Facultad de Veterinaria

Trabajo de Fin de Grado

Control biológico de saprozoonosis y reciclaje de aceite: sinergismo circular

Joel Cuervo Suárez

Grado en Veterinaria

Año 2025

Modalidad del Trabajo: Experimental

LICENCIA

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Joel Cuervo Suárez y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.

IMÁGENES y DIAGRAMAS

Todas las imágenes y diagramas incluídos en esta Memoria son originales y pertenecen al autor y al Grupo de Investigación COPAR (GI-2120; USC).

RESUMEN

El uso intensivo y prolongado de tratamientos antiparasitarios ha dado lugar a un incremento en las resistencias que los parásitos presentan frente a estos fármacos, siendo más notable en aquellos que afectan a los animales de producción. Debido a esta situación, la búsqueda de alternativas y métodos complementarios para el tratamiento y la prevención de dichas infecciones parasitarias está tomando una importancia creciente. Entre estos métodos de prevención complementarios se encuentra el control biológico, el cual emplea sustancias y metabolitos naturales, así como organismos vivos, como alternativas sostenibles y eficaces para minimizar la presencia de dichos parásitos en el ambiente. En este estudio se evaluó la actividad parasiticida de *Trichoderma atrobrunneum*, un hongo con demostrada eficacia frente a ciertos fitopatógenos, aunque su potencial contra nematodos no ha sido ampliamente documentado. Se analizó su actividad ovicida contra *Ascaris suum*, en comparación con los hongos *Mucor circinelloides* y *Clonostachys rosea*, a lo largo de un periodo de 60 días. Otro punto evaluado fue la capacidad ovicida de *T. atrobrunneum* frente a *Toxascaris leonina* y *Trichuris* spp. en presencia de distintos porcentajes de aceite de cocina usado, a lo largo de 45 días, donde se observó que dicha actividad se mantenía. También se estudió la capacidad de crecimiento de este hongo en medios líquidos con diferentes porcentajes de aceite usado, comparándose con la capacidad de crecimiento de *M. circinelloides*. En ambos casos, se observó cómo porcentajes bajos (1 %) de aceite de cocina usado favorecieron el desarrollo de los hongos.

Palabras clave: *Trichoderma,* helmintos, suelo, control biológico, reciclar, sostenibilidad.

RESUMO

O uso intensivo e prolongado de tratamentos antiparasitarios deu lugar a un incremento nas resistencias que os parasitos presentan fronte a estes fármacos, sendo máis notable naqueles que afectan os animais de produción. Debido a esta situación, a procura de alternativas e métodos complementarios para o tratamento e a prevención das devanditas infeccións parasitarias está a tomar unha importancia crecente. Entre estes métodos de prevención complementarios atópase o control biolóxico, o cal emprega substancias e metabolitos naturais, así como organismos vivos, como alternativas sostibles e eficaces para minimizar a presenza dos devanditos parasitos no ambiente. Neste estudo avaliouse a actividade parasiticida de *Trichoderma atrobrunneum*, un fungo con demostrada eficacia fronte a certos fitopatógenos, aínda que o seu potencial contra nematodos non foi amplamente documentado. Analizouse a súa actividade ovicida contra *Ascaris suum*, en comparación cos fungos *Mucor circinelloides* e *Clonostachys rosea*, ao longo dun

período de 60 días. Outro punto avaliado foi a capacidade ovicida de *T. atrobrunneum* fronte a *Toxascaris leonina* e *Trichuris* spp. en presenza de distintas porcentaxes de aceite de cociña usado, ao longo de 45 días, onde se observou que dita actividade mantíñase. Tamén se estudou a capacidade de crecemento deste fungo en medios líquidos con diferentes porcentaxes de aceite usado, comparándose coa capacidade de crecemento de *M. circinelloides*. En ambos os casos, observouse como porcentaxes baixas (1 %) de aceite de cociña usado favoreceron o desenvolvemento dos fungos.

Palabras chave: *Trichoderma*, helmintos, solo, control biolóxico, reciclar, sostibilidade.

SUMMARY

The intensive and prolonged use of antiparasitic treatments has led to an increase in parasite resistance to these drugs, which is especially notable in those affecting livestock animals. Due to this situation, the search for alternatives and complementary methods for the treatment and prevention of such parasitic infections is gaining increasing importance. Among these complementary prevention methods is biological control, which uses natural substances and metabolites, as well as living organisms, as sustainable and effective alternatives to reduce the presence of these parasites in the environment. In this study, the parasiticidal activity of *Trichoderma atrobrunneum* was evaluated, a fungus with proven efficacy against certain phytopathogens, although its potential against nematodes has not been widely documented. Its ovicidal activity against *Ascaris suum* was analyzed and compared with that of *Mucor circinelloides* and *Clonostachys rosea* over a 60-day period. Another aspect evaluated was the ovicidal capacity of *T. atrobrunneum* against *Toxascaris leonina* and *Trichuris* spp. in the presence of different percentages of used cooking oil over a 45-day period, where its activity was observed to persist. The fungus's growth capacity in liquid media with varying percentages of used oil was also studied and compared with that of *M. circinelloides*. In both cases, low percentages (1%) of used cooking oil favored fungal development.

Key words: *Trichoderma*, helminths, soil, biological control, recycling, sustainability.

ABREVIATURAS

ACU: aceite de cocina usado

esp: espora

hpg: huevos por gramo

L1: larva 1

L2: larva 2

L3: larva 3

STH: soil-transmited helminth (helminto transmitido a través del suelo)

ÍNDICE

RESUMEN ... 3
ABREVIATURAS ... 5
1. INTRODUCCIÓN ... 8
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS ... 8
1.2. HONGOS PARA EL CONTROL DE PARÁSITOS ... 9
1.2.1. Actividad ovicida. ... 10
1.2.1. Actividad larvicida. ... 11
1.3. HONGOS PARASITÓFAGOS ÚTILES EN EL CONTROL PARASITARIO ... 12
1.3.1. *Trichoderma atrobrunneum* ... 12
1.3.2. *Mucor circinelloides* ... 13
1.3.3. *Clonostachys rosea* ... 15
1.3.4. *Duddingtonia flagrans* ... 16
1.4. HELMINTOS RESPONSABLES DE SAPROZOONOSIS ... 17
1.4.1. *Ascaris suum* ... 18
1.4.2. *Toxascaris leonina* ... 18
1.4.3. *Trichuris* spp. ... 19
1.5. PROPAGACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS: MEDIOS DE CULTIVO ... 20
1.5.1. Aceite usado de cocina ... 20
2. OBJETIVOS ... 22
3. MATERIAL Y MÉTODOS ... 23
3.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO ... 23
3.1.1. Medio sólido sin ACU. ... 23
3.1.2. Medio sólido con ACU. ... 24
3.1.3. Medio líquido con ACU. ... 24
3.2. OBTENCIÓN DE HUEVOS DE HELMINTOS ... 25
3.2.1. Aislamiento de huevos de *A. suum*, *T. leonina* y *Trichuris* sp. ... 25
3.2.2. Concentración de huevos de *A. suum*, *T. leonina* y *Trichuris* sp. ... 26
3.3. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD PARASITICIDA SOBRE HELMINTOS ... 27
3.3.1. Antagonismo de *T. atrobrunneum*, *M. circinelloides* y *C. rosea*. ... 28
3.3.2. Actividad de *T. atrobrunneum* en presencia de ACU. ... 28
3.4. PROPAGACIÓN DE *T. atrobrunneum* EN MEDIO LÍQUIDO CON ACU ... 28
3.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS ... 29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ... 30
4.1. EFECTO ANTAGONISTA FRENTE A HUEVOS DE *A. suum* ... 30
4.2. EFECTO OVICIDA DE *T. atrobrunneum* EN PRESENCIA DE ACU ... 31

4.2.1. Sobre huevos de *T. leonina*. 31
4.2.2. Sobre huevos de *Trichuris* sp. 34
4.3. PROPAGACIÓN DE *T. atrobrunneum* EN MEDIO LÍQUIDO CON ACU 36
4.4. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS 37
5. CONCLUSIONES 39
6. BIBLIOGRAFÍA 40

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos, con un núcleo definido y orgánulos recubiertos por membranas. Su pared celular está compuesta por glucanos y quitina. Se reproducen sexual y asexualmente y producen esporas. La mayoría de los hongos, salvo las levaduras (hongos unicelulares), crecen en forma de hifas, células elongadas y filamentosas (Fig. 1). Algunos hongos dimórficos pueden cambiar entre estado de levadura y de hifa, y se denomina *micelio* al conjunto de hifas que componen un hongo (Marín, 2018).

Fig. 1.- Los hongos filamentosos se caracterizan por la formación de *hifas*, cuyo conjunto da lugar al *micelio*.

Al inocular cualquier tipo de hongo en un medio de cultivo se producirá un desarrollo progresivo con las fases de *latencia*, *crecimiento exponencial*, *deceleración*, *estacionaria* y finalmente *autolisis*. En la fase de *latencia* tiene lugar la adaptación del hongo al medio de cultivo, y no hay crecimiento. En la fase *exponencial* ocurre un incremento logarítmico a intervalos concretos dependientes de las condiciones del medio y la especie de hongo (Kavanagh, 2005). Posteriormente, en la fase de *deceleración* el ritmo de crecimiento disminuirá gradualmente (Deacon, 2006).

Una vez se ha alcanzado el máximo crecimiento, se alcanza la fase *estacionaria* en la que el desarrollo se mantiene constante, y se ha demostrado que los hongos pueden mantenerse meses en esta fase, donde sobreviven sin la adición de nutrientes; además de la privación de nutrientes, otros factores que contribuyen a esta fase son algunas sustancias tóxicas del medio, cambios de pH (especialmente bajo), elevadas concentraciones de CO_2, etc. Posteriormente ocurre la última fase, de *autolisis*, donde la presencia sufre un descenso gradual (Deacon, 2006).

En las fases iniciales, principalmente en la *exponencial*, se produce el metabolismo primario del hongo, donde ocurren aquellos procesos metabólicos necesarios para el desarrollo (crecimiento + desarrollo), que resultan en metabolitos primarios como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, vitaminas o glicerol (Calvo *et al.*, 2002). En fases posteriores, de *deceleración* y *estacionaria*, ocurren los procesos de metabolismo secundario de los hongos, que facilitan la supervivencia sin afectar el crecimiento, y entre estos metabolitos secundarios se encuentran sustancias con actividad antibiótica, antifúngica, toxinas, etc.

Existen distintas clasificaciones de los hongos, morfológica (filamentosos, levaduras y dimórficos), filogenética empleando técnicas moleculares, y según la forma en la que obtienen carbono y otros nutrientes: patógenos/parásitos, simbiontes y saprofitos (Chethana *et al*., 2021). En base a esta última, se identifican hongos (Fig. 2):

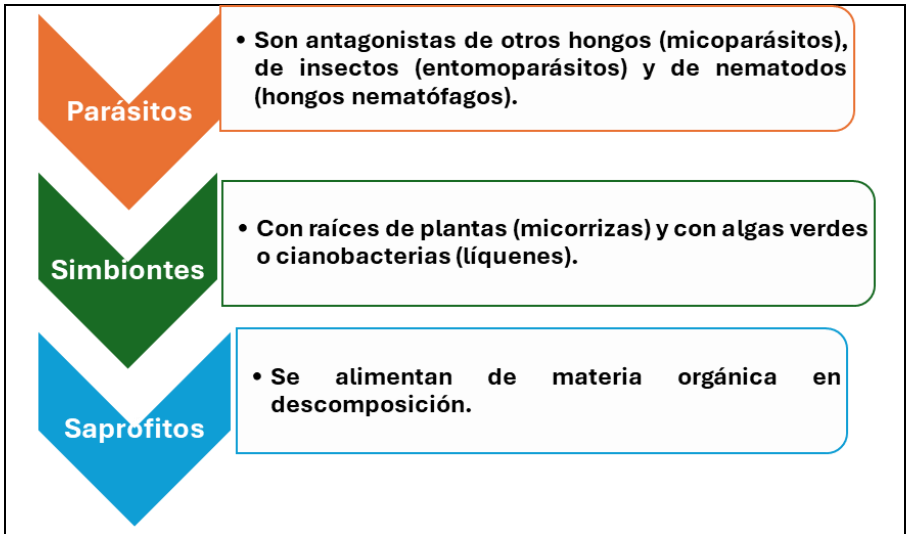


Fig. 2.- Clasificación de los hongos según el tipo de nutrición.

1.2. HONGOS PARA EL CONTROL DE PARÁSITOS

En el siglo XX se desarrollaron numerosas moléculas de acción antiparasitaria, lo que promovió el diseño de protocolos para el control de parásitos que afectaban a diferentes especies animales mantenidas en distintos regímenes. La eficacia de la mayoría de los fármacos orientó prácticamente el control a su administración únicamente, soslayando la aplicación de otras medidas para reducir el riesgo de infección, como el desarrollo de acciones sobre el medio para disminuir la viabilidad de formas infectantes, o relacionadas con el manejo de los animales para evitar su exposición (Voinot, 2022; Palomero, 2023).

Esta estrategia llevó en numerosas ocasiones a una mala praxis, con una dosificación errónea basada en la estimación incorrecta del peso de los animales, que puede desembocar en subdosificación, frecuencia excesiva de desparasitación, administración del mismo principio activo de forma continuada… Como resultado, se detectaron eficacias inferiores a las esperadas, que en ocasiones llevaron a la aparición de *resistencia antihelmíntica*, situación en la que cepas de ciertos parásitos son capaces de sobrevivir a algunos tratamientos antiparasitarios, y además *transmitir* esta capacidad a su descendencia (Fissiha & Kinde, 2021; Mickiewicz *et al*., 2021).

Ante esta situación, hacia el último tercio del siglo XX surgieron algunas corrientes que comenzaron a considerar la utilidad de complementar la administración de fármacos

antiparasitarios con otras medidas orientadas a la prevención de la infección por parásitos. De este modo, se han indicado diversas opciones, como la rotación de pastos, alternancia de especies en pastoreo, empleo de partículas de Cu… También surgió el concepto de *control biológico*, *bioprotección* o también *biocontrol*, que se define como *el procedimiento de control de plagas que emplea otros organismos, enemigos naturales, patógenos, o semioquímicos (feromonas, kairomonas, alomonas, sinomonas) y sustancias naturales* (Deiss & Edginton, 2025). De este modo, se describió la utilidad del empleo de *Bacillus thuringiesis* frente a nematodos (Vázquez-Pineda *et al*., 2011), y también algunas especies de hongos filamentosos (Larsen, 1999).

1.2.1. Actividad ovicida.

La aplicación práctica de los hongos filamentosos ha experimentado un auge notable en los últimos 50 años, en que se empezó a considerar su utilidad para el control biológico de algunas formas parasitarias que afectan a animales, e incluso pueden hacerlo al hombre. Entre estas especies se han descrito algunos hongos que son capaces de alimentarse a partir de ooquistes/huevos de parásitos que se encuentran en el suelo, y que finalmente acaban siendo destruidos. Entre éstos se identificaron especies como *Mucor circinelloides*, *Pochonia chalmydosporia*, *Trichoderma atrobrunneum*, *Verticillium chlamydosporium*, *Clonostachys rosea* o *Purpureocillium lilacinum* (Canhao-Dias *et al*., 2020; Viña *et al*., 2020; Salmo *et al*., 2024; do Carmo *et al*., 2025). La actividad ovicida de los hongos suele desarrollarse progresivamente en distintas fases:

1- Detección: el hongo detecta metabolitos y sustancias secretadas por los parásitos y en su superficie como los ascarósidos, unas moléculas de señalización (Hsueh *et al*., 2012).
2- Adherencia: las hifas crecen hacia los huevos de los parásitos y entran en contacto con la superficie de los huevos, también participan en este proceso los conidios (Hajji-Hedfi *et al*., 2023). Puede tomar lugar un proceso de diferenciación en el que se forman **apresorios**, que son modificaciones aplanadas del extremo de la hifa, con una mayor superficie, que facilitan la adherencia a la cubierta del huevo y su posterior penetración. (Al-Ani *et al*., 2022).
3- Penetración: las hifas que inciden en ángulo recto atraviesan las cubiertas y alcanzan su interior (Braga *et al*., 2009). Se produce de forma mecánica a través de los apresorios, y con la colaboración de enzimas secretadas por el hongo como proteasas, quitinasas y colagenasas (Hernández, 2019; De Freitas Soares *et al*., 2023).

4- Absorción: tiene lugar gracias a la participación de los **haustorios**, estructuras originadas en el interior de algunas hifas, y también a la secreción de enzimas encargadas de la digestión del huevo, el cual le aporta los nutrientes y energía necesarios para el desarrollo (Lopez-Llorca *et al*., 2007). Entre las enzimas secretadas se encuentran lipasas, amilasas y pectinasas (Yang *et al*., 2007).

La evaluación de la actividad ovicida suele clasificarse empleando los parámetros establecidos por Lýsek *et al*. (1982), que posteriormente han sido modificadas por Hernández *et al*. (2019):

-Tipo 1: Las hifas se adhieren a la superficie de los huevos sin causar daño.

-Tipo 2: La cubierta y el contenido interno de los huevos presentan alteraciones sin que se haya producido la penetración hifal.

-Tipo 3: Las hifas penetran y colonizan los huevos, destruyen el embrión y absorben todo el contenido interior.

1.2.1. Actividad larvicida.

Los **hongos parasitófagos** con actividad **larvicida** son prometedores en el control de parásitos que presentan formas móviles en el suelo, como las larvas de tercer estadio (L3) en la mayoría de los tricostrongílidos (Canhao-Dias *et al*., 2020). Dentro de este grupo se encuentran *D. flagrans*, *Arthrobotrys oligospora.*, *Monacrosporium cionopagum* y *Dactylella brochopage* (Deacon, 2006; Webster y Weber, 2007).

La actividad larvicida se produce de manera similar a los hongos del grupo anterior, aunque tienen ciertas peculiaridades (Freiría, 2020):

-Detección: El proceso de detección ocurre de la misma manera, guiándose por los metabolitos excretados por sus presas. Algunos hongos de este grupo, como *Arthrobotrys brochopaga*, secretan metabolitos que atraen a los nematodos (Nordbring-Hertz *et al*., 2011).

-Adherencia: Puede producirse por el contacto de las hifas y conidios del hongo con los parásitos, aunque algunos hongos, como *D. flagrans* y *A. oligospora*, forman redes tridimensionales adhesivas que se disponen alrededor de sus presas o forman anillos constrictores que permiten su captura (Nordbring-Hertz *et al*., 2011).

-Penetración: La penetración del hongo toma lugar gracias a la acción conjunta del daño mecánico producido por las propias hifas junto con la secreción de diversas enzimas (Vega y Kaya, 2012).

-Absorción: Tras la penetración se produce la digestión y absorción del contenido interno de las larvas, a través de las denominadas *hifas asimilativas* (Freiría, 2020).

1.3. HONGOS PARASITÓFAGOS ÚTILES EN EL CONTROL PARASITARIO

1.3.1. *Trichoderma atrobrunneum*

Trichoderma es un género de hongos cosmopolitas saprófitos, pertenecientes a la familia *Hypocreaceae*. Se considera un género anamorfo debido a que la mayoría de las especies que lo constituyen se reproducen de manera asexual (Webster & Weber, 2007).

Los hongos de este género son de crecimiento rápido, generalmente de color verde al observarse macroscópicamente, aunque varía según la especie (Gómez-Méndez *et al*., 2020). Microscópicamente se pueden observar las siguientes estructuras:

-Hifas: Septadas, hialinas y ramificadas irregularmente. (Martínez-Scott *et al*., 2021)

-Conidios: Esporas asexuales redondeadas, de 4 a 5 mm de diámetro (Deacon, 2006), producidas por las fiálides (Minter *et al*., 1983), pueden aparecer sueltas, en cadenas, o en estructuras denominadas conidióforos.

Fig. 3. Conidióforos de *T. atrobrunneum*, junto a un huevo de *A. suum* siendo penetrado por sus hifas.

-Conidióforos: hifa modificada que puede presentar un número variable de fiálides, donde se producen las esporas asexuales (Deacon, 2006). Los conidióforos de estos hongos son similares a los de los géneros *Chlonostacys* (antes denominado *Gliocladium*) y *Verticillium*, con una disposición piramidal/triangular (fig. 3) (Zhu *et al*., 2017).

Los hongos de este género poseen capacidad para degradar polímeros como celulosa, hemicelulosa y quitina, gracias en concreto a las enzimas β-1,3-glucanasa y quitanasas, específicamente cuando se encuentran en presencia de otros hongos (Deacon, 2006). Por este motivo, se emplean en el control biológico de hongos fitopatógenos, ya que presentan una alta actividad fungicida, con una gran diversidad de mecanismos de acción como:

-Penetrar y enroscarse alrededor de las hifas de otros hongos impidiendo su desarrollo (Deacon, 2006).

-Antibiosis por la producción de metabolitos secundarios, sustancias fungicidas y con efectos antibióticos como: 6-pentil-a-pirona, suzukacillina, Alameticina y tricodermina (Deacon, 2006).

-Micoparasitismo (Hernández-Melchor *et al*., 2019).

-La competencia por espacio y nutrientes (Hernández-Melchor *et al*., 2019).

Los mecanismos de acción parasiticida observados en algunas especies del género como *T. harzianum* son la secreción de metabolitos secundarios tóxicos (Bokhari, 2009) como PRA1 y PRB1, con acción nematocida, (Suarez *et al*., 2004), y la propia penetración de las hifas en los huevos de parásitos (Sahebani y Hadavi, 2008).

Otra especie que pertenece a este género, *T. atrobrunneum*, ha sido estudiada principalmente como promotor de crecimiento en plantas (Natsiopoulos *et al*., 2022) y antagonista de otros hongos (Gimeno *et al*., 2020), aunque en el estudio genómico realizado por Fanelli *et al*. (2018) se observó la expresión de genes relacionados con el parasitismo y la síntesis de metabolitos y enzimas con potencial de control biológico. En investigaciones recientes se ha demostrado su antagonismo frente a huevos de nematodos ascáridos, estrongílidos y tricúridos (Hernández *et al*., 2018; Viña *et al*., 2020; Díaz, 2024).

1.3.2. *Mucor circinelloides*

Mucor es un género de hongos dentro de la familia *Mucoraceae* y el orden *Mucorales*, donde la mayoría de especies son anamorfas (Hoffmann *et al*., 2013), como ocurría en el género *Trichoderma*. (Ziaee *et al*., 2016). Se encuentran dentro del grupo de los organismos saprófitos pioneros, denominados así porque son los primeros en actuar en materia orgánica en descomposición y tienen un rápido desarrollo, a diferencia de *Trichoderma* spp. los hongos de este género tienen una capacidad muy limitada para degradar polímeros complejos como la celulosa **(**Webster y Weber, 2007). Otra característica de algunas especies de este género, como *M. circinelloides* (Orlowski, 1991), es que son hongos dimórficos, capaces de alternar entre una estructura de levadura unicelular y de moho según las condiciones del medio (Deacon, 2006).

Macroscópicamente las especies del género *Mucor* pueden presentar colonias de colores como blanco y gris hasta amarillo o incluso marrón; en el caso de *M. circinelloides* son de color blanco a grisáceo, y aspecto aterciopelado (Purwantisari *et al*., 2025). Microscópicamente se pueden observar distintas estructuras:

-Hifas: Hialinas, cenocíticas, anchas y ramificadas irregularmente (Lackner *et al*., 2021), como se observa en la figura 4.

-Esporangióforo: hifa especializada en cuyo extremo se localizará la ***columela*** y el ***esporangio***, en el caso de *M. circinelloides* aparece como una ramificación simpodial de las hifas (Ziaee *et al*., 2016).

-Esporangio: estructura donde se encuentran contenidas las esporas asexuales; en el caso de *M. circinelloides* es globoso, de unos 60 µm de diámetro, y en el interior aparecen las ***esporangiosporas***, ligeramente ovaladas y de pared lisa, de entre 4 y 7 µm de diámetro (Ziaee *et al*., 2016).

Fig. 4. Esporangios e hifas de *M. circinelloides*.

Las diferentes especies del género *Mucor* secretan sustancias bioactivas como parte de su metabolismo secundario e incluso primario; por ejemplo: *Mucor ramosissimus* secreta enzimas y moléculas de señalización como oligogalacturónidos (OGAs) en presencia de *Palicourea marcgravii*, induciendo la producción de fitoalexinas, las cuales son compuestos con actividad antimicrobiana sintetizadas por las plantas (Marques *et al*., 2006). En el caso de *M. circinelloides* se ha estudiado la producción de distintos tipos compuestos bioactivos como diversos antioxidantes (Hameed *et al*., 2017), carotenoides (Nicolás *et al*., 2008) y lípidos microbianos (Rodríguez-Frómeta *et al*., 2012). En un estudio donde se obtuvieron metabolitos producidos por *M. circinelloide*s en biomasa, en concreto la fracción $CHCl_3$, se observó actividad frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Bacillus subtilis* (ATCC 25921) (Chaparro y Campuzano, 2018).

En relación con la actividad parasiticida, se han llevado a cabo distintos trabajos realizados evaluando la eficacia de la acción parasiticida de *M. circinelloides* disminuyendo la viabilidad de

los huevos de *Calicophoron daubneyi*, observándose actividad ovicida de tipo 3 donde se produce la pentración hifal y destrucción del embrión (Arroyo *et al*., 2017) y disminuyendo significativamente la eliminación de coccidios del género *Eimeria* en pavos reales tras 45 y 60 días desde el comienzo de su administración con el pienso (Lozano *et al*., 2024), además se ha observado que la actividad parasiticida de *M. circinelloides* se mantiene tras la fabricación industrial de pellets nutricionales (Arroyo *et al*., 2015). Por último, se ha demostrado que el desarrollo y actividad parasitófaga no resultan afectadas en presencia de anticoccidiósicos como Lasalocid, Amprolio y Toltrazurilo, ni de antihelmínticos como Albendazol, Fenbendazol, Levamisol e Ivermectina (Lozano *et al*., 2023). Recientemente se ha indicado que no existe ningún problema en el desarrollo de *M. circinelloides* en presencia de Levamisol o Piperazina, lo que significa un gran avance en las posibilidades de administración conjunta de un tratamiento curativo y otro preventivo (Zubiría *et al*., 2025).

1.3.3. *Clonostachys rosea*

Se trata de otro género de hongos anamórfico dentro del orden *Hypocreales* (Webster y Weber, 2007). La especie *C. rosea* se denominaba previamente *Gliocladium roseum*, y es una de las especies más destacadas dentro del género debido a sus usos como agente de biocontrol y la alta cantidad de metabolitos secundarios que produce, destacando que más de 200 han sido ya identificados (Han *et al*., 2020).

Macroscópicamente tanto el color como la textura de las colonias de *C. rosea* presentan variaciones dependientes al medio del que proceden, en el estudio realizado por (Nagaraj *et al*., 2023) donde se tomaron muestras de distintas localizaciones se observó como presentaban colores desde blanco hasta salmón y la textura variaba desde plana hasta algodonosa. Microscópicamente se pueden observar:

-Hifas: son septadas e hialinas. (Tamta *et al*., 2022).

-Conidios: redondos, de $2.7 \pm 0.2 \times 1.6 \pm 0.4$ µm (Nagaraj *et al*., 2023).

-Conidióforos: son hialinos y ramificados, de dos tipos: a) en forma de cepillo con una mayor densidad de fiálides, y b) verticiladas, ramificadas, de manera similar a los conidióforos de *Verticillium* (Nagaraj *et al*., 2023).

Como agente de control biológico, *C. rosea* actúa de manera similar a los hongos anteriores: Compite por los recursos del medio y espacio, y como micoparásito, sus hifas penetran y se enrollan alrededor de las de hongos patógenos del medio (Geiger *et al*., 2022; Nagaraj &

Kolanthasamy, 2024). Se ha demostrado que secreta enzimas como quitinasas y proteasas (Pachenari & Dix, 1980), y también metabolitos secundarios con actividad antibacteriana como bisorbicillinoides y TMC-151 C y E (Zhai *et al*., 2016), y epipolisulfanildioxopiperazinas con actividad nematocida (Dong *et al*., 2005).

Además, se ha probado la actividad ovicida de *C. rosea* al inocular sus esporas sobre heces de cerdos infectados por el nematodo *Ascaris suum* (Viña *et al*., 2020), que se debe a la capacidad de adherirse a la cutícula de los huevos, penetrar y destruirlos (Zhang *et al*., 2008) como se observa en la Figura 5. El antagonismo también ha sido demostrado frente a larvas de tercer estadio (L3, infectantes) del nematodo gastrointestinal hematófago *Haemonchus contortus*, observándose más efectividad cuando *C. rosea* fue el único hongo administrado (Da Silva *et al*., 2015).

Fig. 5. Huevo de *A. suum* destruído y parcialmente absorbido por *C. rosea*.

1.3.4. *Duddingtonia flagrans*

Hongo nematófago saprófito perteneciente a los Ascomicetos (orden *Orbiliales*). Tiene hifas septadas, hialinas (transparentes) y ramificadas, capaces de formar trampas adhesivas (Anan'ko y Teplyakova, 2011).

Producen clamidosporas, estructuras de resistencia gruesas y duraderas (Fig. 6), que son resistentes al paso por el tracto digestivo, sin pérdida de actividad parasiticida, por lo que pueden germinar en las heces donde se encuentran las larvas de los nematodos (Larsen, 1999).

Una característica de *D. flagrans* es la formación de redes tridimensionales adhesivas para atrapar nematodos, los extremos de hifas curvadas se anastomosan y se disponen sobre el micelio (Webster y Weber, 2007), estas redes no se producen de manera espontánea, es necesario el estímulo de las excreciones de los nematodos y que el medio no sea demasiado rico en nutrientes para que se produzca la transición a hongo depredador (Anan'ko y Teplyakova, 2011). Sin embargo, Arias *et al*. (2013) demostraron que la presencia de fasciolas y paramfistómidos adultos estimulaba el desarrollo del micelio de *D. flagrans*, y Suárez (2017) lo confirmó con larvas muertas de *Anisakis* spp.

La actividad nematocida de *D. flagrans* incluye otros mecanismos de acción como la actividad enzimática de las proteasas y quinasas secretadas por el hongo (Braga *et al*., 2015).

En un estudio realizado por Silva *et al*. (2010) en el que se evaluó la actividad ovicida de *D. flagrans* (AC001) sobre huevos de *T. vulpis*, se observó que sólo se producía la adherencia de hifas a la cubierta externa de los huevos sin causar la destrucción ni daños notables en los mismos.

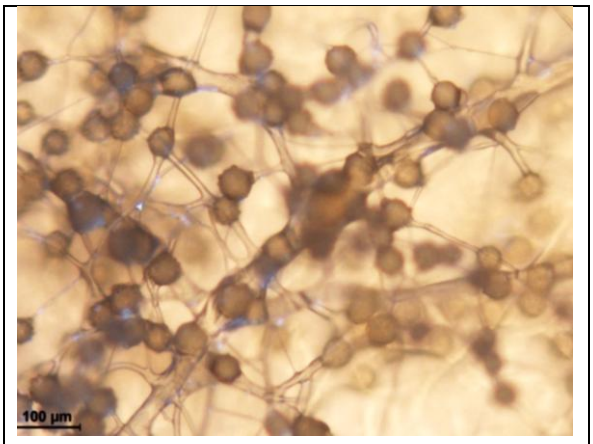


Fig. 6. Esporogénesis de *D. flagrans* con gran formación de clamidosporas.

1.4. HELMINTOS RESPONSABLES DE SAPROZOONOSIS

Se conocen numerosas especies de parásitos que desarrollan parte de su ciclo en el medio (suelo), donde tienen lugar una serie de fases que llevan a alcanzar las fases que causan infección a animales y personas (Ziliotto *et al*., 2023). Con el término *Soil-Transmitted Parasites* se incide precisamente en la importancia de este medio desde un punto de vista de transmisión de ciertas enfermedades, y aunque se suele acotar a los helmintos (*Soil-Transmitted Helminths*, STHs), es importante tener en cuenta que muchas especies de protozoos (*Eimeria* spp., *Cystoisospora* spp., *Isospora* spp., *Sarcocystis* spp.) también completan algunas fases en el suelo (Lozano *et al*., 2023).

Gran parte de estos STHs tienen en común la característica de que las formas adultas (hembras en el caso de nematodos) eliminan huevos sin desarrollar a través de las heces, y una vez en el suelo, se suceden diferentes fases hasta alcanzar los estadios infectantes. Este aspecto resulta muy importante porque la infección no depende del contacto directo con hospedadores infectados, sino con huevos que contienen una larva infectante en su interior (ascáridos, tricúridos), formas de resistencia como *metacercarias* (trematodos) o *larvas* (tricostrongílidos, estrongílidos, ancylostómidos) (Hernández, 2019). Las infecciones provocadas por algunos de estos agentes pueden afectar a animales y personas, y se denominan ***saprozoonosis***.

1.4.1. *Ascaris suum*

Fig. 7. Los huevos de *A. suum* miden 45-75 x 35-40 µm, y presentan unas protrusiones características, los *mamelones*.

Se trata de un nematodo gastrointestinal zoonósico, de distribución cosmopolita, que parasita principalmente a cerdos y jabalíes (Farkas *et al*., 2024). El ciclo biológico es directo, sin hospedadores intermediarios (Bowman, 2011). Los animales infectados excretan huevos no embrionados en sus heces, de color marrón dorado, con forma ovalada o elíptica (Fig. 7). Estas formaciones presentan una cubierta gruesa compuesta por 4 capas: capa interna de lipoproteínas denominada capa ascarósida, capa de quitina/proteína, capa vitelina compuesta de lipoproteínas (Wharton, 1980) y una capa externa uterina de mucopolisacáridos/proteínas (Kim *et al*., 2012). Son muy resistentes a desinfectantes, cloración, radiación UV y temperaturas elevadas (Brownell & Nelson, 2006; Oh *et al*., 2016). En un ambiente adecuado (20-30º y elevada humedad) desarrollarán en su interior una larva de primer estadio o L1, que se convierte en otra L2 infectante, en un periodo de 2 a 4 semanas (Asaolu & Ofoezie, 2018). Tras la ingestión de los huevos infectivos con L2 (si no contiene esta L2 no supone ningún riesgo), se produce la eclosión en estómago e intestino delgado.

Es responsable de graves perjuicios económicos, entre los que destacan la menor ganancia de peso (Whitehead *et al*., 2022) y el decomiso de hígado, pulmones e intestinos. En un matadero de la Comunidad Autónoma Valenciana se evaluó la presencia de *A. suum* y se obtuvo una prevalencia del 10,20% (Sanchis & Mateu, 2020).

La infección en humanos por *A. suum* se observa principalmente en países en desarrollo, regiones rurales, e incluso en zonas industrializadas y urbanas donde no se aplican prácticas de higiene adecuadas. Otro factor que puede facilitar su transmisión es el uso de heces de cerdo como fertilizante en determinadas regiones (Kim *et al*., 2012).

1.4.2. *Toxascaris leonina*

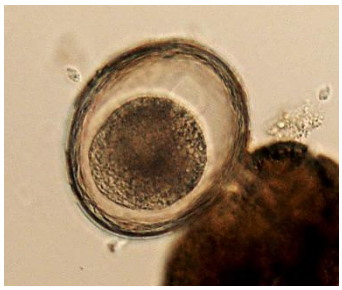


Fig. 8. Los huevos de *T. leonina* miden 59-88 x 59-74 µm.

Es un nematodo gastrointestinal de gatos y perros, que también ha sido observado en otras especies como el lince, y del que se discute su carácter zoonósico (Gallardo-Santis *et al*., 2015). Los huevos de *T. leonina* son ovalados, con una cubierta lisa (principal diferencia con *Toxocara* spp.) y gruesa (Fig. 8) (Xue *et al*., 2014).

El ciclo biológico también es directo, aunque existen pequeños vertebrados que actúan como hospedadores paraténicos como los ratones (Okulewicz *et al*., 2012). Al ingerir huevos infectantes (contienen una L2) o un hospedador paraténico del medio, llegan al intestino delgado, donde las larvas salen e invaden la pared intestinal y quedan enquistadas (Bowman, 2011). Los huevos tardan 1-2 semanas en convertirse en infectantes.

1.4.3. *Trichuris* spp.

Se trata de un género de nematodos que incluye a una gran diversidad de especies (más de 70), con gran variedad hospedadores dependiendo de la especie, algunas con potencial zoonósico, siendo *T. trichuria* la más observada en personas y primates como chimpancés (Horton, 2014) y babuinos (Eo *et al*., 2018).

Los huevos de *Trichuris* spp. son extremadamente resistentes, pueden permanecer infectantes hasta 2 años en condiciones adecuadas (Horton, 2014), y se caracterizan por su coloración marrón, y forma de barril o limón con opérculos polares bien definidos (Fig. 9) (Appleton & White, 1989). La cubierta externa está compuesta de 3 capas (Wharton & Jenkins, 1978): una capa vitelina externa (es la de menor grosor), otra intermedia compuesta por un complejo de quitina/proteínas (la más gruesa), y otra interna lipídica. Los opérculos o tapones en los extremos de los huevos son una continuación de la capa intermedia de quitina, aunque su composición varía respecto al resto de la membrana adyacente, y se observa un menor soporte estructural, lo que se identificó como un posible "punto débil" (Appleton & White, 1989).

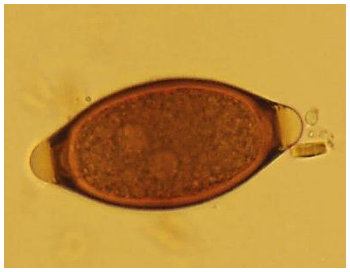


Fig. 9. Los huevos de *Trichuris* miden 60 x 25 µm y tienen unos tapones polares característicos.

El ciclo biológico también es directo, sin hospedadores intermediarios (Horton, 2014). Los huevos en el suelo tardan un mínimo de 2 semanas en desarrollarse en condiciones óptimas, con elevada temperatura y humedad. Tras ser ingeridos los huevos eclosionan en el intestino delgado y las larvas 1 penetran y se fijan en la pared intestinal, donde posteriormente experimentan 4 mudas hasta llegar a su estadio adulto (Horton, 2014).

En un estudio realizado por Whitehead *et al*. (2022) se evaluó el efecto de *T. suis* y *A. suum* en la ganancia de peso de cerdos entre 0 y 14 semanas, observándose que *T. suis* provocaba una disminución mayor que *A. suum*. Además del impacto económico también tiene importancia en salud pública dado el potencial zoonósico de algunas especies como *T. trichuria, T. suis* y *T. vulpis* (Yousuf *et al*., 2022).

1.5. PROPAGACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS: MEDIOS DE CULTIVO

En el desarrollo de estrategias de control biológico basadas en el empleo de ciertas especies de hongos filamentosos, una parte importante de las investigaciones se han centrado en la producción de cantidades elevadas de esporas para poder afrontar diferentes situaciones, protocolos, regímenes de cría de animales, etc. (Freiría, 2020). La mayoría de las soluciones se han basado en el empleo de medios de cultivo sólidos a base de agar suplementado con cereales, siendo más reciente la utilización de medios líquidos (Arias *et al*., 2013). En la última década se ha demostrado la eficacia diferentes medios de cultivo líquidos para la obtención de cantidades elevadas de esporas de *M. circinelloides* o *D. flagrans* (Rodríguez-Sierra, 2017; Hernández, 2019; Freiría, 2020).

Recientemente, se ha empezado a considerar la posibilidad de reciclar subproductos alimentarios en la producción de esporas (Hamdi *et al*., 2022; Kumar *et al.*, 2025), como por ejemplo el aceite de cocina usado (Viñolo, 2025).

1.5.1. Aceite usado de cocina

El aceite de cocina usado (ACU) es un subproducto del proceso de freír alimentos en grasas o aceites. Este tipo de desecho se genera principalmente en cocinas, industrias alimentarias y hogares como resultado de la preparación de alimentos, y debido a que es insoluble en agua, representa un contaminante ambiental (Olu-Arotiowa *et al*., 2022).

El manejo de este residuo (se denomina *residuo* cuando se elimina sin tratamiento, y *subproducto* si se somete a algún tratamiento) presenta desafíos importantes para los sistemas de recolección y transporte, ya que el aceite usado generalmente se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente. Si no se gestiona adecuadamente, puede terminar en el sistema de alcantarillado y diversas masas de agua, causando aún más daños al medio ambiente.

La mayor parte del aceite de cocina usado proviene de restaurantes y otros productores de la industria alimentaria. Las tuberías y mecanismos de desagüe domésticos no están diseñados para soportar grandes cantidades de grasas, aceites y restos grasos (FOGs), que pueden acumularse y obstruirlos, provocando reflujo y posibles inundaciones (Olu-Arotiowa *et al*., 2022). Cuando se desechan FOGs por los desagües, no solo afectan a nivel doméstico, sino que también pueden causar daños en el sistema de alcantarillado municipal, generando atascos graves con el tiempo.

Todas las formas de desechar los ACU supone un riesgo ambiental variable, tanto los métodos industriales, por ejemplo: el vertido al mar de los aceites, como los métodos domésticos, por ejemplo: los pozos/estanques de residuos, suponen un riesgo variable al medio ambiente y,

especialmente en el caso de los métodos industrial, un gasto económico considerable, por lo que los métodos de reciclaje de estos ACU están tomando más interés, en este estudio usamos los ACU como fuente de energía y carbono para los medios de cultivo de los hongos.

El aceite de cocina usado está compuesto principalmente por triglicéridos, monoglicéridos y diglicéridos, además de contener entre un 5% y un 20% en peso de ácidos grasos libres, los cuales se generan durante el proceso de fritura. (Olu-Arotiowa *et al*., 2022).

En el estudio realizado por Molokwu & Okpokwasili (1997) se empleó un 1% de distintos tipos de aceites como fuentes de carbono en los medios de cultivo de distintos hongos, incluyendo mohos como *Aspergillus jlavus, Aspergillus niger, Aspergillus sp., Penicillium sp. y Fusarium sp*. y un cultivo mixto de distintas levaduras unicelulares*: Saccharomyces sp., Candida sp. y Hansenula sp.* Se observó un crecimiento notable en todos los grupos, al medir el peso en seco del micelio.

En otro estudio realizado por Papanikolaou *et al*. (2011) se emplearon 15g/l de aceite de oliva usado para realizar los medios de cultivo de cinco cepas de *Aspergillus* y una de *Penicillium*, obteniéndose un aumento elevado de la producción de biomasa, a pesar de emplearse condiciones con cantidades limitadas de carbono.

En una investigación reciente se ha demostrado la utilidad de añadir diferentes concentraciones de ACU a medio de cultivo líquido para la producción de esporas de *M. circinelloides* (Viñolo, 2025).

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos, se planteó un estudio para alcanzar los **objetivos** siguientes:

1.- Analizar de forma comparada el antagonismo de *Trichoderma atrobrunneum*, *Mucor circinelloides* y *Clonostachys rosea* sobre los huevos del nematodo *Ascaris suum*.

2.- Examinar el desarrollo de *T. atrobrunneum* en cultivos con aceite de cocina usado.

3.- Determinar la actividad parasitófaga de *T. atrobrunneum*, cultivado con aceite de cocina usado, sobre huevos de agentes responsables de saprozoonosis.

4.- Establecer la utilidad de añadir aceite de cocina usado para la propagación de hongos parasitófagos empleados en el control biológico de parásitos en el suelo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En el diseño experimental del presente estudio se consideró una prueba para delimitar en el tiempo la actividad antagonista de *T. atrobrunneum* en condiciones conocidas, comparándola con otros hongos parasitófagos (*M. circinelloides*, *C. rosea*).

A continuación, se desarrolló otra prueba para analizar la actividad antagonista de *T. atrobrunneum* sobre huevos de helmintos, con la particularidad de que el hongo se propagó en medio de cultivo sólido con diferentes concentraciones de ACU.

Finalmente, la tercera prueba consistió en evaluar el rendimiento del empleo de un medio de cultivo líquido con diferentes concentraciones de ACU, para el desarrollo (producción de esporas) de *T. atrobrunneum*.

El desarrollo de las pruebas experimentales descritos en este estudio requirió más de 210 horas de dedicación en el laboratorio.

3.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

En el presente trabajo se emplearon medios de cultivo sólidos (con y sin ACU), y líquidos con ACU.

3.1.1. Medio sólido sin ACU.

Se preparó un medio de cultivo sólido a base de 100 mL de agua destilada, 2.5 g de trigo y 2.5 g de agar. Una vez mezclados, se esterilizó el medio en autoclave a 121ºC durante 20 min, y todo el proceso duró alrededor de una hora y media.

Cuando la temperatura del medio descendió a 40-50ºC, en una cámara de flujo laminar con llama (mechero Bunsen) se vertió en placas Petri hasta completar 2/3 del volumen aproximadamente, y se dejó solidificar (Fig. 10). Todo este proceso se realizó con guantes y se empleó alcohol al 70% para desinfectarlos de forma regular, para evitar contaminaciones secundarias.

Fig. 10. El medio de cultivo esterilizado se vierte en placas Petri dentro de la cámara de flujo laminar

En total se acondicionaron 12 placas, cuatro para el cultivo de cada hongo, *T. atrobrunneum*, *M. circinelloides* y *C. rosea*. La siembra se llevó a cabo colocando en cada placa un inserto de alrededor de 2x2 cm, obtenido de placas madre de cada especie de hongo (*una placa madre es aquella en la que se ha desarrollado el hongo al menos 3 semanas después de su siembra*).

3.1.2. Medio sólido con ACU.

Se mezclaron 100 mL de agua destilada, 2.5 g de levadura de trigo, 2 g de agar comestible (Porto-Muíños®, A Coruña) y cinco cantidades diferentes de ACU (Tabla 1).

GRUPO	**COMPOSICIÓN**
0% Aceite (testigo)	100ml de agua + 2.5 g de trigo
1% Aceite	99ml de agua + 1ml de aceite + 2.5 g de trigo
2% Aceite	98ml de agua + 2ml de aceite + 2.5 g de trigo
5% de aceite	95ml de agua + 5ml de aceite + 2.5 g de trigo
10% aceite	90mL de agua + 10mL de aceite + 2.5 g de trigo

Tabla 1. Se prepararon medios de cultivo sólidos con diferentes proporciones de ACU para evaluar el antagonismo de *T. atrobrunneum* frente a huevos de *Trichuris* sp.

Como se mencionó en el apartado anterior, los medios se esterilizaron en autoclave (121ºC/20 min), y cuando enfriaron (40-50ºC), se vertieron en placas Petri hasta cubrir aproximadamente dos tercios o la mitad de la altura de la placa. Posteriormente, se introdujo un inserto de aproximadamente 2x2 cm de *T. atrobrunneum* (recortado de una placa madre) en cada placa. En total, se prepararon 6 placas por cada grupo considerado.

3.1.3. Medio líquido con ACU.

Para analizar el desarrollo de *T. atrobrunneum* y compararlo al de *Mucor circinelloides*, se prepararon medios líquidos con cuatro porcentajes distintos de aceite, y dos réplicas para cada uno. Se empleó trigo como fuente de carbono y energía, al que se le añadieron 100 mL de una mezcla compuesta por agua destilada y ACU (Tabla 2).

GRUPO	COMPOSICIÓN
0% Aceite (testigo)	100ml de agua + 2.5 g trigo
1% Aceite	99ml de agua + 1ml de aceite + 2.5 gramos de trigo
2% Aceite	98ml de agua + 2ml de aceite + 2.5 gramos de trigo
5% de aceite	95ml de agua + 5ml de aceite + 2.5 gramos de trigo

Tabla 2. El desarrollo de *M. circinelloides* y *T. atrobrunneum* se evaluó en medios con diferente riqueza en ACU.

El aceite usado (ACU) se obtuvo de una freidora doméstica, tras unos 4-5 usos. Una vez preparados los medios de cultivo, se introdujeron en el autoclave para su esterilización, junto con el resto de los instrumentos (espátulas, puntas de pipeta, etc.) que fueron empleados. Este proceso consistió en exponerlos a 121ºC durante 20 min, como se ha indicado previamente.

Cuando el material disminuyó de temperatura, y con objeto de trabajar en condiciones estériles para evitar la contaminación de los distintos cultivos, se trabajó en una cámara de flujo laminar con llama (mechero Bunsen), además, debemos emplear guantes y utilizar alcohol 70% para desinfectar los guantes regularmente por la misma razón.

3.2. OBTENCIÓN DE HUEVOS DE HELMINTOS

En la presente investigación se evaluó la actividad parasiticida de hongos filamentosos frente a huevos de los helmintos *Ascaris suum*, *Toxascaris leonina* y *Trichuris* sp.

3.2.1. Aislamiento de huevos de *A. suum*, *T. leonina* y *Trichuris* sp.

Para evaluar la posible actividad parasiticida de los hongos sobre huevos de parásitos de interés veterinario y salud pública, se recogieron heces de babuinos () y linces (*Lynx linx*) mantenidos en el parque zoológico “Marcelle Natureza” (Outeiro de Rei, Lugo), y de lechones criados en la granja de PRODEME (Monforte de Lemos), organización sin ánimo de lucro que se dedica al cuidado de adultos con discapacidad intelectual.

En primer lugar, se analizaron muestras de los animales indicados mediante la **técnica de flotación en solución salina saturada**, que hace posible la detección de ooquistes y quistes de protozoos, y de huevos de nematodos gastrointestinales, en base a la utilización de una solución saturada de cloruro sódico (ρ= 1.2 g/cm^3). Se emplean soluciones de alta densidad que permiten

que los elementos parasitarios, menos densos, floten y puedan ser recolectados en la superficie del líquido. Se utilizó el protocolo siguiente:

1. Colocar 3 g de heces en un recipiente, añadir 42 mL de agua destilada y homogenizar completamente la muestra.

2. Filtrar la solución a través de un tamiz con una malla de 0.150 mm de diámetro de poro para eliminar las partículas de mayor tamaño y restos de materia orgánica.

3. Distribuir el filtrado en tubos de 12 mL.

4. Centrifugar los tubos a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos.

5. Retirar con cuidado el sobrenadante de cada tubo, dejando el sedimento en el fondo, ya que aquí se encuentran los huevos concentrados.

6. Rellenar con solución salina saturada, homogenizando el contenido para que se visualice correctamente al microscopio.

7. Esperar un par de minutos para permitir que los huevos asciendan a la superficie de la solución.

8. Con ayuda de una pipeta Pasteur desechable, rellenar las dos partes de una cámara de McMaster y visualizar al microscopio (4-10X).

En este caso, el análisis de las muestras de heces de babuinos resultó en la observación de 40 huevos de *A. suum*, 10 de *T. leonina*, y 25 de *Trichuris* sp. en la cámara de McMaster, y como el factor de conversión es de 50 cuando se analizan 3 g de heces, el número total fue de 2000, 500 y 1250 huevos/g de heces (HPG), respectivamente. Con el fin de incrementarlo, el paso siguiente consistió en concentrar estas formas parasitarias.

3.2.2. Concentración de huevos de *A. suum*, *T. leonina* y *Trichuris* sp.

La concentración de huevos, aunque similar al proceso de flotación, tiene como objetivo incrementar la concentración sin que, obviamente, experimenten daños o alteraciones, manteniéndose viables hasta su empleo. En este estudio se aplicó el protocolo siguiente:

1. Pesar 3 g de heces y mezclar con 42 mL de agua (o una proporción equivalente como 6 g de heces y 84 mL de agua).

2. Tamizar con malla de 150 μm y colocar el filtrado en tubos de vidrio.

3. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min.

4. Eliminar el sobrenadante, rellenar con solución salina saturada y homogenizr la muestra.

5. Centrifugar (a 3000 rpm/5 min).

6. Recuperar con una pipeta aproximadamente 2 mL de la zona más superficial de cada tubo, con cuidado de no mezclar de nuevo la muestra, ya que la solución salina habrá hecho que estos asciendan, y pasar a un tubo limpio.

7. Añadir agua a los nuevos tubos, homogeneizar y centrifugar (a 3000 rpm/5 min) para eliminar los restos de la solución salina.

8. Eliminar el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 1 mL en cada tubo.

9. Repetir los lavados (pasos 7 y 8) otras dos veces. De este modo se eliminan los restos de solución salina, que pueden provocar la rotura de los huevos.

Para determinar el nº de huevos/mL, se colocaron 25 µL del concentrado entre un portaobjetos y un cubreobjetos de vidrio, y se examinaron al microscopio (4-10X). El recuento obtenido se multiplicó por 40 para obtener el nº total de huevos por mL:

$$\frac{1000\mu L\ en\ 1\ ml}{25\mu L\ examinados}\text{x huevos observados} = 40\text{ x huevos observados} = \text{huevos/mL muestra}$$

Se decidió emplear 150 huevos de cada helminto en cada placa, procediendo a la estimación del volumen de solución concentrada de huevos que sería necesaria:

$$mL\ empleados\ en\ la\ siembra = \frac{Huevos\ sembrados\ en\ cada\ placa(150)}{Huevos/mL}$$

El área donde se depositaron los huevos se demarcó con rotulador permanente en la case de la placa, para facilitar su futura visualización bajo el microscopio.

3.3. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD PARASITICIDA SOBRE HELMINTOS

Para determinar el efecto de *T. atrobrunneum* sobre huevos de helmintos, en presencia de ACU, se diseñaron dos pruebas en placas Petri.

3.3.1. Antagonismo de *T. atrobrunneum*, *M. circinelloides* y *C. rosea*.

Esta primera prueba se realizó en ausencia del aceite, y se estableció la cronología de la actividad, comparándola con la de otros dos hongos filamentosos, *M. circinelloides* y *C. rosea*.

Como se indicó anteriormente, en 12 placas Petri con agar-trigo sembradas con los hongos señalados (cuatro por cada hongo), se dispusieron 150 huevos de *A. suum*. Dos veces por semana, durante un periodo de ocho semanas, se examinaron las placas para evaluar si se desarrollaba el micelio, si las hifas se adherían a los huevos, qué efecto ejercían, etc.

El análisis del efecto de los hongos sobre los huevos de diferentes helmintos en placas Petri consistió en la evaluación de ≥100 huevos/placa, y los resultados se expresaron en porcentajes. Los huevos se clasificaron en no viables y viables, en función de la integridad de la cubierta, presencia de todas las estructuras (tapones polares), o de vacuolas en el citoplasma (Hernández, 2019; Viñolo, 2025).

3.3.2. Actividad de *T. atrobrunneum* en presencia de ACU.

En esta segunda prueba se utilizaron placas con agar-trigo y ACU, que se sembraron con *T. atrobrunneum*, y se añadieron huevos de *T. leonina* y *Trichuris* sp., que se obtuvieron previamente de heces de babuinos (*Papio hamadryas*) y de linces (*Lynx lynx*) recogidas en el parque zoológico Marcelle Natureza (Outeiro de Rei, Lugo). En concreto, se prepararon seis placas para cada helminto, y se depositaron 150 huevos en cada una.

3.4. PROPAGACIÓN DE *T. atrobrunneum* EN MEDIO LÍQUIDO CON ACU

Con objeto de conocer el rendimiento de medios con ACU para la obtención de esporas de *T. atrobrunneum*, se utilizaron medios con 0% (testigo), 1%, 2% y 5% ACU. Además, se desarrolló en paralelo otro ensayo idéntico, pero con *M. circinelloides*, para comparar los resultados

Cada medio fue inoculado con **500 µL de un cultivo líquido (madre)** de los respectivos hongos con 10^5 esporas/ml para iniciar el desarrollo. Tras un periodo de incubación de dos semanas, se extrajeron 10 µL de los recipientes para evaluar la concentración de esporas, que se realizó con ayuda de una **cámara de Neubauer**, se realizó una dilución 1:9 (una parte del medio y nueve partes de agua destilada), con el objetivo de facilitar el recuento.

Recuento de esporas:

Se emplea la cámara de Neubauer, un dispositivo de recuento celular que permite determinar la concentración de esporas en una suspensión.

-Carga de la muestra en la cámara

Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y posteriormente se depositaron 10 µL de la suspensión de esporas con una micropipeta por capilaridad, tras esperar un par de minutos para que se asentaran las esporas se hizo el recuento.

-Recuento de Esporas en el Microscopio

Se examinó la cámara de Neubauer en el microscopio a 40X. El recuento se realizó observando los cuadrantes de mayor tamaño tienen una superficie de 0.01cm^2 y se subdividen a su vez en 16 cuadrados pequeños. En la figura 11 se observan las esporas de *M. circinelloides* en uno de estos 16 cuadrados.

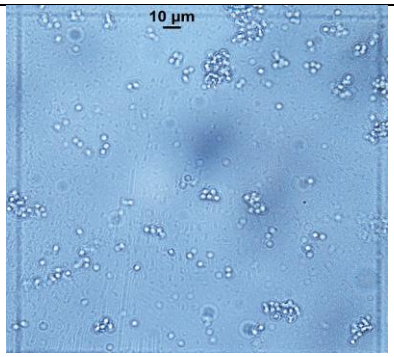


Fig. 11. Esporas de *M. circinelloides* a 20X.

-Cálculo del nº de esporas/mL

Tras el recuento se calculó el número de esporas por mL, multiplicando el número de esporas obtenidas por 10^5: este cálculo proviene de que la profundidad de la cámara es de 0.1 mm (0.01 cm), y de que la superficie de recuento es de 0.01 cm^2 por lo que:

0.01 cm (altura) x 0.01 cm^2 (superficie de recuento) = 0.0001 cm^3 de volumen evaluado.

0.0001 cm^3 = 0.0001 mL = 0.1 µl de volumen evaluado.

1 mL=1000 µl, por lo que se multiplica el número de esporas observadas por 10^4. Teniendo en cuenta el factor de dilución 1:9, se multiplicó por 10 este resultado: 10 x 10^4 = 10^5.

3.5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Con las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene se determinó que los datos recabados no seguían una distribución normal (P< 0.05), de modo que se procedió a la utilización de las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis, considerando significación si P< 0.05. Los recuentos de huevos se expresaron como porcentajes, con el intervalo de confianza al 95% (IC 95%).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO ANTAGONISTA FRENTE A HUEVOS DE *A. suum*

Como se explicó en el apartado **3.2.1.**, se estudió el efecto de *T. atrobrunneum* sobre los huevos del nematodo *A. suum*, comparándolo con el de *M. circinelloides* y el de *C. rosea*, en placas con medio agar-trigo. En la Figura 12 se puede comprobar que se establecieron diferencias mínimas ente las distintas especies, localizándose en una actividad un poco más precoz con *Clonostachys* en las fases de desarrollo de hifas y de adherencia a la cubierta de los huevos de *A. suum*; no se detectaron diferencias entre *T. atrobrunneum* y *M. circinelloides*.

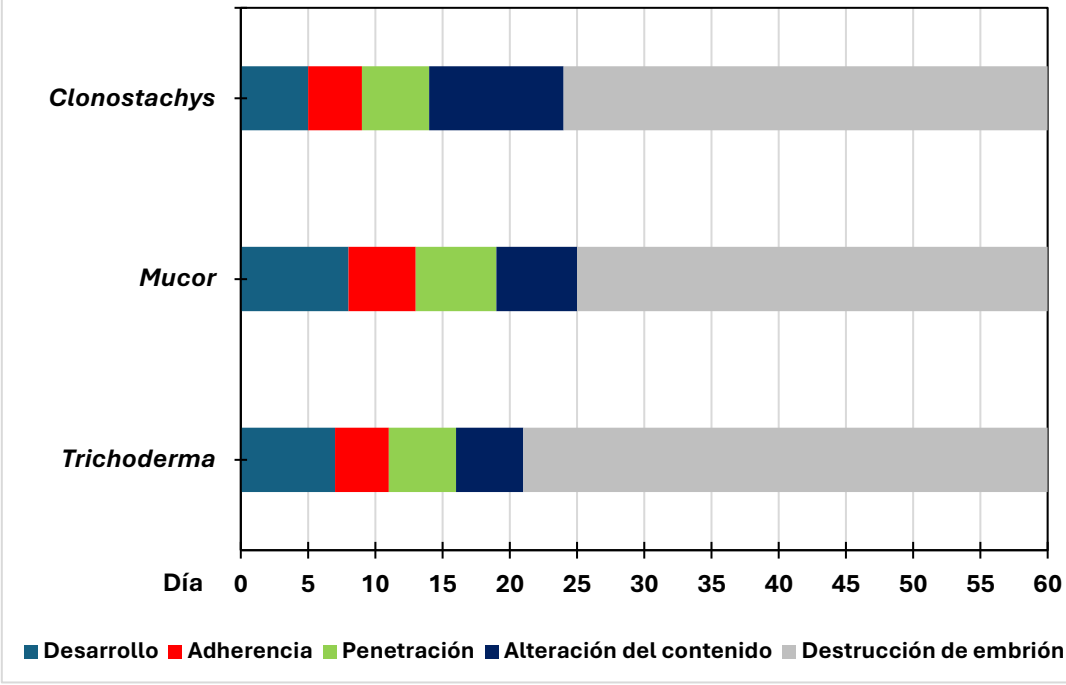


Fig. 12.- Los hongos *T. atrobrunneum*, *M. circinelloides* y *C. rosea* ejercieron antagonismo sobre los huevos de *A. suum*, que resultó muy similar entre los tres, y en especial entre *Trichoderma* y *Mucor*.

A los 30 días, el porcentaje de huevos de *A. suum* con alteraciones irreversibles resultó del 63% (IC 95%: 50-75) con *T. atrobrunneum*, 66% (51-81) con *M. circinelloides*, y 54% (41-67) con *C. rosea*. Al final del estudio (día 60), se obtuvieron unos porcentajes de huevos con daños permanentes del 71% (IC 95%: 60-72) con *T. atrobrunneum*, 74% (63-85) con *M. circinelloides*, y 63% (54-72) con *C. rosea*. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tres hongos (χ^2= 0.985, *P*= 0.842).

Estos resultados confirman que los tres hongos parasiticidas ejercen un efecto ovicida de tipo 3 de acuerdo con la clasificación de Lýsek *et al*. (1982), puesto que las hifas de cada uno fueron capaces de adherirse a la cubierta de los huevos del nematodo, penetrarla y asimilar su contenido interno (Figura 13). En investigaciones previas se ha demostrado que la pulverización de esporas

de *M. circinelloides* sobre heces de suidos que eliminaban huevos de *A. suum* resultó en una reducción de la viabilidad de estos huevos del 53%, por un 60% cuando se administraron las esporas por vía oral a los animales (Cortiñas *et al*., 2015).

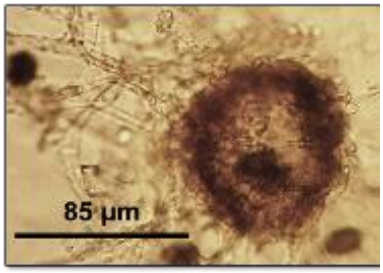
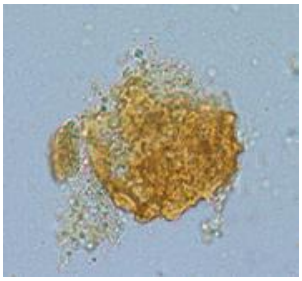
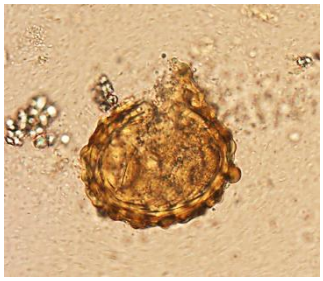
T. atrobrunneum	***M. circinelloides***	***C. rosea***
		

Fig. 13.- Los huevos de *A. suum* resultaron dañados de forma irreversible tras la exposición a los hongos *T. atrobrunneum*, *M. circinelloides* y *C. rosea*.

Más recientemente, Díaz (2024) señaló que el hongo *C. rosea* desarrollaba fundamentalmente un efecto ovistático (de inhibición del desarrollo) sobre los huevos de *A. suum*, y que con *T. atrobrunneum* se alcanzaba un efecto ovicida moderado (30%) a los 45 días de exposición. Es importante tener en cuenta que este estudio se realizó en medio líquido, mientras que el presente se llevó a cabo en placas Petri con agar-trigo, lo que favorece el desarrollo de micelio (Figura 6), y con ello la actividad antagónica sobre los huevos del nematodo. Viña *et al.* (2020) pulverizaron esporas de *T. atrobrunneum* y de *C. rosea* sobre heces de suidos parasitados por *A. suum*, y consiguieron reducir la viabilidad de los huevos en más del 66%.

4.2. EFECTO OVICIDA DE *T. atrobrunneum* EN PRESENCIA DE ACU

4.2.1. Sobre huevos de *T. leonina*.

En todas las placas con ACU se observó que *T. atrobrunneum* se desarrollaba y crecía hasta identificarse micelio y esporas, pero se apreció una especie de "moteado" en lugar de un desarrollo uniforme a lo largo de toda la placa (Fig. 14).

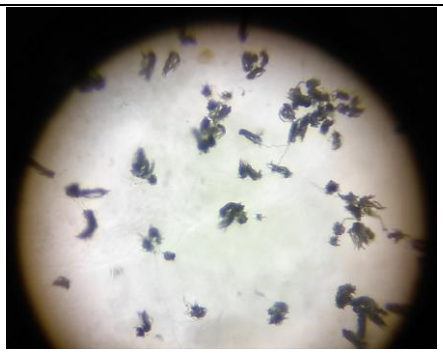


Fig. 14.- El crecimiento de *T. atrobrunneum* en presencia de ACU siguió un patrón "moteado".

En la Figura 15 se muestra la cronología de la actividad de *T. atrobrunneum* sobre los huevos de *T. leonina* en placas con diferentes concentraciones de ACU. El patrón fue muy similar en las placas con 1-5% de aceite, y también muy parecido al testigo (sin ACU). Se detectaron diferencias con la proporción más elevada (10%) de ACU (χ^2= 7.098, *P*= 0.009). En un Trabajo de Fin de Grado defendido en este mismo año (Viñolo, 2025) se demostró que *M. circinelloides* tiene un desarrollo muy similar en ausencia de ACU y con aceite hasta el 5%; sin embargo, con aceite al 10% se ralentiza significativamente el crecimiento del hongo. En el presente estudio, el crecimiento de *T. atrobrunneum* también se ralentizó al sembrarlo en placas con ACU al 10%.

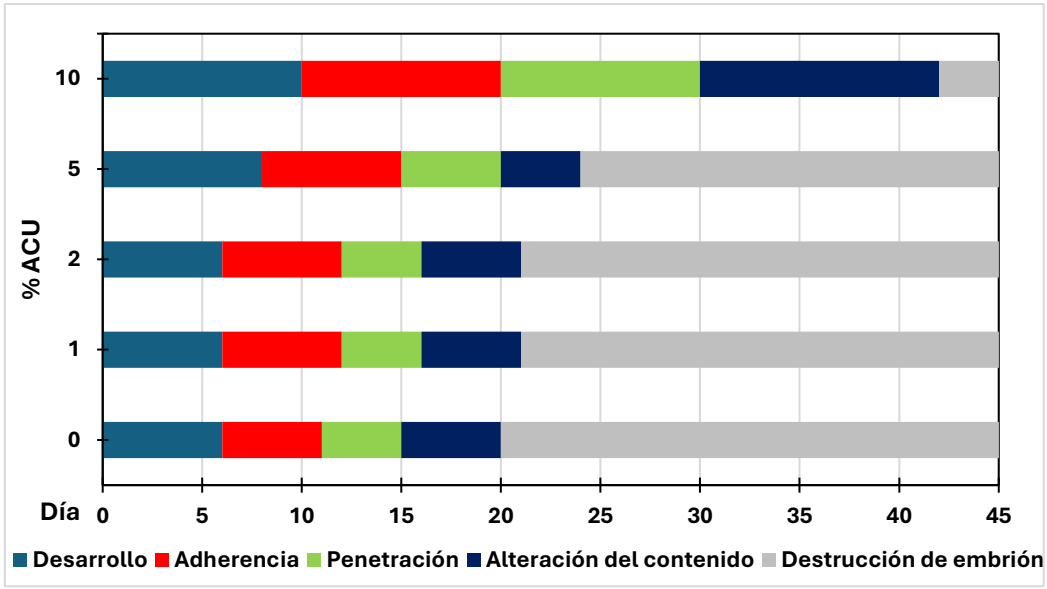


Fig. 15.- La adición de aceite al medio de cultivo sólido no causó importantes diferencias en la actuación de *T. atrobrunneum* salvo cuando se alcanzó una proporción del 10%.

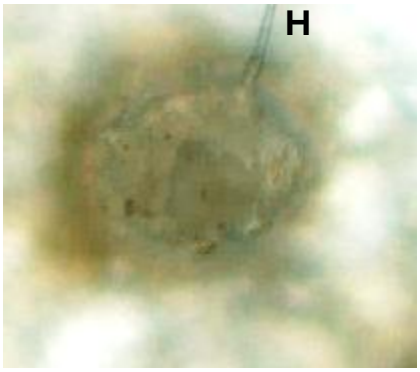


Fig. 16.- Hifa (H) de *T. atrobrunneum* adherida y penetrando la cubierta de un huevo del nematodo *T. leonina*.

Los resultados de las placas con ACU al 1 y 2% fueron muy similares a los de las placas testigo (sin aceite); en las placas con ACU al 10% se observaron las menores reducciones. En este experimento se confirmó una vez más que *T. atrobrunneum* ejerce un efecto ovicida de tipo 3 sobre los huevos de *T. leonina*, penetrando y alimentándose de su contenido interno. Este efecto se comprobó claramente en medios con porcentajes de hasta el 5% de ACU, como se puede observar en la Figura 16.

Cada semana durante un período de 6 semanas, se evaluó la actividad ovicida de *T. atrobrunneum* sobre huevos de *T. leonina* en placas con agar-trigo y aceite a distintos porcentajes (0, 1, 2, 5 y 10%; Fig. 17). La viabilidad de los huevos disminuyó a lo largo del experimento, encontrándose los valores más elevados de reducción a las 6 semanas de exposición al hongo. Se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados con ACU al 10% y el resto de medios (χ^2= 6.413, *P*= 0.015).

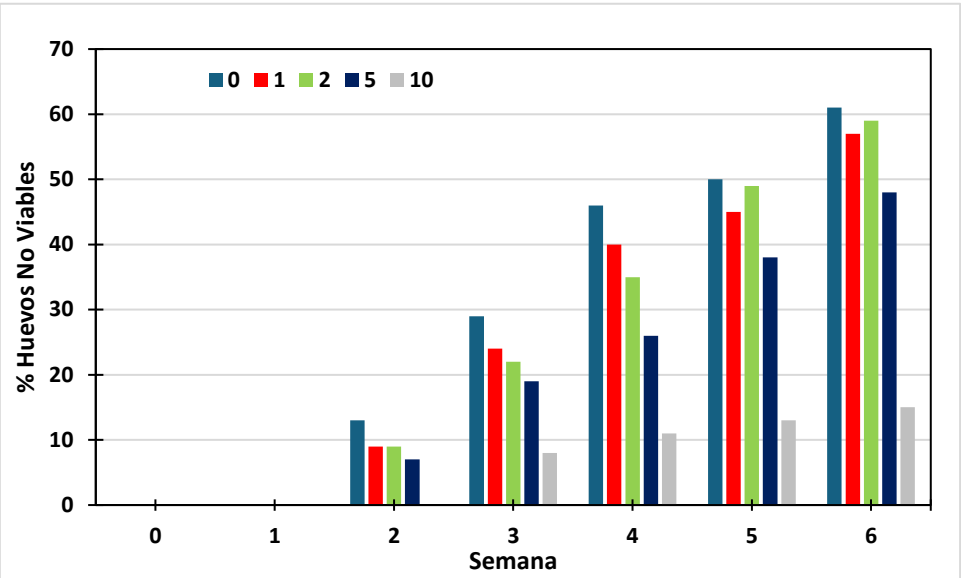


Fig. 17.- Dinámica de la reducción de viabilidad de huevos de *T. leonina* expuestos a *T. atrobrunneum* en placas con agar-trigo y diferentes concentraciones de ACU.

Además de adherirse a la cubierta, también se observó que su integridad se iba perdiendo con la exposición a *T. atrobrunneum* (Fig. 18).

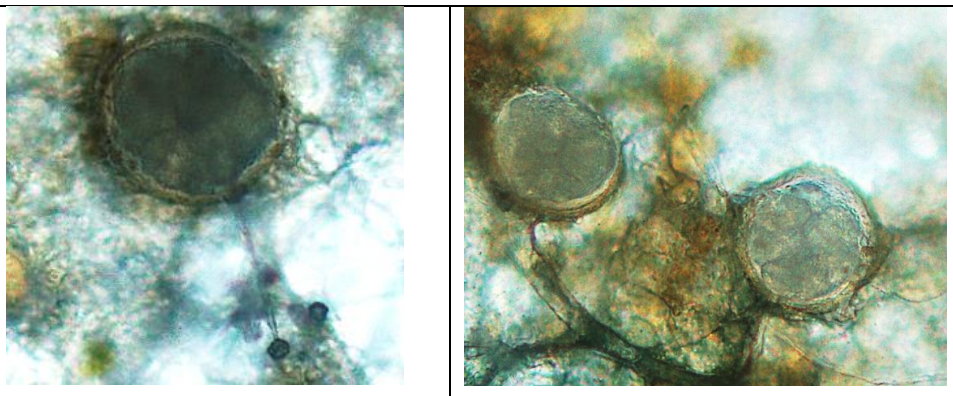


Fig. 18.- Hifas de *T. atrobrunneum* adheridas y penetrando la cubierta de huevos de *T. leonina* (izda.), que van perdiendo su integridad incluso en medios con ACU.

4.2.2. Sobre huevos de *Trichuris* sp.

Tras la siembra de *T. atrobrunneum* en placas con agar-trigo y distintos porcentajes de aceite, y la adición de huevos de *Trichuris* sp., se comprobó que el comportamiento era muy parecido en las placas testigo y en aquellas que tenían hasta el 5% ACU (χ^2= 21.538, *P*= 0.008) (Fig. 19).

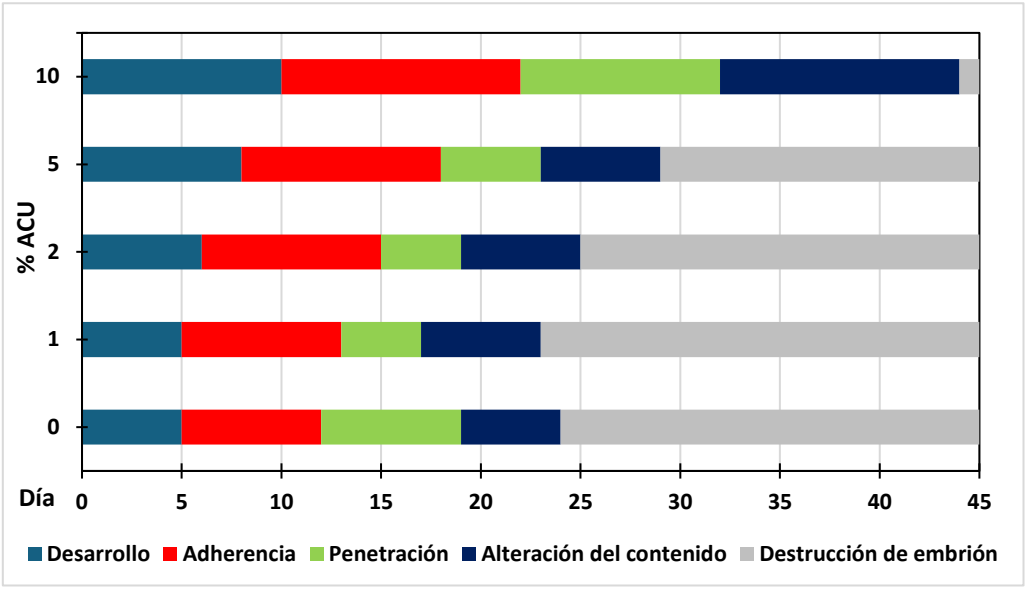


Fig. 19.- Efecto de *T. atrobrunneum* sobre huevos de *Trichuris* sp. en placas con agar-trigo y aceite a diferentes concentraciones.

El efecto ovicida de *T. atrobrunneum* se desarrolló casi sin diferencias en placas sin ACU (testigos) y con aceite hasta el 2% (Fig. 20), superando el 50%, es decir, más de la mitad de los huevos de *Trichuris* sp. con alteraciones irreversibles que afectan a su supervivencia, y a su infectividad (capacidad de infectar organismos).

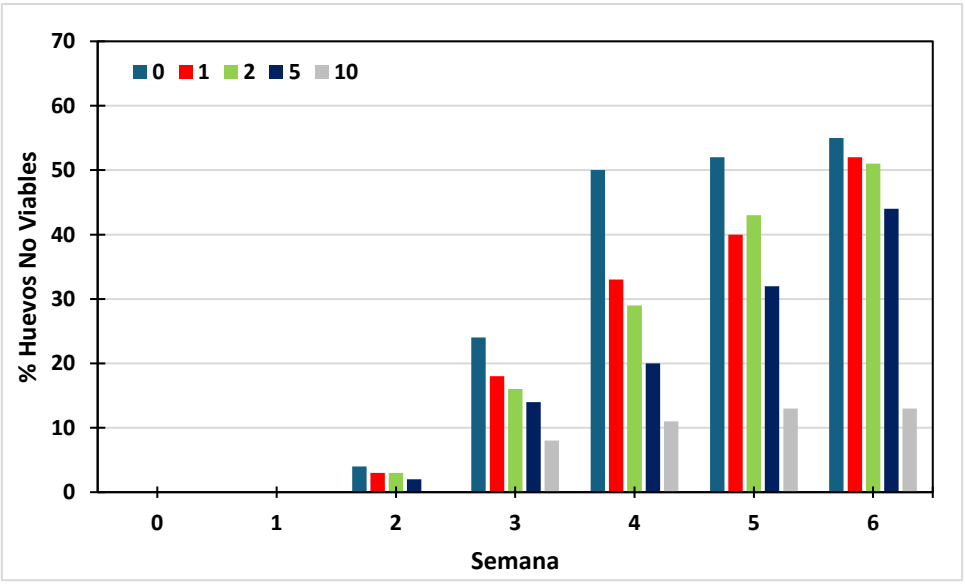


Fig. 20.- Dinámica de la reducción de viabilidad de huevos de *Trichuris* sp. expuestos a *T. atrobrunneum* en placas con agar-trigo y diferentes concentraciones de ACU.

En presencia de aceite al 5%, la reducción de la viabilidad fue inferior, y mucho más cuando la concentración alcanzó el 10%, detectándose porcentajes de disminución de la viabilidad por debajo del 20%. Se comprobaron diferencias entre las placas con ACU al 10% y el resto (χ^2= 6.004, *P*= 0.033). En la Figura 21 se puede apreciar que en medios con concentraciones de aceite de hasta el 5%, *T. atrobrunneum* es capaz de crecer e incluso de producir gran cantidad de esporas.

Fig. 21.- Desarrollo de *T. atrobrunneum* en presencia de huevos de *Trichuris* sp. en agar-trigo y ACU al 5%. En el centro se pueden ver numerosas esporas (EE).

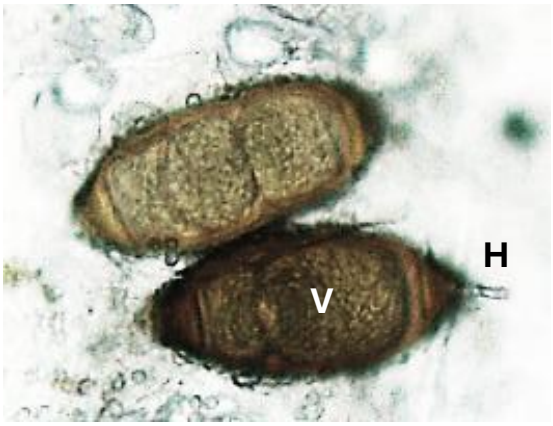


Fig. 22.- En el huevo inferior se observa hifa (H) de *T. atrobrunneum* penetrando el tapón polar de *Trichuris* sp. (dcha.). También se aprecian vesículas (V) de tamaño anormalmente aumentado.

También es posible apreciar la alteración del contenido interno del huevo de *Trichuris* sp., dando lugar a la formación de vesículas citoplasmáticas asimétricas, de tamaño superior al normal (Fig. 22).

Una vez que las hifas de *T. atrobrunneum* penetran en el interior del huevo de *Trichuris*, ingieren el contenido interior y finalmente se multiplican, lo que explica que en ocasiones se encuentren numerosas esporas (Fig. 23).

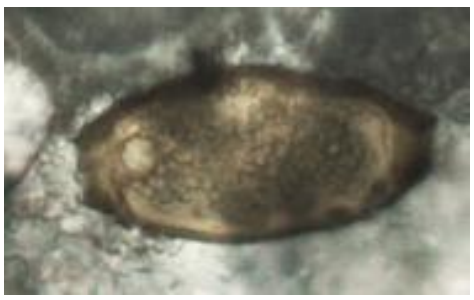


Fig. 23.- Huevo de *Trichuris* sp. sin uno de los tapones polares (izda.), con el contenido completamente desorganizado y presencia de esporas en el interior.

4.3. PROPAGACIÓN DE *T. atrobrunneum* EN MEDIO LÍQUIDO CON ACU

En esta última prueba se evaluó la capacidad de desarrollo de *T. atrobrunneum* en un medio líquido con diferentes concentraciones de ACU. Como se refleja en la Figura 24, se apreció que el hongo colonizaba la capa lipídica, llegando incluso a detectarse crecimiento vertical de hifas.

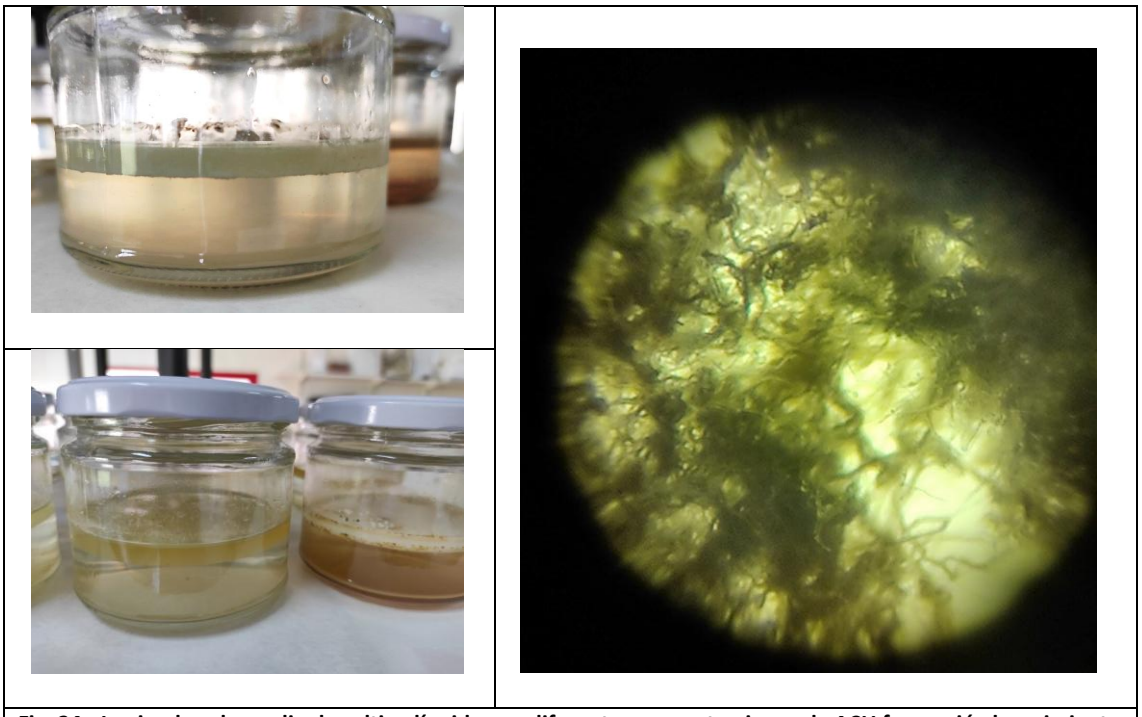


Fig. 24.- La siembra de medio de cultivo líquido con diferentes concentraciones de ACU favoreció el crecimiento del micelio de *T. atrobrunneum*. A la izquierda observación macroscópica, notándose el crecimiento de hifas incluso en vertical, y a la derecha imagen microscópica (20X).

La adición de aceite usado al medio de cultivo líquido incrementó la producción de esporas con la concentración más baja empleada (1%), y a continuación, aunque se alcanzaron valores elevados, se observó un descenso gradual con un efecto inversamente proporcional (Fig. 25).

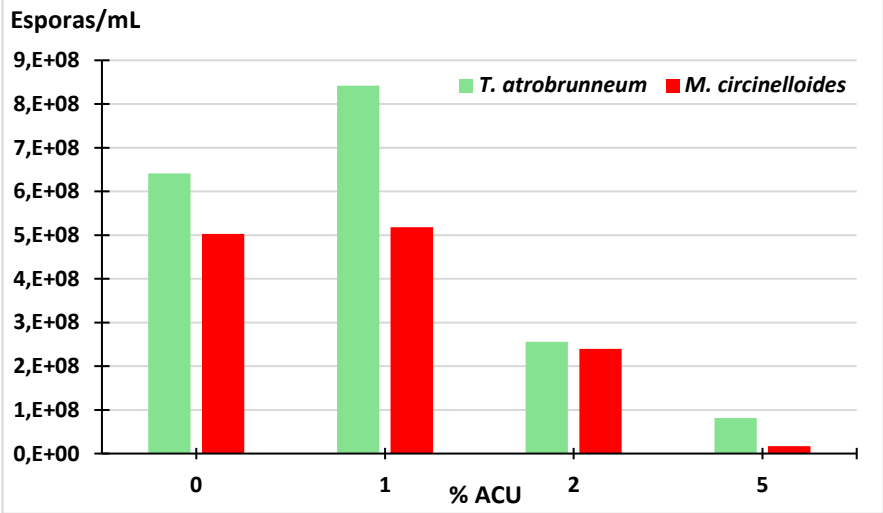


Fig. 25.- Producción de esporas en medios con ACU.

Se demostraron diferencias estadísticamente significativas a partir de la adición de ACU al 2% (χ^2= 20.052, *P*= 0.001). Estos resultados resultan coinciden, en parte, con los presentados por Viñolo (2025), quien señaló que el número de esporas de *M. circinelloides* disminuía cuando se empleaban concentraciones de ACU superiores al 2%.

Es importante señalar que el recuento en medios líquidos con aceite entraña una elevada dedicación temporal, dado que, al realizarse bajo microscopio, las microgotas de agua y aceite que se forman complican extraordinariamente la identificación y recuento de las esporas (Fig. 26). Incluso se han observado en ocasiones esporas en el interior de las microgotas (Fig. 27).

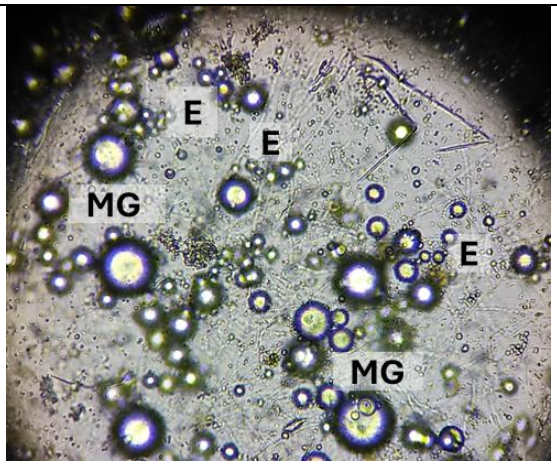


Fig. 26.- El recuento de esporas (E) en medios con ACU es farragoso y arduo, debido a que se forman microgotas (MG) de agua y aceite que impiden la visualización correcta bajo microscopio (20X).

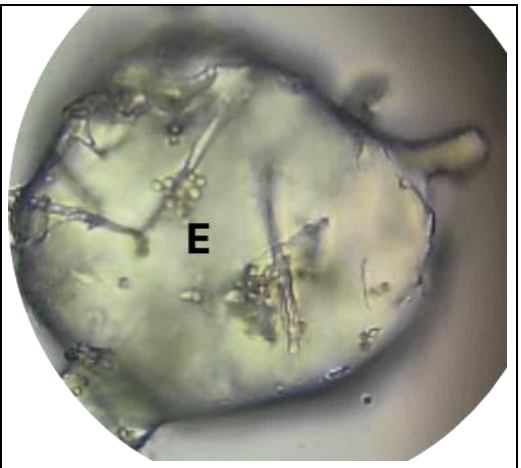


Fig. 27.- En medios líquidos con ACU se observan esporas (E) de *T. atrobrunneum* en el interior de microgotas de aceite o de agua (40X).

4.4. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la presente investigación se ha tratado de demostrar la utilidad de reciclar un subproducto que se encuentra fácilmente en gran parte de hogares, orientándolo hacia una nueva aplicación que aúna otro beneficio singular, el control *preventivo* de algunas infecciones parasitarias que están íntimamente relacionadas con la presencia de formas infectantes en el suelo, y que pueden afectar a animales y personas sin requerirse el contacto directo con hospedadores animales infectados, y que se denominan saprozoonosis.

Con el diseño de esta investigación se ha procurado, en primer lugar, presentar datos novedosos acerca de la utilidad de una especie de hongo filamentoso, *T. atrobrunneum*, de la que se dispone de conocimiento acerca de su empleo frente a fitopatógenos e incluso a otras especies de hongos, pero que su aplicación veterinaria no ha sido muy refrendada hasta la fecha. De este modo, es importante tener en cuenta, aunque no se trate del objeto de este Trabajo de Fin de Grado, que se contribuye a la idea *One Health* puesto que los resultados presentados hacen posible considerar

la utilidad del empleo de organismos que tengan actividad antagonista frente a patógenos de especies vegetales y animales, mejorando la calidad del medio en términos de riesgo de infección.

En segundo lugar, la adición de aceite usado para el cultivo de *T. atrobrunneum* viene a completar un poco más la información detraída previamente de las posibilidades de propagación de otra especie filamentosa de gran actividad parasitófaga, *M. circinelloides* (Viñolo, 2025), y resulta muy interesante desde el punto de vista del enriquecimiento de medios de cultivo para alcanzar rendimientos óptimos en la producción de esporas, que suelen constituir la base de la mayoría de las estrategias de control biológico de parásitos mediante hongos filamentosos (Zhu *et al*., 2017).

En tercer lugar, y relacionado con las posibilidades de *economía circular*, resulta indudable que el presente Trabajo se diseñó para conseguir información sobre algunos aspectos relacionados con el empleo de hongos filamentosos para el control de agentes etiológicos de saprozoonosis, y que no hubo tiempo para ahondar en la *circularidad*, pero sí de demostrar que es una opción muy prometedora a tener en cuenta (Wikandari *et al*., 2022). Además, se abre una vía que sería muy interesante explorar en un futuro inmediato, que consiste en determinar el efecto del cultivo de los hongos parasitófagos en la composición del aceite usado, en términos de su más que probable aprovechamiento para transformar algunos componentes en otros aprovechables para la alimentación animal, o simplemente convertir un subproducto en un producto carente del riesgo ecológico que puede suponer, así como de numerosas alteraciones que provoca su eliminación inadecuada, como se ha destacado en la Introducción.

Por último, destacar que esta Memoria constituye un Trabajo de Fin de Grado en una línea de investigación muy atractiva y prometedora porque ofrece una visión un poco diferente y sostenible de las posibilidades futuras (próximas) para el control de infecciones *en el suelo*, que entraña indudablemente una estrategia preventiva muy necesaria para el sector agroganadero.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio sustentan las siguientes **conclusiones**:

1.- El hongo filamentoso *Trichoderma atrobrunneum* es capaz de realizar una notable actividad ovicida sobre los huevos de *A. suum*, similar al que ejerce *Mucor circinelloides* y superior al de *Clonostachys rosea*.

2.- Tanto en medios sólidos como líquidos suplementados con aceite de cocina usado, *T. atrobrunneum* se desarrolla de forma completamente satisfactoria, e incluso produce cantidades elevadas de esporas.

3.- La actividad parasitófaga de *T. atrobrunneum* es elevada y no varía si se propaga en medios con un máximo de ACU al 5%, disminuyendo si se emplean concentraciones superiores.

4.- Se recomienda la adición de aceite de cocina usado a medios de cultivo líquidos para la producción de esporas de *T. atrobrunneum*, pero deben utilizarse concentraciones similares o inferiores al 5%.

6. BIBLIOGRAFÍA

Al-Ani, L. K. T., De Freitas Soares, F. E., Sharma, A., De los Santos-Villalobos, S., Valdivia-Padilla, A. V., & Aguilar-Marcelino, L. (2022). Strategy of Nematophagous Fungi in Determining the Activity of Plant Parasitic Nematodes and Their Prospective Role in Sustainable Agriculture. *Frontiers In Fungal Biology*, *3*. https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.863198

Anan'ko, G. G., & Teplyakova, T. V. (2011). Factors responsible for transition of the Duddingtonia flagrans carnivorous fungus from the saprotrophic to the zootrophic nutrition type. *Microbiology*, *80*(2), 188-193. https://doi.org/10.1134/s0026261711020020

Appleton, C. C., & White, B. J. (1989). The structure of the shell and polar plugs of the egg of the whipworm, Trichuris trichiura (Nematoda: Trichuridae) from the Samango monkey (Cercopithecus albogularis). *The Onderstepoort journal of veterinary research*, *56*(4), 219–221.

Arias, M. S., Suárez, J., Cazapal-Monteiro, C. F., Francisco, I., López-Arellano, M. E., Piñeiro, P., Suárez, J. L., Sánchez-Andrade, R., Mendoza de Gives, P., & Paz-Silva, A. (2013). Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. *Fungal biology*, *117*(7-8), 540–544. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.06.003

Arias, M. S., Cazapal-Monteiro, C. F., Suárez, J., Miguélez, S., Francisco, I., Arroyo, F. L., Suárez, J. L., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Mendoza de Gives, P. (2013). Mixed Production of Filamentous Fungal Spores for Preventing Soil-Transmitted Helminth Zoonoses: A Preliminary Analysis, *BioMed Research International*, 2013, 567876, 8 pages, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/567876

Arroyo, F., Arias, Cazapal-Monteiro, C., Hernández, J., Suárez, J., Miguélez, S., Romasanta, A., Sánchez-Andrade, R., & Paz-Silva, A. (2015). The capability of the fungus Mucor circinelloides to maintain parasiticidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. *Biological Control*, *92*, 38-44. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.007

Arroyo, F., Hernández, J. A., Cazapal-Monteiro, C. F., Pedreira, J., Sanchís, J., Romasanta, Á., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., & Arias, M. S. (2017). Effect of the Filamentous Fungus Mucor circinelloides On The Development of Eggs of the Rumen Fluke Calicophoron daubneyi (Paramphistomidae). *Journal Of Parasitology*, *103*(3), 199-206. https://doi.org/10.1645/16-76

Asaolu, S. O., & Ofoezie, I. E. (2018). *Ascaris* spp. En *Michigan State University eBooks*. https://doi.org/10.14321/waterpathogens.41

Bokhari, F. M. (2009). Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, *42*(4), 361-369. https://doi.org/10.1080/03235400601070520

Bowman, D. (2011) *Georgis Parasitología para Veterinarios 9 ed.* https://books.google.com.cu/books?id=1guexEogRE8C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false (consultado el 23/5/2025)

Braga, F. R., Araújo, J. V., Silva, A. R., Carvalho, R. O., Araujo, J. M., Ferreira, S. R., & Carvalho, G. R. (2009). Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Veterinary Parasitology*, *168*(3-4), 264-268. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.020

Braga, F. R., Soares, F. E. F., Giuberti, T. Z., Del Carmen Garcias Lopes, A., Lacerda, T., De Hollanda Ayupe, T., Queiroz, P. V., De Souza Gouveia, A., Pinheiro, L., Araújo, A. L., Queiroz, J. H., & Araújo, J. V. (2015). Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Veterinary Parasitology*, *212*(3-4), 214-218. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.018

Brito-Vega, H. (2020). The morphological and molecular characterization of *Trichoderma* spp. in cocoa agroforestry systems. *Open Science Journal*, *5*(4). https://doi.org/10.23954/osj.v5i4.2407

Brownell, S. A., & Nelson, K. L. (2006). Inactivation of Single-Celled *Ascaris suum* Eggs by Low-Pressure UV Radiation. *Applied And Environmental Microbiology*, *72*(3), 2178-2184. https://doi.org/10.1128/aem.72.3.2178-2184.2006

Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *66*(3), 447–459. https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.447-459.2002.

Canhão-Dias, M., Paz-Silva, A., & De Carvalho, L. M. (2020). The efficacy of predatory fungi on the control of gastrointestinal parasites in domestic and wild animals—A systematic review. *Veterinary Parasitology*, *283*, 109173. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109173

Chaparro Pedraza, A. P., & Campuzano Fernández, S. E. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos producidos por *Mucor circinelloides* (cepa nativa SPG 321). *Revista Nova publicación científica en ciencias biomédicas, 16*(29), 63–70. https://doi.org/10.22490/24629448.2690

Chethana, K. W. T., Manawasinghe, I. S., Hurdeal, V. G., Bhunjun, C. S., Appadoo, M. A., Gentekaki, E., Raspé, O., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021). What are fungal species and how to delineate them? *Fungal Diversity*, *109*(1), 1-25. https://doi.org/10.1007/s13225-021-00483-9

Cortiñas, F. J., Cazapal-Monteiro, C. F., Hernández, J. A., Arroyo, F. L., Miguélez, S., Suárez, J., López de Arellano, M.E. Sánchez-Andrade, R., Mendoza de Gives, P., Paz-Silva, A., Arias, M. S. (2015). Potential use of *Mucor circinelloides* for the biological control of certain helminths affecting livestock reared in a care farm. *Biocontrol Science and Technology*, *25*(12), 1443–1452. https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1062843

Da Silva, M. E., Braga, F. R., De Gives, P. M., Uriostegui, M. A. M., Reyes, M., De Freitas Soares, F. E., De Carvalho, L. M., Rodrigues, F. B., & De Araújo, J. V. (2015). Efficacy of *Clonostachys rosea and Duddingtonia flagrans* in Reducing the *Haemonchus contortus* Infective Larvae. *BioMed Research International*, *2015*, 1-5. https://doi.org/10.1155/2015/474879

De Freitas Soares, F. E., Ferreira, J. M., Genier, H. L. A., Al-Ani, L. K. T., & Aguilar-Marcelino, L. (2023). Biological control 2.0: Use of nematophagous fungi enzymes for nematode control. *Journal Of Natural Pesticide Research*, *4*, 100025. https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100025

Deacon, J. W. (2006). *Fungal biology*. John Wiley & Sons.

Deiss, F., Edginton, S. Tipos de control biológico: aumentativo, de conservación y clásico. https://bioprotectionportal.com/es/resources/types-of-biological-control/ (consultado el 18/07/2025).

Díaz Valledor, A. (2024) Efecto ascaricida de los hongos saprófitos *Clonostachys rosea* y *Trichoderma atrobrunneum* [Trabajo fin de grado. Facultad de veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela] https://minerva.usc.gal/rest/api/core/bitstreams/86d6afbb-7269-44bc-84d0-e31442d16007/content

do Carmo, T. A., Fonseca, J. D. S., Braga, F. R., Paz-Silva, A., de Soutello, R. V. G., & de Araújo, J. V. (2025). Exploring the use of helminthophagous fungi in the control of helminthoses in horses: A review. *Animals, 15*(6), 864. https://doi.org/10.3390/ani15060864

Dong, J., He, H., Shen, Y., & Zhang, K. (2005). Nematicidal Epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. *Journal Of Natural Products*, *68*(10), 1510-1513. https://doi.org/10.1021/np0502241

Eo, K., Seo, M., Lee, H., Jung, Y., Kwak, D., & Kwon, O. (2018). Severe whipworm (*Trichuris* spp.) infection in the hamadryas baboon (*Papio hamadryas*). *Journal Of Veterinary Medical Science*, *81*(1), 53-56. https://doi.org/10.1292/jvms.17-0568

Fanelli, F., Liuzzi, V. C., Logrieco, A. F., & Altomare, C. (2018). Genomic characterization of *Trichoderma atrobrunneum* (*T. harzianum* species complex) ITEM 908: insight into the genetic endowment of a multi-target biocontrol strain. *BMC Genomics*, *19*(1). https://doi.org/10.1186/s12864-018-5049-3

Farkas, C., Juhász, A., Fekete, B., & Egri, B. (2024). Comparative Analysis of *Ascaris suum* and *Macracanthorhynchus hirudinaceus* Infections in Free-Ranging and Captive Wild Boars (Sus scrofa) in Hungary. *Animals*, *14*(6), 932. https://doi.org/10.3390/ani14060932

Fissiha, W., & Kinde, M. Z. (2021). Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. *Infection and drug resistance*, *14*, 5403–5410. https://doi.org/10.2147/IDR.S332378

Freiría Barreiro, D. (2020). Procedimientos de escalado de la producción de esporas del hongo parasiticida *Duddingtonia flagrans*. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela. https://investigacion.usc.gal/documentos/603069b73eb5cd6a690230aa (consultada el 23/01/2025).

Gallardo-Santis, A., Romero, E., Monroy-Vilchis, O., & Zarza, H. (2015). Presencia de *Toxascaris leonina y Cystoisospora felis* en Lince Rojo (*Lynx rufus escuinapae*) en México. *Mammalogy Notes*, *2*(1), 13-15. https://doi.org/10.47603/manovol2n1.13-15

Geiger, A., Karácsony, Z., Geml, J., & Váczy, K. Z. (2022). Mycoparasitism capability and growth inhibition activity of *Clonostachys rosea* isolates against fungal pathogens of grapevine trunk diseases suggest potential for biocontrol. *PLoS ONE*, *17*(9), e0273985. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273985

Gimeno, A., Kägi, A., Drakopoulos, D., Bänziger, I., Lehmann, E., Forrer, H., Keller, B., & Vogelgsang, S. (2020). From laboratory to the field: biological control of *Fusarium graminearum* on infected maize crop residues. *Journal Of Applied Microbiology*, *129*(3), 680-694. https://doi.org/10.1111/jam.14634

Gómez-Méndez, E., Brito-Vega, H., López-Ferrer, U., Salaya-Domínguez, J., Salinas-Hernández, R., Gómez-Vázquez, A., & Cruz-Hernández, A. (2020). The morphological and molecular characterization of *Trichoderma* spp. in cocoa agroforestry systems. *Open Science Journal, 5*(4), [2]. https://doi.org/10.23954/osj.v5i4.2407

Hajji-Hedfi, L., Hlaoua, W., Rhouma, A., Al-Judaibi, A. A., Arcos, S. C., Robertson, L., Ciordia, S., Horrigue-Raouani, N., Navas, A., & Abdel-Azeem, A. M. (2023). Biological and proteomic analysis of a new isolate of the nematophagous fungus *lecanicillium sp. BMC Microbiology*, *23*(1). https://doi.org/10.1186/s12866-023-02855-4

Hamdi, N. A., Sha'arani, S., Azman, N. F., Mohd. Rafi, S. B., Norsin, E., Othman, N. (2022). Management of Waste Cooking Oil and its Potential for Value-added Materials: A Mini Review. The 9th AUN/SEED-Net Regional Conference on Natural Disaster (RCND 2021),

Hameed, A., Hussain, S. A., Yang, J., Ijaz, M. U., Liu, Q., Suleria, H. A. R., & Song, Y. (2017). Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). *Nutrients*, *9*(10), 1101. https://doi.org/10.3390/nu9101101

Han, P., Zhang, X., Xu, D., Zhang, B., Lai, D., & Zhou, L. (2020). Metabolites from Clonostachys Fungi and Their Biological Activities. *Journal Of Fungi*, *6*(4), 229. https://doi.org/10.3390/jof6040229

Healey, K., Lawlor, C., Knox, M. R., Chambers, M., & Lamb, J. (2018). Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep. *Veterinary Parasitology*, *253*, 48-54. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.010

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Chilean Journal Of Agricultural & Animal Science*, *ahead*, 0. https://doi.org/10.4067/s0719-38902019005000205

Hernández Malagón, J. Á., Cazapal-Monteiro, C. F., Quintero, R. B., Salinero, A. M. P., Torres, M. I. S., Messnier, M. V., Pena, M. V., Blanco, Á. R., García, J. P., Silva, A. P., Fernández, R. S., & Vázquez, M. S. A. (2019b). Advantageous Fungi against Parasites Transmitted through Soil. En *IntechOpen eBooks*. https://doi.org/10.5772/intechopen.81027

Hoffmann, K., Pawłowska, J., Walther, G., Wrzosek, M., De Hoog, G., Benny, G., Kirk, P., & Voigt, K. (2013). The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia - Molecular Phylogeny And Evolution Of Fungi*, *30*(1), 57-76. https://doi.org/10.3767/003158513x666259

Horton, J. (2014). Helminth-Nematode: *Trichuris trichiura.* En *Elsevier eBooks* (pp. 111-115). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-378612-8.00146-3

Hsueh, Y., Mahanti, P., Schroeder, F. C., & Sternberg, P. W. (2012). Nematode-Trapping Fungi Eavesdrop on Nematode Pheromones. *Current Biology*, *23*(1), 83-86. https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.035

Kavanagh, K. (2005). *Fungi: Biology and Applications*. John Wiley & Sons.

Kim, J., Oh, D., Ahn, K., & Shin, S. (2012). Effects of Kimchi Extract and Temperature on Embryostasis of *Ascaris suum* Eggs. *Korean Journal Of Parasitology*, *50*(1), 83-87. https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.1.83

Kumar, A., Bhayana, S., Singh, P.K., Tripathi, A.D., Paul, V., Balodi, V., Agarwal, A. (2025). Valorization of used cooking oil: challenges, current developments, life cycle assessment and future prospects. *Discov Sustain* 6, 119 (2025). https://doi.org/10.1007/s43621-025-00905-7

Lackner, N., Posch, W., & Lass-Flörl, C. (2021). Microbiological and Molecular Diagnosis of Mucormycosis: From Old to New. *Microorganisms*, *9*(7), 1518. https://doi.org/10.3390/microorganisms9071518

Larsen, M. (1999). Biological control of helminths. *International Journal For Parasitology*, *29*(1), 139-146. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00185-4

Lopez-Llorca, L. V., Maciá-Vicente, J. G., & Jansson, H. (2007). Mode of Action and Interactions of Nematophagous Fungi. En *Springer eBooks* (pp. 51-76). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6063-2_3

Lozano, J., Louro, M., Almeida, C., Victório, A. C., Melo, P., Rodrigues, J. P., Oliveira, M., Paz-Silva, A., & Madeira de Carvalho, L. (2023). Isolation of saprophytic filamentous fungi from avian fecal samples and assessment of its predatory activity on coccidian oocysts. *Scientific Reports, 13*(1), 8965. https://doi.org/10.1038/s41598-023-36120-5

Lozano, J., Almeida, C., Vicente, E., Sebastião, D., Palomero, A. M., Cazapal-Monteiro, C., Arias, M. S., Oliveira, M., De Carvalho, L. M., & Paz-Silva, A. (2024). Assessing the efficacy of the ovicidal fungus *Mucor circinelloides* in reducing coccidia parasitism in peacocks. *Scientific Reports*, *14*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-024-61816-7

Lýsek, H., Fassatiová, O., Pineda, N. C., & Hernández, N. L. (1982). Ovicidal fungi in soils of Cuba. *PubMed*, *29*(3), 265-270. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6890012

Marín, C. (2018). Conceptos fundamentales en ecología de hongos del suelo: una propuesta pedagógica y de divulgación. *BoletíN MicolóGico*, *33*(1), 32. https://doi.org/10.22370/bolmicol.2018.33.1.1168

Marques, M. R., Buckeridge, M. S., Braga, M. R., & Dietrich, S. M. C. (2006). Characterization of an extracellular endopolygalacturonase from the saprobe *Mucor ramosissimus* Samutsevitsch and its action as trigger of defensive response in tropical plants. *Mycopathologia*, *162*(5). https://doi.org/10.1007/s11046-006-0064-3

Martínez-Scott, M. M., Zuñiga-Maldonado, W. M., & Moreno-Zacarias, P. E. (2021). Isolation and identification of microscopic fungi of agricultural importance in the Tetillas hill in

Salvatierra, Guanajuato. *Journal of Quantitative and Statistical Analysis, 23*(8), 1–16. https://doi.org/10.35429/JQSA.2021.23.8.1.16

Mickiewicz, M., Czopowicz, M., Moroz, A., Potărniche, A. V., Szaluś-Jordanow, O., Spinu, M., Górski, P., Markowska-Daniel, I., Várady, M., & Kaba, J. (2021). Prevalence of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in Polish goat herds assessed by the larval development test. *BMC veterinary research*, *17*(1), 19. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02721-9

Minter, D. W., Sutton, B. C., & Brady, B. L. (1983). *What are phialides anyway?* Transactions of the British Mycological Society, 81(1), 109–120. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80210-1

Molokwu, C. N., & Okpokwasili, G. C. (1997). Biodeterioration potentials of fungal isolates from vegetable oils. *International Journal Of Food Sciences And Nutrition*, *48*(4), 251-255. https://doi.org/10.3109/09637489709028569

Nagaraj, G., & Kolanthasamy, E. (2024). Unveiling the antimicrobial and biocontrol potential of the Ascomycete fungus, Clonostachys rosea: A review. *The Microbe*, *6*, 100226. https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100226

Nagaraj, G., Rengasamy, K., Thiruvengadam, R., Karthikeyan, M., Shanmugam, V., & Narayanan, S. (2023). Morpho-molecular characterization of *Clonostachys rosea* and deciphering its biomolecules untangles the anti-fungal action against *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. *Physiological And Molecular Plant Pathology*, *125*, 102013. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102013

Natsiopoulos, D., Tziolias, A., Lagogiannis, I., Mantzoukas, S., & Eliopoulos, P. A. (2022). Growth-Promoting and Protective Effect of *Trichoderma atrobrunneum* and *T. simmonsii* on Tomato against Soil-Borne Fungal Pathogens. *Crops*, *2*(3), 202-217. https://doi.org/10.3390/crops2030015

Nicolás, F. E., Calo, S., Murcia-Flores, L., Garre, V., Ruiz-Vázquez, R. M., & Torres-Martínez, S. (2008). A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiology Letters, 280*(1), 81–88. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01044.x

Nordbring-Hertz, B., Jansson, H.-B., & Tunlid, A. (2011). Nematophagous fungi. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000374.pub3

Oh, K., Kim, G., Ahn, K., & Shin, S. (2016). Effects of Disinfectants on Larval Development of *Ascaris suum* Eggs. *Korean Journal Of Parasitology*, *54*(1), 103-107. https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.1.103

Okulewicz, A., Perec-Matysiak, A., Buńkowska, K., & Hildebrand, J. (2012). *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in wild and domestic carnivores. *Helminthologia*, *49*(1), 3-10. https://doi.org/10.2478/s11687-012-0001-6

Olu-Arotiowa, O. A., Lawal, A. I., Ogunniyi, D. S., Adegbite, S. A., & Oloruntoba, D. T. (2022). *Revisión sobre el impacto ambiental y la valorización del aceite de cocina usado*. LAUTECH Journal of Engineering and Technology, 16(1), 144–163. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/370839743_Review_on_Environmental_Impact_and_Valorization_of_Waste_Cooking_Oil (consultado el 14/5/2025)

Orlowski, M. (1991). Mucor dimorphism. *Microbiological Reviews*, *55*(2), 234-258. https://doi.org/10.1128/mr.55.2.234-258.1991

Pachenari, A., & Dix, N. (1980). Production of toxins and wall degrading enzymes by *Gliocladium roseum*. *Transactions Of The British Mycological Society*, *74*(3), 561-566. https://doi.org/10.1016/s0007-1536(80)80057-x

Palomero Salinero, A. M. (2023). *Integrated control of digestive helminths in captive herbivores* (Tesis doctoral). Universidade de Santiago de Compostela. https://investigacion.usc.gal/documentos/63ec36ab22c76f7351b4ba89 (consultada el 23/3/2025)

Papanikolaou, S., Dimou, A., Fakas, S., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., & Aggelis, G. (2011). Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal Of Applied Microbiology*, *110*(5), 1138-1150. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04961.x

Pozio, E. (2015). Foodborne nematodes. En *Elsevier eBooks* (pp. 165-199). https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-332-4.00008-4

Purwantisari, S., Nurbayani, F. A., Safina, M. F. I., & Choiriyah, M. (2025). Antagonistic activity of *Trichoderma harzianum* against *Aspergillus parasiticus* and *Mucor circinelloides* in corn plant (*Zea mays L.*). *Planta Tropika*, *13*(1), Press. https://doi.org/10.18196/pt.v13i1.21507

Rodríguez-Frómeta, R. A., Gutiérrez, A., Torres-Martínez, S., & Garre, V. (2012). Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, *97*(7), 3063-3072. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4432-2

Sahebani, N., & Hadavi, N. (2008). Biological control of the root-knot nematode Meloidogyne javanica by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology And Biochemistry*, *40*(8), 2016-2020. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.011

Salmo, R., Viña, C., Lozano, J., Palomero, A. M., Hernández, J. Á., Bonilla, R., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., De Carvalho, L. M. M., Vázquez, M. T., & Cazapal-Monteiro, C. (2024). *Saprophytic filamentous fungi against helminths affecting captive wild animals*. Encyclopedia, 4(1), 91–100. https://doi.org/10.3390/encyclopedia4010008

Sanchis, C. I., & Mateu, V. B. (2020). Prevalencia de ascariosis en ganado porcino en un matadero de la Comunidad Valenciana. *Nereis Interdisciplinary Ibero-American Journal Of Methods Modelling And Simulation*, *12*, 167-184. https://doi.org/10.46583/nereis_2020.12.601

Silva, A., Araújo, J., Braga, Alves, C., & Frassy, L. (2010). In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans, Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Veterinary Parasitology*, *172*(1-2), 76-79. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.034

Sk, K., & Fj, P. (1968). Effect of chlorine on Ascaris (Nematoda) eggs. *PubMed*, *5*(4), 225-232. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4880128

Suárez Sánchez-Andrade, J. (2017). Control biológico de parasitismos gastrointestinales en caballos. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela. https://investigacion.usc.gal/documentos/5d1df67d29995204f766d939 (consultada el 04/05/2025).

Suarez, B., Rey, M., Castillo, P., Monte, E., & Llobell, A. (2004). Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidal activity. *Applied Microbiology And Biotechnology*, *65*(1). https://doi.org/10.1007/s00253-004-1610-x

Tamta, A. K., Pandey, R., Sharma, J. R., Rai, R., Barman, M., G, D. M., Mitra, D., Mohapatra, P. K. D., Sami, R., Al-Mushhin, A. A. M., Baakdah, F., Mostafa, Y. S., Alrumman, S. A., & Helal, M. (2022). First Record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) Entomopathogenic Fungus in the Mango Hopper *Amritodus atkinsoni* (Hemiptera: Cicadellidae). *Pathogens*, *11*(12), 1447. https://doi.org/10.3390/pathogens11121447

Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2015). *Veterinary parasitology*. John Wiley & Sons.

Vázquez-Pineda, Alejandro, Bravo-de-la-Parra, Alejandra, Mendoza-de-Gives, Pedro, Liébano-Hernández, Enrique, Hernández-Linares, Ismael, Yáñez-Pérez, Nandy, Aguilar-Marcelino, Liliana, Ramírez-Vargas, Gabriel, Hernández-Castro, Elías, Gutiérrez-Segura, Isidro, & López-Arellano, Ma. Eugenia. (2012). Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importancia veterinaria: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, *3*(1), 77-88.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000100006&lng=es&tlng=es

Vega, F. E. & Kaya, H. K. (2012). *Insect pathology*. Elsevier.

Viña, C., Silva, M. I., Palomero, A. M., Voinot, M., Vilá, M., Hernández, J. Á., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Cazapal-Monteiro, C. F., & Arias, M. S. (2020). The Control of Zoonotic Soil-Transmitted Helminthoses Using Saprophytic Fungi. *Pathogens*, *9*(12), 1071. https://doi.org/10.3390/pathogens9121071

Viñolo, E. (2025) Desarrollo de Mucor circinelloides en presencia de aceite de cocina usado (ACU): análisis de la actividad parasiticida [Trabajo fin de grado. Facultad de veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela]

Voinot, M., Arroyo, F., Hernández, J., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Bermúdez, R., & others. (2022). Safety of daily administration of pellets containing parasiticidal fungal spores over a long period of time in heifers. *Biocontrol Science and Technology, 32*(11), 1249–1259. https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2103663

Wharton, D. (1980). Nematode egg-shells. *Parasitology*, *81*(2), 447-463. https://doi.org/10.1017/s003118200005616x

Wharton, D., & Jenkins, T. (1978). Structure and Chemistry of the Egg-Shell of a Nematode (Trichuris Suis). *Tissue And Cell*, *10*(3), 427-440. https://doi.org/10.1016/s0040-8166(16)30338-x

Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi* (3rd ed.). Cambridge University Press.

Whitehead, B., Thamsborg, S. M., Denwood, M. J., & Nejsum, P. (2022b). Assessing the impact of Ascariasis and Trichuriasis on weight gain using a porcine model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *16*(8), e0010709. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010709

Wikandari, R., Hasniah, N., & Taherzadeh, M. J. (2022). The role of filamentous fungi in advancing the development of a sustainable circular bioeconomy. *Bioresource technology*, *345*, 126531. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126531

Xue, L., Chai, J., Guo, Y., Zhang, L., & Li, L. (2014). Further studies on *Toxascaris leonina* (Linstow, 1902) (Ascaridida: Ascarididae) from *Felis lynx* (Linnaeus) and *Panthera leo* (Linnaeus) (Carnivora: Felidae). *Acta Parasitologica*, *60*(1). https://doi.org/10.1515/ap-2015-0020

Yang, J., Tian, B., Liang, L., & Zhang, K. (2007). Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied Microbiology And Biotechnology*, *75*(1), 21-31. https://doi.org/10.1007/s00253-007-0881-4

Yousuf, P., Parvaiz, S., Razzak, S., & Zehbi, N. (2022). *Trichuris*: A critical review. *IntechOpen eBooks*. https://doi.org/10.5772/intechopen.107112

Zhai, M., Qi, F., Li, J., Jiang, C., Hou, Y., Shi, Y., Di, D., Zhang, J., & Wu, Q. (2016). Isolation of Secondary Metabolites from the Soil-Derived Fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a Biological Control Agent, and Evaluation of Antibacterial Activity. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *64*(11), 2298-2306. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00556

Zhang, L., Yang, J., Niu, Q., Zhao, X., Ye, F., Liang, L., & Zhang, K. (2008). Investigation on the infection mechanism of the fungus *Clonostachys rosea* against nematodes using the green fluorescent protein. *Applied Microbiology And Biotechnology*, *78*(6), 983-990. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1392-7

Zhu, Z., Xu, H., Zhuang, W., & Li, Y. (2017). Two new green-spored species of *Trichoderma* (Sordariomycetes, Ascomycota) and their phylogenetic positions. *MycoKeys*, *26*, 61-75. https://doi.org/10.3897/mycokeys.26.14919

Ziaee, A., Zia, M., Bayat, M., & Hashemi, J. (2016). Molecular Identification of *Mucor* and *Lichtheimia* Species in Pure Cultures of Zygomycetes. *Jundishapur Journal Of Microbiology*, *9*(4). https://doi.org/10.5812/jjm.35237

Ziliotto, M., Ellwanger, J. H., Chies, J. A. B., *et al.* (2023). Soil-transmitted helminths detected from environmental samples in a campus of southern Brazil. *One Health, 1*, 100016. https://doi.org/10.1016/j.soh.2023.100016

Zubiría, I., Abreu, I., Boso, D., Pérez, G., Cazapal, C., Sánchez-Andrade, R., Arias, M. S., Paz-Silva, A., Hernández, J. Á., & Camiña, M. (2025). Agar–agar gels carrying curative and preventive agents against helminths: An *in vitro* compatibility evaluation. *Gels, 11*(7), 542. https://doi.org/10.3390/gels11070542