

2014

## **Estandarización de preservantes y técnicas de conservación de hongos nematófagos para el control de nematodos gastrointestinales en bovinos**

Angélica Pérez Oviedo  
*Universidad de La Salle, Bogotá*

Follow this and additional works at: [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria)



Part of the [Veterinary Medicine Commons](#)

---

### **Citación recomendada**

Pérez Oviedo, A. (2014). Estandarización de preservantes y técnicas de conservación de hongos nematófagos para el control de nematodos gastrointestinales en bovinos. Retrieved from [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria/53](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/53)

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medicina Veterinaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact [ciencia@lasalle.edu.co](mailto:ciencia@lasalle.edu.co).

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria



ESTANDARIZACIÓN DE PRESERVANTES Y TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE  
HONGOS NEMATÓFAGOS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS  
GASTROINTESTINALES EN BOVINOS.

Informe de Práctica Rotatoria

Angélica Pérez Oviedo

Bogotá, Colombia

2014

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria



ESTANDARIZACIÓN DE PRESERVANTES Y TÉCNICAS DE CONSERVACIÓN DE  
HONGOS NEMATÓFAGOS PARA EL CONTROL DE NEMATODOS  
GASTROINTESTINALES EN BOVINOS.

Informe de Práctica Rotatoria

Angélica Pérez Oviedo

14071132

Director

Dildo Márquez Lara

Bogotá, Colombia

2014

## APROBACIÓN

DIRECTOR

---

Dildo Márquez Lara

JURADO

---

JURADO

---

## DIRECTIVOS

RECTOR  
Restrepo

Hno. Carlos Gabriel Gómez

VICERRECTOR ACADÉMICO  
Padilla

Hno. Fabio Humberto Coronado

VICERRECTOR DE PROMOCIÓN Y  
Baquero DESARROLLO HUMANO

Hno. Frank Leonardo Ramos

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

Dr. Eduardo Ángel Reyes

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y  
Hernández TRANSFERENCIA

Dr. Luis Fernando Ramírez

DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
AGROPECUARIAS

Dra. Claudia Aixa Mutis Barreto

DIRECTOR PROGRAMA DE MEDICINA  
VETERINARIA

Dr. Fernando Nassar Montoya

## **COMPROMISO**

Los trabajos de grado no deben contener ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

## **AGRADECIMIENTOS**

Doy gracias a Dios por darme la oportunidad de estudiar una carrera que permite tocar el alma de las personas ayudando a seres que nos acompañan y dan parte de su ser para suplir las necesidades de los seres humanos, los animales son parte vital de nuestra existencia en esta tierra y ayudarlos es mi propósito.

Agradezco a mi madre quien estuvo conmigo apoyándome y amándome al igual que mi hermana que es mi mejor amiga y confidente, agradezco a mi esposo que ha sido incondicional apoyando mis sueños y metas.

Doy mi gran admiración y agradecimiento al doctor Dildo Márquez Lara por su constante enseñanza y apoyo en mi pasantía, con este trabajo y en aspectos personales brindando siempre una palabra de aliento y fuerza, al igual que doctor Andrés Cubides quien ha sido un mentor siempre enseñándome y ayudando en mi formación

A la Universidad de la Salle y sus docentes que hicieron de mí una persona ética e integral, lista para aportar con mis conocimientos a Colombia.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
OBJETIVOS	3
Objetivo General	3
Objetivos Específicos	3
1. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS	4
2. HONGOS NEMATOFAGOS	12
2.1 Definición	12
2.2 Tipos de trampas de hongos depredadores	13
2.3 Hongos utilizados en el ensayo de conservación	16
2.3.1 <i>Arthrobotrys oligospora</i>	16
2.3.2 <i>Arthrobotrys musiformis</i>	17
3. NEMATODOS GASTROINTESTINALES	17
3.1 Ciclo de vida	18
3.2 Especies de nematodos gastrointestinales de rumiantes	19
4. CONTROL BIOLÓGICO	20
5. METODOS DE PRESERVACION DE HONGOS	21
5.1 Criopreservación	21
5.2 Liofilización	22
5.3 Conservación en capa de aceite mineral	23
5.4 Deseccación en Silica gel	23
5.5 Agua destilada	24
5.6 Glicerol	24
5.7 Preservación en DMSO	24
5.8 Mantenimiento en arena/tierra	25
5.9 Transferencia continua	25
6. MATERIALES Y METODOS	25
6.1 Protocolo de conservación en Glicerol	25
6.2 Protocolo de conservación en Silica–Gel	26
6.3 Protocolo de conservación en Aceite Mineral	27
6.4 Protocolo de conservación en suelo	27
6.5 Protocolo de conservación en DMSO	28
7. RESULTADOS	29
8. DISCUSIÓN	38-40
9. CONCLUSIONES	40-41
10. RECOMENDACIONES	41-
BIBLIOGRAFIA	42-43

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies de nematodos gastrointestinales en rumiantes.	19
Tabla 2. Efectos causados por nematodos más destacados.	20
Tabla 3. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con Silica-gel	30
Tabla 4. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con Aceite mineral	31
Tabla 5. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con DMSO	31
Tabla 6. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con suelo	32
Tabla 7. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con Glicerol	33
Tabla 8. Ensayos contaminados con otros hongos	33
Tabla 9. Ensayos contaminados con bacterias	34
Tabla 10. Ensayos sin contaminación	35
Tabla 11. Conteo de conidios y clamidosporas	36
Tabla 12. Larvas no atrapadas	37
Tabla 13. Porcentaje de nematofagia por replica	37
Tabla 14. Análisis de varianza	37
Tabla 15. Análisis de varianza de un factor	38



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Materia fecal sembrada en agar agua	5
Figura 2. Micelio con conidióforos y conidios.	6
Figura 3. Conidióforos con conidios	6
Figura 4. Procedimiento para realizar la prueba <i>in vitro</i>	7
Figura 5. Cámara de Neubauer con reglilla para conteo de clamidosporas y conidios	8
Figura 6. Maceración de agar trigo con clamidosporas	9
Figura 7. Coprocultivo de materia fecal bovina	9
Figura 8. Nematodos gastrointestinales	10
Figura 9. Larvas atrapadas por hongos nematófagos.	11
Figura 10. Hongos contaminantes	12
Figura 11. Ramas columnares adhesivas	13
Figura 12. Redes Tridimensionales adhesivas	14
Figura 13. Anillos constrictores	14
Figura 14. Anillos no constrictores	15
Figura 15. Perillas adhesivas esféricas u ovaladas	15
Figura 16. Perillas adhesivas en forma de reloj de arena	16
Figura 17. Ciclo de vida de los nematodos gastrointestinales	18
Figura 18. Resiembra de ensayos	29
Figura 19. Medición de halo	30
Figura 20. Ensayos con hongos contaminantes	34
Figura 21. Ensayos contaminados con bacterias	35

## 1. INTRODUCCIÓN

Los constantes desarrollos en la investigación de microorganismos como enemigos naturales de diferentes plagas o como modelos para desarrollar antígenos de vacunas han conllevado a que se mantengan los aislamientos durante largos periodos de tiempo o inclusive se conserven de por vida como referencia para diferentes tipos de ensayo, por lo que es imperativo asegurar la viabilidad de esos microorganismos pero manteniendo la mínima variabilidad genética posible (Friedler, Landis y Wratten, 2008).

Debido al auge de la investigación con hongos nematófagos en CORPOICA y teniendo en cuenta que no se tiene un banco de germoplasma de los hongos, surge la necesidad de desarrollar estrategias para su conservación que permitan garantizar su posterior uso. Sin embargo, para la conservación de estos se debe contar con medios y preservantes que provean a los hongos la capacidad de mantener su potencial biológico y evitar contaminación secundaria (Saumell, 2008).

En cuanto a los métodos comúnmente utilizados en la preservación de diferentes tipos de hongos se tiene conocimiento de alrededor de ocho métodos clásicos, estos son: criopreservación en nitrógeno líquido a temperatura bajo cero grados Celsius (-196 °C), criopreservación en congelador mecánico (-20 o -70 °C), almacenamiento en aceite, almacenamiento en agua, continuo transferencia, liofilización, almacenamiento en gel de sílice y almacenamiento de arena / tierra (Smith, 1994). La elección del método adecuado se debe basar en los siguientes criterios: características especie específicas, el tiempo a preservar, la disponibilidad de recursos, materiales y equipos con los que se cuente en el laboratorio (Ryan, 2000).

El presente trabajo compila la revisión y evaluación de protocolos de preservación (Silica gel, DMSO, suelo, glicerol y aceite mineral) reportados en hongos para corroborar su adaptabilidad con los hongos nematófagos aislados en laboratorio (*Arthrobotrys musiformis* y *Arthrobotrys oligospora*) usando dos agares (agar trigo y agar sabouraud) que son utilizados actualmente en el laboratorio para el mantenimiento de estas cepas.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad parasitaria causada por los nematodos gastrointestinales en los rumiantes produce pérdidas económicas en los sistemas de producción bovino. Teniendo en cuenta lo anterior, el control de los nematodos gastrointestinales se ha convertido en una problemática mundial (Kaplan y Vidyashankarb, 2012), problema que se ha acrecentado debido a que la dependencia a los compuestos químicos y su uso indiscriminado ha generado resistencia de los nematodos a estos, aumento en los costos de producción, residuos químicos en los alimentos de origen animal además un perjudicial efecto ambiental (Márquez, 2008).

Por lo anterior, surge la necesidad de desarrollar alternativas no químicas al control tradicional de los parásitos, entre estas alternativas se encuentra el uso de hongos nematófagos que es tema de investigación en diferentes países.

En Colombia, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria ha venido realizando esfuerzos para desarrollar estrategias alternativas al control químico, dentro de los cuales se encuentra el aislamiento, identificación y evaluación de la capacidad nematófaga de hongos nematófagos nativos. Resultado de esto se han logrado identificar hongos con un alto potencial nematófago (*A. musiformis* y *A. oligospora*) que se caracterizan por capturar larvas de nematodos gastrointestinales por medio de redes tridimensionales (Gómez y Díaz, 2012).

Dada la realización constante de diferentes ensayos y evaluaciones de estos hongos se vuelve indispensable mantenerlos viables para en el futuro finalmente crear un bioproducto a base de estos, aun así es poca la información disponible de la conservación de estos hongos y los investigadores que poseen bancos de germoplasma de estos microorganismos (SAGARPA, 2009; Carnevalli, 2004). Esto implica evaluar y estandarizar el proceso de conservación de hongos nematófagos en el laboratorio de Corpoica para el mantenimiento de un banco que sirva de base para futuras investigaciones en el control biológico de nematodos gastrointestinales.

## 3. OBJETIVOS

### **Objetivo General**

Evaluar cinco protocolos para la criopreservación de dos cepas de hongos nematófagos nativos de Colombia

### **Objetivos Específicos**

- Revisar el estado del arte de los protocolos de conservación de microorganismos con énfasis en hongos nematófagos utilizados para control biológico de nematodos gastrointestinales de bovinos.
- Comparar los criopreservantes para los hongos nematófagos *Arthrobotrys oligospora* y *Arthrobotrys musiformis* con base en el crecimiento radial de estos hongos y susceptibilidad a contaminación secundaria.

## **1. DESCRIPCION DE ACTIVIDADES REALIZADAS**

El trabajo de laboratorio es una tarea constante que requiere mucha sensibilidad, dedicación y sobre todo concentración, es una rutina en la cual no se pueden mecanizar los procedimientos debido a que un descuido, al pensar que se tiene todo memorizado; puede ocasionar que se pierdan todas las muestras, las secuencias, los ensayos y en general la continuidad del trabajo.

Lo importante es aprender bien, ser precavido y algo perfeccionista, pensar todo el tiempo que entre más reales queramos que sean los resultados, más cuidado se debe tener en el paso a paso.

La pasantía fue dirigida por el Dr. Dildo Márquez en el laboratorio de parasitología de CORPOICA, y las labores estaban dirigidas a:

1. Apoyar el proyecto de “Estrategias para mejorar la competitividad y sostenibilidad de los sistemas de producción de leche y/o carne en la Región Andina” y el trabajo asignado de “Estandarización de preservantes y técnicas de conservación de hongos nematófagos para el control de nematodos gastrointestinales en bovinos”.
2. Apoyar el proyecto de resistencia antihelmíntica en ocasiones que por complicaciones de personal en el laboratorio así se requería.

Las tareas diarias están especificadas a continuación:

- Preparación de agar agua, PDA y agar trigo

La preparación de agar agua se realiza con el fin de sembrar muestras de materia fecal y suelo donde se aplican larvas para evaluar el potencial nematófago de los hongos, así como para hacer aislamientos de hongos recuperados que se encuentren en estos ensayos, permitir que crezcan y posteriormente recuperarlos en medios como trigo y PDA, estos medios son enriquecidos y se utilizan para conservar los hongos haciendo réplicas, cambiando continuamente a cajas nuevas con el motivo de tener un número significativo de hongos para ser utilizado en ensayos in vivo.

Se entiende como medio de cultivo un sustrato o una solución de nutrientes con el fin de que se desarrollen diversos microorganismos.

Los microorganismos son los seres más abundantes de la tierra, pueden vivir en condiciones extremas de pH, temperatura y tensión de oxígeno, colonizando una amplia diversidad de nichos ecológicos. Entre los requerimientos más importantes para su desarrollo están el carbono, el oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno.

- Siembra de materia fecal en agar agua

Al tomar muestras de suelo y materia fecal se realiza el procedimiento de siembra en agar agua con el fin de buscar nuevos hongos con propiedad nematófaga en el país.

El procedimiento es poner una porción no muy grande en el agar agua sellarlo con Parafilm® M y marcar la procedencia y la fecha de elaboración.

Figura 1. Materia fecal sembrada en agar agua



Tomado de: Archivo Personal, (2014)

- Transferencias de hongos nematófagos

Para reproducir los hongos ya comprobados en cuanto a su poder nematófago se transfieren de cajas de Petri en donde han crecido en HN sin contaminación a agar trigo que ha demostrado su beneficio debido a que conserva el HN por más tiempo y su propiedad de enriquecimiento permite que este crezca formando conidios y clamidosporas.

En la cabina con ayuda de un mechero y un asa se transfiere de una caja de Petri con el hongo sembrado totalmente limpio y sin ningún hongo contaminante, en donde se haya comprobado la existencia de conidios en el micelio, a una caja de Petri con agar enriquecido, posteriormente esta caja se sella con Parafilm® M y se rotula con el nombre del hongo y la fecha de siembra. Se conserva en un lugar seco sin luz y totalmente limpio con hongos del mismo carácter.

Figura 2. Micelio con conidióforos y conidios.



Tomado de: Archivo Personal, (2014)

- Transferencias con microscopio

En casos en donde se adquiere el HN de suelo o materia fecal, esta transferencia se realiza con un microscopio recogiendo con el asa exclusivamente conidios con el fin de reproducirlos sin contaminación del medio, este procedimiento se hace con mecheros de cada lado del microscopio y las cajas se rotulan y conservan en un mesón limpio para su revisión diaria.

- Identificación y medición de conidios

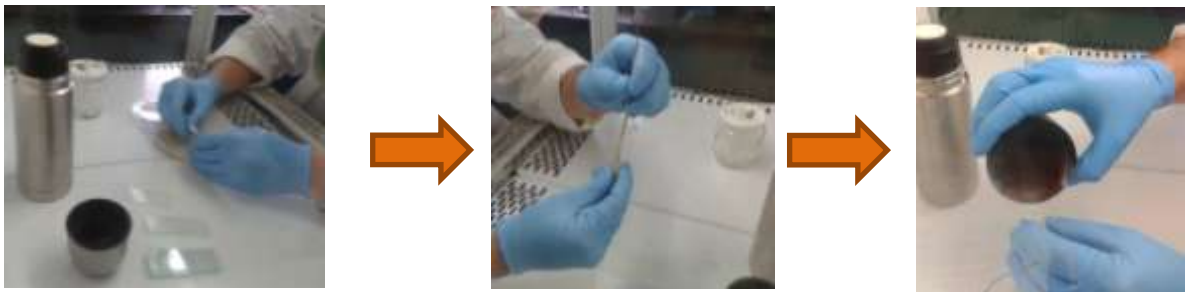
Con estas cajas y una vez crecido el hongo se realiza una identificación y medición de conidios buscando la correcta clasificación de éstos. Este procedimiento se realiza montando una lámina con cinta haciendo impresiones sobre el hongo, recogiendo parte de micelio y aplicando unas gotas de lactofenol para teñir los conidios, una vez identificados se miden con ayuda de la reglilla de la cámara de Neubauer entre 25 a 50 conidios.

- Prueba *in vitro*

- a. Se tiene el hongo identificado y las cajas de Petri sin ningún contaminante
- b. Mechero + alcohol
- c. Frascos pequeños
- d. Quemar el asa y enfriarla en agua destilada

- e. Aplicar a la caja de Petri agua en una cantidad que cubra el hongo y con el asa recoger el hongo
- f. El agua sobrenadante conteniendo el micelio del hongo se coloca en frascos pequeños
- g. Poner de a 2 o 3 cajas de Petri con el hongo por cada frasco con el fin de que quede concentrado
- h. Se vuelve a raspar con el asa el agar y las paredes de la caja de Petri con el fin de recoger conidios que puedan quedar pegados

Figura 3. Procedimiento para realizar la prueba *in vitro*



Tomado de: Archivo Personal, (2014)

- Extracción de ADN

Este procedimiento se realiza para identificar los hongos que se encuentran con características nematófagas, en busca de encontrar nuevas especies. Una vez se tenga el hongo sin contaminantes se lleva a titulación y recolección de micelio, se recuperan 200 µg, para esto se debe fracturar para liberar células y romper la pared celular, esto se lleva a cabo en un Eppendorf con guantes de nitrilo y nitrógeno líquido el cual se aplica las veces que sea necesario para macerar el hongo.

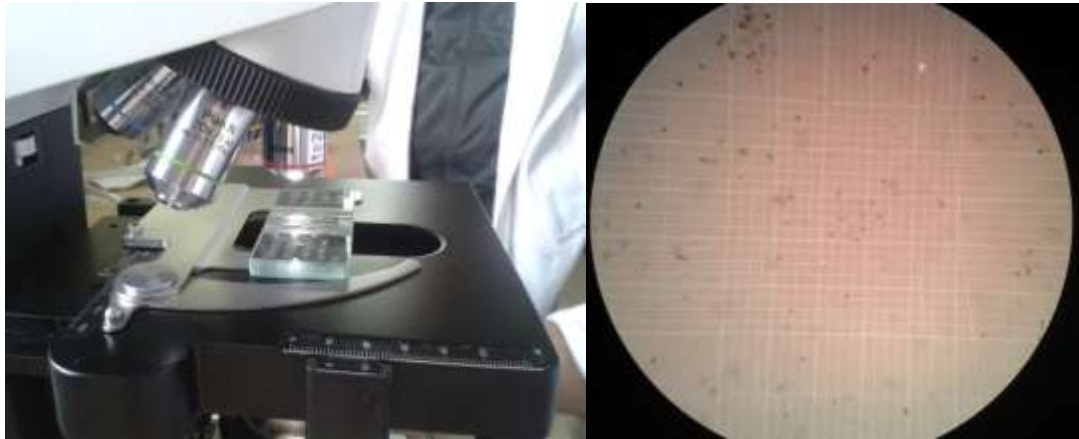
- Conteo de conidios y clamidosporas en la cámara de Neubauer

En la cámara se realiza un conteo del número de conidios y clamidosporas pero no se evalúa su morfología.

- a. Mezclar muy bien el hongo ya diluido y homogéneo
- b. Con una pipeta de 50 µL poner una gota entre la cámara de Neubauer y una laminilla
- c. Se observa en el microscopio a 10x
- d. Se cuentan los 5 recuadros y se saca un total, éste se multiplica por 10.000
- e. Con este resultado se realizan los cálculos para saber cuál es la dosis a aplicar vía oral a los animales



Figura 4. Cámara de Neubauer con reglilla para conteo de clamidosporas y conidios



Tomado de: Archivo Personal, (2014)

- Dilución de conidios y clamidosporas

Para poder contar los conidios y las clamidosporas es necesario diluirlas. En el caso de conidios se recupera el micelio del hongo con agua destilada y un asa raspando el agar hasta obtener todo el micelio ya que los conidios se encuentran en éste y para las clamidosporas es necesario macerar el agar por completo hasta obtener un medio líquido debido a que estas clamidosporas se encuentran inmersas en el agar. En los dos casos se conservan en un frasco debidamente tapado y en refrigeración para su posterior conteo y utilización.

Figura 5. Maceración de agar trigo con clamidosporas



Tomado de: Archivo Personal, (2014)

- Técnica McMaster

Una vez se dosifica a los animales con la concentración necesaria según el peso que se toma semanalmente, se recolectan las muestras de materia fecal y se realiza la técnica de McMaster donde se cuentan los huevos por gramo de los diferentes nematodos que puedan tener en el intestino los rumiantes evaluados.

- Realización de coprocultivos

Cuando se realiza el McMaster queda un sobrante de materia fecal, con el resto de materia fecal se siembran con replica en agar agua y se hacen coprocultivos; este coprocultivo se airea cada 2 a 3 días y se limpia de hongos que puedan crecer alrededor y por último se abre el día 8 para recolectar larvas, contarlas y clasificarlas.

Figura 6. Coprocultivo de materia fecal bovina

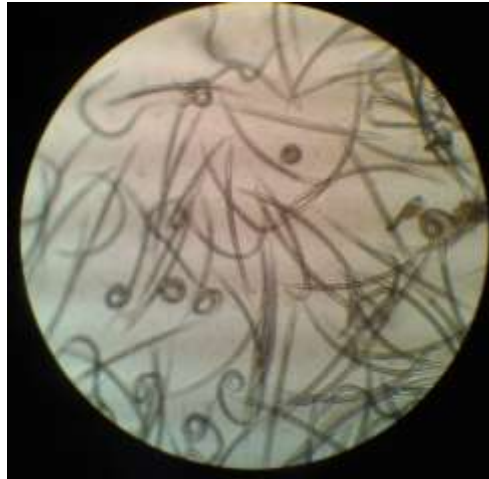


Tomado de: Archivo Personal, (2014)

- Recolección de larvas

Una vez pasados 8 días de la realización del coprocultivo y las aireaciones respectivas; se abren los coprocultivos y el frasco donde los contienen se llena por completo de agua destilada a una temperatura que no exceda a los 32°C y con precaución de no dejar salir el agua se pone boca abajo sobre una caja de Petri, allí se deja por 3 horas como mínimo y se levanta un poco el frasco, con el agua que queda en la caja de Petri en una lámina, con ayuda de una pipeta se recolectan varias gotas y se lleva al microscopio verificando la existencia de larvas, si se encuentran larvas, se recogen en un tubo de vidrio toda el agua que se encuentre en la caja de Petri, dependiendo del número de larvas, este procedimiento se realiza 3 o 4 veces cada media hora, en el caso de que haya gran cantidad de larvas se pueden realizar más de 4 veces estas recolecciones. Las larvas se conservan en la nevera.

Figura 7. Larvas L3 de nematodos gastrointestinales



Tomado de: Archivo Personal, (2014)

- Identificación y conteo de larvas

En los tubos que se guardan en la nevera con las larvas recolectadas, gracias al efecto del frío estas deben estar sedimentadas en la parte inferior del tubo, de esta manera al sacar el sobrenadante se puede poner en una lámina varias gotas del agua destilada que contienen las larvas, estas se paralizan con una solución de Lugol y se inicia el conteo y la clasificación morfológica con base en las longitudes de la cola de la vaina de la larva, número de células intestinales, longitud del esófago y presencia o ausencia de cuerpos ovales en el extremo anterior de la larva.

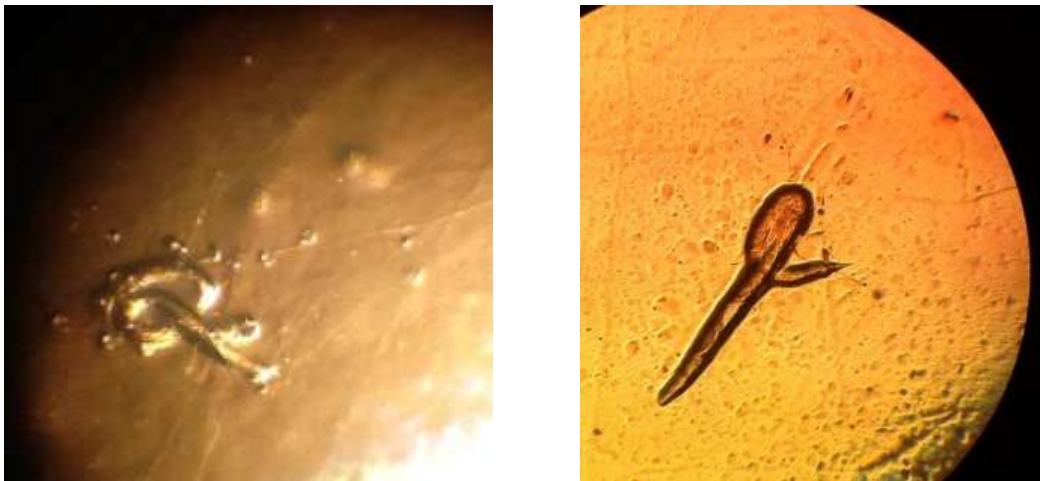
- Lavado de larvas

Para poder conservar por más tiempo las larvas se deben lavar quitando los restos de materia fecal y otras partículas que pueda tener el agua destilada en donde se mantienen; para este fin las larvas se concentran, se adiciona en proporción 1:4 larvas: solución de sacarosa al 40% previamente preparada para las larvas que están destinadas a lavar ese día ya que no se puede reutilizar; la solución de sacarosa permite que las larvas se separen del resto de partículas por densidad, estos viales se ponen en la centrifuga de frío, una vez separadas con una micropipeta se rescatan las larvas y se lavan 3, 4 o las veces que sean necesarias con agua destilada con ayuda de la centrifuga con el fin de retirar la solución de sacarosa. Las larvas se conservan en cajas de Petri o en cajas de cultivo celular con agua destilada en refrigeración.

- Revisión de cajas sembradas

Constantemente se deben revisar todas las cajas sembradas para eliminar las contaminadas y para hacer seguimiento a las transferencias así como a los hongos que a través de los días van demostrando su actividad nematófaga en las siguientes imágenes se evidencian larvas atrapadas y contaminantes que hacen difícil la tarea de pasar en muchas ocasiones los hongos y que reafirman el objetivo de este trabajo al conservar los hongos de una manera efectiva.

Figura 8. Larvas atrapadas por hongos nematófagos.



Tomado de: Archivo Personal, (2014)

Figura 9. Hongos contaminados.



Tomado de: Archivo Personal, (2014)

## 2. HONGOS NEMATÓFAGOS

### 2.1 Definición

Los hongos nematófagos tienen la facultad de alimentarse de nematodos y huevos de nematodos, tienen diferentes formas de alimentarse predando y capturando las larvas en las heces antes de que se trasladen a las pasturas, evitando así su ingestión por los animales en pastoreo, de esta manera este es un factor de prevención debido a que un 3-5% de la biomasa parasitaria se encuentra a nivel gastrointestinal, lo que significa que la fracción más significativa se encuentra en la pradera (Orozco, 2009).

Se clasifican en: hongos atrapadores que forman trampas con las hifas, entre los cuales se encuentran los Deuteromycetes: *Arthrobotrys oligospora*, *Monacrosporium haptotylum* y *Monacrosporium gephyropagum* y Zygomycetes: *Stylopagehadra* y *Arthrobotrys dactyloides* (Orozco, 2009).

Los hongos atrapadores se caracterizan por desarrollar su micelio fuera de su huésped, por lo tanto viven como saprófitos y atrapan a sus presas con las hifas vegetativas o en trampas especiales. Esto significa que sólo las etapas de nematodos móviles están atrapados (Barron, 1977).

También desarrollan trampas especiales: redes tridimensionales adhesivas, ramas columnares adhesivas, perillas adhesivas, anillos de constricción y anillos no constrictores (Barron, 1977).

Los hongos endoparásitos que utilizan sus esporas para infectar nematodos como: *Catenaria anguillulae*, *Drechmeria coniospora* y *Hirsutella hirsutella* (Barron, 1977).

Excepto para el desarrollo y la difusión de las esporas, el ciclo de vida de los endoparásitos se lleva a cabo dentro del huésped. Dependiendo de la especie, ninguna

de las etapas de nematodos pueden ser atacados. La forma de la infección puede ser por vía oral (por ejemplo *Harposporium anguillulae* Lohde) o en la mayoría de las especies percutánea. Sólo el segundo grupo es de importancia para el control biológico de nematodos fitopatógenos, porque nematodos no pueden tragar enteros esporas, en cambio, algunos de ellos son capaces de succionar conidios del hongo (Sagües, 2011).

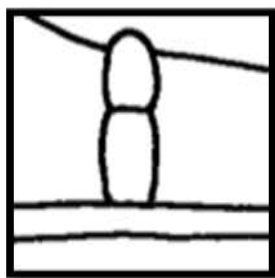
Los hongos parásitos de huevos y hembras entre ese grupo se encuentran: *Catenaria auxiliaris*, *Lagenidium spp*, *Nematophthora gynophila*, *Verticillium chlamydosporium* y *Heterodera avenae* (Sagües, 2011).

El modo de acción es destruir los huevos penetrándolos e infectándolos, también pueden causar una ruptura brusca en las larvas o embriones contenidas en los huevos, esto es posible porque hace contacto entre la superficie del huevo y la hifa, después el hongo forma una dilatación en este punto de contacto y deteriora el complejo proteína-quitina de la parte exterior del huevo cambiando la conformación de la cáscara, debilitándola y permitiendo que entre al huevo y consuma al embrión (Carvalho, 2013).

Los HN y los nematodos viven en diferentes ambientes, están sobre el suelo y son muy resistentes a diferentes pH, temperaturas (Carvalho, 2013).

## 2.2 Tipos de trampas de hongos predadores

Figura 11. Ramas columnares adhesivas



Fuente: Philip Jacob

*Dactylella lobata*, *Monacrosporium cionopagum*. *Monacrosporium gephyropagum*

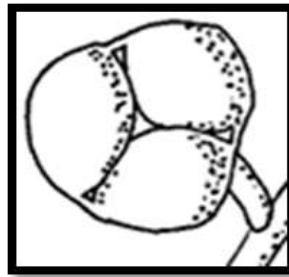
Las ramas de las hifas tienen tres columnas unicelulares cubiertas con una sustancia adhesiva. A veces el desarrollo de mallas o escaleras (Jacob, 1997).

Figura 12. Redes Tridimensionales adhesivas



Fuente: Philip Jacob Cubiertas con una sustancia adhesiva. Diámetro 20-59 micras. Alta cuota de captura in vitro debido a su estructura tridimensional (Jacob, 1997).

Figura 13. Anillos constrictores



Fuente: Philip Jacob

*Monacrosporium doedycoides*, *Arthrobotrys dactyloides*, *Dactylaria brochopaga*

Anillos unicelulares. Diámetro 20-50 micras. Las células se expanden hacia el lado interior cuando es tocado allí y atrapan las presas, rotíferos y protozoos, así como los nematodos (Jacob, 1997).

Figura 14. Anillos no constrictores

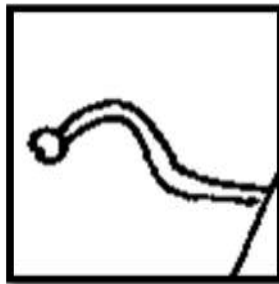


Fuente: Philip Jacob

*Dactylella leptospora*, *Dactylella candida*

Anillos unicelulares. Diámetro 20-50 micras. La presa se enreda al tratar de pasar (Jacob, 1997).

Figura 15. Perillas adhesivas esféricas u ovaladas



Fuente: Philip Jacob

*Monacrosporium ellipsosporum*, *Dactylella leptospora*, *Dactylella candida*

Multinuclear sincitios cubierto con sustancia adhesiva. Diámetro 6-10 micras. En 1-3 unicelular, tallos no adhesivos (Jacob, 1997).

Figura 15. Perillas adhesivas en forma de reloj de arena





Fuente: Philip Jacob

Teleomorfos Hohenbuehelia / Resupinatus con anamorfo (género Form) Nematoctonus, ejemplos: *Nematoctonus leiosporus* *Nematoctonus GeoGenius* / *Hohenbuehelia petalodes* (Jacob, 1997).

Multinuclear sincitios cubierto con sustancia adhesiva. Diámetro 12-20 micras. En esterigmas (tallos cortos, no celulares). Muy adhesivo (Jacob, 1997).

### 2.3 Hongos utilizados en el ensayo de conservación

#### *Arthrobotrys oligospora*

*A. oligospora* es de los hongos nematodos que atrapan larvas de nematodos gastrointestinales, es el que más se estudiado, las cepas se han encontrado en diversos ambientes de suelos, incluyendo suelos contaminados con metales pesados y madera en descomposición donde viven principalmente como saprófitos. En la presencia de nematodos este hongo pasa a fase parasitaria mediante la formación de redes tridimensionales complejas para atrapar los nematodos puede producir una estructura especializada de la red, formado por una rama lateral erecta que crece de una hifa vegetativa, curvándose para fusionarse con la hifa padres y desarrollar más lazos externos al bucle original o en la hifa de los padres. También los conidióforos de *A. oligospora* se pueden desarrollar directamente en una estructura de red compleja (Niu, 2011). El atrapamiento inicia una serie de procesos que incluyen la adhesión, penetración, y la inmovilización de los nematodos. La capacidad de atrapar nematodos hace que sea un agente candidato atractivo para el control de nematodos parásitos de plantas y animales (Jacob, 1997).

*A. oligospora* puede crecer en ambientes diversos, incluyendo suelos, alrededor de las raíces de las plantas y las heces de los animales, y es especialmente extendida en ambientes infestados de nematodos. *A. oligospora* tiene una alta capacidad saprofita y eficiente utiliza una diversidad de hidratos de carbono. La ubicuidad aparente y caracteres biológicos de *A. oligospora* están fuertemente correlacionados con sus habilidades infecciosos hacia nematodos. Los grandes aumentos en los nematodos residentes suelen dar lugar a un gran aumento en los propágulos *A. oligospora*, y las respuestas de *A. oligospora* a nematodos son generalmente mucho más fuertes que las

de otros hongos de captura. Estas características han hecho *A. oligospora* un candidato excelente a partir del cual desarrollar un agente de control biológico eficaz (Niua, 2011).

Las estructuras de trampas son formadas por micelios o conidios que se organizan a partir de esporas directamente sobre la germinación sin una fase intermedia de hifas, y se pueden encontrar en estiércol de la vaca y otros lugares de la naturaleza, las trampas de conidios son capaces de atrapar los nematodos como trampas de red. Se adhieren a un nematodo que pasa y pueden ser arrastrados y se propagan por el nematodo de una manera similar a la adherencia de los conidios de hongos nematófagos endoparásitos. La producción de las trampas de conidios puede indicar un mayor potencial del hongo como antagonistas de los nematodos. Trampas de conidios también han sido consideradas como estructuras de supervivencia, similar a las redes de adhesivo convencional, basado en el hecho de que trampas de red adhesivas pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en el laboratorio en comparación con hifas normales (Niua, 2011).

#### *Arthrobotrys musiformis*

Es un hongo nematófago utilizado para capturar los nematodos y es bien conocido (tomado de Araújo, 1998; Gomes et al ., 2001; Bordallo et al ., 2002; Nordbring -Hertz et al, 2002 ; Kano *et al.*, 2004 ) citado por (Fermino, 2006). Sin embargo, el tipo de estructuras de nematodos que atrapan depende de la especie o incluso las cepas de las especies y en ambas condiciones ambientales bióticas y abióticas. El hongo actúa como biocontrol de nematodos y han sido estudiados en su mayoría en zonas tropicales y en el área de producción en cultivos y también en nematodos gastrointestinales en rumiantes en estrategias como agentes de biocontrol potenciales (Fermino, 2006).

### **3. NEMATODOS GASTROINTESTINALES**

Los nematodos son helmintos de forma cilíndrica que al llegar a su estadio adulto miden menos de un milímetro y alcanzan hasta más de 25 cm, el cuerpo está cubierto de una cutícula elástica pero bastante dura, que puede llevar espículas, garfios u otras estructuras externas. No muestran ninguna segmentación, poseen un sistema digestivo completo, así como órganos reproductores y sistemas nerviosos, pero carecen de un sistema circulatorio y de órganos excretores. La boca se sitúa de ordinario en posición terminal, es decir, en el extremo anterior, y con frecuencia posee estructuras especializadas (ventosas, garfios, placas cortantes, etc.) para adherirse al hospedador o alimentarse de él. En las hembras, el útero termina en una apertura vaginal denominada vulva. Los machos poseen un par de órganos quitinosos, las espículas copulatorias que les sirven para prenderse a la hembra durante la copulación. Los machos de los nematodos estróngilos disponen de una así llamada bolsa o bursa copulatrix en su extremo posterior que consiste en una expansión de la cutícula en forma de embudo que facilita la copulación. La morfología de estos órganos reproductivos es muy específica de cada especie y se usa para su clasificación sistemática. La infección con nematodos se denomina nematodiasis (Junquera, 2014).

#### **3.1 Ciclo de vida**

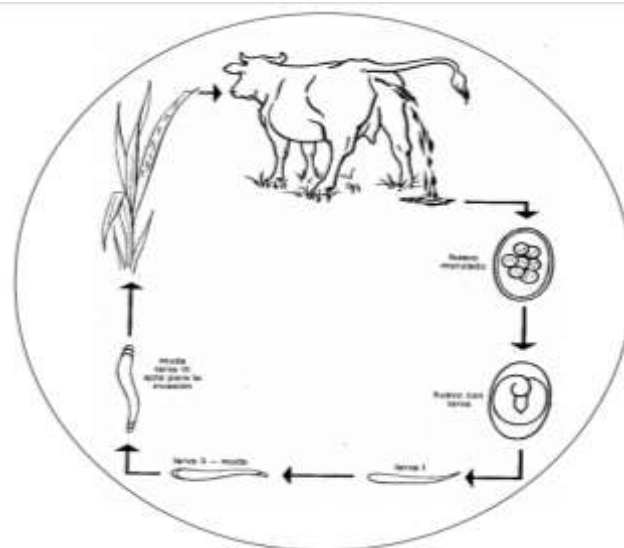
El ciclo de vida de la mayoría de estos endoparásitos es directo y se desarrolla en dos fases: una fase parasitaria y una de vida libre. Dentro del hospedador final, las hembras producen miles de huevos que se excretan al exterior en las heces del hospedador y contaminan pasturas, flujos de agua y en condiciones favorables de temperatura y humedad, en los huevos se desarrollan a larvas del primer estadio (L1) que eclosionan a las pocas horas. En condiciones adversas, el desarrollo dura más o los huevos mueren (Junquera, 2014).

Las larvas eclosionadas viven en la vegetación o en medio acuático y se alimentan de bacterias y microorganismos. Como la piel es rígida, el crecimiento a los estadios 2 y 3 (L2 y L3) exige mudas sucesivas. Las larvas L3 son ya infecciosas para el ganado. Mediante películas de agua se trasladan a las pasturas y se ubican en las partes superiores (ápice) de éstas, donde las posibilidades para ser ingeridas por un animal que está pastando se incrementan (Junquera, 2014).

Una vez dentro del hospedador migran a su sitio u órgano predilecto en el que continúan su desarrollo a larvas del estadio 4 (L4) y finalmente al estadio adulto y a la madurez sexual (Junquera, 2014).

Bajo ciertas condiciones ambientales (sequía o frío excesivo) las larvas L3 y L4 de ciertas especies pueden interrumpir su desarrollo dentro del huésped durante un tiempo que puede durar meses (hipobiosis). Se denominan entonces larvas inhibidas, paradas, hipobióticas o durmientes. Este fenómeno se da p.ej. para *Ostertagia* spp., *Cooperia* spp. y otras especies. Los mecanismos que provocan el inicio de la hipobiosis y el subsiguiente reinicio del desarrollo son poco conocidos (Junquera, 2014).

Figura 17. Ciclo de vida de los nematodos gastrointestinales



Fuente: Archivo de Bayer, (1968)

### 3.2 Especies de nematodos Gastrointestinales de rumiantes

Cuando un animal es afectado por varias especies de nematodos gastrointestinales al mismo tiempo esto se llama infección mixta (Junquera, 2014). Las especies más comunes que realizan estas infestaciones múltiples o mixtas son los *Estrongilidos* tales como: *Bunostomum*, *Cooperia*, *Haemonchus*, *Mecistocirrus*, *Nematodirus*, *Oesophagostomum*, *Ostertagia (Teladorsagia)* y *Trichostrongylus*. La presencia conjunta y abundancia relativa de unas u otras especies depende de la región geográfica, del clima, del tipo de ganado, etc (Junquera, 2014).

Las infecciones mixtas complican también el control químico, pues ocurre a veces que la dosis suficiente para controlar una especie no basta para controlar otra. Y como a menudo se aplican tratamientos preventivos, sin saber con precisión qué especies están presentes, hay que aplicar la dosis necesaria para controlar la especie que necesita una dosis mayor. Es decir, hace falta usar más producto del necesario para controlar la mayoría de las otras especies de gusanos. Esto se agrava más aún allí donde algunas especies han desarrollado resistencia a los antihelmínticos, un problema muy extendido, sobre todo en ovinos. Puede ocurrir, p.ej., que un producto hasta ahora suficientemente eficaz y económico no baste ya para controlar todos los gusanos, pues algunos se han vuelto resistentes. Esto puede exigir aplicar otro producto adicional lo que aumenta los costos y complica el manejo (Junquera, 2014).

Las larvas gastrointestinales que se encuentran en países de climas tropicales como Colombia son: *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.*, *Cooperia spp.* Y *Oesophagostomum spp.* Los métodos de conservación son: nitrógeno líquido (Campbel, 1973), DMSO (Gill, 1995) con el fin de que sean viables una vez se reactiven (Guzmán, 2012).

Tabla 1. Especies de nematodos gastrointestinales en rumiantes

ESPECIE	ÓRGANOS PREDILECTOS	ANIMALES AFECTADOS
<i>Bunostomum</i> spp	Intestino delgado	Bovinos, ovinos, caprinos
<i>Chabertia ovina</i>	Intestino grueso	Ovinos y caprinos
<i>Cooperia</i> spp.	Intestino delgado	Bovinos, ovinos, caprinos
<i>Gongylonema</i> spp.	Esófago y estómago (rumen)	Ovinos, caprinos; bovinos
<i>Haemonchus</i> spp.	Estómago (cuajar)	Bovinos, ovinos, caprinos
<i>Mecistocirrus digitatus</i>	Estómago (cuajar)	Bovinos, ovinos, caprinos
<i>Nematodirus</i> spp.	Intestino delgado	Bovinos, ovinos, caprinos
<i>Oesophagostomum</i> spp.	Intestino grueso	Bovinos, ovinos, caprinos

<i>Ostertagia=Teladorsagia</i> spp.	Estómago (cuajar) e intestino delgado	Bovinos, ovinos, caprinos
<i>Skjabinema</i> spp.	Intestino grueso (ciego)	Ovinos y caprinos
<i>Strongyloides</i> spp	Intestino delgado	Bovinos, ovinos, caprinos
<i>Toxocaravitulorum</i>	Intestino delgado	Bovinos
<i>Trichostrongylus</i> spp. <i>T. axei</i>	Estómago (cuajar); otros: intestino delgado	Bovinos, ovinos, caprinos
<i>Trichuris</i> spp.	Intestino grueso	Bovinos, ovinos, caprinos

Tomado de: parasitipedia.net

Tabla 2. Efectos causados por nematodos más destacados.

Género	Localización	Efecto
<i>Haemonchus</i> sp.	Abomaso	Anemia, gastritis
<i>Trichostrongylus axei</i>	Abomaso	Abomasitis, gastritis, úlceras profundas, diarreas severas, alteraciones del pH
<i>Ostertagia</i> sp.	Abomaso	Anemia, nódulos, alteraciones del pH, afecta la producción de pepsinógeno
<i>Cooperia</i> sp.	Intestino delgado	Enteritis, anemia, diarreas
<i>Strongyloides papillosus</i>	Intestino delgado	Enteritis y enflaquecimiento
<i>Bonostomum</i> sp.	Intestino delgado	Enteritis
<i>Oesophagostomum</i> sp.	Intestino grueso	Enflaquecimiento, diarreas, pérdidas de proteína plasmática

Tomado de: (Soca, 2005).

#### 4. CONTROL BIOLÓGICO

En la naturaleza existen estrategias establecidas de diferentes microorganismos que atacan a nematodos y ejercen un control natural, pero este hallazgo que se produjo hace más de 100 años por el hombre no había sido usado para combatir los problemas parasitológicos que se llevan a cabo en las producciones animales, incluso en los problemas parasitológicos de mascotas (Mendoza de Gives, 2011). Actualmente, tal vez debido al complejo problema de resistencia antihelmíntica por el que cursa el mundo entero, se ve necesaria la investigación de dichos microorganismos para controlar de forma biológica los problemas que conllevaron el inadecuado uso de los antihelmínticos por parte de productores, ganaderos e incluso profesionales veterinarios. En busca de una solución al problema que ya se conoce de forma extensa se investigan bacterias que fagocitan nematodos (Vasquez, 2012), extractos de plantas que liquidan nematodos (Moreno, 2010), incluso plantas que por sus cualidades químicas exterminan nematodos y están siendo dadas vía oral a los animales, nematodos que comen nematodos, protozoos (Avila, 2005), artrópodos como lo son los escarabajos estercoleros que

mueven las heces y no permiten que las larvas sigan su ciclo en pasturas y por último el motivo de este trabajo hongos nematófagos (Saumell, 2008).

La resistencia antihelmíntica es un problema mundial que actualmente causa pérdidas económicas importantes a productores en el área ovina y bovina, (Prichard, 2007) tal situación ha obligado a investigadores veterinarios a buscar una solución desde el control biológico y es en ese ámbito en donde entran a jugar un papel muy importante los hongos nematófagos (HN). En el laboratorio de CORPOICA se aíslan, estudian, conservan y reproducen, estos hongos además se aplican vía oral en los ensayos in vivo a un grupo de bovinos en iguales condiciones fisiológicas con 2 tipos de HN y un grupo control evaluando la acción nematófaga de estos para su posible utilización como control biológico.

El control biológico promete una alternativa eficiente y segura en la reducción en la población de parásitos que viven de forma natural en las pasturas y que viven en el sistema gástrico por el consumo de pasto de los animales, de esta manera se realizaría una profilaxis que previene la aparición de problemas parasitarios (Saumell C. A., 2000).

Por último el control biológico se define como el interés por desarrollar alternativas no químicas para el control de los helmintos y las enfermedades parasíticas, y está encaminado a la eliminación de parásitos en la vida libre y no en el animal como lo hacen los antihelmínticos químicos, además de esto el factor económico influye en la decisión para el productor ya que la naturaleza se encarga de combatir a los nematodos gastrointestinales, otra ventaja es la eliminación de residuos químicos en carne y leche que afectan notoriamente a los productores y se ha convertido en un problema de salud pública, la aparición de resistencia a antihelmínticos y aún más a la combinación de estos lo cual es un problema mundial y que actualmente afecta a los productores colombianos en especial el sector ovino (Marquez, 2003).

## **5. MÉTODOS DE PRESERVACIÓN DE HONGOS**

Para evitar la degeneración y el envejecimiento de las cepas es necesario preservarlas adecuadamente y retardar, hasta donde sea posible, los cambios degenerativos normales que ocurren en las células. La declinación en las características deseables de una cepa, se han atribuido a diferentes factores que actúan en el almacenamiento de la misma, como se enumeran a continuación: Carencia o agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo; acumulación de secreciones tóxicas propias del metabolismo del hongo; alteración del pH en el medio (acidez o alcalinidad); disminución en la concentración de oxígeno y la consecuente acumulación de CO<sub>2</sub> (Ryan, 2000).

En la actualidad existen protocolos de preservación que prueban la viabilidad de los hongos después de cierto tiempo de conservación, cada protocolo depende del hongo que se va a conservar dependiendo de sus características morfológicas y bioquímicas, los factores que influyen en la recuperación y el crecimiento de los mismos, tales como requerimientos nutricionales del medio de cultivo, pH y actividad del agua, la temperatura bajo la cual se almacenan y las condiciones de luz y aireación (Estrada, 2003).

### **5.1 Criopreservación**

En estas condiciones el agua, mayor componente de las células vivientes, pasa de fase líquida a sólida. Las temperaturas utilizadas en congelación pueden ser de  $-20$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y temperaturas de nitrógeno (fase de vapor  $-140^{\circ}\text{C}$ ; fase líquida  $-196^{\circ}\text{C}$ ). La temperatura de almacenamiento seleccionada depende de las facilidades disponibles; teniendo las temperaturas más bajas, un mayor tiempo de almacenamiento sin variación de cualidades genéticas.

Existen muchos factores que pueden afectar la viabilidad y estabilidad de los cultivos durante el proceso de congelación, como son la edad de las células, la velocidad de congelación-descongelación, la temperatura de almacenamiento y el empleo de agentes crioprotectores. Estos últimos son compuestos químicos de gran afinidad por el agua. Tales sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Entre los crioprotectores más utilizados se encuentran el glicerol, dimetilsulfóxido, leche descremada, inositol, sacarosa, glucosa, lactosa [García y Uruburu, 2001; Uzunova-Doneva y Donev, 2004-2005] citado por (Gato, 2010).

### **5.2 Liofilización**

La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío [ACTT, 2000] citado por (Gato, 2010). La técnica contiene ciertos pasos de congelación y deshidratación, así como las características físico-químicas del medio de suspensión, el tipo de microorganismo, el estado fisiológico del cultivo, las condiciones del cultivo y la concentración de los microorganismos, que aseguran un resultado de viabilidad de las cepas (Smith, 1983).

Para realizar este procedimiento se deben tener recursos en el laboratorio tales como el equipo liofilizador con un sistema de vacío y ciertos elementos de preservación lo que hace de este proceso algo inaccesible por su alto costo del equipo especializado (Smith, 1983).

Otra desventaja para los hongos que forman esporas de  $10\ \mu\text{m}$  de diámetro, es que colapsan durante el proceso dañándolas estructuralmente y en el caso de las de tamaño menor pueden morir por ruptura debido a la formación de cristales de agua (Smith, 1983).

#### **Métodos de conservación de corta duración**

Las ventajas es que son económicos, y necesitan pocos materiales del laboratorio, además se mantienen las cepas por poco tiempo y los protocolos pueden ser usados por personal del laboratorio sin necesidad de capacitación.

Las desventajas son la pérdida por muchas transferencias de nombres o designaciones de los cultivos; el riesgo de contaminación y de cambios genéticos que se incrementa a mayor número de transferencias; la posible inoculación con el microorganismo equivocado cuando se realiza la transferencia de una serie de cepas; el peligro de pérdida del cultivo, sobre todo cuando se trabaja con microorganismos delicados y no se realizan transferencias periódicas a medios frescos; la posibilidad de que ocurra deshidratación del medio de cultivo. Además, cuando hay muchos microorganismos el trabajo es muy intenso y se requiere un espacio grande para el almacenamiento (Smith, 1983).

### **5.3 Conservación en capa de aceite mineral**

Este método permite conservar micelio y otros órganos no esporulados pues debido a la formación de cristales, la congelación no es recomendable por posible ruptura y muerte, es viable en climas tropicales para prevenir la desecación del cultivo e impedir la penetración de ácaros. Es un método fácil de realizar y no requiere de equipos caros. Con esto se consigue también evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su concentración (Gato, 2010).

La esencia del método está en cubrir el cultivo bien desarrollado sobre medio nutritivo líquido o agarizado con el aceite mineral no tóxico y estéril, como la parafina o vaselina; también se usa petrolato líquido y tiene una duración de varios años, se han reportado casos de 30 años, [Uzunova-Doneva y Donev, 2004-2005] citados por (Gato 2010). Su mayor desventaja es que el hongo puede continuar su crecimiento, al menos durante los primeros períodos, y así ocurrir que sobrevivan mutantes capaces de crecer bajo las condiciones adversas que implican la conservación.

El protocolo descrito por [Little y Gordon 1967] citado por (Rodríguez, 2010), modificado por Deshmukh (2003), donde cultivos jóvenes esporulados de 72 h de incubación fueron cubiertos completamente con aceite mineral previamente esterilizado a 121°C durante 15 min. Los bulbos se taparon con tapa de goma y tapas metálicas, y se almacenaron en refrigeración a 4°C.

### **5.4 Desecación en Silica gel**

Es un método utilizado en hongos esporulados, se preserva en leche descremada y en granos de silica gel, en este medio se ha demostrado que duran de cuatro a cinco años, teniendo en cuenta el medio inicial de crecimiento del hongo.

Este método tiene como ventaja que evita el crecimiento de hongos contaminantes y disminuye el metabolismo al estar en ausencia de agua (Gato, 2010).

Protocolo descrito por [Perkinson, 1962] citado por (Rodríguez 2010), modificado por Deshmukh (2003). Cinco gramos de silica gel no indicadora fueron distribuidos en tubos de cristal tapados con papel metálico, esterilizados a 180°C por 3 h. Cuando estuvieron frescos se colocaron en una bandeja de metal que contenía agua suficiente para cubrir los frascos hasta el nivel de la silica contenida dentro de los tubos. De esta manera las



bandejas se colocaron en congeladores por 24 h. La suspensión de esporas se realizó en leche descremada estéril al 5% a partir de un cultivo fresco en medio agarizado y se dejó en refrigeración durante 24 h. En condiciones de esterilidad se agregó 1 ml de suspensión de conidios a la silica gel para garantizar que quedara solo humedecida. A fin de mantener un bajo contenido de humedad dentro de los tubos, se mantuvieron con tapones de algodón durante 14 días en un ambiente seco y refrigerado, luego se le colocaron tapas de gomas y tapas metálicas y se almacenaron a 4°C (Gato, 2010).

### **5.5 Agua destilada**

Es un método muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en los hongos filamentosos, en períodos a veces superiores a cinco años. Aparentemente el agua suprime cambios morfológicos en muchos hongos. Es un método simple, económico y seguro, capaz de garantizar la supervivencia de los cultivos fúngicos por períodos prolongados, y evita el pleomorfismo y la contaminación con ácaros. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia y el poder fermentativo [Pasarell y McGinnis, 1992; Malik y Hoffmann, 1993] citados por (Gato, 2010).

La conservación en agua destilada estéril se realizó según la metodología descrita por Castellani (1967), modificado por Deshmukh (2003), con la diferencia que 1 ml de la suspensión de esporas obtenida directamente del cultivo se centrifuga en tubos Eppendorf, con capacidad de 1,5 ml a 12 000 r.p.m. durante 5 min, se descarta el sobrenadante y se resuspende el concentrado celular en 1 ml de agua destilada estéril. La cepa conservada por este método se almacena en refrigeración a 4°C (Gato, 2010).

### **5.6 Glicerol**

Congelación en glicerol a -10 o -25 °C para esto, se obtiene una suspensión de esporas del hongo en agua destilada más glicerol al 10% y luego de dispensar 2 ml en viales de polipropileno, se somete a un proceso de congelación gradual. Pueden utilizarse temperaturas de congelación bajo 0°C, pero se recomienda el almacenamiento del material biológico de -15 a -25°C para asegurar una mayor viabilidad e integridad de este a través del tiempo. Con el propósito de proveer suficiente material y asegurar un inóculo homogéneo para pruebas que se deben realizar con cierta periodicidad, se preparan suspensiones celulares de concentración conocida en glicerol al 10%, las cuales se almacenan hasta el momento de la realización de las pruebas (Smith, 1983).

### **5.7 Preservación en DMSO**

Para observar la criopreservación del aislado, un inóculo de 0,5ml de cultivo de hongos activos de 3 a 4 días de edad, se instala en crioviales pregaseados (1,5 ml), y los tubos

se separan cargados con 1 ml de los crioprotectores (0,5 ml ya sea de 10% de glicerol, 10% de DMSO, o 10% de glicol de etileno, más 0,5 ml de 10% de licor de rumen libre de células estéril). Los tubos (en triplicado) se colocan a continuación durante aproximadamente 1 hora en el del frigorífico (5-7° C) y después se mantienen a -70 °C. Para la conservación a -196° C, los tubos se preservan durante aproximadamente 1 hora en el refrigerador (5-7 °C) y luego durante 24 horas a -70° C, y se transfirieren luego a -196° C. Un conjunto de tubos de cada tratamiento. Esto se lleva a cabo después de 7, 15, 30, 60, y 90 días, descongelados moviendo entre las palmas de las manos, y 0,5 ml se utiliza para examinar la viabilidad del aislado fúngico usando el método de tubo (Joblin 1981).

### **5.8 Mantenimiento en arena/tierra**

Es una técnica utilizada en el laboratorio para el mantenimiento de cultivos de importancia comercial, se utiliza en cultivos de hongos que producen esporas y estructuras de resistencia, las cepas pueden almacenarse en varios sustratos como arena, papel filtro o perlas de vidrio. La técnica se trata en esterilizar y secar el suelo el cual es utilizado como medio absorbente para una pequeña cantidad de inóculo y se ha comprobado una eficacia de 3 años de preservación en medio ambiente y 8 años en refrigeración a 5°C; otro hallazgo encontrado es la utilización de este método para hongos que no precisamente provienen del suelo (Smith, 1983).

### **5.9 Transferencia Continua**

Es el método tradicional para la preservación de hongos pero tiene algunas desventajas, como son la posibilidad de la pérdida de la identificación del microorganismo después de muchas transferencias de nombres o designaciones de los cultivos; el riesgo de contaminación y de cambios genéticos que se incrementa a mayor número de transferencias; la posible inoculación con el microorganismo equivocado cuando se realiza la transferencia de una serie de cepas; el peligro de pérdida del cultivo, sobre todo cuando se trabaja con microorganismos delicados y no se realizan transferencias periódicas a medios frescos; la posibilidad de que ocurra deshidratación del medio de cultivo. Además, cuando hay muchos microorganismos el trabajo es muy intenso y se requiere un espacio grande para el almacenamiento (Smith, 1983).

## **6. MATERIALES Y METODOS**

Se evaluaron 5 métodos de conservación de hongos cada uno con 10 viales utilizando 2 grupos de hongos; *A. musiformis* y *A. oligospora* cada uno con 5 viales por método de

conservación, se evaluó glicerol, Silica gel, DMSO, suelo y aceite mineral. Al final de 7 días se determinó microscópicamente la efectividad de cada medio comprobando existencia de contaminación, poder de reproducción, facultad de atrapamiento de nematodos

### **6.1 Protocolo de conservación de hongos en Glicerol**

#### Materiales

- Hongo *A. musiformis*
- Hongo *A. oligospora*
- Agua destilada
- Glicerol
- Viales de 2 cm de tapa rosca
- Autoclave
- Cabina de flujo laminar
- Laminas autoclavadas
- Vortex
- Refrigerador (-70°C)

#### Metodología

1. Se realiza una solución de glicerol al 20% teniendo 20 ml de glicerol y 80 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se autoclava por 1 hora
2. En 10 viales agregar 1ml de la solución de glicerol dentro de la cabina teniendo en cuenta que son 5 viales por cada cepa. Rotular los frascos
3. Con una lámina arrastras micelio de cada hongo con el centímetro del vial correspondiente a cada hongo
4. Recuperar el centímetro de la solución de glicerol con el micelio y colocar nuevamente en el frasco
5. Homogenizar en el vortex
6. Dejar durante 2 horas a temperatura ambiente
7. Poner en el refrigeración a -70 °C (Andrade, 2003).

### **6.2 Protocolo de conservación en Silica - Gel**

#### Materiales

- Tubos de vidrio (100mm x 13mm de diámetro)
- Algodón
- Silica gel
- H<sub>2</sub>O destilada
- Vortex
- Leche descremada
- Autoclave

- Pipetas Pasteur
- Laminas estériles
- Escobillones de algodón
- Hielo y agua común
- Nevera
- Hongo *A. musiformis*
- Hongo *A. oligospora*

#### Metodología

1. Poner tapón de algodón a tubos y rotularlos
2. Poner 65mm de Silica gel en el frasco y tapar con algodón
3. Agregar agua estéril retirar con una lámina el micelio y recolectar 0,5ml
4. Autoclavar la leche descremada y adicionar a cada micelio recolectado 0,5ml
5. Con una pipeta agregar gota a gota a cada vial con silica gel su respectivo hongo según la rotulación
6. Agitar con un escobillón hasta homogenizar la mezcla
7. Colocar en baño de hielo y agua
8. Dejar secar a temperatura ambiente
9. Poner en la nevera de -5 °C a -20 °C (Mueller, 2011).

### 6.3 Protocolo de conservación en Aceite Mineral

#### Materiales

- Botellas de vidrio de 60 ml
- Aceite mineral
- Autoclave
- Agua destilada
- Nevera
- Laminas
- Hongo *A. musiformis*
- Hongo *A. oligospora*

#### Metodología

1. Autoclavar 2 veces el aceite mineral a 121°C por 15 minutos
2. Los cultivos de los hongos se recolectan en botellas de vidrio, a continuación, el aceite mineral se vierte sobre los cultivos. Esto es para evitar la deshidratación y

para frenar las actividades del metabolismo y el crecimiento, debido a la falta de oxígeno

3. vuelva a crecer a partir de aceite: retirarse y tomar algunas colonias utilizando inocular asa estéril en el medio de agar fresco

La conservación en aceite mineral se realizó según el protocolo descrito por Little y Gordon (1967), modificado por Deshmukh (2003), donde cultivos jóvenes esporulados de 72 h de incubación fueron cubiertos completamente con aceite mineral previamente esterilizado a 121°C durante 15 min. Los bulbos se taparon con tapa de goma y tapas metálicas, y se almacenaron en refrigeración a 4°C (Mueller, 2011).

#### **6.4 Protocolo de conservación en Suelo**

##### Materiales

- Botellas de vidrio de 60 ml
- Suelo
- Autoclave
- Agua destilada
- Nevera
- Laminas
- Hongo *A. musiformis*
- Hongo *A. oligospora*

##### Metodología

1. Llenar los tubos dos terceras partes de tierra y autoclavar durante 20 minutos a 120°C
2. Dejar enfriar los tubos y volver a autoclavar
3. Se añade agua destilada a la superficie de la caja de Petri conteniendo cada hongo y con la lámina raspar el micelio y recuperarlo
4. Rotular los tubos y poner sobre la tierra 1 ml de cada hongo según corresponda
5. Después de 2 a 14 días de crecimiento a temperatura ambiente, las botellas se tapan sin apretar y se guardan en el refrigerador a 4 ° C.
6. Para recuperar el hongo, unos cuantos granos de suelo se dispersan sobre medio de agar fresco (Andrade, 2003).

#### **6.5 Protocolo de conservación en DMSO**

##### Materiales

- Hongo *Arthrobotrys musiformis*
- Hongo *Arthrobotrys oligospora*
- Agua destilada
- DMSO
- Viales de 2 cm de tapa rosca
- Autoclave
- Cabina de flujo laminar
- Laminas autoclavadas
- Vortex
- Refrigerador (-70°C)

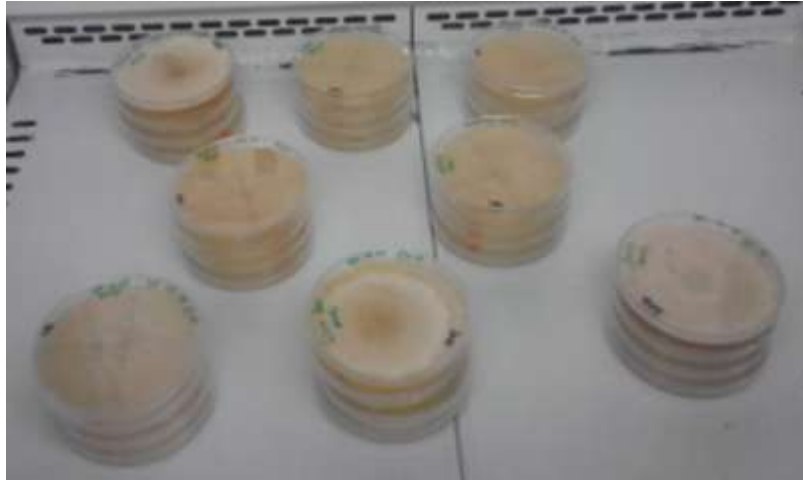
#### Metodología

8. Se realiza una solución de DMSO al 10% teniendo 10 ml de glicerol y 90 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se autoclava por 1 hora
9. En 10 viales agregar 1ml de la solución de glicerol dentro de la cabina teniendo en cuenta que son 5 viales por cada cepa. Rotular los frascos
10. Con una lámina recolectar el micelio de cada hongo con el centímetro del vial correspondiente a cada hongo
11. Recuperar el centímetro de la solución de glicerol con el micelio y colocar nuevamente en el frasco
12. Homogenizar en el vortex
13. Dejar durante 2 horas a temperatura ambiente
14. Poner en el refrigeración? a -70°C (Mueller, 2011).

### 7. RESULTADOS

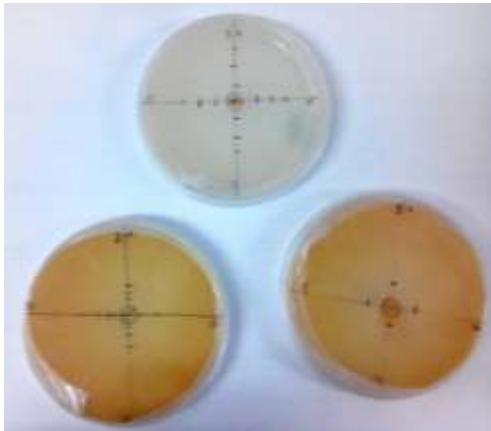
Se realizó una siembra de cada vial con su correspondiente método en su respectivo agar buscando rescatar el hongo correspondiente a cada ensayo, después de descartar los contaminados en las cajas dejadas al medio ambiente se prosiguió a transferir cada vial por ensayo con el fin de medir el halo de crecimiento a las 48, 72 y 96 horas de sembrado realizando una verificación de la viabilidad.

Figura 18. Resiembra de ensayos



Tomado de: archivo personal

Figura 19. Medición de halo



Tomado de: archivo personal

Tabla 3. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con Silica gel

FECHA: 22 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 23 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 24 DE OCTUBRE 2014
TIEMPO DE SIEMBRA: a las 48 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 72 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 96 horas

<b>CRIOPRESERVANTE: Silica Gel HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.6	0.8	0.5	0.6	1.0	1.4	1.0	1.3	1.6	2.4	1.6	2.0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0.6	1.3	0.8
<b>CRIOPRESERVANTE: Silica Gel HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.7	0.8	0.8	0.7	1.2	1.4	1.2	1.3	1.6	1.8	1.7	1.3
2	1.0	1.0	0.9	1.0	1.6	1.6	0.5	1.6	2.1	2.1	1.9	2.1
3	0.4	0.3	0.3	0.4	1.1	1.6	1.5	1.2	1.7	1.8	1.8	1.6
<b>CRIOPRESERVANTE: Silica Gel HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.5	0.5	0.5	0.4	0.8	0.9	1.0	0.8	1.3	1.3	1.3	1.2
2	0.7	0.5	0.5	0.4	0.9	0.9	0.8	0.8	1.2	1.3	1.3	1.3
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0	1.0	0.7	1.0
<b>CRIOPRESERVANTE: Silica Gel HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.6	0.5	0.7	0.9	2.1	0.9	1.7	2.0	2.9	2.3	3.1	2.7
2	0.6	0.6	0.7	0.6	0.8	0.6	0.7	0.6	0.8	0.7	0.7	0.6
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: autor

Tabla 4. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con Aceite mineral



FECHA: 22 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 23 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 24 DE OCTUBRE 2014
TIEMPO DE SIEMBRA: a las 48 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 72 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 96 horas

<b>CRIOPRESERVANTE: Aceite mineral HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.7	0.8	0.8	0.6	1.1	1.3	1.2	1.1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7	0.7	0.8	0.8
3	1.1	0.8	0.5	0.4	1.5	1.0	0.8	0.8	2.0	1.7	1.4	1.4
<b>CRIOPRESERVANTE: Aceite Mineral HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>CRIOPRESERVANTE: Aceite Mineral HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.8	0.8	0.4	0.5	1.2	1.2	0.9	1.0	1.7	1.6	1.4	1.4
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>CRIOPRESERVANTE: Aceite Mineral HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: autor

Tabla 5. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con DMSO

FECHA: 22 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 23 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 24 DE OCTUBRE 2014
TIEMPO DE SIEMBRA: a las 48 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 72 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 96 horas

<b>CRIOPRESERVANTE: DMSO HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.5	0.5	1.0	0.9	1.5	1.0	1.3	1.6	1.9	1.5	1.7	1.8
2	0.5	0.7	0.6	0.7	1.4	1.1	1.9	1.0	1.8	1.5	2.4	1.5
3	0.5	0.9	0.8	0.7	1.5	1.8	1.3	1.1	2.1	1.8	1.6	1.4
<b>CRIOPRESERVANTE: DMSO HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.9	1.3	1.2	0.8	1.6	1.9	2.2	2.1	3.1	2.6	3.1	3.0
<b>CRIOPRESERVANTE: DMSO HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.5	0.7	0.6	0.5	0.5	0.7	0.6	0.5	0.9	1.1	0.9	1.0
2	0.3	0.6	0.6	0.5	0.3	0.6	0.6	0.5	1.0	1.0	1.0	0.9
3	0.4	0.8	0.8	0.7	0.4	0.8	0.8	0.7	1.2	1.4	1.2	1.1

<b>CRIOPRESERVANTE: DMSO HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.9	1.1	0.9	0.9	1.4	1.5	1.5	1.4	1.8	2.0	2.0	1.9
2	0.7	1.0	1.0	0.9	2.3	1.5	1.5	1.6	2.7	2.1	2.0	1.9
3	1.1	1.0	1.0	1.0	1.6	1.4	1.5	1.5	1.9	1.9	1.8	2.0

Fuente: autor

Tabla 6. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con suelo

FECHA: 22 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 23 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 24 DE OCTUBRE 2014
TIEMPO DE SIEMBRA: a las 48 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 72 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 96 horas

<b>CRIOPRESERVANTE: Suelo HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.7	0.6	0.7	0.6	1.0	1.1	1.1	1.1	1.5	1.5	1.5	1.5
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.7	0.6	0.6	0.7	1.0	1.4	1.0	1.1	1.4	1.8	1.3	1.4
<b>CRIOPRESERVANTE: Suelo HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.6	0.7	0.6	0.5	1.6	1.7	1.6	1.6	2.7	1.7	1.7	1.9
<b>CRIOPRESERVANTE: Suelo HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.7	0.7	0.9	0.8	0.7	0.7	0.9	0.8	1.0	1.0	1.2	1.2
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>CRIOPRESERVANTE: Suelo HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.6	0.7	0.8	0.7	1.3	1.3	1.5	1.6	1.7	2.0	2.2	2.2
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.9	0.5	0.7	0.8	1.6	1.7	1.9	1.6	2.3	2.5	2.5	2.3

Fuente: autor

Tabla 7. Tamaño de halo en (cm) de ensayo con Glicerol

FECHA: 22 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 23 DE OCTUBRE 2014	FECHA: 24 DE OCTUBRE 2014
TIEMPO DE SIEMBRA: a las 48 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 72 horas	TIEMPO DE SIEMBRA: a las 96 horas

<b>CRIOPRESERVANTE: Glicerol HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.6	0.7	0.8	0.6	1.5	1.1	1.3	1.4	2.0	1.5	1.6	1.9
2	0.7	0.6	1.0	0.8	1.0	0.9	1.5	2.1	1.5	1.4	1.8	2.7
3	1.3	0.7	2.7	1.0	2.0	1.4	2.2	2.1	2.7	1.9	2.6	2.5
<b>CRIOPRESERVANTE:Glicerol HONGO: <i>A. musiformis</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.8	0.9	1.1	0.9	0.8	0.9	1.1	0.9	1.5	2.2	1.8	1.8
2	0.8	0.9	0.7	0.9	0.8	0.9	0.7	0.9	1.3	1.3	1.2	1.4
3	1.0	0.7	0.9	0.8	1.0	0.7	0.9	0.8	1.5	1.9	1.5	1.4
<b>CRIOPRESERVANTE: Glicerol HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Sabouraud</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0	0	0.6	0.8	1.3	1.4	0.6	0.8	2.6	1.5	0.9	1.1
2	0.7	0.7	0.8	0.8	1.1	1.1	1.2	1.1	1.4	1.5	1.6	1.5
3	0	1.0	0	0.6	0.6	1.3	0.6	0.6	0.8	1.7	0.8	0.6
<b>CRIOPRESERVANTE: Glicerol HONGO: <i>A. oligospora</i> AGAR: Trigo</b>												
Nº caja	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	0.7	1.0	0.8	0.9	0.7	1.0	0.8	0.9	0.7	1.0	0.8	0.9
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: autor

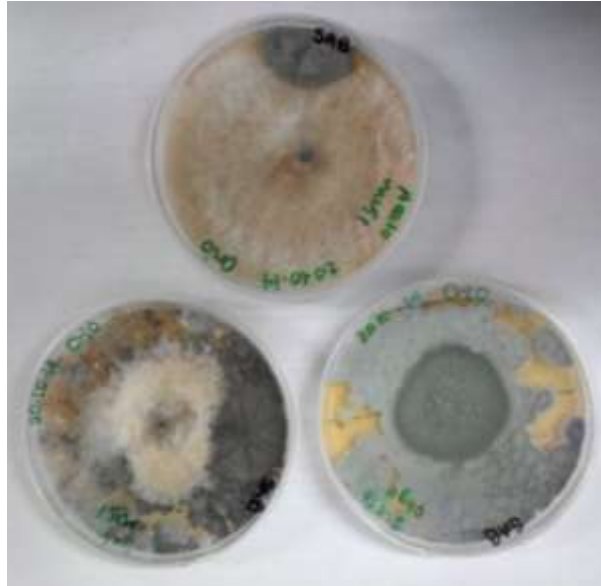
Contaminación según ensayo, agar y hongo seleccionado.

Tabla 8. Ensayos contaminados con otros hongos

	<i>A. musiformis</i>		<i>A. oligospora</i>	
	Sabouraud	Trigo	Sabouraud	Trigo
DMSO	2		2	1
GLICEROL				
SUELO	2	1	2	
SILICA GEL	2	3		3
ACEITE MINERAL	3			2

Fuente: autor

Figura 20. Ensayos con hongos contaminantes



Tomado de: archivo personal

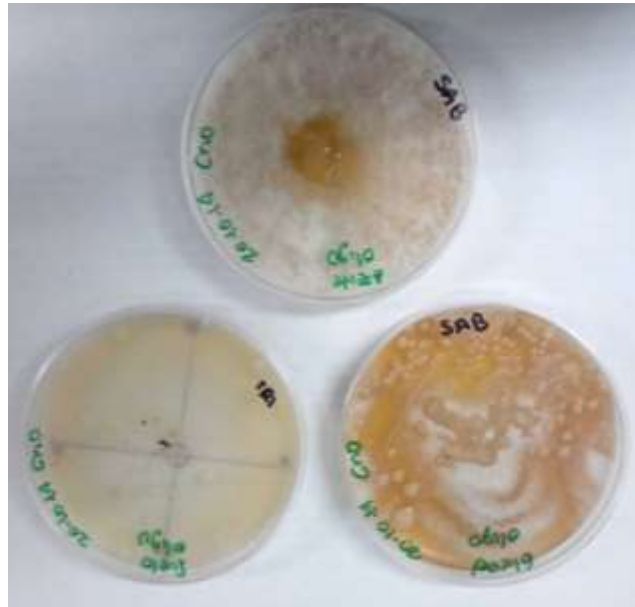
En cuanto a la contaminación se tomó la siguiente información en la cual se contaminaron con otros hongos como lo muestra en la tabla 8 en donde se denota una mayor contaminación en los agares Sabouraud y el método que más se vio afectado por hongos contaminantes fue el de Silica gel y el único método que no fue afectado por otros hongos fue en de Glicerol.

Tabla 9. Ensayos contaminados con bacterias

	<i>A. musiformis</i>		<i>A. oligospora</i>	
	Sabouraud	Trigo	Sabouraud	Trigo
DMSO	1			
GLICEROL				
SUELO			1	1
SILICA GEL				
ACEITE MINERAL	1	4	2	3

Fuente: autor

Figura 21. Ensayos contaminados con bacterias



Tomado de: archivo personal

Como se puede observar en las ilustraciones, también fue afectado por bacterias algunos ensayos como DMSO, Suelo y notando un número mayor en las cajas de Petri que contenían el ensayo de aceite mineral, por otro lado los ensayos de Glicerol y Silica gel no resultaron afectados por la contaminación con bacterias.

Tabla 10. Ensayos sin contaminación

	<i>A. musiformis</i>		<i>A. oligospora</i>	
	Sabouraud	Trigo	Sabouraud	Trigo
DMSO	1	2	1	2
GLICEROL	3	3	2	2
SUELO	1	1		1
SILICA GEL	1		3	1
ACEITE MINERAL				

Fuente: autor

El método de conservación con aceite mineral no tuvo ninguna caja de Petri de los ensayos sin contaminación, por lo que se decide que no es apta para sembrar ya que ninguna replica esta apta para esto, pero al guardar los dos viales iniciales se estudia si el tiempo en congelación ayudara a inhibir el crecimiento de otros microorganismos que puedan contaminar las siembras y esto se decidirá al transcurrir de los años o el tiempo que sea pertinente y que el laboratorio así lo designe; en cuanto a los otros métodos el que no presentó contaminación fue el de glicerol el cual pasa al siguiente nivel para medir si aún conserva sus característica nematófagas.

Para la preservación y realización de la prueba *in vitro*, se realizan réplicas en agar trigo de cada ensayo para el caso se decidió hacer 4 réplicas de cada uno tomando las cajas en donde no se evidencia contaminación y el crecimiento de conidios y clamidosporas era adecuado.

Las cajas con los respectivos ensayos se dejaron crecer por 3 meses y se conservaron con el fin de evidenciar contaminación en mayor tiempo y se encontró contaminación por ácaros en las cajas sembradas con Silica Gel por lo que se decidió dejar este ensayo fuera de la prueba *in vitro*.

Al cabo de este tiempo se seleccionaron 2 cajas, preservando las 2 restantes para evaluar preservación en un futuro y se recolectó el micelio en tubos Falcon con agua destilada y se realizó una mezcla con ayuda de vortex hasta tener el micelio homogenizado y diluido con el fin de realizar el conteo de clamidosporas y conidios que dio como resultado lo que se muestra en la Tabla 11. Una vez se realizó el conteo se procedió a aplicar a cajas de Petri pequeñas con agar agua en 5 réplicas, en las siguientes proporciones: MG: 389µL; MS: 297µL; MD: 359µL; OG: 173µL; OS:185µL; OD:92µL. Con el fin de aplicar a cada caja 1`000.000 de clamidosporas o conidios según el caso *A. musiformis* o *A. oligospora* respectivamente, y sus respectivos medios de preservación. Los hongos se dejaron crecer por 2 días y luego del conteo de larvas *Panagrellus redivivus* se aplicaron 200 larvas por cada ensayo y a 5 réplicas control, para evaluar el atrapamiento de larvas y determinar si los hongos tenían su facultad nematófaga y los porcentajes de atrapamiento.

Tabla 11. Conteo de conidios y clamidosporas

Medio de conservación	<i>A. Musiformis</i>	<i>A. Oligospora</i>
<b>Glicerol</b>	2`570.000	5`760.000
<b>Suelo</b>	3`360.000	5`400.000
<b>DMSO</b>	2`780.000	10`770.000

Fuente: autor

Por último se realizó la técnica Baerman para evidenciar las larvas no atrapadas como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Larvas no atrapadas

O. DMSO	O. Glicerol	O. Suelo	M. DMSO	M. Glicerol	M. Suelo	Control
2	3	22	4	0	3	157
4	4	18	5	5	10	176
7	3	13	1	3	15	184
6	12	18	5	8	17	177
6	19	2	1	5	5	203

Fuente: autor

Tabla 13 Porcentaje de nematofagia por replica

Porcentaje de nematofagia por replica						
O.DMSO	O.Glicerol	O.Suelo	M.DMSO	M.Glicerol	M.Suelo	
96,86	65,46	65,46	93,72	100	95,29	
92,96	92,96	68,32	91,2	91,2	82,4	
87,12	94,48	76,08	98,16	94,48	72,4	
89,38	78,76	68,14	91,15	85,84	69,91	
87,82	61,43	95,94	97,97	89,85	89,85	
Promedio	90,828	78,618	74,788	94,44	92,274	81,97

Fuente: autor

Fuente: autor

Análisis de varianza de los 3 medios en general para identificar cual tiene el mayor promedio de nematofagia.

Tabla 15. Análisis de varianza de un factor para *A.oligospora* ( tres criopreservantes y el hongo sin crioconservación.

### ANOVA de un factor

Atrapamiento para *A.oligospora*

	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1210,800	3	403,600	3,367	,045
Intra-grupos	1918,000	16	119,875		
Total	3128,800	19			

No hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el hongo sin conservar y criopreservado con cualquiera de los métodos.

Tabla 15. Análisis de varianza de un factor para *A. musiformis* ( tres criopreservantes y el hongo sin crioconservación).

#### ANOVA de un factor

Atrapamiento para *A. musiformis*

	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	654,600	3	218,200	5,374	,009
Intra-grupos	649,600	16	40,600		
Total	1304,200	19			

Hongo	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	5	81,80 <sup>b</sup>	
3	5	92,20 <sup>ab</sup>	
2	5		94,40 <sup>a</sup>
1	5		96,80 <sup>a</sup>
Sig.		,085	,670



Para el caso de *A. musiformis* si existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el hongo sin crioconservar (1) y el método cuatro suelo, esto quiere decir que el método de suelo no se recomendaría usar para tratar de conservar esta especie de hongo.

## 8. DISCUSIÓN

Este estudio se realizó en el laboratorio de helmintología de CORPOICA, fueron dos ensayos por separado uno por cada hongo *A. musiformis* y *A. oligospora* donde de cada uno se dejaron 60 viales, 30 de estos corresponden a los micelios que fueron recogidos de agar trigo y los 30 restantes los que se recogieron en agar sabouraud, de esta división se escogieron 6 viales por cada criopreservante a evaluar (Silica gel, DMSO, suelo, aceite mineral y glicerol).

Para evaluar la viabilidad a largo plazo se decidió destapar en dos tiempos (1 año y 3 años) evidenciando existencia o no de contaminación, este se vuelve a sembrar en los agares de origen y se realizaron réplicas con el fin de evaluar crecimiento radial y realizar una prueba *in vitro* en la cual se aplicaron larvas para observar su porcentaje de atrapamiento.

En cuanto al mantenimiento de cepas en aceite Mineral es el método más dispendioso de realizar de los 5 que se seleccionaron esto es porque los hongos elegidos no forman esporas de forma espontánea y previamente se debe realizar un medio líquido de esporulación y sobre este se realiza la técnica de conservación, como describe Gato (2010) en su estudio con la cepa A-34 de *Trichoderma harzianum rifai* utilizada uno de los métodos de conservación que usó fue aceite mineral en donde tomó micelio u hongos no esporulados donde evaluó la viabilidad, los caracteres morfológicos y la capacidad antagónica durante un año. Para el presente estudio también se utilizó un medio de cultivo líquido para poner el micelio de *A. musiformis* y *A. oligospora* ya que en este tipo de hongos la congelación puede ser adversa para ellos. También se eligió este método ya que se ha demostrado que previene la desecación y la penetración de ácaros en climas tropicales y es de vital importancia dejar este protocolo establecido para los distintos centros de investigación de CORPOICA donde se lleva a cabo el trabajo de hongos nematófagos y que la principal imposibilidad para trabajar con éstos es la desecación en un lapso corto de tiempo. Como desventaja tiene que sigue su crecimiento, y esto permite la mutación genética de la cepa. Se ha demostrado que con este método los conidios se mantienen intactos. (Gato, 2010), como resultado tuvo grandes problemas de contaminación con hongos y/o con bacterias lo que nos indica claramente que no es el método adecuado para las dos cepas utilizadas a corto plazo, pero se conservan los viales para evaluarlo a largo plazo.

El método en suelo es el más económico porque se utiliza tierra o arena se pasa por un cernidor y al autoclavarse queda totalmente estéril es muy fácil de implementar puesto que los materiales que se necesitan para realizar el método están disponibles en el laboratorio así como los equipos. En el estudio de (Godínez, 2008) se utilizaron las especies *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Mucor pusillus* conservadas durante ocho años por los métodos de suelo, para

identificar durante 7 años si aun se mantenian intactas las características de las cepas, dejando como conclusión que en este caso el metodo de conservación en suelo no es adecuado para la conservación a largo plazo en las especies fúngicas, pero a corto plazo se ha demostrado viabilidad y pureza sin cambios morfológicos. En el ensayo se notó gran contaminación lo que indica su dificultad para ser ejecutado pero los ensayos han revelado que es un método utilizado a largo tiempo lo que permite tener esperanza de una adecuada recuperación en un futuro.

El método de Silica gel es muy práctico, fácil de realizar, los materiales están disponibles en el laboratorio y en el caso en el cual no contemos con Silica gel en el laboratorio su valor es económico. En los estudios realizados anteriormente está comprobado a largo plazo la viabilidad de la cepa, y se estima una duración de cuatro a cinco años, teniendo en cuenta el medio inicial de crecimiento del hongo. Este método tiene como ventaja que evita el crecimiento de hongos contaminantes y disminuye el metabolismo al estar en ausencia de agua (Gato, 2010). En el ensayo por contener gran contaminación, la decisión de realizar pruebas de transferencia para comprobar su aislamiento en subcultivos para comprobar su poder nematófago y de propagación.

El glicerol ( $C_3H_8O_3$ ) es un alcohol con tres grupos hidroxilos ( $-OH$ ). El método es muy sencillo de realizar, no necesita de muchos materiales y estos están disponibles en el laboratorio, así como los equipos que se cuentan para uso diario. Este criopreservante tienen características físico-químicas que les confieren afinidad por el agua molecular, y de esa forma atrapan la molécula de agua en su interior, lo que impide que el agua forme cristales geométricos ordenados; en consecuencia, la solidificación del medio se establece con una distribución molecular desordenada del agua y la sustancia toma el carácter de sustancia vítrea protectora, asegurando la estabilidad genética. (Estrada, 2003) realizó un estudio en donde determinaba el material biológico preservado a través de la técnica de glicerol al 10%, a  $-25^{\circ}C$ , y su recuperación ha sido exitosa. En el ensayo se comprobó su adecuada recuperación y la ausencia de contaminación siendo el candidato número uno para realizar pruebas de su viabilidad y poder nematófago así como de actitud de propagación.

El método de DMSO se sugirió en último momento ya que es el método de elección para conservación de otros microorganismos incluso se realizó un ensayo con huevos de nematodos gastrointestinales evaluando DMSO, la solución azucarada con la que se realiza la técnica de McMaster y alcohol, en este estudio los únicos huevos viables y que no sufrieron ningún tipo de cambio morfológico fueron los conservados con DMSO. Por supuesto se han hecho estudios con DMSO pero no es un método de elección ni muy nombrado por lo cual se vio la motivación de comprobar su capacidad de conservación en las cepas de hongos nematófagos; el proceso en si es muy fácil de realizar y los materiales y equipos se encuentran disponibles en el laboratorio. En el ensayo de conservación de hongos nematófagos tuvo buen resultado en los recolectados de agar trigo y su comportamiento aceptable siendo candidato opcional para realizar transferencias y comprobar el poder nematófago del hongo y su poder de propagación.

El método que se vaya a elegir en un futuro tiene como prioridad o limitante el equipo con el que se dispone en el laboratorio, las instalaciones y el costo de los materiales necesarios para realizar la conservación. (Deshmukh, 2003)

## **9. CONCLUSIONES**

El método más apropiado para la conservación de estos dos hongos *A. musiformis* y *A. oligospora* es el método de preservación con DMSO demostrando un análisis de varianza de 92,634%, en todos los métodos se vieron diferencias significativas en el atrapamiento.

Es necesario realizar diferentes tipos de estudio de criopreservación que permitan conocer el comportamiento de los microorganismos en diferentes medios y diferentes periodos de tiempo, este es solo un ensayo que sirve como base para posibles estudios futuros con otros hongos y otras pruebas de viabilidad.

La necesidad de conservación en el laboratorio de helmintología permite que este tipo de estudios se lleven a cabo incentivando de esta manera las buenas prácticas de laboratorio y la investigación de nuevas técnicas, el modificar las técnicas ya existentes da una ventaja para los hongos con los que se está trabajando en busca de estandarizar las técnicas exclusivamente para el laboratorio de CORPOICA y con especificidad de hongos nematófagos.

Los métodos escogidos para ser parte del estudio tienen gran potencial para ser utilizados en los hongos nematófagos que son el propósito de la conservación que se quiere evaluar, todos han sido utilizados en hongos filamentosos, esporulados y no esporulados y se ha recolectado el micelio para su conservación y posterior propagación, como se han utilizado tiempos tan prolongados y en otros casos como es el caso de suelo se ha reportado viabilidad de tiempo corto, se plantea la posibilidad de indagar en las propiedades de cada uno en estos protocolos utilizados en los hongos nematófagos que hasta el momento se han venido almacenando gracias a subcultivos seriados teniendo como riesgo la contaminación de las cepas, su mutación genética y su corta duración en los diferentes agares probados.

## **10. RECOMENDACIONES**

Cada proceso de recuperación y preservación de hongos debe tener tiempos estrictos dedicados únicamente a este objetivo, la elaboración de estos protocolos debería estar como tema principal de una investigación en donde se haga secuencia a cada proceso y después de varios años, dependiendo del objetivo de la investigación, se adquiera el conocimiento que es requerido para cada protocolo teniendo en cuenta las características de cada hongo a preservar. Es muy enriquecedor hacer un análisis previo para basarse en varios autores y de esta manera escoger el método ideal a implementar en los hongos de estudio. Esto ayudará al laboratorio para guardar las cepas de forma segura y en el momento de crear un banco no tener problemas con la contaminación, cambios genéticos y pérdidas importantes de material biológico dedicado a la investigación.

## BIBLIOGRAFIA

- Andrade, M. K.** (2003). Sporulation, radial growth and biomass production of *A. robusta* and *M. thaumasium* submitted to different methods of preservation. *Brasilian Journal of Microbiology*, 157-160.
- Avila, J.** (2005). control biologico de nematodos fitoparasitarios. En J. C. Jacas, el control biologico de plagas y enfermedades, 153-155.
- Barron, G.** (1977). The nematode destroying fungi. *Topics in Mycobiology*, 140.
- Bayer.** (1968). Manual practico del hacendado. Bayer Laverkusen, 172.
- Campbel, W. S.** (1973). Unimpaired Infectivity of the Nematode *Haemonchus contortus* after Freezing for 44 Weeks in the Presence of Liquid Nitrogen. *The Journal of Parasitology*, 425-427.
- Carnevali, G.** (2004). IE, Cepario de hongos (INECOL). Colecciones biológicas de los centros de investigación CONACYT, 26-28.
- Carvalho, L. B.** (2013). Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Parascaris equorum* eggs in different culture media. *Journal of Basic Microbiology*, 109-114.
- Estrada, M. V.** (2003). Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos. *Manejo integrado de plagas y agroecología*, 97-103.
- Estrada, M. y.** (2003). Procedimientos para el registro, aislamiento, mantenimiento, preservación y sistematización de una colección de hongos entomopatógenos. *Manejo integrado de plagas y agroecología*, 97-103.
- Fermino, A. S.** (2006). Predatory ability of *Arthrobotrys musiformis* and *Monacrosporium thaumasium* on *Scutellonema bradys*. *Scientia agricola*, 1-3.
- Fiedler, A., Landis, D. y Wratten, S.** (2008) Maximizing services from conservation biological control: The role of habitat management. *Biological control*, 45, 254-271.
- Flota, C. M.** (2013). patron espacio temporal de larvas y huevesillos de nematodos gastrointestinales en pastizales ganaderos en veracruz, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 61.
- Foreyt, W.** (1986). Recovery of nematode eggs and larvae in deer: evaluation of fecal preservation methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1065-1067.
- Gato, Y.** (2010). métodos de conservación y formulación de *trichoderma harzianum* rifai. *Red de revistas científicas de américa latina, el caribe, españa y portugal*, 189-195.

**Gill, J. R.** (1995). Cryopreservation of the First-Stage Larvae of Trichostrongylid Nematode Parasites . Internarional Journalfor Pamifology, 1421-1426.

**Godínez, S. C.** (2008). Metodos alternativos para la preservacion de hongos filamentosos. ciencia y tecnologia de alimentos, 31-37.

**Gómez, Y., Díaz, D.** (2012). Capacidad predadora in vitro de hongos nematofagos, para el control biológico de nematodos gastrointestinales de bovinos. Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias agropecuarias, Universidad De La Salle.

**Guzmán, M. F.** (2012). Supervivencia y capacidad infectiva de larvas criopreservadas de nematodes trichostrongylideos. Investigacion Veterinaria, 25-31.

**Jacob, P.** (1997). Investigations of the effect of nematophagous fungi against Meloidogyne sp. in vitro and in Lycopersicon esculentum153-165. Journal of Plant Diseases and Protection, 153-165.

**Junquera, P.** (2014). PARASITIPEDIA.NET. Recuperado el 22 de septiembre de 2014, de [www.parasitipedia.net](http://www.parasitipedia.net)

**Kaplan,R y Vidyashankarb, N.** ( 2012) An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. Veterinary parasitology, 186, 70-78

**Marquez, D.** (2003). Nuevas tendencias para el control de los parasitos de bovinos en Colombia. Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 124-135

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

**Mendoza de Gives, P.** (2011). hongos que capturan, matan y se alimentan de nematodos parásitos del ganado. Epidemiologia de enfermedades parasitarias en animales domesticos, 345-353.

**Moreno, F. G.** (2010). Efecto antihelmíntico in vitro de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. Valdivia Archivos de medicina veterinaria, 155-163.

**Mueller, G. B.** (2011). Biodiversity of fungi, 37-46.

**Niua, X. Z.** (2011). Arthrobotrys oligospora: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. Mycology: An International Journal on Fungal Biology, 59-78.

**Orozco, M. A.** (2009). evaluación in vitro de hongos nematófagos para el control biológico de nemátodos gastrointestinales de rumiantes. Revista mvz cordoba, 1820-1830.

**Prichard, R. B.** (2007). Foreword: Towards markers for anthelmintic resistance in helminths of importance in animal and human health. *Parasitology*, 134(8), 1073-6.

**Rodriguez, D. G.** (2010). métodos alternativos en la conservación de *trichoderma harzianum rifai*. *Fitosanidad*, 241-246.

**Ryan, M. S.** (2000). A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 183-186.

**Sagarpa** (2009). Programa de Uso Sustentable de Recursos Naturales para la Producción Primaria/ Recursos Biogenéticos y Biodiversidad.

**Sagües, M. P.** (2011). Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *revista iberoamericana de micología*, 143-147.

**Saumell, C. A.** (2000). Hongos nematofagos para el control biológico de nematodos parásitos de rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria*, 270-273.

**Saumell, C. F.** (2008). Enfoque bioecológico del potencial de los hongos nematofagos en el control biológico. *Revista de Medicina Veterinaria*, 45-54.

**Silva, A.** (2010). In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Veterinary Parasitology*, 76-79.

**Smith, D.** (1983). A comparison of some preservation techniques for fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 535-540.

**Smith, D.** (1994). The Preservation and Maintenance. *Veterinary Dermatology*, 215.

**Soca, M. R.** (2005). Epizootiología de los nemátodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 175.185.

**Vasquez, A.** (2012). Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importancia veterinaria, *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 77-88

**Yang, j. et al** (2011). Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. *Join genome institut*, 1553–7366