

1951
REV.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“EVALUACION DE LA CAPACIDAD ATRAPADORA
in vitro DE *Arthrobotrys robusta* Y *Monacrosporium*
gephyropagum SOBRE LARVAS INFECTANTES (L3)
DE *Strongyloides papillosus*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

MA. ESTHER CRUZ GONZALEZ

Asesores: MVZ. M. en C. Pedro Mendoza de Gives
MVZ. M. C. M. Héctor Quiroz Romero

Octubre de 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MATERIAL Y METODOS.....	15
RESULTADOS	20
DISCUSION	22
LITERATURA CITADA.....	26

CUADROS

Página

- 1.- Preparación de muestras fungales para inóculos de las placas experimentales..... 35
- 2.- Establecimiento de las series experimentales... 36
- 3.- Actividad atrapadora de *Monacrosporium* *gephyropagum* y *Arthrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* in vitro a 25 C..... 37
- 4.- Número y porcentaje de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* atrapadas por *Monacrosporium* *gephyropagum* después de siete días de interacción en placas con harina de maíz agar (Serie 1)..... 38
- 5.- Número y porcentaje de larvas infectantede *Strongyloides papillosus* atrapadas por *Arthrobotrys robusta* después de siete días de interacción en placas con harina de maíz agar (Serie 2)..... 39
- 6.- Número y porcentaje de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* con y sin movimiento en placas con harina de maíz agar (Serie 3).... 40

- 1.-Fotografía tomada al microscópio electrónico de rastréo, mostrando el desarrollo de ramas adhesivas de *Monacrosporium gephyropagum*, que emergen de las hifas del hongo en harina de maíz agar (480 X)....41
- 2.-Fotografía tomada al microscopio compuesto, mostrando el desarrollo de *Monacrosporium gephyropagum* en una placa de harina de maíz agar, a) Ramas adhesivas de dos y tres células producidas en forma continua y equidistante a lo largo de las hifas, b) Un conidio desprendido del conidióforo. (75 X).....42
- 3 y 4.- Fotografías tomadas al microscópio electrónico de rastréo, mostrando una larva de *Strongyloides papillosus* atrapada por las ramas adhesivas de *Monacrosporium gephyropagum* en una placa de harina de maíz agar. (540 X y 940X, respectivamente).....43
- 5.- Fotografía tomada al microscópio compuesto, mostrando dos racimos de conidios de *Arthrobotrys robusta* en harina de maíz agar (25X).....44
- 6 y 7. Fotografías tomadas al microscópio electrónico de rastréo, mostrando el desarrollo de anillos tridimensionales adhesivos de *Arthrobotrys robusta*. (2,000X y 1,300X, respectivamente).....45
- 8 a 11. Fotografías tomadas al microscópio electrónico de rastréo, mostrando una larva infectante de *Strongyloides papillosus* capturada por *Arthrobotrys robusta* en harina de maíz agar. Fotos 8 y 9, larva atrapada por un anillo de captura (540X y 2200X, respectivamente). Fotos 10 y 11, aspecto de una larva destruida por el hongo, algunos filamentos hifales emergen del interior del nematodo (940X y 1200X, respectivamente).....46

RESUMEN

Cruz Gonzalez Ma. Esther: Evaluación de la capacidad atrapadora *in vitro* de *Arthrobotrys robusta* y *Monacrosporium gephyropagum* sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*. Bajo la Dirección de: Pedro Mendoza de Gives y Hector Quiroz Romero.

En este trabajo se evaluó la capacidad atrapadora *in vitro* de *A. robusta* y *M. gephyropagum* sobre larvas infectantes de *S. papillosus*. Se formaron 2 series de 10 cajas de Petri cada una, las series 1 y 2 contenían un cultivo de *M. gephyropagum* y de *A. robusta* en harina de maíz y agar respectivamente. Una tercera serie de cajas de Petri, conteniendo únicamente el mismo medio de cultivo con 20 repeticiones, fungió como testigo sin agregar hongos. Se adicionaron aproximadamente 100 larvas de *S. papillosus* en cada caja y se incubaron a 25 C durante siete días, se revisó la superficie de los cultivos con un microscopio compuesto, se cuantificó el total de larvas y se llevó un registro del número de larvas libres y atrapadas por los hongos. Se obtuvo un 94.26% (± 6.19) de larvas atrapadas de *S. papillosus* por *M. gephyropagum* y 35.98% (± 21.39) de larvas atrapadas por *A. robusta*. En las series testigo se recuperaron con actividad 87.20% (± 19.5) de larvas de *S. papillosus*. *Monacrosporium gephyropagum* mostró una excelente capacidad atrapadora sobre larvas infectantes de *S.*

papillosus a 25 C. A esta misma temperatura *Arthrobotrys robusta* mostró una baja capacidad atrapadora *in vitro* sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*. *Monacrosporium gephyropagum* será considerado en futuras pruebas de campo para evaluar un posible efecto de reducción del número de larvas de *S. papillosus* y otros nematodos parásitos de rumiantes en parcelas experimentales.

INTRODUCCION

Las enfermedades parasitarias en ruminantes causan pérdidas económicas de gran magnitud en la producción ovina nacional (5, 54).

Dentro del grupo de nematodos causales de las verminosis gastroentéricas en ovinos en México, se encuentra *Strongyloides papillosus*, considerado como uno de los responsables de pérdidas cuantiosas, especialmente en áreas tropicales (46). Este parásito afecta sobre todo a ruminantes jóvenes (30, 33, 49), aunque también se presenta en adultos (3). Dentro del cuadro clínico provocado por este nematodo se puede presentar: enteritis catarral, diarrea, claudicación, retardo en el crecimiento y en casos agudos: Disentería, anemia moderada, emaciación y por último la muerte (46, 49).

No existe algún trabajo que haya determinado con precisión las pérdidas económicas causadas por la *Strongyloidosis* en el país. Sin embargo, *Strongyloides papillosus* se encuentra con frecuencia en áreas subtropicales (54) y dadas sus características de patogenicidad principalmente en corderos, provoca un impacto económico considerable para la producción ovina nacional. El uso indiscriminado de sustancias químicas antihelmínticas en el ganado para controlar esta y otras parasitosis del ganado, implican un peligro que merece ser analizado pues contribuye

en parte al deterioro del medio ambiente , además de contaminar los tejidos de los animales y del hombre (7).

PRESENTACION DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

Las nematodosis se han tratado de combatir mediante muchos métodos, yendo desde prácticas comunes de manejo de potreros, hasta la aplicación sistemática o estratégica de productos químicos antihelmínticos en el ganado, que es la forma más usual de control de estas parasitosis. Los estudios hasta ahora realizados con hongos destructores de nematodos prevén un panorama muy promisorio en cuanto a un posible método de control biológico de las nematodosis del ganado, sin embargo aún falta mucho por conocer. Actualmente se cuenta con poca información acerca de la actividad nematófaga *in vitro* de los géneros *Arthrobotrys* y *Monacrosporium* sobre Tricostrongílidos, de rumiantes. En el presente estudio se investigó la capacidad atrapadora de los hongos depredadores *A. robusta* y *M. gephyropagum* sobre larvas infectantes del nematodo de rumiantes *S. papillosus in vitro* a 25 C.

El suelo es un hábitat donde se presenta una vida microscópica muy compleja constituida por insectos, bacterias, virus, ácaros, protozoarios, nematodos y una extensa variedad de hongos de diversos grupos taxonómicos que se relacionan entre sí (45), estableciéndose asociaciones depredadoras, parasíticas y simbióticas (26). En las primeras se encuentra

la relación que establecen ciertos hongos nematófagos con sus presas. Los nematodos comúnmente atacados por estos hongos son cosmopolitas y constituyen los organismos más abundantes de la microfauna del suelo. Son animales microscópicos, la mayoría de vida libre, que se alimentan por la ingestión de bacterias y esporas e hifas de hongos, aunque también hay parásitos de plantas y animales (1).

Los hongos nematófagos son microorganismos que capturan, matan y consumen nematodos y viven en el suelo, hojarasca, madera podrida, estiércol de diversos animales y restos vegetales en descomposición (8,14,18,24). Estos hongos pertenecen a diversos grupos taxonómicos, incluyendo Chytridiomycetes, Oomycetes, Zygomycetes, Deuteromycetes, Basidiomycetes e Hyphomycetes (1,23); presentan una serie de características morfológicas y fisiológicas particulares para adaptarse a una existencia nematófaga. La primera publicación sobre hongos atrapadores de nematodos fue hecha por Fresenius en 1852 citado por Barron (1), quien al estudiar hongos sobre detritus orgánicos centró su atención en un hongo de conidióforos erectos dispersos sobre la superficie del sustrato, y una gran cantidad de conidios de dos células en racimos, dándole el nombre de *Arthrobotrys oligospora*. En 1874, Lohde citado por Pandey (41), describió al endoparásito *Harposporium anguillulae*. En 1870, Woronin citado por Grönvold et al. (18), observó que el micelio de A.

oligospora sufría unas deformaciones, curvándose y fusionándose entre sí, dando como resultado una serie de anillos hifales, sin poder establecer su función. Hasta 1888, cuando Zopf citado por Grønbold et al. (18), encontró atrapados en estas estructuras nematodos de vida libre que eran penetrados, destruidos y consumidos por el hongo, aunque consideró incidental la captura de los nematodos. Drechsler (12), encontró que las trampas que formaban los anillos hifales secretaban una sustancia adhesiva que participa en la sujeción de los nematodos.

Otras observaciones interesantes que se han hecho, acerca de estos hongos son el descubrimiento de una sustancia extraída de nematodos que induce a la formación de trampas en *A. conoides* conocida con el nombre de "Nemina" (43); o la secreción de una nematotoxina producida por *A. oligospora* que paraliza los nematodos que posteriormente son consumidos por el hongo (40, 41). Así mismo se comprobó la presencia de una sustancia que atrae a los nematodos para facilitar su captura (34).

A partir de los trabajos de Zopf en 1888, un gran número de hongos nematófagos se han identificado, actualmente se conocen más de 150 especies diferentes (18). El comportamiento capturador de nematodos de muchos de ellos se evalúa sobre todo utilizando nematodos de vida libre o

parásitos de animales; aún se desconocen muchos aspectos de su actividad contra nematodos parásitos de animales.

Para su estudio los hongos nematófagos pueden ser divididos en dos grandes grupos: hongos atrapadores de nematodos y hongos endozoicos o endoparásitos de nematodos. Los hongos atrapadores de nematodos desarrollan órganos especializados para capturar nematodos, pueden actuar mediante cuatro diferentes mecanismos (según del género y especie que se trate): Redes adhesivas de anillos tridimensionales, anillos simples (no constrictores), anillos constreñibles, ramas adhesivas y botones adhesivos. Estos hongos desarrollan un micelio extenso que forma redes y botones que pueden estar cubiertos por una sustancia pegajosa generalmente secretada al contacto con el nematodo; por último el hongo penetra la cutícula del mismo, invadiéndolo y alimentándose de él (1, 10, 26, 52). En un estudio realizado por Veenhuis et al en 1985 (55), acerca de los órganos de captura de *A. oligospora* sobre el nematodo *Panagrellus redivivus*, se observó que el nematodo era atrapado en una malla, formándose en seguida unos tubos de penetración que inician el proceso de destrucción del nematodo.

Los hongos endozoicos actúan mediante conidios adhesivos que se pegan a la cutícula para posteriormente romperla e invadirla y destruir al nematodo, o mediante esporas pequeñas que son deglutidas y alojadas en el intestino, donde estas se

desarrollan destruyéndolo y alimentándose de él (1). Dentro del grupo de hongos atrapadores de nematodos destacan algunos géneros con alta capacidad atrapadora como *Arthrobotrys*, *Dactylella* y *Monacrosporium* (28).

El género *Arthrobotrys* spp pertenece al grupo de los Hyphomycetes, hongos cuyos conidios se reproducen en conidióforos que no se encuentran en el cuerpo fructífero (53, 47). En cultivo puro en harina de maíz agar las colonias de *Arthrobotrys* aparecen expandidas, translúcidas, de color blanquecino a rosa pálido. El micelio se compone de hifas hialinas delgadas, de pared lisa, septadas y ramificadas. Los conidióforos son lisos, septados y rara vez ramificados; suelen ser erectos, pero algunas veces son geniculados o articulados. El ápice de los conidióforos maduros termina típicamente en una pequeña protuberancia corta que es la marca conidial o espiga, que representa el punto de crecimiento donde nace el conidio. Algunas veces se renueva el crecimiento del conidióforo después de la formación de la primera cabeza del conidio y una segunda cabeza es formada a alguna distancia cerca de la primera; el proceso puede repetirse y llegar a la producción de varias protuberancias semejantes a lo largo del conidióforo. Los conidios distintamente blastógenos se elevan como inflados fuera del extremo del conidióforo, su forma es de abovada a oblongo elipsoidal algunas veces levemente curvado, septado, de pared lisa, hialina, redondeada, cuya

célula proximal aparece abocónica con una base truncada (47). Dentro de este género destacan las especies de *A. conoides* y *A. oligospora*, debido a que en diversas pruebas de laboratorio han demostrado alta capacidad atrapadora (11, 12, 26). El hongo nematófago más estudiado hasta hoy es *A. oligospora* (17); se le encuentra fácilmente en materia vegetal en descomposición, así como en heces de muchos animales domésticos (26, 45). En México se notificó por primera vez la presencia de este hongo en el suelo de campos agrícolas y de un invernadero (26).

A. robusta fue descrita por Duddington en 1951 (13). Sus colonias en harina de maíz agar son hialinas y blancas. Sus conidióforos se elevan del sustrato o de las hifas aéreas fasciculadas no ramificadas. En cada conidióforo pueden formarse de 5 a 15 racimos de conidios en la punta, seguido de un alargamiento de conidióforos con la producción sucesiva de racimos adicionales de conidios. Los conidios son obovoides a piriformes, más anchos y largos en la célula apical y presentan una constricción en el septum (12). En harina de maíz agar en presencia de nematodos algunas hifas se diferencian en anillos que originan un sistema de redes tridimensionales cubiertos por una sustancia adhesiva por medio de los cuales el hongo captura al nematodo (26). La formación de anillos por lo regular requiere de la presencia de nematodos vivos como un estímulo para que las hifas se

diferencien en anillos de captura (38). El género *Monacrosporium*, descrito por Oudemans et al. en 1885 citado por Domsch, (11) posee coniodióforos erectos con un único conidio terminal multiseptado. *Monacrosporium gephyropagum* es una especie productora de ramas adhesivas uniformes en tamaño y forma, con frecuencia aparece a intervalos regulares de distancia a lo largo de la hifa para formar una serie de columnas cortas que se fusionan con otras o con la punta de la rama, lo que da como resultado una red escalariforme. Cuando la larva entra en contacto con estas ramas se secreta un material adhesivo con el cuál es atrapada (10).

Los nematodos que viven en el suelo se dividen en nematodos fitoparásitos, nematodos de vida libre, nematodos depredadores de otros nematodos y nematodos parásitos de animales. Los nematodos fitoparásitos se nutren de diferentes tejidos vegetales, los nematodos de vida libre se alimentan sobre todo de bacterias y esporas, otros nematodos tienen como principal fuente alimenticia a otros nematodos que son presas de ellos. Por último, están los nematodos parásitos de animales cuyas primeras fases evolutivas están en el suelo, donde se alimentan de bacterias y restos vegetales, después que la larva infectante es ingerida por su hospedero susceptible, penetra la mucosa gástrica para evolucionar hasta el siguiente estado de desarrollo. En el caso de *S.*

papillosus, su ciclo evolutivo es muy complejo. Se reproduce por partenogénesis. Las hembras viven en el interior de la mucosa intestinal produciendo huevos larvados que salen al exterior con la materia fecal, eclosionando como larva (L1); ésta puede generar larvas infectantes o larvas de vida libre por varias generaciones (16, 39). Las larvas que por la piel llegan a los capilares son arrastradas por el torrente sanguíneo hacia el corazón y los pulmones, pasando a los alveolos y continuando su migración hacia la tráquea, el esófago, el estómago y por último a la mucosa intestinal, donde alcanzan la madurez sexual. Hay una muda más para llegar a desarrollar una hembra partenogenética. Las larvas que se ingieren por vía oral llegan al intestino sin realizar la migración. Los animales jóvenes son infectados con la leche (3, 16 y 25), las hembras partenogenéticas, pueden estar presentes desde la primera semana posnacimiento: causan dermatitis, hemorragias pulmonares, enteritis, diarrea y anemia moderada. También pueden presentarse cojeras y necrosis de las patas. Los animales jóvenes son más susceptibles a infecciones graves (3).

La Estrongiloidosis y otras enfermedades parasitarias por nematodos se combaten de diversas maneras. Uno de los métodos comunmente usado por los productores es el tratamiento periódico de los animales mediante la administración de

antihelmínticos que si bien ayudan a reducir la carga parasitaria en el ganado, implica un gasto importante en el costo de producción, además de la inminente presentación de resistencia en los parásitos (7, 46, 50). Otro método propuesto es la combinación de dos o más métodos de control simultáneamente por ejemplo; la rotación de potreros conjuntamente con el empleo de algún antihelmíntico (46). También se recomienda el uso de sustitutos de leche en corderos para evitar las infecciones teniendo como desventaja su alto costo (36).

El antagonismo de hongo a nematodo se ha estudiado ampliamente en una gran diversidad de hongos nematófagos con nematodos fitoparásitos y de vida libre en pruebas de laboratorio y suelos cultivables (1, 38). Asimismo, se ha estudiado la actividad de estos hongos sobre parásitos de rumiantes. En un experimento realizado por Roubaud and Deschiens, 1941 (48) quienes dispersaron los hongos *Arthrobotrys oligospora*, *Dactylella bembicoides* y *Dactylaria ellipsopora* sobre pasto, se logró disminuir la carga parasitaria por *Strongyloides papillosus* y *Bunostomum* spp en borregos en pastoreo. Pandey, en 1973 (41), demostró *in vitro* con *Monacrosporium cyanopaga* un 100% de eficacia en la captura de larvas infectantes de *Trichostrongylus axei* y *Ostertagia ostertagi* y de un 50% con las especies *Monacrosporium*

bembicoides y *M. ellipsospora*. Grønvoid et al, en 1985 (18), obtuvieron en un trabajo *in vitro* con *A. oligospora* un 100% de eficacia de captura de larvas infectantes de *Cooperia* spp en harina de maíz agar. Grønvoid et al, en 1987 (19), lograron reducir en diez veces el número de larvas infectantes de *Cooperia oncophora* en heces de vaca y en el pasto que rodea a éstas, mediante biopreparados de micelio de *A. oligospora*. Grønvoid et al en 1989 (20), redujeron el 42% de las larvas infectantes de *Ostertagia ostertagi*, en heces de borrego y en 50 a 71% el número de larvas en pasto. Dos meses después de pastorear los animales en praderas adicionadas con micelio de *A. oligospora*, obtuvieron un promedio de 37% menos de carga parasítica con respecto a un lote testigo . En 1986 (45) Pryadko et al, utilizando los hongos *A. artrobotryoides* y *A. flagras*, redujerón considerablemente el número de larvas de nematodos gastroentéricos y pulmonares en heces de borrego administrándolas como biopreparados orales. En ese mismo año Nansen et al (35), compararon la actividad de *A. oligospora* sobre larvas preparásiticas de *Cooperia oncophora* y nematodos del suelo, observando que estas eran rápidamente capturadas, inmovilizadas y muertas por el hongo. *Arthrobotrys robusta* se ha usado para el control de parásitos de importancia en parasitología agrícola. En pruebas en charola *A. robusta* ha mostrado extraordinarios resultados en el control de la lombriz del chicharo, logrando incrementar la productividad

hasta nueve veces (21). Cayrol et al en 1978 (8), desarrollaron un preparado comercial a base de un aislamiento de *A. robusta* y *M. doedycoides*, para proteger cultivos de champiñones del ataque de los nematodos *Aphelenchus avenae*, *Aphelencoides bicaudatus* y *A. composticola*, lo que redujo considerablemente las poblaciones de estos en los cultivos. Dicho producto esta disponible en el mercado bajo el nombre comercial de Royal "300". (Laboratorio "Royal Champignons").

Otras especies del género *Monacrosporium* han mostrado resultados muy promisorios en el control de nematodos de importancia en parasitología agrícola, como *M. ellipsosporum* que redujo la infección a la raíz del tomate causada por estados juveniles de *Meloidogyne incognita* (17, 29) Y *M. doedycoides*, que mostró alta actividad nematófaga en contra de nematodos miceliófagos y que con *A. robusta* (cepa Antipolis), se consideran agentes de lucha biológica (8).

JUSTIFICACION

Se desconoce la actividad atrapadora de *Arthrobotrys robusta* y de *Monacrosporium gephyropagum* contra larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* *in vitro*. Tomando en cuenta la repercusión económica de las Estrongiloidosis en la ovinocultura nacional, así como la inducción de resistencia en los parásitos a los antihelmínticos por el uso indiscriminado de éstos, es necesario buscar nuevas alternativas en el control de las parasitosis causadas por nematodos al ganado. Los hongos nematófagos pueden convertirse en una herramienta útil en el control de las parasitosis por nematodos. Sin embargo para llegar a proponer a un hongo nematófago como posible controlador biológico de nematodos de rumiantes a nivel de campo, primero es necesario conocer su capacidad depredadora bajo condiciones de laboratorio. La información generada en estas pruebas servirá de base para diseñar experimentos de campo que permitan conocer el potencial de éste método de control biológico de nematodosis gastroentéricas de rumiantes.

HIPOTESIS

Los hongos *Arthrobotrys robusta* y *Monacrosporium gephyropagum* atrapan entre 90 y 100% de las larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* in vitro.

OBJETIVOS

Cuantificar la actividad atrapadora de los hongos nematófagos *Arthrobotrys robusta* y *Monacrosporium gephyropagum* sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* en cultivos en harina de maíz agar a 25 C.

Comparar la actividad atrapadora in vitro de *Arthrobotrys robusta* y *Monacrosporium gephyropagum* sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*.

MATERIAL Y METODOS

A) HONGOS

Para este experimento se utilizaron 2 cepas de hongos nematófagos, una de *Arthrobotrys robusta* y otra de *Monacrosporium gephyropagum*, proporcionadas por el Dr. Reynold Mankau investigador del departamento de Nematología de la Universidad de California, Riverside, ambos hongos fueron mantenidos mediante la transferencia periódica de conidios a cajas Petri con harina de maíz agar (32).

B) PREPARACION DE MUESTRAS FUNGALES PARA INOCULOS DE PLACAS EXPERIMENTALES

Los dos hongos en estudio se cultivaron de manera individual durante 2 semanas a 25 C en cajas Petri de vidrio de 10 cm de diámetro con una capa de harina de maíz agar de 1 cm de espesor (Cuadro 1). Transcurrido éste período se prepararon 40 cajas Petri de plástico estériles de 3.5 cm de diámetro con una capa de maíz agar de 1 cm. de espesor, dividiéndolas en 3 series. Las series 1, y 2, contenían cada una 10 cajas Petri, mientras que la serie 3, contenía 20 cajas. Con un sacabocado cilíndrico de 1 cm de diámetro se tomaron muestras del cultivo del hongo *M. gephyropagum* y se depositó una muestra del cultivo por cada caja Petri de la serie 1, incubándolas a 25 C durante 14 días (42). Siete días después, se realizó la transferencia de *Arthrobotrys robusta*

en las cajas de la serie 2, de la misma forma, incubando a 25 C durante 7 días (27, 41). Todo el proceso se efectuó en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad (Cuadro 2).

C) ESTIMACION DEL PROMEDIO DE CONIDIOS EN MUESTRAS PARA INOCULO FUNGAL.

Adicionalmente una serie de muestras tomadas con el sacabocados de los cultivos de cada hongo fueron tomadas en forma aleatoria y se depositaron individualmente en tubos de plástico estériles de centrifuga de 10 ml, adicionando agua destilada estéril hasta aforar a 5ml. Despues los tubos fueron agitados energicamente con la ayuda de un homogeneizador vortex* para desprender los conidios de los conidióforos, resultando una suspensión de conidios. Por último, el conteo de conidios se realizó en una cámara de conteo de células "Neubauer" (2), desarrollando la siguiente fórmula:

$$\text{No. de conidios por ml.} = \bar{X} \text{ conidios en 5 campos} \times 1 \times 10^4$$

D) NEMATODOS

Para la obtención de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*, se usó un borrego infectado en forma natural con el nematodo en estudio. El número promedio de huevos eliminados por g de heces (6), fue de 16,000. Este borrego

* Genie Mod. K-550 G

fue confinado en un corral aislado y las heces fueron recuperadas para elaboración de coprocultivos. Estas fueron homogeneizadas e hidratadas cuando así lo requirieron durante días. Los coprocultivos fueron sometidos a la técnica de Baermann (51), para extraer las larvas presentes en ellos. Posteriormente las larvas fueron concentradas y limpiadas por medio de filtración usando papel Whatman* del No. 1, en un embudo de porcelana conectado a una bomba de vacío**. Para recuperar las larvas del papel filtro, este último fue puesto en forma invertida en un embudo de Baermann durante una hora en una solución preparada con antibióticos (penicilina 200 UI, estreptomycin 260 mg/ml y por un fungicida, nistatina 0.05 ml/l). Después las larvas se recuperaron y enjuagaron para eliminar los residuos de antibióticos y fungicida con una solución amortiguadora de fosfatos a 0.15 M (PBS) estéril.

Para la cuantificación de larvas, el contenido resultante del filtrado se depositó en tubos de centrifuga esteriles de 50 ml, aforando a 20 ml con agua destilada estéril; posteriormente la suspensión de larvas fue homogeneizada con un agitador de tubos Vortex y después se tomaron 10 alícuotas de 10 μ l cada una con una micropipeta automática ***,

* Whatman International LTD

** Koblenz Modelo CGP134

*** Pipetteman Gilson

depositándolas en un portaobjetos. El contéo de larvas presentes en las alícuotas se realizó con un microscopio compuesto (objetivos 10X y 40X). La estimación del número de larvas para ser depositadas en las placas experimentales se tuvo mediante una regla de tres simple tomando como base el número promedio de larvas observadas en las alícuotas.

E) ESTABLECIMIENTO DEL EXPERIMENTO.

Se usaron 40 cajas de Petri de plástico de 3.5 cm de diámetro con harina de maíz agar, distribuidas en tres series. Las series 1 y 2 constaban de 10 cajas cada una, la serie 3 estaba formada por 20 cajas. Las cajas de la serie 1 contenían una muestra cilíndrica de agar de 1 cm de diámetro por 1 cm de espesor (41), de un cultivo de *Monacrosporium gephyropagum* de 14 días de edad (42) conteniendo aproximadamente 3,500 conidios. Las cajas de la serie 2, contenían una muestra de agar del mismo tamaño, tomada a partir de un cultivo de *Arthrobotrys robusta* de 7 días de edad (41), conteniendo aproximadamente 11,000 conidios. Las cajas de la serie 3 contenían sólo el medio de cultivo sin hongos para fungir como testigo. Se adicionaron aproximadamente 100 larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* en cada caja de las 3 series (Cuadro 3), se metieron a incubar a una cámara húmeda a 25 C, durante 7 días. Al cabo de este tiempo se realizó la lectura, observando la superficie del agar en un microscopio compuesto (Objetivos 10X, 40X y 100X), se cuantificó la

totalidad de las larvas presentes en las placas y se llevó un registro tanto de larvas capturadas como larvas libres. Los datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba de U Mann-Whitney (31).

Para apreciar con detalle la actividad atrapadora de los hongos, algunas placas adicionales fueron procesadas para microscopía electrónica de rastréo, siguiendo el procedimiento descrito por Eisenback, 1986. (*)

*Eisenback, J.D.:Techniques for preparing nematodes for scanning electron microscopy. Journal of Nematology, 18(4):479-487 (1986)

RESULTADOS

Antes de adicionar los nematodos a las placas, se observó que tres cajas de la serie testigo se habían contaminado con otros hongos, motivo por el cual se eliminaron del experimento, quedando la serie testigo con 17 repeticiones. Al examinar microscópicamente los cultivos de *Monacrosporium gephyropagum* a los 14 días de edad, previo a la adición de los nematodos, se observó que este había desarrollado un crecimiento micelial abundante que abarcaba casi la totalidad de la superficie del cultivo y algunas ramas adhesivas empezaban a formarse. Siete días después de haber adicionado los nematodos a los cultivos de este hongo, se observó el desarrollo de una gran cantidad de ramas adhesivas que emergían de las hifas (Foto 1) y en la mayoría de los casos éstas se encontraban distribuidas a intervalos regulares a lo largo de las hifas (Foto 2), en la que estas estructuras asemejaban las cuentas de un rosario. Casi todas las larvas de *Strongyloides papillosus* se encontraban adheridas con firmeza a las ramas (Fotos 3 y 4); algunas larvas luchaban por liberarse agitándose vigorosamente, sin lograrlo y terminaban por ser adheridas a las ramas adyacentes, pocas larvas se encontraban libres cerca de las ramas adhesivas.

La cepa de *Arthrobotrys robusta* mostró en cultivo puro un abundante crecimiento micelial con gran cantidad de

conidióforos conteniendo conidios en racimo (Foto 5). Siete días después de haber adicionado en ellos las larvas del nematodo en estudio, se desarrolló una gran cantidad de anillos tridimensionales de captura (Fotos 6 y 7), la mayoría de las larvas se encontraban libres deslizándose sobre la superficie del agar, algunas larvas entraban a los anillos de captura sin que éstos ejercieran algún efecto de atrapamiento sobre ellas, pudiendo así entrar y salir libremente, algunas larvas yacían atrapadas destruidas en los anillos de captura (Fotos 8 a 11).

El análisis estadístico determinó los siguientes resultados: El porcentaje de larvas atrapadas por *Monacrosporium gephyropagum* fué de 94.26% (+- 6.19) (Cuadro 4), mientras que *Arthrobotrys robusta* capturó únicamente al 35.98% (+-21.3) (Cuadro 5). Cabe mencionar que en solo una placa (Caja No. 1) de la serie 2 el porcentaje de captura resultó elevado (92.5%). ($P < 0.001$).

En la serie de las cajas testigo 87.20% (+-19.5) de larvas de *S. papillosus* se encontraban vivas deslizándose activamente sobre la superficie del agar o enroscadas con poco movimiento (al agregar sobre ellas algunas gotas de agua, estas comenzaron a moverse activamente sobre el agar). El resto de las larvas permanecieron estiradas o ligeramente curvadas sin ningún movimiento y aún después de agregarles

agua continuaron estáticas por lo que fueron consideradas larvas muertas ($P < 0.001$) (Cuadro 6).

DISCUSION.

El desarrollo en cultivo puro mostrado por la cepa de *Monacrosporium gephyropagum* usada en el presente estudio, concuerda con las descripciones de Drechsler 1937 (12), Cooke et al, 1963 (9), incluyendo el desarrollo espontáneo de ramas adhesivas. Este hongo mostró una gran capacidad para producir ramas adhesivas en presencia de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* y una alta eficacia en la captura de larvas de este nematodo.

En una revisión bibliográfica disponible se encontró que se ha generado poca información con respecto a la actividad depredadora de hongos del género *Monacrosporium* spp sobre nematodos de importancia en parasitología veterinaria. Al parecer hasta hoy, no había sido evaluada *in vitro* la actividad atrapadora de *Monacrosporium gephyropagum*, ni *Arthrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* por lo que esta podría ser la primera notificación al respecto.

Algunos trabajos realizados con otras especies de hongos nematófagos sobre nematodos parásitos de rumiantes pueden ser comparados con los resultados obtenidos en el presente estudio, tal es el caso de un experimento realizado por Pandey en 1973 (41) quien empleó diversas especies de hongos nematófagos incluyendo los géneros *Arthrobotrys*, *Dactylella* y

Monacrosporium contra larvas infectantes de *Trichostrongylus axei* y *Ostertagia ostertagi*, observando que al día siete, el 100% de las larvas habían sido capturadas por *Monacrosporium cionopaga* (una especie productora de ramas adhesivas igual que *M. gephyropagum*) no así para *Monacrosporium bembicoides* (productora de anillos constreñibles) que únicamente capturó al 49%.

Monacrosporium gephyropagum (*D. gephyropaga*)* y otras especies como *M. elliposporum* (*D. ellipospora*)* y *M. drechsleri* (*D. drechsleri*)* al ser adicionadas al suelo mostraron un marcado decremento en la población de nematodos de vida libre (9).

La adición de los hongos nematófagos *Arthrobotrys oligospora* y *Dactylella thaumasia* en parcelas contaminadas experimentalmente con nematodos gastroentéricos, han mostrado resultados alentadores ya que en borregos pastoreando en estas parcelas se observó una considerable reducción en el número de huevos por g de heces con respecto a un lote de borregos pastoreando en parcelas sin la adición de hongos, obteniendo además un desarrollo superior de los borregos hasta de 91%, comparado con el lote testigo (15).

Tomando en consideración el alto porcentaje de captura de larvas infectantes de *S. papillosus* *in vitro* por el hongo *Monacrosporium gephyropagum* en el presente estudio, *Cooke, C.R. and Dickinson, C.H., 1965 (10)

sería conveniente diseñar nuevos experimentos de campo que evalúen el efecto de la adición de esta cepa en parcelas sobre una población de *Strongyloides papillosus* y otros nematodos parásitos de rumiantes.

El desarrollo de la cepa de *Arthrobotrys robusta* en cultivo puro, usada en el presente estudio, resultó similar al observado por Haard, 1968 (22) para esta especie. *A. robusta* mostró en promedio una baja actividad atrapadora de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*. No existe una explicación categórica al hecho de que en la placa No. 1 de la serie 2 el hongo mostró un elevado comportamiento atrapador; sin embargo, en general en todas las cajas restantes la capacidad atrapadora fue muy baja. En diversas pruebas realizadas con esta cepa en el laboratorio se ha observado una alta actividad atrapadora *in vitro* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (más del 94%) (32). La aplicación práctica del empleo de hongos nematófagos en el control de nematodos parásitos de rumiantes, podría efectuarse usando hongos con un elevado poder depredador y amplio espectro de acción en contra de diversos géneros y especies de nematodos, o bien con la mezcla de diferentes cepas de hongos altamente activos en contra de algunos nematodos en particular (como podría ser el caso de *Arthrobotrys robusta* contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (32) y *Monacrosporium*

gephyropagum contra larvas infectantes de *Strongyloides papillosus*, ambas cepas usadas en el presente estudio).

La actividad atrapadora es mediada por la unión de receptores glicoproteínicos presentes en la cutícula del nematodo y en los órganos de captura de los hongos nematófagos (38, 44, 48). La compatibilidad de estos receptores es determinante en la especificidad del hospedador, pudiéndose encontrar en ocasiones que una misma cepa puede ser altamente efectiva contra un tipo de nematodo o bien presentar una baja o nula actividad contra otro (17). El hecho de que algunas larvas infectantes entraran y salieran libremente de los anillos de captura sugiere falta de compatibilidad de los receptores presentes en la cutícula del nematodo y en los órganos de captura del hongo. Probablemente por esta razón el hongo mostró baja actividad atrapadora.

En los últimos años, se ha puesto gran interés en la investigación del control de las parasitosis gastroentéricas en rumiantes a partir de métodos biológicos, ya que el uso indiscriminado de sustancias químicas (antihelmínticos) tiene una repercusión directa tanto en los animales, el hombre y el medio ambiente.

Según los resultados obtenidos bajo las condiciones que este experimento fue realizado se concluye que el hongo nematófago *Monacrosporium gephyropagum*, mostró una elevada capacidad atrapadora *in vitro* (> del 94%) de las larvas

infectantes de *Strongyloides papillosus* a los siete días a 25 C. Bajo estas mismas condiciones experimentales *Arthrobotrys robusta* mostró una baja capacidad atrapadora (< del 36%) sobre el nematodo en estudio. *Monacrosporium gephyropagum* será tomado en cuenta en futuras pruebas de campo para evaluar su efecto en parcelas experimentales sobre una población de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* y otros nematodos parásitos de rumiantes.

LITERATURA CITADA

- 1.-Barron, G.L.: The nematode destroying fungi. Canadian Publications LTD, Cuelph, Ontario, Canada., 1977.
- 2.-Bentinck-Smith, J.:Hematología. En: Patología Clínica Veterinaria. Editado por : Medway, W., Frier, J. E. y Wilkinson, J. S.,208-251, Editorial UTEHA, México, D.F., 1969.
- 3.-Blood, D. C., Radostits, O. M. and Henderson, J. A.: Medicina Veterinaria, 6a. Nueva Editorial Interamericana, México D.F., 1990.
- 4.-Borrebaeck, C. A. K., Mattiasson, B. and Nordbring- Hertz, B.: A fungal lectin and its apparent receptors on a nematode surface. FEMS Microbiology letters, (27)1:35 - 39, (1985).
- 5.-Bull. off. int. Epiz. 93, XLIX Session Générale. Raport 1. 13, (5 - 6), (1981).
- 6.-Campos, R.R, y Bautista, G. R.: Diagnóstico de Helmintos y Hemoparásitos de ruminantes, Editado por: Asoc. Mx. de Parasitología Vet. A. C. Jiutepec, Morelos, 1989.

7.-Campos, R.R.: Resistencia de Haemonchus contortus a los Bencimidazoles en Ovinos de México, Tesis de Maestría de Ciencias Veterinarias, Fac. de Med. Vet. y Zootec., Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1989.

8.-Cayrol, J.C., Frankowski, J.P., Laniece, A., D, Hardemare, G. et Talon, J.P.: Contre les nematodes en champignoniere. Mise au point d' une méthode de lutte biologique à l aide d' un hyphomicète prédateur: Arthrobotrys robusta souche antipolis (Royal 300). Rev. Hort. 184:23-30, (1978).

9.-Cooke, C.R.: Ecological characteristics of nematode - trapping Hyphomycetes. APP. Biol., 52 : 431 - 437, (1963).

10.-Cooke, C.R. and Dickinson, C.H.: Nematode - Trapping species of Dactylella and Monacrosporium. Trans. Brit. Mycol. Soc. 48 (4):621 - 629 (1965).

11.-Domsch, H. K., Gams, W. and Traude-Heidi, A.: Compedium of soil fungi. Acad. Press., London England, 1: 58 - 64, 1980.

12.-Drechsler, C.: Some Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. Mycologia. 29: 447-552, (1937).

- 13.-Duddington, C. L.: The ecology of predacious fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 34:322 - 331, (1951).
- 14.-Duddington, C. L.: Fungi that attack microscopic animals. Bot. Rev. 21:377 - 432, (1955).
- 15.-Fernandes, F.G., Meireles, M. C. A. and Coimbra, A. M.: Biological control of verminosis on ruminant. In: Abstracts of the 11th conference of the World Association for the advancement of Veterinary Parasitology. August, 5-9. Rio de Janeiro, Brazil. Ref. No. 22, 1985.
- 16.-Gállego, B.J.: Atlas de Parasitología, Serie D No. 5, 10a ed. Editorial Jover, Madrid, España, 1978
- 17.-Gaspar, J.T. and Mankau, C. R.: Density - dependence and host specificity of the nematode - trapping fungus Monacrosporium elliposporum. Revue de Nématologie 10 (2):241-246 (1987).

18.-Grønvoold, J., Korsholm, H., Wolstrup, J., Nansen, P. and Henriksen, S. A.: Laboratory experiments to evaluate the ability of Arthrobotrya oligospora to destroy infective larvae of Cooperia species and to investigate the effect of physical factors on the growth of the fungus. J. Helminth. 59:119-125 (1985).

19.-Grønvoold, J., Wolstrup, J., Henriksen, S.A. and Nansen, P.: Field experiments on the ability of Arthrobotrya oligospora (Hyphomycetales) to reduce the number of larvae of Cooperia oncophora (Trichostrongylidae) in cow pats and surrounding grass. J. Helminth., 61: 65-71 (1987)

20.-Grønvoold, J., Henriksen, S. A., Nansen, P., Wolstrup, J. and Thylin, J.: Attempts to control infection with Ostertagia ostertagi (Trichostrongylidae) in grazing calves by adding mycelium of the nematode-trapping fungus Arthrobotrys oligospora (Hyphomycetales) to cow pats. J. Helminth. 63: 115-126 (1989).

21.-Haard, K.: Taxonomic studies on the genus Arthrobotrys. Corda Mycologia, vol. LX Nov. - Dec., 6:1140 - 1159 (1968).

- 22.-Hams, A.J. and Wilkin, G.D.: Observacions on the use of predacious fungi for the control of Heterodes spp. Ann. Appl. Biol., 49:515 - 523 (1961).
- 23.-Herrera, T. y Ulloa, M.: El Reino de los hongos, Micología básica y aplicada. 10a ed., Fondo de Cultura Económica, México, D. F., 1990.
- 24.-Juniper, A.J.: Dung as a source of predacious fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 40:346 - 348 (1957).
- 25.-Lapage, G.: Parasitología Veterinaria. 3a. ed. CECSA., México, D.F., 1979.
- 26.-Lappe, P. y Ulloa, M.: Hongos destructores de nematodos en algunos suelos de México. Bol. Soc. Mex. Mic. 17:99-113 (1982).
- 27.-Lozano, M.J.J.: Reducción del número de larvas preparasíticas de Haemonchus contortus en heces de ovinos adicionadas con Arthrobotrya robusta in vitro. Tesis de licenciatura: Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1991.
- 28.-Mankau, R.: Biocontrol: Fungi as nematode control agents. J. Nematol. 12 (4): 244-252 (1980).

29.-Mankau, C.R. and Wu, X.:Effect of the nematode-trapping fungus, Monacrosporium ellipso sporum of Meloidogyne incognita populations in field soil. Revue de Nematol. 8(2):147-153 1985.

30.-Martínez, G.M., Urrutia, J.M., Mejía, S.A., Sánchez, J. y Martínez, L.:Eficiencia reproductiva de borregos de la raza Corriedale en el altiplano de México. Reunión de Investigación pecuaria en México., México, D.F., 1989.

31.-Méndez, R.I., Namihira, G.D., Moreno, A.L. y Sosa, M.C.:El Protocolo de Investigación, Lineamientos para su elaboración y análisis., 1era, ed., Trillas, México, D.F. , 1984 .

32.-Mendoza de G. P., Zavaleta-M. E., Herrera-R. D., Quiróz-R. H. and Perdomo-R. F. Interaction between the nematode-destroying fungus Arthrobotrys robusta (Hyphomycetales) and Haemonchus contortus infective larvae in vitro. Veterinary Parasitology, 41: 101-107 (1992).

33.-Miller, F.R. and Easterbooks, S.:Progress in cattle and sheep practice. Ann. Vet. Pub. DROVER. Cap.1:141 (1974).

- 34.-Monoson, L. H. and Ranieri, M. G.: Nematode attraction by an extract of a predacious fungus. Mycologia., 64:628-631 (1972). In: Proceedings of Helminth. soc. Wash., 53: 237-243, (1986).
- 35.-Nansen, P., Grønvoold, J., Henriksen, S.A. and Wolstrup, J. Interactions between the predacious fungus Arthrobotrys oligospora, on preparasitic larvae of Cooperia oncophora and soil nematodes. In: Proceedings of Helminth. soc. Wash., 53: 237-243 (1986).
- 36.-Nikitin, B.F.: Strongyloides infection in calves. Veterinariya, Moscow, U.S.S.R., 12:35-37 (1984).
- 37.-Nordbring-Hertz: Nematode-induced morphogenesis in the predacious fungus Arthrobotrys oligospora. Nematologica, 23:44-46 (1978).
- 38.-Nordbring-Hertz, B.: Ecology and recognition in the nematode-nematophagous fungus system. Advances in Microbial Ecology, vol. 10, Edited by K.C. Marshall. (Plenum Publishing Corporation, (1988).
- 39.-Olsen, W.G.: Animal parasites: Their live cycles and ecology, 3a. ed., University Park Press., Baltimore, 1980

40.-Olthof, H.A. and Estey, R. H.: A nematotoxin produced by the nematophagous fungus Arthrobotrys oligospora Fresenius. Nature, 197:514-515 (1963).

41.-Pandey, V.S.: Predatory activity of nematode precting fungi against the larvae of Trichostrongylus axei and Oatertagia ostertagi. A possible method of biological control, J. Helminth. 57(1):35-48 (1973).

42.-Poinar, G.O. and Jakson, H.B.: Infection of Neoplectana and Heterorhabditis (Rhabditida: Nematoda) with the predatory fungi Monacrosporium elliposporum and Arthrobotrys oligospora (Moniliales: Deuteromycetes). Revue Nematol. 9(3):241-244 (1986).

43.-Pramer, D. and Kuyama, S.: Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi: II Nemin and the nematode-trapping fungi, Bacteriol. Rev. 27:282-292 (1963).

44.-Premachandran, D.S. and Pramer, D.: Role of N (Nitrogen) at the Acetyl Galactosamine-specific protein in tramping of nematodes by Arthrobotrys oligospora (Fungi). Microbiology, 47(6):1358-1359 (1984).

45.-Pryadko, E. I. and Osipov, P. P.: Trials of nematophagous fungi in field conditions. Biologicheskaya, 1:30-33 (1986).

46.-Quirós, R.H.:Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos.,2a. ed. , LIMUSA, México, D.F., 1986.

47.-Rifai, A.M. and Cooke, C.R.:Hyphomycetes. Trans. Br. Mycol. Soc. 49(1):164-168 (1966).

48.-Roubaud, E. and Deschiens, R.:Essais relatifs à la prophylaxie de l'anguillulose du mouton par l'usage des hyphomycètes prédateur de sol. C.R. Soc.Biol. (Paris), 135:687-690 (1941).

49.-Soulsby, R.J.L.:Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 6a. ed., Nueva Ed. Interamericana, 1987.

50.-Sumano, L.H. y Ocampo, C.L.:Farmacología Veterinaria, 1a ed., Libros Mc. Graw. Hill de México, S.A., México, D.F., 1987.

51.-Todd, S.K., Levine, D.N. and Anderson, F.L.:An evaluation of the Baermann technic using infective larvae of Haemonchus contortus. Proc. of the Helminthol.Soc. Wash., 37:57-68, January, (1970).

52.-Tribe, H. T.: Prospects for the biological control of plant-parasitic nematodes. Parasitology, 81:619-639 (1980)

53.-Ulloa, M. y Hanlin, R.: Atlas de Micología Básica., 1a. ed., Concepto, S.A., México, D.F., 1978.

54.-Vázquez, P.V. y Nájera, F.R.:Variación mensual de nematodos intestinales en ovinos en el C.E.F.H. del Estado de Puebla. VI Reunión anual, 1985. Asoc. Mex. Parasitología Veterinaria, A.C., México, D.F., 1985.

55.-Veenhuis, M., Nordbring-Hertz, B. and Harder, W.:An ultrastructural study of cell-cell interactions in capture organs of the nematophagous fungus Arthrobotrys oligospora, Microbiology Letters, 30(1-2) (1985).

C U A D R O 1

PREPARACION DE MUESTRAS FUNGALES PARA INOCULOS DE LAS PLACAS
EXPERIMENTALES.

SERIE	HONGOS	No. DE CAJAS PETRI CON H.M.A.*	TEMPERATURA
I	<i>A. robusta</i>	5	25 C
II	<i>M. geophyropagum</i>	5	25 C

*.- Harina de maíz y agar.

C U A D R O 2

ESTABLECIMIENTO DE LAS SERIES EXPERIMENTALES

SERIE	No. DE CAJAS	HONGO	TEMPERATURA
1	10	<i>M. geophyropagum</i>	25 C
2	10	<i>A. robusta</i>	25 C
3	20	TESTIGOS	25 C

C U A D R O 3

ACTIVIDAD ATRAPADORA DE *Monacrosporium gephyropagum* Y *Arthrobotrys robusta* SOBRE LARVAS INFECTANTES DE *Strongyloides papillosus* in vitro A 25 C.

SERIE	No. DE CAJAS	HONGO	<i>S. papillosus</i>
1	10	* <i>M. gephyropagum</i>	100
2	10	** <i>A. robusta</i>	100
3	20	TESTIGOS	100

*.- Cultivo de catorce días de edad en harina de maíz y agar.

**.- Cultivo de siete días de edad en harina de maíz y agar.

CUADRO 4.

Número y porcentaje de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* atrapadas por *Monacrosporium gephyropagum* después de siete días de interacción en placas con harina de maíz agar. (Serie 1)

CAJA No.	LARVAS ATRAPADAS	/ LARVAS TOTALES	PORCENTAJE DE LARVAS ATRAPADAS
1	83	84	98.80
2	77	82	93.90
3	67	67	100.00
4	69	69	100.00
5	84	84	100.00
6	77	85	90.58
7	104	108	96.29
8	89	94	94.68
9	95	115	82.60
10	133	155	85.80
	878	943	$X=942.65/10=94.26(+6.19)$ *

* $P < 0.001$ Prueba U de Mann-Whitney (31).

CUADRO 5

Número y porcentaje de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* atrapadas por *Arthrobotrys robusta* después de siete días de interacción en placas con harina de maíz agar. (Serie 2)

CAJA No.	LARVAS ATRAPADAS	/	LARVAS TOTALES	PORCENTAJE DE LARVAS ATRAPADAS
1	37		40	92.5
2	31		174	17.81
3	17		51	33.33
4	17		56	30.35
5	23		92	25.00
6	24		79	30.37
7	14		70	20.00
8	44		136	32.35
9	65		139	46.76
10	54		172	31.39
	326		1009	$X=359.86/10=35.98 (+21.39)*$

* $P < 0.001$ Prueba U de Mann-Whitney (31).

CUADRO 6

Número y porcentaje de larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* con y sin movimiento en placas con harina de maíz agar. (Serie 3, Testigo).

CAJAS No.	LARVAS TOTALES	LARVAS EN MOVIMIENTO	PORCIENTO	LARVAS SIN MOVIMIENTO	PORCIENTO
1	75	70	(93.33)	5	(6.6)
2	55	50	(90.90)	5	(9.09)
3	15	15	(100.00)	0	0
4	45	40	(88.88)	5	(11.11)
5	55	45	(81.81)	10	(18.18)
6	20	20	(100.00)	0	0
7	80	70	(87.50)	10	(12.50)
8	45	45	(100.00)	0	0
9	30	30	(100.00)	0	0
10	95	95	(100.00)	0	0
11	65	65	(100.00)	0	0
12	45	30	(66.66)	15	(33.33)
13	30	10	(33.33)	20	(66.67)
14	10	10	(100.00)	0	0
15	20	10	(50.00)	10	(50.00)
16	15	15	(100.00)	0	0
17	50	45	(90.00)	5	(10.00)
	750	665		85	

‡ Larvas con movimiento = $\frac{750}{665} \text{ --- } 100\%$
 $X = 88.6\% *$

‡ Larvas sin movimiento = $\frac{750}{85} \text{ --- } 100\%$
 $X = 11.33\% **$

* = Larvas deslizándose activamente sobre la superficie del agar o larvas enroscadas con poco movimiento.

** = Larvas estiradas o ligeramente curvadas sin ningún movimiento.



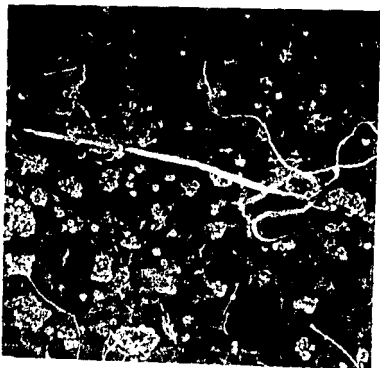
1

Foto 1. Fotografía tomada al microscopio electrónico de rastréo, mostrando el desarrollo de ramas adhesivas de *Monacrosporium gephyropagum*, que emergen de las hifas del hongo en harina de maíz agar. (480 X)

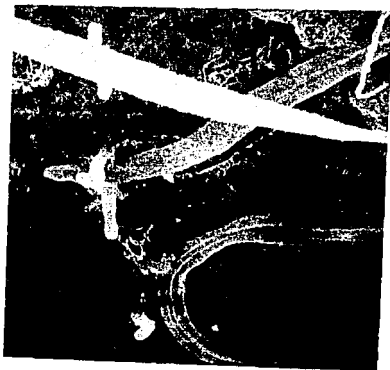


2

Foto 2. Fotografía tomada al microscopio compuesto, mostrando el desarrollo de *Monacrosporium geophyropagum* en una placa de harina de maíz agar. a) Ramas adhesivas de dos y tres células producidas en forma continua y equidistante a lo largo de las hifas. b) Un conidio desprendido del conidióforo. (75 X).



3



4

Fotos 3 y 4. Fotografías tomadas al microscópio electrónico de rastréo, mostrando una larva de *Strongyloides papillosus* atrapada por las ramas adhesivas de *Monacrosporium gephyropagum* en una placa de harina de maíz agar. (540 X y 940 X, respectivamente)

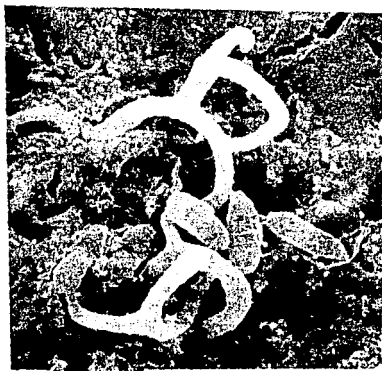


5

Foto 5. Fotografía tomada al microscópio compuesto, mostrando dos racimos de conidios de *Arthrobotrys robusta* en harina de maíz agar (25X).

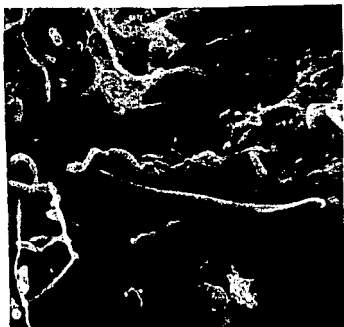


6

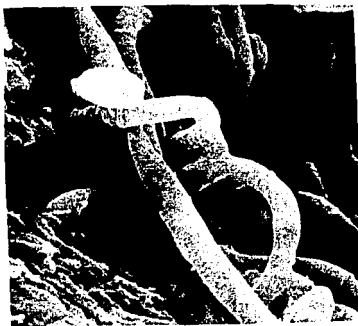


7

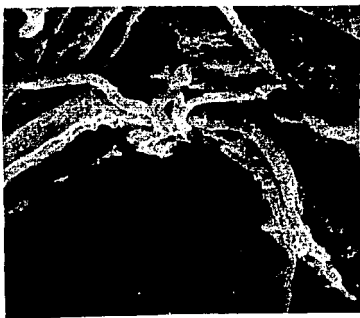
Fotos 6 y 7. Fotografías tomadas al microscópio electrónico de rastréo, mostrando el desarrollo de anillos tridimensionales adhesivos de *Arthrobotrys robusta*. En la foto inferior se aprecian algunos conidios del hongo. (2,000X y 1,300X, respectivamente).



8



9



10



11

Fotos 8 a 11. (Página anterior). Fotografías tomadas al microscópio electrónico de rastreo, mostrando una larva de *Strongyloides papillosus* capturada por *Arthrobotrys robusta* en harina de maíz agar. Fotos 8 y 9, larva atrapada por un anillo de captura (540X y 2200X, respectivamente). Fotos 10 y 11, Aspecto de una larva destruida por el hongo, algunos filamentos hifales emergen del interior del nematodo (940X y 1200X, respectivamente).