox, D. 2011. Proteases in blood-feeding nematodes and their potential as vaccine candidates. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 712: 155-76.
- Kosi K.G., Scott, M.E. 2001. Gastrointestinal nematodes, nutrition and immunity: breaking the negative spiral. *Annual Review of Nutrition*. 21: 297-321.

- Liébano-Hernández, Enrique., López-Arellano, M.E., Mendoza de Gives, P., Aguilar-Marcelino, L. 2011. Manual de Diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria Manual Especial No. 2. pp:1-48.
- Llerandi-Juárez, R.D., Mendoza De Gives, P 1998. Resistance of chlamydospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep in México. *Journal of Helminthology*.72:155-158.
- López-Arellano, M.E., Mendoza de Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., Liébano-Hernández, E. 2010. Buenas prácticas en el manejo de antihelmínticos para el control de parásitos en rumiantes. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Folleto Técnico No. 8. pp: 1-38.
- Lucas-Tron, J. 2010. Evaluación de la condición corporal en ovejas. Fortalecimiento del sistema producto ovinos. Tecnología para productores. *Revista el Borrego*. 1:1-10.
- Martinez, M.I., Cruz, R.M. 2009. The use of agricultura and livestock chemical products in the cattle-ranching area of Xico, central Veracruz, Mexico, and their possible environmental impact. *Acta Zoologica Mexicana*. 25: 637-681.
- Mendoza De Gives, P., Zapata-Nieto, C., Hernández, E.L., Arellano, M.E., Rodríguez, D.H., Garduño, R.G. 2006. Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1081:355-359.
- Mendoza de Gives, P., Valero-Coss, R.O. 2009. Uso de hongos nematófagos: Una herramienta biotecnológica para el control de nematodos parásitos del ganado. Folleto Técnico No. 7.

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Forestal, Agrícolas y Pecuarias. pp: 1-29.

Mendoza de Gives, P., López-Arellano, Ma. E., Liébano-Hernández, E., Aguilar-Marcelino, L. 2011. Plant Extracts: A potential tool for controlling animal parasitic nematodes. *In: Biosphere* (Ivona Lovric Editor) In Tech inc. Slavka Krautzeka Rijeka, Croatia. (In Press).

Mendoza de Gives, P., Torres-Acosta, J.F.J. 2011. Biotechnological Use of Fungi in the Control of Ruminant Parasitic Nematodes. *In: "Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Diseases"*, Adolfo Paz and María Sol Árias Vázquez. Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, New York, 11788-3619 (In Press).

Mendoza de Gives, P. 2011. Hongos que capturan, matan y se alimentan de nematodos parásitos del ganado. Capítulo 20. *In: Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*. Editores: Héctor Quiroz Romero, Juan Antonio Figueroa Castillo, Froylan Ibarra Velarde. María Eugenia López Arellano. 1ª Edición. pp: 345-353.

Miller, J.E., Horohov, D.W. 2006. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J.Anim.Sci.* 84: 124-132.

Molina, A., Gallego, L. 1993. Efecto del nivel de reservas corporales en distintas épocas del año sobre algunos parámetros productivos en ovejas Manchegas. *Investigación Agrícola y Producción- Sanidad Animal.* 8: 127-137.

Mugambi, J.M., Bain, R.K., Wanyangu, S.W., Ihiga, M.A., Duncan, J.L., Murray, M., Stear, M.J. 1997. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology.* 69(3-4): 265-73.

Ojeda-Robertos, N.F., Mendoza-de Gives, P., Torres-Acosta, J.F., Rodríguez-Vivas, R.I., Aguilar-Caballero, A.J. 2005. Evaluating the effectiveness of a Mexican strain of

Duddingtonia flagrans as a biological control agent against gastrointestinal nematodes in goat faeces. *Journal of Helminthology*. 79(2): 151-7.

Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J., Ayala-Burgos, A., Cob-Galera, L.A., Sandoval-Castro, C.A., Barrientos-Medina, R.C., de Gives, P.M. 2008. Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary parasitology*. 158(4): 329-35.

Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F., Ayala-Burgos, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Valero-Coss, R.O., Mendoza-de-Gives, P. 2010. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Veterinary Research*. 5:46-52.

Paraud, C., Lorrain, R., Pors, I., Chartier C. 2011. Administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to goats: an evaluation of the impact of this fungus on the degradation of feces and on free-living soil nematodes. *Journal of Helminthology*. 21:1-9.

Paz-Silva, A., Francisco, I., Valero-Coss, R.O., Cortiñas, F.J., Sánchez, J.A., Francisco, R., Arias, M., Suárez, J.L., López-Arellano, M.E., Sánchez-Andrade, R., de Gives, P.M. 2011. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Veterinary Parasitology*. 179(1-3): 277-82.

Poglavén, G., Batelli, G. 2006. An insight into the epidemiology and economic impact of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Parasitologia*. 48: 409-413.

Rincon-Delgado, R.M., Gutierrez-Banuelos, H., Perez-Vazquez, E.D., Muro-Reyes, A., Diaz-Garcia, L.H., Banuelos-Valenzuela, R., Gutierrez-Pina, F.J., Medina-Flores, C.A., Escareno-Sánchez, L.M., Aguilera-Soto, J.I., Lopez-Carlos, M.A., Arechiga-Flores, C.F. 2011. Relationship of residual feed intake on specific hematological and biochemical

parameters in Rambouillet sheep. *Journal of animal Veterinary Advance*. 10(9): 1112-1116.

Rubio, C., Vidal, J. 2000. El bloque multi-nutricional (BMN) investigación en nutrición de rumiantes en pastoreo. INIFAP. México. pp: 1-6.

Ruíz-Rodríguez, M.J. 2005. Los bloques multinutricionales, su justificación, elaboración y respuesta animal. In: *Memorias del IV Seminario de Producción de vinos en el Trópico*. Teapa-Tabasco, México. pp: 61-68

Sadiqqi, H.A. 2011. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*. 109 (6):1483-1500.

Sagüés, M.F., Fusé, L.A., Fernández, S.A., Iglesias, L.E., Moreno, F.C., Saumell, C.A. 2011. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes in sheep. *Parasitology Research*. 109(3): 707-713

Santamaría-Colonia, N. Torres-Acosta J.F., Rodríguez-Vivas, R.L. 1995. Efecto del peso al destete sobre el parasitismo gastrointestinal de cabritos en clima tropical. *Revista Biomédica*. 6: 143-150.

SAS, Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute. Cary. North Carolina. USA. 1028.

Schalling, H.D. 2000. Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 120:63-72.

Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A., Sandoval-Castro, C., May-Martínez, M., Cob-Galera, L.A. 2004. The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. *Veterinary Parasitology*. 124: 217-238.

- Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J. 2005. Control, Prevención y erradicación de la nematodiasis gastrointestinal en rumiantes. In: Rodríguez, V.I. Cob, G.L. Enfermedades de importancia económica en mamíferos domésticos. McGraw-Hill. pp: 161-176.
- Torres-Acosta, J.F., Molento, M, Mendoza de Gives, P. 2011. Research and implementation of novel approaches for the control of nematode parasites in Latin America and the Caribbean: is there sufficient incentive for a greater extension effort? *Veterinary Parasitology*. (In Press).
- Torres-Hernández, G., González-Garduño, R. 2005. Aspectos genéticos relacionados con la resistencia de caprinos a los parásitos gastrointestinales. Memorias en XX Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Sinaloa, México. pp: 17-28.
- Valcárcel-Sancho, F., Rojo-Vázquez, F.A., Olmeda-García, A.S., Arribas-Novillo, B., Márquez-Sopeña, L.F. Pat. N. 2009. Atlas de Parasitología Ovina. 137 p. Editorial Servet. Zaragoza, España.
- Wolstenholme, A.J., Kaplan, R.M. 2011. Resistance to macrocyclic lactonas. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. (In Press).
- Zajac, A.M., Krakowka, S., Herd, R.P., McClure, K.E. 1990. Experimental *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Veterinary Parasitology*. 36: 221-235.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

La búsqueda de microorganismos que actúen como enemigos naturales de las fases libres de estos parásitos (*ngi*) ha ganado un lugar prioritario en las estrategias de control y prevención de las nematodiasis del ganado durante los últimos años (Mendoza de Gives, 2011; Baloyi *et al.*, 2011; Hoste *et al.*, 2008; Hoste *et al.*, 2011; Soto-Barrientos *et al.*, 2011). Algunas bacterias como *Pasteuria penetrans* han mostrado resultados prometedores en el control de nematodos parásitos de importancia agrícola y debido a que tanto nematodos parásitos de plantas como parásitos de animales comparten el mismo hábitat también comparten los mismos enemigos naturales quienes de alguna manera regulan sus poblaciones evitando su crecimiento poblacional desmedido (Gowen *et al.*, 2008). No obstante, la especie *Pasteuria penetrans* posee un amplio rango de nematodos a quienes se ha demostrado que parasita y afecta (Davies, 2009; Gómez *et al.*, 2010); hasta ahora no se había encontrado ningún reporte sobre su actividad contra nematodos parásitos del ganado. La bacteria *P. penetrans* posee diversas ventajas para utilizarse como agente de control biológico. Dentro de esas ventajas se encuentran la resistencia hacia el calor, la desecación y a la exposición a algunos químicos (como ejemplo los nematicidas) (Jansen *et al.*, 2011). La alteración del metabolismo y daño mecánico al cuerpo de nematodo, interfiere en la reproducción e inhibe la producción de huevos del nematodo (Mendoza de Gives *et al.*, 1999; Davies, 2009; Gómez *et al.*, 2010). Además, ha demostrado una efectividad en la regulación de poblaciones de *Meloidogyne* spp. en diversos agrosistemas (Talavera *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2007; Javed *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha presentado un problema en la producción masiva de esporas de la bacteria *P. penetrans*. El mayor impedimento para el uso de este microorganismo como producto comercial para el control de plagas agrícolas causadas por nematodos, ha sido la imposibilidad de su crecimiento en ausencia del nematodo hospedante, impidiendo su uso a gran

escala con métodos de bajos costos de producción (Bishop y Ellar, 1991). No obstante, estudios recientes han informado acerca de una técnica de vanguardia para la reproducción masiva *in vitro* de varias cepas de *Pasteuria* en fermentación líquida, utilizando un medio de cultivo que contiene tejidos viables del nematodo *Belonolaimus longicaudatus* Rau y que puede ser utilizada también para el control de especies de *Meloidogyne* spp. (Hewlett *et al.*, 2009). En otro estudio se cultivó a la bacteria *P. penetrans* sobre el nematodo fitopatógeno *M. javanica* en cultivos de tejidos de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, pero sólo se produjo una generación de endosporas. Las cutículas de las hembras infectadas no llegaron a romperse y por lo tanto las endosporas no se liberaron para iniciar el ciclo biológico de la bacteria (Verdejo y Jaffee, 1988). El método de reproducción *in vivo*, ha proporcionado cantidades de esporas suficientes para realizar los estudios de investigación y generar información del potencial que posee la bacteria *P. penetrans* como agente de control biológico, tanto en condiciones de laboratorio como en microparcels. No obstante, la búsqueda de técnicas modernas de biotecnología y específicamente las herramientas moleculares para lograr producir grandes cantidades de esporas de esta bacteria hiperparásita de nematodos, han mostrado recientemente que esta barrera puede superarse. Actualmente se han logrado obtener diferentes clones en cultivos *in vitro*, a partir de la bacteria *Pasteuria ramosa* que infecta al crustáceo planctónico del orden Cladocera, *Daphnia magna*. La especificidad de infección de la clona obtenida de la bacteria *P. ramosa* mostró un mayor número de interacciones específicas con genotipos de *D. magna* que con otros aislamientos utilizados. Las clones de *P. ramosa* cultivadas *in vitro* infectaron en menor porcentaje a *D. magna*, como perspectivas en este trabajo los autores sugieren lograr entender la evolución y dinámica del mecanismo de infección en el sistema que lo conforma la bacteria *P. ramosa* y *D. magna* (Luijckx *et al.*, 2011). Diversos estudios han sido enfocados a desarrollar un producto comercial de gran efectividad en contra de los nematodos parásitos de plantas

(Fernández y Juncosa, 2002; Hewlett *et al.*, 2011). Este tipo de investigaciones amplía las perspectivas de llegar a utilizar este organismo como un posible agente candidato de control biológico en el área agrícola y pecuaria. En el capítulo 2 de la presente tesis se presentaron detalles sobre cómo se logró obtener un aislamiento de *Pasteuria*-like que mostró cierta avidez por parasitar la cutícula de larvas infectantes y contra larvas histotrópicas del nematodo gastrointestinal *Haemonchus contortus* lo que podrá servir como un primer antecedente para futuros trabajos que sean dirigidos a dar seguimiento a este organismo con un enfoque práctico hacia el control de *H. contortus* y otros nematodos de importancia pecuaria y de salud pública. Otras bacterias han sido estudiadas como posibles agentes potenciales de control biológico de plagas agrícolas causadas por nematodos a diversos cultivos en área agrícola (Hodgkin *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2007; Soberón y Bravo, 2008), dentro de estas bacterias se encuentra *Bacillus thuringiensis* que se ha utilizado como insecticida biológico más utilizado comercialmente y tradicionalmente se ha ocupado para el control de insectos plaga en la agricultura y mosquitos vectores de enfermedades como la malaria y el dengue (Soberón y Bravo, 2008). Una característica importante de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis* es que son altamente específicas e inocuas para vertebrados y otros insectos no blanco (Tabashnik *et al.*, 2011). En el área pecuaria se ha logrado caracterizar una proteína de *B. thuringiensis* (IB-16) que ha mostrado una importante toxicidad en contra de larvas histotrópicas del nematodo parásito *H. contortus* (Hernández-Linares *et al.*, 2009). Posteriormente lograron identificar dos fracciones de la proteína con pesos de 25 y 79 KDa, por cromatografía de alta resolución (HPLC) que fueron evaluadas *in vitro*, obteniendo una reducción de las larvas histotrópicas de *H. contortus* del 67.1% y 17.3% respectivamente (Vázquez-Pineda *et al.*, 2010, 2011). Los estudios con estas fracciones bacterianas están siendo intensificados en la búsqueda de un agente potencial de control biológico de este importante parásito. Otra bacteria que infecta a nematodos es

Microbacterium nematophilum, este organismo fue encontrado casualmente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* adherida a la cutícula en la parte anterior del cuerpo de *C. elegans* (Hodgkin *et al.*, 2000). Se han identificado cinco genes (bus-1, bus-6, bus-8, bus-10, bus-12, bus-18) que se encuentran involucrados en el proceso de infección de *M. nematophilum* con *C. elegans* (Gravato-Nobre *et al.*, 2005; Gravato-Nobre y Hodgkin, 2006). Hasta ahora cuenta con muy escasa información sobre la biología y espectro de infección de esta bacteria y se desconoce si ésta posee actividad antagónica en contra de *ngi*. De manera similar otros organismos que han sido identificados como antagonistas naturales de nematodos como por ejemplo, los ácaros depredadores de nematodos han mostrado una importante actividad depredadora de nematodos fitopatógenos de importancia agrícola (Muraoka y Ishibashi, 1976; Imbriani y Mankau, 1983; Bilgrami, 1994, 1997). En la presente investigación (Capítulo 3), se encontró por primera vez evidencia de un ácaro depredador con avidez por alimentarse de larvas infectantes de *H. contortus*. Este hallazgo podría ser considerado como importante, ya que al demostrarse que estos ácaros poseen una actividad voraz contra este importante parásito, podrían llegar a ser utilizados en pruebas de campo para determinar su posible efecto potencial en la reducción de individuos de poblaciones de nematodos parásitos del ganado. Esta característica podría conferir al ácaro una categoría de agente controlador de nematodos parásitos del ganado. Una ventaja importante que presenta el ácaro *L. penicilliger* para utilizarse como agente de control biológico de parásitos es que su reproducción es muy sencilla y pueden producirse una cantidad abundante de individuos de esta población (Wallwork, 1967). Otra ventaja es que el ácaro presenta un ciclo de vida corto; además de presentar una reproducción partenogenética. Tomando en cuenta los resultados del Capítulo 3 en los que se encontró una voraz actividad de los ácaros para alimentarse de los estadios infectantes del parásito bajo estudio, se tiene planeado dar continuidad a estos estudios y llevarlos a nivel de praderas controladas para finalmente buscar la posibilidad de establecerlos a

nivel de campo. La aplicación práctica de estos organismos para el control queda aún sin ser dilucidada y es un reto. Los estudios con estos microorganismos deberán enfocarse a la evaluación de la reducción de la población de larvas infectantes de los parásitos en los potreros en donde estos estadios de vida libre de los parásitos son la fuente directa de contaminación. Trabajos preliminares sobre la reducción de la población de larvas en estiércol del ganado y en la vegetación que rodea a las heces en el pasto deberán ser considerados cruciales para poder traspolar la información a nivel de pruebas de campo. El uso del ácaro nematófago *L. penicilliger* podría aplicarse en praderas en donde se encuentren las larvas infectantes de nematodos parásitos y estas a su vez podrían ser depredadas y consumidas por los ácaros, disminuyendo su población y actuando como un agente descontaminante de la pradera. Considerando las características biológicas que ha mostrado en la presente investigación el ácaro *L. penicilliger* se propone para futuros trabajos el estudio de la aplicación práctica de este organismo sobre la población parasitaria a nivel del pastizal. Otros antagonistas naturales de nematodos han sido reportados con actividad en contra de nematodos, por ejemplo los nematodos depredadores como una cepa del género *Butlerius* sp. que fue aislada del poblado de Tres Marías, Municipio de Huitzilac, del Estado de Morelos, y ha sido evaluado por el método de coprocultivo *in vitro* en contra de larvas infectantes de *H. contortus*, obteniendo una reducción de la población de larvas en un 82% (Vázquez de Jesús, 2009). Otro organismo es la ameba *Theratromyxa weberi* (Protozoa: Vampyrellidae) que se han cultivado en el nematodo *Aphelenchoides rutgersi* en donde han observaron por microscopia electrónica de barrido y de transmisión, el contacto entre ambos organismos. Los resultados por microscopia de transmisión mostraron que la *T. weberi* utiliza el protoplasma multinucleado para envolver a su presa en un tiempo de 3 h. Los resultados por microscopía electrónica de barrido, revelaron a los trofozoítos unidos al protoplasma y posteriormente hubo contacto y envolvimiento de las larvas de nematodos por *T. weberi* (Sayre y

Wergin, 1989). Otros organismos son los tardígrados. El género *Hypsibius myrops* du BoisReymond Marcus, 1944, ha sido reportado como un antagonista natural de los nematodos parásitos de plantas *Meloidogyne incognita* y *Ditylenchus dipsaci*, también del nematodo del nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* (Sayre, 1969). También se encuentran los hongos que infectan a los nematodos como *Clonostachys rosea*, que habita en el suelo y produce esporas o conidios de resistencia y son adhesivos. Este hongo ha sido evaluado *in vitro*, y los resultados que obtuvieron en la reducción de la población de los diferentes nematodos utilizados en la confrontación fue para *Rhabditis* sp. 71.9%, *C. elegans* 94.7%, *P. redivivus* 92.7%, *H. contortus* 87.7% y *Butlerius* sp. 100% (Rodríguez-Martínez, 2011). El hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* este hongo posee la capacidad de transformar sus micelios en trampas, para capturar y destruir nematodos, este método ecológico fue diseñado por el hombre para disminuir las poblaciones de parásitos o plagas a densidades subclínicas aceptables o mantener esas poblaciones a niveles no dañinos usando antagonistas vivos. Este método nos ofrece una estrategia eficiente y segura para la reducción de poblaciones de nematodos, tanto de plantas como de animales (Mendoza de Gives, 2011). Los resultados de la presente investigación conducen a concluir que la bacteria *Pasteuria-like* y el ácaro nematófago *L. penicilliger* poseen potencial para ser utilizados como agentes de control biológico de la hemoncosis ovina. Sin embargo; es necesario evaluar su posible aplicación práctica, en pruebas controladas y en trabajos de campo. Se debe considerar que el uso de esta alternativa de control nos ofrece la ventaja de no generar resistencia, a diferencia del control químico. Los antagonistas o enemigos vivos naturales de nematodos no pueden considerarse como suficientes para controlar las parasitosis por nematodos, hay que diseñar un programa integrado de control en el que se utilicen diversas herramientas de manera que el problema pueda atacarse con diferentes estrategias.

8.1. LITERATURA CITADA

- Baloyi, M.A., Laing, M.D., Yobo, K.S. 2011. Use of mixed cultures of biocontrol agents to control sheep nematodes. *Veterinary Parasitology*. (In Press).
- Bilgrami, A.L. 1994. Predatory behavior of a nematode feeding mite *Tyrophagus putrescentiae* (Sarcoptiformes: Acaridae). *Fundamental and Applied Nematology* . 17(4):293-297.
- Bilgrami, A.I. 1997. Evaluation of the predation abilities of the mite *Hypoaspis calcuttaensis* predaceous on plant and soil nematodes. *Fundamental and Applied Nematology*. 20(1): 96-98.
- Bishop, A. H. and Ellar, D. J., 1991. Attempts to culture *Pasteuria penetrans in vitro*. *Biocontrol Science and Technology* 1: 101-114.
- Carneiro, R.M.D.G., De Mesquita-Luiz, F.G., Cirotto, P.A.S., Mota, F.C., Almeida, M.R.A., Cordeiro, M.C. 2007. El effect of Sandy soil, bacterium dose and time on the efficacy of *Pasteuria penetrans* to control *Meloidogyne incognita* race 1 on coffe. *Nematology*. 9: 845-549.
- Davies, K.G. 2009. Understanding the interaction between an obligate hyperparasitic bacterium. *Pasteuria penetrans* and its obligate plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne* spp. *In: Advances in Parasitology. Plant Pathology and Microbiology*, Rothamsted Research, Harpenden, United Kingdom. Elsevier. Ltd. pp: 211-245
- Fernández, C., Juncosa, R. 2002. Biopesticidas: ¿La agricultura del futuro? *Phytoma*. 141:14-19.
- Gómez L, Gandarilla H, Rodríguez MG. 2010. The identification of *Pasteuria penetrans* como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. *Revista de Protección Vegetal*. 25: 137-149.

- Gowen, S., Davies, K.G., Pembroke, B. 2008. Potential use of *Pasteuria* spp. In the management of plant parasitic nematodes. Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. Ciancio A, Mukerji GK. Eds. Springer. pp: 205-219.
- Gravato-Nobre, M.J., Nicholas, H.R., Nijland, R., O'Rourke, D., Whittington, D.E., Yook, K.J., Hodgkin, J. 2005. Multiple genes affect sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to the bacterial pathogen *Microbacterium nematophilum*. *Genetics*. 171(3): 1033-1045.
- Gravato-Nobre, M.J., Hodgkin, J. 2006. *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. *Cellular Microbiology*. 7(6): 741-751.
- Hernández-Linares, I., López-Arellano, ME., Mendoza de Gives, P., Liébano-Hernández, E., Bravo de la Parra, A. 2009. Identificación y clonación del gen de la toxina IB-16 de *Bacillus thuringiensis* responsable del efecto nematicida en *Haemonchus contortus*. Memorias en el XVIII Congreso Nacional de Parasitología. Aguascalientes, México. p 129.
- Hewlett, T., Stetina, S., Schmidt, L., Waters, J., Lee, S., Rich, J. 2009. Identification of *Pasteuria* spp. That parasitizes *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology*. 41(4): 338.
- Hewlett, T.E., Schmidt, L.M., Waters, J., Barmore, C., Marshall, C. 2011. Preparation for commercial production of *Pasteuria* spp. Control root-knot nematode. Bioscience, Inc. 12085 Research Drive, Suite 185, Alachua, FL. 32615. pp: 881-882.
- Hodgkin, J., Kuwabara, P.E., Corneliussen, B. 2000. A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*. *Current Biology*. 10: 1615-1618.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J. 2008. Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasite Immunology*. 30(2):79-88.

- Hoste, H., Sotiraki, S., Torres-Acosta JFJ. 2011. Control of endoparasitic nematode infections in goats. *Veterinary Clinic North America Food Animal Practice*. 27(1): 163-73.
- Imbriani, J.L., Mankau, R. 1983. Studies on *Lasioseius scapulatus*, a mesostigmatid mite predaceous on nematodes. *Journal of Nematology* 15(4): 523-528.
- Jansen, M., Stoks, R., Coors, A., Van-Doorslaer, W, De-Meester, L. 2011. Collateral damage: rapid exposure-induced evolution of pesticide resistance leads to increased susceptibility to parasites. *Evolution*. 65(9): 2681-2691.
- Javed, N., El-Hassan, S., Gowen, S., Pemproke, B., Inam-ul-Haq, M. 2008. The potential of combining *Pasteuria penetrans* and neem (*Azadirachta indica*) formulations as a management system for root-knot nematodes on tomato. *European Journal of Plant Pathology*. 120: 53-60
- Luijckx, P., Ben-Ami, F., Mouton, L., Du-Pasquier, L., Ebert, D. 2011. Cloning of the unculturable parasite *Pasteuria ramosa* and its *Daphnia* host reveals extreme genotype-genotype interactions. *Ecology Letter*. 4(2): 125-31.
- Mendoza de Gives, P., Davies, K.G., Morgan, M., Behnke, J.M. 1999. Attachment test of *Pasteuria penetrans* to the cuticle of plant and animal parasitic nematodes, free living nematodes and *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Helminthology*. 73: 67-71.
- Mendoza de Gives, P. 2011. Hongos que capturan, matan y se alimentan de nematodos parásitos del ganado. In: "Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos". Quiroz Romero H, Figueroa Castillo A, Ibarra Velarde F, López Arellano ME. 1 (Eds.) Ciudad de México, DF. pp: 345-352.

- Muraoka, M., Ishibashi, N. 1976. Nematode mites and their feeding behaviour. *Appl. Ent.Zool.* (1):1-7.
- Rodríguez-Martínez, R. 2011. Evaluación de la actividad *in vitro*, del hongo nematófago *Clonostachys rosea* contra cinco diferentes nematodos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México, México. pp: 1-54.
- Sayre, R.M. 1969. A method for culturing a predaceous tardigrade on the nematode *Panagrellus redivivus*. *Transactions of the American Microscopical Society.* 88(2): 266-274.
- Sayre, R.M., Wergin, W. 1989. Morphology and fine structure of the trophozoites of *Theratromyxa weberi* (Protozoa: Vampyrellidae) predacious on soil nematodes *Canadian Journal of Microbiology.* 35(5):589-602.
- Soberón, M., Bravo de la Parra, A. 2008. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario.pp: 303-313.
- Soto-Barrientos, N., De Oliveira, J., Vega-Obando, R., Montero-Caballero, D., Vargas, B., Hernández-Gamboa, J., Orozco-Solano, C. 2011. *In-vitro* predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes. *Revista de Biología Tropical.* 59.1:37-52.
- Tabashnik, B.E., Huang, F., Ghimire, M.N., Leonard, B.R., Siegfried, B.D., Rangasamy, M., Yang, Y., Wu, Y., Gahan, L.J., Heckel, D.G., Bravo, A., Soberón, M. 2011. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biotechnology.* (In Press).

- Talavera, M., Itou, K., Mizukubo, T. 2002. Combined application of *Glomus* sp. and *Pasteuria penetrans* for reducing *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) populations and improving tomato growth. *Applied Entomology Zoological*. 37: 61-67
- Tian, B., Yang, J., Zhang, K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanism of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*. 61: 197-213.
- Vázquez de Jesús, E. 2009. Evaluación de Cuatro Métodos de Cultivo *in vitro* para la Reproducción de Nematodos Depredadores para el Control de Nematodos Parásitos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.pp: 1-32.
- Vázquez-Pineda, A., Yáñez-Pérez, G.N., López-Arellano, M.E., Mendoza de Gives, P., Liébano-Hernández, E., Bravo de la Parra, A. 2010. Biochemical characterization of two purified proteins of the IB-16 *Bacillus thuringiensis* strains and their toxicity against the sheep nematode *Haemonchus contortus* *in vitro*. *Transboundary and Emerging Diseases*. 1(2): 111-114.
- Vázquez-Pineda, A., Bravo-de-la-Parra, A., Mendoza-de-Gives, P., Liébano-Hernández, E., Hernández-Linares, I., Yáñez-Pérez, N., Aguilar-Marcelino, L., Ramírez-Vargas, G., Hernández-Castro, E., Gutiérrez-Segura, I., López-Arellano, M.E. 2011. Uso de Productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en Nematodos de Importancia Veterinaria. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 3(1): 77-88.
- Verdejo, S., Jaffee, B.A. 1988. Reproduction of *Pasteuria penetrans* in a tissue-culture system containing *Meloidogyne javanica* and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots. *Phytopathology*. 78: 284-286.

Wallwork, J.A. 1967. Acari. In "Soil Biology", (Eds.). By Burges, A. and F. Raweds, Academic Press London, England. pp: 363-395.

IX. CONCLUSIONES GENERALES

- I. La bacteria *Pasteuria/Pasteuria-like* posee la capacidad de adosamiento *in vitro* a la cutícula de diferentes estadios evolutivos de *Haemonchus contortus* y al nematodo de vida libre *Rhabditis* sp. y a los nematodos *Meloidogyne arenaria*, *M. javanica* y *M. incognita*.
- II. La identificación molecular de la bacteria *Pasteuria (Pasteuria-like)* muestra un 94% de similitud con la bacteria *Comamonas aquatica*.
- III. El ácaro *Lasioseius penicilliger* muestra diferentes porcentajes de reducción de la población de los nematodos *H. contortus* (L₃), *P. redivivus* y *Rhabditis* sp. presentando mayor actividad depredadora contra el nematodo *Rhabditis* sp.
- IV. El nematodo depredador *Butlerius* sp. posee actividad depredadora *in vitro* sobre los nematodos *H. contortus* (L₃), *P. redivivus* y *Rhabditis* sp.; existiendo una clara predilección por *H. contortus* y en menor grado sobre *P. redivivus* y *Rhabditis* sp. selección de presa. El nematodo *Butlerius* sp. mostró una elevada tasa de reproducción al cultivarse en presencia de los distintos nematodos presa. El incremento poblacional de este nematodo osciló en un rango entre 80 y 263 veces.
- V. La suplementación con comprimidos multinutricionales conteniendo clamidosporas del hongo *Duddingtonia flagrans* (cepa mexicana: FTOH-8) a dosis de 2×10^6 clamidosporas a los ovinos de la raza Santa Cruz reduce la población de larvas de *Haemonchus contortus* (L₃). Respecto a la ganancia de peso diaria fue muy similar en los dos grupos de ovinos alimentados con concentrado comercial y suplementado con los comprimidos multinutricionales. Este resultado conduce a concluir que el aporte nutricional de los

comprimidos conteniendo clamidosporas del hongo *D. flagrans* es tan eficiente como un alimento comercial; además de fungir como un excelente vehículo para suministrar los hongos nematófagos.